



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	尿路上皮癌における抗がん剤治療がもたらす腫瘍血管の耐性獲得 [全文の要約]
Author(s)	菊地, 央
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2374 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12995号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70396
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroshi_Kikuchi_summary.pdf



学位論文（要約）

尿路上皮癌における抗がん剤治療がもたらす腫瘍血管の耐性獲得
(Chemotherapy-induced resistance in tumor endothelial cells
of urothelial carcinoma)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

菊 地 央

【緒言】

尿路上皮癌は尿路（腎盂，尿管，膀胱，尿道）に発生する癌である．発生場所として膀胱が最も多く，悪性腫瘍全体で膀胱癌の発生頻度は世界で9番目であり，泌尿器科系悪性腫瘍の中では，前立腺癌に次いで2番目に多い．進行癌に対しては集学的治療が必要であり，筋層浸潤性膀胱癌の根治療法では，一般的にシスプラチンベースの多剤併用による術前化学療法後に膀胱全摘を行う．しかし，根治療法を行った場合でも再発率は40%ほどであり，また再発症例の予後は不良である．手術不能な局所進行例や転移症例には抗癌剤による全身治療が行われ，通常はゲムシタビン/シスプラチンによる化学療法が第一選択となる．しかし，ほとんどの症例は1次化学療法に抵抗性となるため，タキサンなどを含む2次化学療法が行われるが，その治療効果は乏しい．このように薬剤耐性は尿路上皮癌の予後不良の大きな要因となっており，その克服は治療上重要な課題のひとつである．

一般的に抗癌剤への耐性獲得要因として，腫瘍細胞による耐性獲得や癌幹細胞の存在があげられる．薬剤耐性獲得の分子メカニズムとして，薬剤排出トランスポーターの発現亢進などといった，腫瘍細胞の形質変化が知られている．一方で，近年では間質が癌の悪性化，抗癌剤耐性に関わることが報告されている．腫瘍血管の内腔を裏打ちする腫瘍血管内皮細胞も癌間質細胞のひとつである．我々の研究室では，血管内皮細胞が遺伝学的に安定で均一な細胞集団であるというこれまでの概念に反して染色体異常や幹細胞性があることを報告してきた．また腫瘍血管内皮細胞は，薬剤トランスポーターのMDR1/ABCB1発現が高く，その排出基質であるパクリタキセルなどの抗癌剤に対して耐性を示すことを見出した．さらに，マウスメラノーマ移植腫瘍においてABCB1阻害剤併用によって，パクリタキセルによる血管新生阻害効果と抗腫瘍効果が増強されることを報告した．これらの結果より，抗癌剤耐性克服のためには腫瘍細胞のみならず腫瘍血管内皮細胞も含めて，耐性獲得の分子機構を明らかにすることが必要であると考えた．

これまで尿路上皮癌の研究で，腫瘍血管内皮細胞の薬剤トランスポーター発現を詳細に解析している報告はなく，尿路上皮癌の抗癌剤耐性に腫瘍血管内皮細胞のABCB1発現が寄与しているかは不明である．そこで本研究では，尿路上皮癌腫瘍血管内皮細胞におけるABCB1発現の有無を明らかにすることを目的に，尿路上皮癌臨床検体を用いて解析した．さらに，抗癌剤治療による癌微小環境の変化が腫瘍血管内皮細胞のABCB1発現にもたらす影響の有無について検討した．具体的には，抗癌剤治療前後の臨床検体を用いて，腫瘍血管におけるABCB1発現の変化を解析した．また，腫瘍血管内皮細胞におけるABCB1発現変化のメカニズムを明らかにするため，腫瘍細胞と血管内皮細胞との相互作用に着目して，膀胱癌細胞と血管内皮細胞を用いた *in vitro* 解析ならびに膀胱癌担癌マウスモデルを用いて *in vivo* 解析を行った

【実験方法】

北海道大学病院および関連施設において1次化学療法が施行された66例の尿路上皮癌を対象とし，化学療法前後の手術摘出組織標本を用いて免疫染色を行った．ABCB1陽性血管の割合により腫瘍血管ABCB1発現を評価し，Kaplan-Meier法により全生存率との関連を解析した．腫瘍細胞におけるABCB1，IL-8発現は腫瘍組織内における染色強度とその染色

強度の占有率により算定した．続いて抗癌剤による腫瘍微小環境の変化が血管内皮に与える影響を *in vitro*, *in vivo* 実験にて解析した．*In vitro* においてゲムシタビン，シスプラチン処理がヒト血管内皮細胞（HMVEC）の MDR1 mRNA 発現レベルに与える影響，および抗癌剤処理によりヒト膀胱癌細胞（UMUC3）から分泌されるサイトカインが HMVEC の MDR1 mRNA 発現レベルに与える影響を qRT-PCR で評価した．*In vivo* においては，膀胱癌 UMUC3 担癌マウスに抗癌剤を投与し，腫瘍組織，腫瘍血管内皮細胞の変化を qRT-PCR，免疫染色，ELISA で評価した．*In vivo* における ABCB1 阻害実験は，Luc2 遺伝子発現 UMUC3 をマウスに皮下移植し，パクリタキセルと ABCB1 阻害剤ベラパミルの併用治療を行った．抗腫瘍効果を腫瘍体積により評価し，血管新生阻害効果を血管におけるアポトーシスとして Cleaved Caspase 3 免疫染色により評価した．IVIS を用いた *in vivo* イメージング解析および，肺組織における Luc2 遺伝子の発現解析により肺転移を評価した．

【実験結果】

1 次化学療法前・後の腫瘍細胞における ABCB1 発現は，化学療法前後で増加する症例，減少した症例など様々であり，全症例における定量解析の結果，1 次化学療法前後で腫瘍細胞の ABCB1 発現レベルに有意な差は認められなかった．一方で，腫瘍血管における ABCB1 陽性率はそれぞれ 0.00-16.27%（中央値 0.38%），0.00-58.84%（中央値 2.47%）であり，化学療法後に ABCB1 陽性血管の割合が有意に増加した（ $p < 0.0001$ ）．*In vitro* においてゲムシタビンにより HMVEC の MDR1 mRNA 発現レベルが上昇し，NF- κ B 阻害剤によりその上昇がキャンセルされた．ゲムシタビン，シスプラチン処理をした UMUC3 細胞の培養上清を HMVEC に処理すると，HMVEC の MDR1 mRNA 発現が亢進した．ゲムシタビン，シスプラチンにより UMUC3 細胞において発現が亢進する炎症性サイトカインとして，PCR array により IL-8 が選出された．IL-8 処理により HMVEC の MDR1 mRNA 発現が亢進し，抗癌剤処理後の UMUC3 培養上清に IL-8 中和抗体を添加することで HMVEC の MDR1 mRNA 発現レベルが低下した．*In vivo* においても同様にゲムシタビン，シスプラチンにより UMUC3 腫瘍組織の IL-8 発現レベルが上昇し，血中の IL-8 レベルも上昇した．また，抗癌剤投与により UMUC3 腫瘍内の腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 発現レベルが上昇した．一方で，IL-8 ノックダウン UMUC3 腫瘍ではコントロール腫瘍に比べ，抗癌剤処理後の腫瘍血管内皮細胞 ABCB1 発現は低下した．11 例の尿路上皮癌臨床検体を用いて免疫染色により IL-8 発現を解析し，腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 陽性率との関連を検証したところ，化学療法後の腫瘍血管 ABCB1 高発現群は 1 次化学療法前から IL-8 発現が高く，さらに化学療法後に IL-8 発現が上昇する症例が多かった．さらに，全 66 症例で腫瘍血管 ABCB1 陽性率と全生存率の関係を解析すると，化学療法後の腫瘍血管 ABCB1 高発現群は，低発現群と比較して全生存期間が有意に短かった（ $p = 0.0168$ ）．最後に，2 次治療における ABCB1 阻害剤併用の有用性を検討するため，膀胱癌担癌マウスに 1 次治療としてゲムシタビン/シスプラチン投与後，2 次治療としてパクリタキセルと ABCB1 阻害剤ベラパミルを併用投与した．併用群において腫瘍増大率の減少，腫瘍血管内皮細胞のアポトーシスの増加がもたらされた．さらに，ABCB1 阻害剤併用により肺組織におけるルシフェラーゼ活性の減少，ならびに肺組織の Luc2 遺伝子の発現レベルの低下傾向が認められた．

【考察】

本研究では抗癌剤治療により尿路上皮癌内の ABCB1 陽性腫瘍血管内皮細胞が増加することが示された。これまで、腫瘍血管内皮細胞には様々な異常性があることが明らかになってきており、その一つに幹細胞性を有していることが報告されている。癌幹細胞と同様に、腫瘍血管内皮細胞は薬剤トランスポーターを高く発現し、抗癌剤に対しても耐性である。さらにそうした幹細胞性をもつ血管内皮細胞は、血管新生能が高いことも報告されている。これらのことより、幹細胞性を有する腫瘍血管内皮細胞は薬剤耐性をもつがゆえ、抗癌剤治療後にも残存することが可能で、癌の進展に貢献していると考えられる。したがって、ABCB1 陽性血管の増加も、抗癌剤治療後の癌の再発、治療抵抗性のメカニズムのひとつではないかと考えられた。

また、腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 発現が亢進するメカニズムとして、ゲムシタビンとシスプラチン投与による腫瘍細胞からの IL-8 分泌増加が関与していた。IL-8 は好中球遊走を動員する炎症メディエーターであり、自然免疫において重要なサイトカインである。さまざまな癌において腫瘍細胞の IL-8 高発現が予後不良因子であることが知られており、IL-8 が癌関連線維芽細胞の CCL2, CXCL12 分泌を促進し、それらが腫瘍の悪性化誘導に関与するという報告もある。今回の我々の研究においても、1 次化学療法後に ABCB1 陽性血管が増加している症例は予後不良であったが、IL-8 などがもたらす腫瘍微小環境の炎症性変化も関与しているのではないかと考えられる。

進行性尿路上皮癌の全身治療において、ゲムシタビン/シスプラチン療法抵抗性の症例に対する 2 次治療として、標準的治療法は確立されていない。腎癌などとは異なり血管新生阻害剤が使われることはなく、腫瘍血管をターゲットにした治療についてはこれまでほとんど検討されていなかった。しかし、今回の知見から、尿路上皮癌においても腫瘍血管の異常性獲得を防ぐ、もしくは異常な腫瘍血管を標的とすることは重要な治療戦略になり得ることが示された。近年、シスプラチンベースの化学療法後の進行性尿路上皮癌に対し、ドセタキセルと抗 VEGFR2 抗体の併用療法で予後延長が得られた大規模臨床試験が行われており、腫瘍血管を念頭にいた治療は今後ますます重要視されていくものと考えられる。今回の研究結果から、IL-8 阻害剤の併用が腫瘍血管内皮の ABCB1 発現亢進といった異常性獲得を抑える一つの戦略になりうるのではないかと考えられた。一方で、我々は腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 発現亢進のメカニズムに VEGF が関与していることをすでに報告している。すなわち、腫瘍微小環境内の複数の要因が複雑に絡み合っただけでなく、腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 発現を誘導していると考えられ、IL-8 抑制のみでは不十分であることが予想される。また、我々が用いたベラパミル以外にも、近年では腫瘍血管の ABCB1 をチロシンキナーゼ阻害剤で抑制することで抗癌剤の抗腫瘍効果が増強したことも報告されており、腫瘍血管の ABCB1 標的化のための手段は複数存在するものと考えられる。いずれにせよ、癌の薬剤耐性克服のためには腫瘍血管の異常性も視野にいた戦略が必要と考えられる。そのうちのひとつとして、腫瘍血管 ABCB1 標的化は、臨床における尿路上皮癌治療の問題点である耐性を克服する一つの方法になりうることを示唆された。

【結論】

抗癌剤治療による尿路上皮癌腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 発現亢進が抗癌剤耐性に寄与している可能性が示唆された．腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 を標的とした治療は従来の抗癌剤治療の効果を高め，アトラクティブな治療戦略となる可能性があると考えられた．