



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
Author(s)	菊地, 央
Description	配架番号 : 2374
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12995号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12995
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88956
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroshi_Kikuchi.pdf



学 位 論 文

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

学 位 論 文

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

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	4 頁
略語表	7 頁
実験方法	8 頁
実験結果	1 5 頁
考察	3 5 頁
総括および結論	3 8 頁
謝辞	4 0 頁
引用文献	4 1 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の結果の一部は以下の論文に投稿中である

Hiroshi Kikuchi, Nako Maishi, Randa Ibrahim Hassan Dawood, Alam Mohammad Towfik, Ryo Takeda, Keita Ishizuka, Ryuji Matsumoto, Tomoshige Akino, Kunihiro Tsuchiya, Takashige Abe, Takahiro Osawa, Naoto Miyajima, Satoru Maruyama, Toru Harabayashi, Manabu Azuma, Katsushige Yamashiro, Kaname Ameda, Akira Kashiwagi, Yoshihiro Matsuno, Yasuhiro Hida, Nobuo Shinohara, Kyoko Hida.

Chemotherapy-induced resistance in tumor endothelial cells of urothelial carcinoma

The Journal of Clinical Investigation

本研究の一部は以下の学会に発表した

1. 菊地 央, 間石奈湖, 秋山廣輔, 樋田京子: 抗癌剤治療前後の尿路上皮癌における腫瘍血管内皮の P-glycoprotein 発現変化, 第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2016. 7. 21 (米子)
2. 菊地 央, 間石奈湖, 土屋邦彦, 丸山 寛, 安部崇重, 樋田泰浩, 原林 透, 松野吉宏, 篠原信雄, 樋田京子: 抗癌剤治療前後の尿路上皮癌における腫瘍血管内皮の P-glycoprotein 発現変化, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016. 10. 7 (横浜)
3. 菊地 央, 間石奈湖, 秋山廣輔, 森本真弘, 柳谷美沙, 宮島直人, 土屋邦彦, 丸山 寛, 安部崇重, 樋田泰浩, 原林 透, 飴田 要, 松本隆児, 柏木 明, 出村孝義, 津田真寿美, 田中伸哉, 松野吉宏, 篠原信雄, 樋田京子: 抗癌剤治療前後の尿路上皮癌における腫瘍血管内皮の P-glycoprotein 発現変化, 第 49 回北海道病理談話会, 2016. 10. 15 (札幌)
4. 菊地 央, 間石奈湖, 土屋邦彦, 丸山 寛, 安部崇重, 樋田泰浩, 原林 透, 松野吉宏, 篠原信雄, 樋田京子: 抗癌剤治療前後の尿路上皮癌における腫瘍血管内皮の P-glycoprotein 発現変化, 第 7 回 IGM 研究交流会, 2016. 10. 18 (札幌)

5. Kikuchi H., Maishi N., Akiyama K., Morimoto M., Yanagiya M., Miyajima N., Tuchiya K., Maruyama S., Abe T., Hida Y., Harabayashi T., Ameda K., Matsumoto R., Kashiwagi A., Demura T., Tsuda M., Tanaka S., Matsuno Y., Shinohara N., Hida K. : P-glycoprotein expression dynamics in tumor blood vessels of urothelial carcinoma during chemotherapy, ” has been accepted for presentation at Vascular Biology, The 19th International Vascular Biology Meeting, 2016. 11. 2, Boston, Massachusetts, USA
6. 菊地 央, 間石奈湖, 秋山廣輔, 森本真弘, 柳谷美沙, 土屋邦彦, 安部崇重, 樋田泰浩, 原林 透, 飴田 要, 柏木 明, 田中伸哉, 松野吉宏, 篠原信雄, 樋田京子 : P-glycoprotein expression dynamics in tumor blood vessels of urothelial carcinoma during chemotherapy, 第24回日本血管生物医学会学術集会, 2016. 12. 10
7. 菊地 央, 間石 奈湖, 秋山 廣輔, 森本 真弘, 柳谷 美沙, 宮島 直人, 土屋 邦彦, 丸山 覚, 安部 崇重, 樋田 泰浩, 原林 透, 飴田 要, 松本 隆児, 柏木 明, 出村 孝義, 津田 真寿美, 田中 伸哉, 松野 吉宏, 篠原 信雄, 樋田 京子 : 尿路上皮癌における抗癌剤治療後の腫瘍血管 ABCB1 発現亢進, 第26回 泌尿器科分子・細胞研究会, 2017. 3. 11 (大分)
8. Kikuchi H., Maishi N., Akiyama K., Morimoto M., Yanagiya M., Miyajima N., Tsuchiya K., Maruyama S., Abe T., Hida Y., Harabayashi T., Ameda K., Matsumoto R., Kashiwagi A., Matsuno Y., Shinohara N., Hida K. : Analysis of multidrug resistant transporter expression in tumor blood vessels of urothelial carcinoma during chemotherapy, 2017 ASCO Annual Meeting, 2017. 6. 2-6, Chicago, Illinois (誌上発表)
9. 菊地 央, 間石奈湖, 秋山廣輔, Randa Ibrahim Hassan Dawood, 土屋邦彦, 丸山 覚, 安部崇重, 樋田泰浩, 原林 透, 飴田 要, 柏木 明, 松野吉宏, 篠原信雄, 樋田京子 : Analysis of multidrug resistant transporter expression in tumor blood vessels of urothelial carcinoma during chemotherapy, 第5回がん代謝研究会, 2017. 7. 14 (札幌)

10. 菊地 央, 間石奈湖, 秋山廣輔, 森本真弘, 土屋邦彦, 丸山 寛, 安部崇重, 樋田 泰浩, 原林 透, 飴田 要, 松本隆児, 柏木 明, 松野吉宏, 篠原信雄, 樋田京子: 尿路上皮癌における抗癌剤治療後の腫瘍血管 ABCB1 発現亢進, 第 26 回 日本がん転移学会学術集会, 2017. 7. 28 (大阪)

緒言

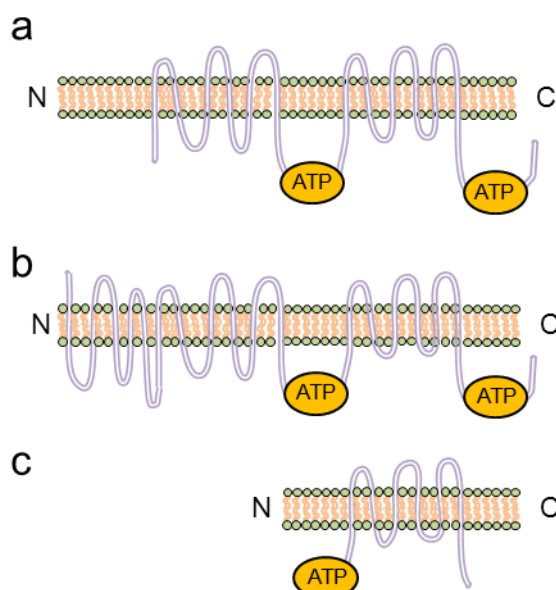
尿路（腎盂，尿管，膀胱，尿道）に発生する悪性腫瘍は組織学的タイプにより，尿路上皮癌，扁平上皮癌，腺癌などに分けられ，そのうち尿路上皮癌が90%以上を占めている¹．発生場所として膀胱が最も多く，悪性腫瘍全体で膀胱癌の発生頻度は世界で9番目となっており^{2,3}，泌尿器科系悪性腫瘍の中では，前立腺癌に次いで2番目に多い¹．世界で新規に年間約429,000件の膀胱癌が生じ，死亡数は年間約165,000件である⁴．日本では2013年の1年間の推定罹患数は19,000件，死亡数は約7,700件となっている⁵．低悪性度の表在性膀胱癌と筋層浸潤膀胱癌で治療方針，予後が大きく異なっており，それぞれの遺伝学的背景が異なることがわかってきている．低悪性度の表在性膀胱癌ではfibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)の変異や9p, 9q領域の染色体欠失などが高確率で生じている⁶⁻¹⁰．一方，高悪性度の浸潤癌ではTP53, RB-1などの変異が報告されており，近年ではAPOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) によるゲノム変異が高率に生じていることが報告されている^{11,12}．表在性である場合には内視鏡手術による腫瘍摘出術が行われるが，進行性の筋層浸潤性膀胱癌に対する根治治療は，シスプラチンベースの多剤併用による術前化学療法後の膀胱全摘が一般的である¹³⁻¹⁵．しかし，根治術を行った場合でも再発率は40%ほどで^{16,17}，再発症例の予後は不良である．一方，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^{18,19}．しかし，ほとんどの症例が1次化学療法に耐性となり，タキサンなどを含む2次化学療法が行われるが，全生存期間の中央値が8ヶ月ほどと短く，治療成績は悪い^{20,21}．また，VEGF 阻害剤，EGFR 阻害剤や免疫チェックポイント阻害剤といった分子標的薬の治験が行われており，従来の抗癌剤治療と比較して予後延長効果が得られたレジメンはあるが，寛解に至るケースは稀である^{22,23}．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機構として，腫瘍細胞による耐性獲得^{24,25}や癌幹細胞の存在があげられる^{26,27}．膀胱癌においても癌幹細胞は薬剤耐性の要因となり，そのマーカーとしてaldehyde dehydrogenase 1 family member A1 (ALDH1A1)，cytokeratin 14 (CK14)，and CD44v6, SOX2などが報告されている²⁸⁻³¹．薬剤耐性獲得の分子メカニズムとしては，薬剤排出トランスポーターの発現亢進により細胞外に細胞毒性のある薬剤を排出することやDNA修復機能の活性化，アポトーシス抵抗性の獲得^{32,33}など腫瘍細胞の形質変化が知られている．ヒトにおいて，薬剤排出トランスポーターとしてABCトランスポーターが知られており，ATP結合ドメインをもつスーパーファミリーである（図1）^{34,35}．ATP結合領域のアミノ酸配列の相同性からAか

ら G までの 7 つのサブグループに分けられる (表 1)^{36,37}. 一方で, 近年, 癌間質の薬剤耐性や癌悪性化への関与が報告されている³⁸⁻⁴¹. 癌微小環境において, 腫瘍の増殖, 浸潤, 転移播種といった進行に伴い腫瘍細胞および間質細胞内のシグナル伝達は両者の相互作用により変化する^{40,42}. 癌関連線維芽細胞から分泌される fibroblast growth factor (FGF) ファミリー, insulin-like growth factor (IGF) ファミリー, hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor- β (TGF- β) ファミリーなどの増殖因子, サイトカイン⁴³⁻⁴⁶や骨髓由来免疫抑制性細胞の動員⁴⁷⁻⁴⁹がその一端を担っている. 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り, 近年では様々な異常性, 多様性⁵⁰⁻⁵²をもつことが報告されている. さらに最近, 腫瘍血管内皮細胞が癌の悪性化や転移促進に寄与していることも報告されるようになってきた⁵³⁻⁵⁵. 我々の研究室では, 癌間質の概念に反して腫瘍血管内皮細胞に染色体異常があることを見出した^{56,57}. また我々を含む複数のグループは, 腫瘍血管における幹細胞様の内皮細胞集団の存在を報告している^{58,59,51,60}. 我々はマウスメラノーマモデルにおける腫瘍血管内皮細胞が薬剤トランスポーター ABCB1 の高い発現と, その排出基質であるパクリタキセルなどの抗癌剤に対する耐性を有すること, さらに血管内皮細胞の ABCB1 の発現は腫瘍細胞由来の過剰な VEGF によって誘導されることを見出している⁶¹. 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⁶². 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 での解析を行った.

Structure



Examples

ABCB1
ABCC4
ABCC5
ABCB11

ABCC1
ABCC2
ABCC3
ABCC6

ABCG2

図 1) 薬剤耐性に寄与することが報告されている ABC トランスポーターの分子構造³⁴
a. ABCB1 (MDR1), ABCC4 などの ABC トランスポーター. 12 の膜貫通ドメインと 2 つの ATP 結合領域をもつ. b. ABCC1, ABCC2 などの ABC トランスポーター. 17 の膜貫通ドメインと 2 つの ATP 結合領域をもつ. c. ABCG2 は 6 の膜貫通ドメインと 1 つの ATP 結合領域をもつ. ホモダイマーまたはヘテロダイマー化して機能する.

表 1. ヒト ABC トランスポーターファミリー

Subtype	A	B	C	D	E	F	G
	ABCA1	ABCB1 (MDR1)	ABCC1 (MRP1)	ABCD1 (ALDP)	ABCE1	ABCF1	ABCG1
	ABCA2	ABCB2 (TAP1)	ABCC2 (MRP2)	ABCD2		ABCF2	ABCG2
	ABCA3	ABCB3 (TAP2)	ABCC3	ABCD3 (PMP70)		ABCF3	ABCG4
	ABCA4	ABCB4 (MDR2)	ABCC4	ABCD4			ABCG5
	ABCA5	ABCB5	ABCC5				ABCG8
	ABCA6	ABCB6	ABCC6				
	ABCA7	ABCB7	ABCC7 (CFTR)				
	ABCA8	ABCB8	ABCC8 (SUR1)				
	ABCA9	ABCB9	ABCC9 (SUR2)				
	ABCA10	ABCB10	ABCC10				
	ABCA12	ABCB11 (BSEP)	ABCC11				
	ABCA13		ABCC12				
			ABCC13				

略語表

本文中および図中に使用した略語は以下の通りである.

ABC	ATP-binding cassette
ACTB	actin beta
BSA	bovine serum albumin
CDDP	cisplatin
DAPI	4, 6-diamidino-2-phenylindole
DAMPs	damage-associated molecular patterns
FACS	fluorescence activated cell sorter
GEM	gemcitabine
HE	Hematoxylin and eosin
HMVEC	human dermal microvascular endothelial cell
IVIS	<i>in vivo</i> imaging system
MVD	microvessel density
PBS	phosphate buffered saline
PTX	paclitaxel
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
Scr	scramble
TBS	Tris buffered saline
TEC	tumor endothelial cell

実験方法

細胞と培養条件

HMVEC (ヒト皮膚毛細血管内皮細胞) は Lonza (Tokyo, Japan) より入手し, EGM-2 MV (Lonza) で継代培養した. MS1 (マウス臍臓ランゲルハンス島由来血管内皮細胞) は American Type Culture Collection (Manassas, VA) より入手した. UMUC3 (ヒト膀胱癌由来細胞株), tdTomato-Luc2 遺伝子導入 UMUC3 は北海道大学大学院医学研究院病理学講座腫瘍病理学分野のご厚意により提供された. それぞれ 10% 牛胎仔血清 (FBS (fetal bovine serum); Sigma) 添加 Dulbecco 改変 Minimum Essential Medium (DMEM; Sigma) で継代培養した. ゲムシタビン, シスプラチン耐性 UMUC3 は DMEM にそれぞれの抗癌剤を添加し, 抗癌剤の濃度を段階的に増加しながら継代培養することで作製した. ゲムシタビン 25 nM またはシスプラチン 3 μ M で増殖する細胞を耐性株とした. 細胞は 37°C, 5%CO₂-95%気相下において培養した. Mycoplasma 感染が無いことを PCR (Takara PCR Mycoplasma Detection Set, Japan) で確認した.

抗体と試薬

種々の実験に以下の抗体, 試薬を使用した. ゲムシタビン (Wako, 077-05671 or Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd, G0367, Japan), シスプラチン (Wako, 033-30091, Japan), パクリタキセル (Pfizer, USA), NF- κ B 阻害剤, BAY11-7082 (Calbiochem, USA), verapamil hydrochloride (Vasoran®, Eisai Co. Ltd. , Japan), anti-mouse CD31 microbeads (Miltenyi Biotec, 130-097-418, Germany), mouse anti-human ABCB1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, sc-13131, USA), mouse anti-human CD31 antibody (Leica Biosystems, NCL-CD31, Germany), mouse anti-human IL-8 antibody (R&D, MAB208, USA), rabbit anti-human IL-8 antibody (Abcam, ab7747, UK), rabbit anti-mouse/human ABCB1 antibody (LifeSpan Biosciences Inc. , LS-B1448, USA), rabbit anti-mouse CD31 antibody (Abcam, ab28364, UK), Alexa Fluor 647 rat anti-mouse CD31 antibody (BioLegend, 102515, USA), Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies, A-11037), Rabbit anti-Cleaved Caspase-3 antibody (Cell Signaling Technology, #9664, USA), HRP conjugated goat-anti-rabbit IgG (DAKO, P0448, USA), alkaline phosphatase conjugated goat-anti-rabbit IgG (DAKO, D0487, USA), anti- β -actin antibody (Cell Signaling Thecnology, #4970, USA), anti-phospho-NF κ B p65 antibody (Ser536) (Cell Signaling Technology, #3033, USA), anti-NF κ B p65 antibody (Cell Signaling Technology, #8242, USA), HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology, #7074, USA),

recombinant human IL-8 protein (R & D Systems, 208-IL, USA), マイヤーヘマトキシリン溶液 (Wako, Japan), 1%エオシンY溶液 (Wako, Japan).

免疫組織染色および解析方法

ヒトにおいては医師主導自主臨床研究(「抗癌剤治療前後の尿路上皮癌における腫瘍血管内皮のP-glycoprotein 発現変化に関する研究」, 自 015-0228, 平成 27 年 10 月 29 日承認)のプロトコールに従い, 同意書を事前に取得した患者の手術標本を用いた. ヒト尿路上皮癌ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより切片を薄切し, CD31, ABCB1 および IL-8 染色を Morphotechnology 株式会社 (Sapporo, Japan) にて施行した. HE 染色は切片を脱パラフィン, 脱水処理後, マイヤーヘマトキシリン溶液にて 2 分染色して水洗し, 1%エオシン Y 溶液にて 10 分染色を行った. その後, 脱水, 透徹を行い封入処理をした. NanoZoomer (Hamamatsu Photonics, Japan) を使用して染色標本の画像をスキャンし, デジタルデータに変換して解析に用いた. 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 (negative, weak, moderate, strong) とその染色強度の占有率を計算し, H score 法 ($H\ score = 1 \times \text{weak area} + 2 \times \text{moderate area} + 3 \times \text{strong area}$) により算定した. 腫瘍血管内皮の ABCB1 発現は, 連続切片で CD31 染色, ABCB1 染色を行って評価した. 具体的には, 低倍率視野 (x100) にて CD31 で染色される血管密度が高い領域をランダムに 5 ヶ所選択し, 各視野において, 全体の血管数における ABCB1 陽性血管の割合をカウントし, その 5 ヶ所の平均を ABCB1 陽性率とした.

マウスにおける検討では, 動物の愛護および管理に関する法律, ならびに実験動物の飼育及び保管等に関する基準に従い, 研究は国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程に基づいて行った. UMUC3 皮下移植腫瘍組織を摘出後, Tissue-TEK cryocompound (Miles, Elkhart, IN) に包埋し, 液体窒素で凍結させた. 厚さ $8\ \mu\text{m}$ の切片を薄切し, 血管における ABCB1 発現または cleaved caspase 3 発現を抗 CD31 抗体と抗 ABCB1 抗体または抗 cleaved caspase 3 抗体による蛍光二重免疫染色により解析した. ABCB1 染色についてはアセトン, cleaved caspase 3 染色については 4% paraformaldehyde で 10 分間固定した. 2%ヤギ血清, 5%ウシ血清由来アルブミン (Bovine serum albumin; Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) / PBS で 60 分ブロッキング処理をした. ABCB1 発現解析については, 一次抗体として抗 ABCB1 抗体を用い 4°C 下で 24 時間反応させた. 次に Alexa Fluor 647-rat 抗マウス CD31 抗体を用い, 室温で 2 時間反応させた. その後, 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Roche, Indianapolis, IN) により核染色した. cleaved caspase 3 発現解析については, 一次抗体として抗 cleaved caspase 3 抗体と抗 CD31 抗体を用い 4°C 下で 24 時間

反応させた。次に、Alexa Fluor 647 または Alexa Fluor 488 がコンジュゲートされた二次抗体を室温で 2 時間反応させた。その後、同様に核染色をした。FV1000 confocal microscope (Olympus) により蛍光イメージを撮影した。血管における ABCB1 発現は、高倍率 (x600) 視野内で、CD31 と共局在する ABCB1 陽性血管内皮細胞数をカウントし、割合を算出した。cleaved caspase 3 発現は、低倍率 (x100) にて観察した視野内で、NIH Image J software (Bethesda, MD) を用いて CD31 陽性範囲を計算し、その中で CD31 と cleaved caspase 3 が共局在する範囲の割合を計算した。微小血管密度 (Microvessel density: MVD) は、全視野の面積における CD31 陽性面積の割合として計算した。各群 40-50 視野をランダムに選択して解析した。腫瘍組織における IL-8 発現は抗 IL-8 抗体を用いて解析した。アセトンで 10 分間固定後に、上記と同様にブロッキングを行い、抗 IL-8 抗体を用い 4°C 下で 24 時間反応させた。alkaline phosphatase をコンジュゲートされた二次抗体を室温で 1 時間反応させ、Vulcan Fast Red Chromogen Kit2 (Biocare Medical, BRR805AS) で発色した。NanoZoomer を用いて染色標本をスキャンし、デジタルデータに変換して解析に用いた。各腫瘍において低倍率 (x100) で 5 視野ずつ選定し、全体の面積における IL-8 陽性面積の割合を NIH Image J software を用いて算出した。5 視野の平均をその腫瘍の IL-8 発現とした。

非接触共培養アッセイ

径 6.5mm (孔 0.4 μ m) のトランスウェル (Corning Costar, 3413) に 1×10^4 の UMUC3 を播種し、10%FBS DMEM で 12 時間培養後、25nM ゲムシタビンと 3 μ M シスプラチンを含む 10%FBS DMEM に培地を交換し、24 時間培養した。10%FBS DMEM で複数回培地を入れかえて抗癌剤を除去後、トランスウェルを 2×10^4 の HMVEC を播種している 24 well-plate に挿入した。EGM-2MV で 48 時間培養後に、HMVEC の RNA を抽出し遺伝子発現解析を行った。

腫瘍細胞培養上清処理および IL-8 抑制アッセイ

6 well plate 上に UMUC3 を播種し、70-80%の細胞密度まで培養後、培地を 3 μ M のシスプラチンまたは 25nM のゲムシタビンを含む 10%FBS DMEM に入れかえ、24 時間培養した。培地を複数回交換して抗癌剤を除去後、10%FBS DMEM でさらに 24 時間培養した。その培養上清を回収し、0.22- μ m filter (Merck Millipore Ltd., SLGS033SS) を通過させ細胞成分を除去した。その腫瘍細胞培養上清に等量の EGM-2MV を加えて HMVEC に処理し、48 時間培養後に RNA を回収した。コントロールとして、腫瘍細胞がない状態で同様にインキュベーションした 10%FBS DMEM を用いた。また、

IL-8 抑制アッセイは、IL-8 中和抗体を 0.5ug/ml の濃度で腫瘍細胞培養上清に添加して行った。

PCR array

3 μ M のシスプラチンまたは 25nM のゲムシタビンを含む 10%FBS DMEM で 24 時間培養した UMC3 およびコントロールの UMC3 から回収した 0.5 μ g の RNA を用いて、種々のサイトカイン mRNA 発現を PCR アレイキット (Qiagen, RT² ProfilerTM PCR Array Human Cytokines & Chemokines PAHS-150Z) で解析した。

IL-8 処理アッセイ

MS1 を 25ng/ml のリコンビナント IL-8 を含む培地で 36 時間培養後、RNA を抽出して、quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 法にて MDR1 mRNA 発現を解析した。HMVEC を 12.5ng/ml のリコンビナント IL-8 を含む培地で 48 時間培養後、同様に MDR1 mRNA 発現を解析した。HMVEC を 12.5ng/ml のリコンビナント IL-8 を含む培地で培養し、1, 2, 4 時間後にタンパクを回収して NF- κ B, pNF- κ B の発現レベルを解析した。

抗癌剤処理アッセイ

HMVEC を 12.5nM のゲムシタビンまたは 3 μ M のシスプラチンを含む培地で培養し、24 時間後に MDR1 mRNA 発現を解析した。HMVEC を 12.5nM のゲムシタビンまたは 3 μ M のシスプラチンを含む培地で培養し、1, 2, 4 時間後にタンパクを回収し NF- κ B, pNF- κ B レベルを解析した。

抗癌剤処理における NF- κ B 抑制アッセイ

1. 25 μ M の NF- κ B 阻害剤を含む培地で HMVEC を 30 分間前処理した後、12.5nM ゲムシタビンと 1.25 μ M NF- κ B 阻害剤を含む培地で 24 時間培養し、MDR1 mRNA 発現を解析した。

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

細胞から ReliaPrepTM RNA Cell Miniprep System (Promega, Z6012) を用いて total RNA を抽出した。マウス腫瘍組織および肺組織から RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。0.5–5 μ g の RNA から ReverTra Ace, RT Buffer (ToYoBo, Osaka, Japan), Oligo dT primer, Random primer (Hokkaido System Science, Sapporo, Japan), dNTP mixture (Takara, Shiga, Japan) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。使用したプライマーの配列を以下に示す。

mouse actb Forward: 5' - TTTGCACATGCCGGAGCCGTTG -3'
 mouse actb Reverse: 5' - TTTGCAGCTCCTTCGTTGCCGG -3'
 mouse cxcl15 (il-8) Forward: 5' - CTTGGAGCCAAGGCAAGAACAC -3'
 mouse cxcl15 (il-8) Reverse: 5' - AAATGGAGAGGCATCCGTTCA -3'
 mouse cxcl12 Forward: 5' -TGGCGCTTTGTAACTCGCTCCTC-3'
 mouse cxcl12 Reverse: 5' -ACCAGGGCAGGAAAGCCTAAGCA-3'
 mouse mdr1 Forward: 5' - ATCCGGGAGCAGAAGTTTGA -3'
 mouse mdr1 Reverse: 5' - GCACCAAAGACAACAGCAGA -3'
 human Actb Forward: 5' - TTACAGGAAGTCCCTTGCCATCC—3'
 human Actb Reverse: 5' - AAGCAATGCTATCACCTCCCCTG -3'
 human Il-8 Forward: 5' - CCGGAAGGAACCATCTCACTGT -3'
 human Il-8 Reverse: 5' - TTGGGGTGGAAGGTTTGGAGT -3'
 human Mdr1 Forward: 5' - TGATTGCATTTGGAGGACAA -3'
 human Mdr1 Reverse: 5' - ACCAGAAGGCCAGAGCATAA -3'
 Luc2 Forward : 5' - GAATAGCTTGCAGTTCTTCATGC -3'
 Luc2 Reverse : 5' - GATCTTTTGTATGATCGGTAGCTTC -3'

qRT-PCRは、KAPA SYBR FAST qPCR Kit (KAPA Biosystems)を用いて、イニシャル
 インキュベーション (95°C 300秒), 熱変性 (95°C 1秒), アニーリング (60°C 5
 秒), 伸長反応 (60°C) で40サイクル行い, CFX Manager (Bio-Rad, Richmond, CA)
 で増幅産物を定量した. 内部標準には β -Actinを用い, $\Delta\Delta$ Ct法をもとに相対比を比
 較検討した.

ウェスタンブロッティング

細胞をPBSで2回洗浄した後, RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH = 7.4), 150
 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM
 Na_3VO_4]を添加し, 氷上で10分間静置し, 可溶化した. ライセートを回収して10分
 間の遠心後の上清を細胞抽出液として採取した. 細胞抽出液をBCA protein assay
 kit (Pierce, Rockford, IL)を用いて定量した. 20–25 μg のタンパクをSDS-
 polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)で展開後, Immobilon-P
 membranes (Millipore, Bradford, MA)に転写した. PVDF膜を5%スキムミルク含有
 TBST (0.1% Tween20を含んだTris-buffered saline (TBS))でブロッキングした後,
 一次抗体を4°Cで16時間反応させた. 二次抗体としてAnti-rabbit IgG HRP-
 linked Antibody (Cell Signaling Technology)を室温で2時間反応させ, Western

Lightning (PerkinElmer, Waltham, MA) を用いて LAS-4000 mini image analyzer (FUJIFILM, Tokyo, Japan) により検出した。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

血清中の IL-8 タンパク濃度を Quantikine ELISA kits (R&D Systems, #D8000C) を用いて解析した。

IL-8 の発現抑制

UMUC3 の IL-8 発現を抑制するために、レンチウイルス GFP vector (ORIGENE, #TG319476) を用いて IL-8 shRNA (5' -GATGCCAGTGAACTTCAAGCAAATCTAC-3') ベクターをトランスフェクションした。non-targeting control shRNA (ORIGENE, #TR30021) をコントロールとして用いた。トランスフェクション方法は下記の通り行った。パッケージング vector pCAG-HIVgp, VSV-G-, REV-expressing construct pCMV-VSV-G-RSV-REV (from H. Miyoshi) を用いて前述の発現ベクターを FuGene HD Transfection Reagent (Promega) により HEK293T 細胞に導入した。12 時間後に培地交換し、さらに 48 時間培養後に培養上清を回収した。0.45 μ m フィルターでフィルトレーション後、遠心分離 (6,000g 4°C 16 時間) し、レンチウイルスを濃縮した。培地で再懸濁後に UMUC3 に処理し、目的の shRNA 発現 UMUC3 を得た。遺伝子組み換えに関しては「北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定」に従った。

マウス腫瘍移植モデルおよび抗癌剤処理実験

6 週齢の雌性ヌードマウス Balb (nu/nu) を日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。入舎日より 1 週間飼育後、 4×10^6 の UMUC3 もしくは tdTomato-Luc2 遺伝子導入 UMUC3 を皮下移植した。本研究に関する実験プロトコールは北海道大学動物実験委員会により承認された。動物の取り扱いには「北海道大学動物実験に関する規程」に従った。

腫瘍移植 10-11 日後に抗癌剤処理を開始した。ゲムシタビンを 60mg/kg の量で腹腔内投与し、その 24 時間後にシスプラチンを 6mg/kg の量で腹腔内投与した。コントロールとして、それぞれの溶媒 (滅菌蒸留または dimethyl sulfoxide (DMSO)) をハンクスバッファー (HBSS) で溶解した溶液を投与した。それぞれ週 1 回、2 から 3 コース投与した。イソフルラン吸入麻酔下で心腔内穿刺により血液を回収した。頸椎脱臼により安楽死させた後、腫瘍を摘出した。

パクリタキセル、ベラパミルの二次治療としての投与は、一次治療のゲムシタビン、シスプラチン投与を 3 コース行い、最終のシスプラチン投与後 5 日後に開始し

た。パクリタキセルは1.3mg/kg、ベラパミルは20mg/kgで連日腹腔内投与し、18日後に頸椎脱臼により屠殺し、肺組織と腫瘍を摘出した。

腫瘍体積は長径 $\times$ 短径 $^2 \times 0.5$ で算出した。IVIS Spectrum（住友ファーマインターナショナル株式会社）を用いて、全肺組織のルシフェラーゼ活性を検出し肺転移を評価した。その後、肺左葉をミンスしてRNAを回収した。

UMUC3-TEC 分離をよび RNA 回収

7週齢の雌性ヌードマウスに皮下移植されたUMUC3腫瘍組織から、磁気細胞分離法（MACS system: MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Germany）を用いてCD31陽性細胞分画をTECとして分離した。分離した細胞の一部を、FACS Aria II（Becton Dickinson; Franklin Lakes, New Jersey）を用いてCD31陽性率を解析した。データ解析はFlow Jo（Tree Star, Ashland, OR, USA）を用いて行った。残りの細胞はPBSで洗浄後にRNAを抽出した。

統計解析

臨床症例における化学療法前後の群間の比較はウィルコクソンの符号順位検定を使用した。臨床症例において、1次化学療法後の手術日からの生存期間を全生存期間とし、カプラン-マイヤー法により生存率曲線を作成してログランク検定により生存率曲線の差を検定した。1次化学療法後のABCB1陽性腫瘍血管内皮細胞の割合により2群に分けた。カットオフ値の設定は、それぞれのカットオフ値におけるp valueを算出し、最もp valueが最小となる7%とした。ABCB1陽性腫瘍血管内皮細胞の割合が高い群（7%以上）をABCB1 high group、低い群（7%未満）をABCB1 low groupとした。*in vitro*, *in vivo*の実験結果について、2群間の統計解析にはウィルコクソンの順位和検定、Unpaired-Student's t testを使用した。多群間の解析にはKruskal-Wallis testにより有意差を認めた場合に、ペア毎の比較をウィルコクソンの順位和検定により行った。P<0.05を有意差ありと判定した。統計解析はJMP version 13（SAS Institute, Tokyo, Japan）を使用した。

実験結果

尿路上皮癌臨床検体における 1 次化学療法前後の ABCB1 発現解析

抗癌剤治療による尿路上皮癌組織内の ABCB1 発現変化を免疫組織化学法により解析した (表 2)．代表的な症例の尿路上皮癌組織 HE 染色像を図 2A に示す．Case1, Case2 共に 1 次化学療法前の組織において腫瘍細胞の筋層浸潤を認める症例であった．Case1 は 1 次化学療法後の組織において少数の生存する腫瘍細胞を浅筋層に認め、Case2 では深筋層まで浸潤する多数の腫瘍細胞を認めた．Case1 では 1 次化学療法前の尿路上皮癌組織において、ABCB1 陽性腫瘍細胞が認められたが、1 次化学療法後の尿路上皮癌組織内の腫瘍細胞は ABCB1 陰性であった．一方、Case2 では、1 次化学療法後の組織内において、ABCB1 強陽性の腫瘍細胞の比率が増加していた (図 2B)．腫瘍細胞における ABCB1 染色スコアは、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 発現レベルには有意な差は認められなかった (図 2C)．一方、腫瘍血管内皮細胞における ABCB1 染色に関しては、1 次化学療法前ではほぼ全例陰性であったが、治療後に陽性となった症例が認められた (図 2D)．定量解析により、ABCB1 陽性腫瘍血管内皮細胞の割合は 1 次化学療法後に有意に増加していた (図 2E)．これらの結果により、化学療法により腫瘍血管内皮細胞における ABCB1 発現が誘導される可能性が示唆された．

表 2. 尿路上皮癌症例の患者背景

N = 66	Median (range)
Age (years)	66 (40-82)
	N (%)
Sex	
Male	47 (71.2)
Female	19 (28.8)
Tumor location	
Bladder/ Urethra	55 (83.3)
Upper urinary tract	11 (16.7)
pT stage (after first-line chemotherapy)	
<T1	19 (28.8)
T2	14 (21.2)
T3	26 (39.4)
T4	7 (10.6)
pN+	23 (34.8)

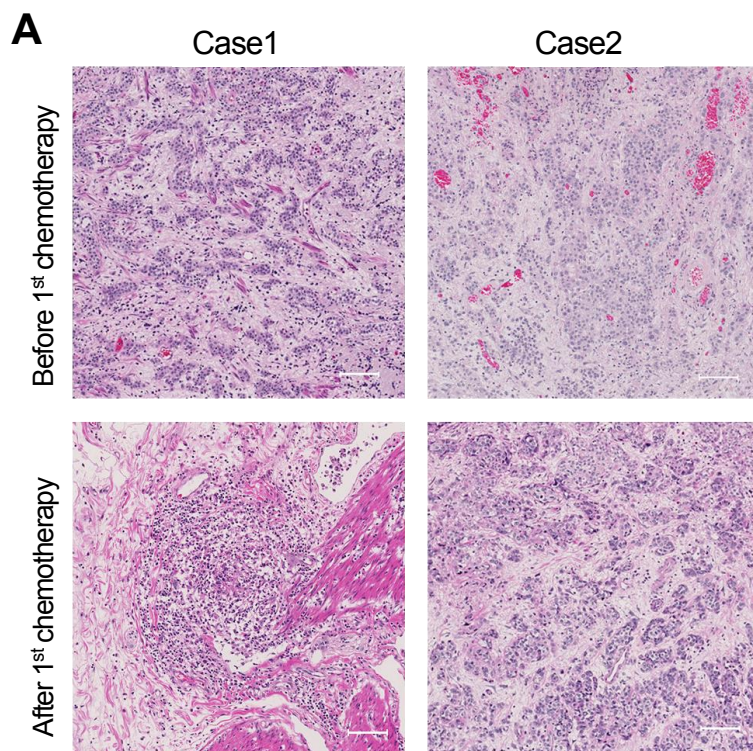


図 2A) 1 次化学療法前後の尿路上皮癌組織における HE 染色像. 代表的な 2 症例を示す (Case1, Case2). Scale bar, 100 μ m.

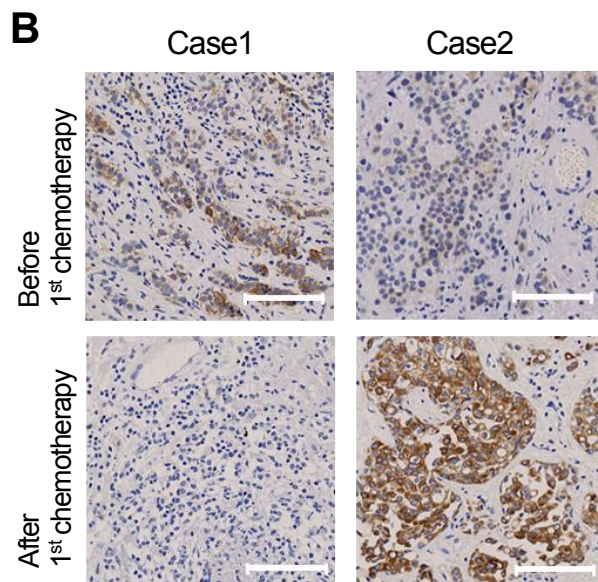


図 2B) 1 次化学療法前後の尿路上皮癌組織における ABCB1 組織免疫染色像. 図 2A と同一の代表例を示す. Scale bar, 100 μ m.

C ABCB1 expression change in tumor cells

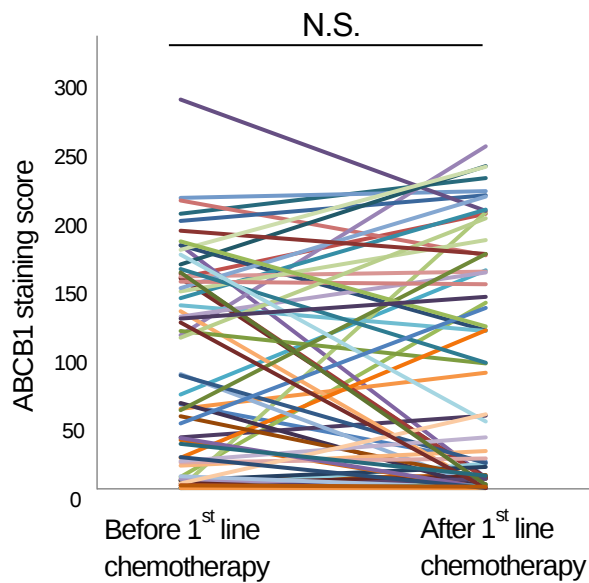


図 2C) 1 次化学療法前後での腫瘍細胞 ABCB1 染色レベルの定量解析結果 (N=66, 各色は各症例を表し, 同一症例の化学療法前後の染色スコアを線で結ぶ). ウィルコクソンの符号順位検定により化学療法前後の群間の発現変化を解析. (N.S.; Not significant).

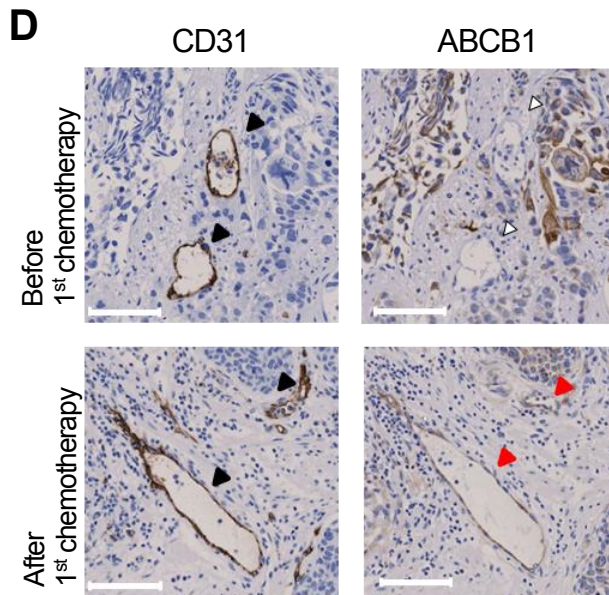


図 2D) 尿路上皮癌組織連続切片を用いた CD31, ABCB1 免疫染色による腫瘍血管内皮細胞 ABCB1 発現解析. 黒矢頭; CD31 陽性腫瘍血管, 白矢頭; ABCB1 陰性腫瘍血管, 赤矢頭; ABCB1 陽性腫瘍血管. Scale bar, 100 μ m.

E ABCB1 expression change in tumor endothelial cells

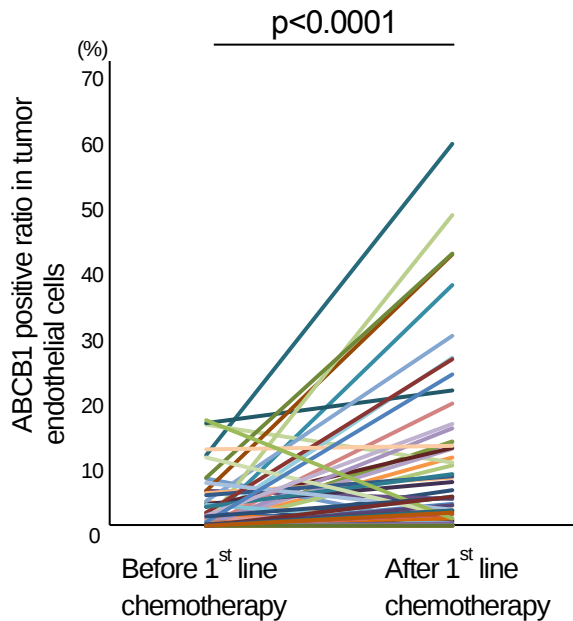


図 2E) 1 次化学療法前後での腫瘍血管内皮細胞における ABCB1 陽性率の解析結果 (N=66, 各色は各症例を表し, 同一症例の化学療法前後の腫瘍血管内皮細胞 ABCB1 陽性率を線で結ぶ). ウィルコクソンの符号順位検定により化学療法前後の群間の発現変化を解析.

ゲムシタビンによる NF- κ B の活性化を介した血管内皮細胞の MDR1 発現上昇

尿路上皮癌の一次化学療法にはゲムシタビン, シスプラチンが一般的に使用されている. そこで, 抗癌剤による腫瘍血管の ABCB1 発現亢進メカニズムとして, これらの抗癌剤が血管内皮に及ぼす直接的な影響について検討した. ヒト正常血管内皮細胞 HMVEC にゲムシタビン処理を行うと, ABCB1 をコードする MDR1 mRNA 発現レベルが上昇した (図 3A). 一方で, シスプラチン単独処理では MDR1 mRNA 発現レベルは低下した (図 3B). したがって, ゲムシタビンに焦点を絞って以降の解析を行った. NF- κ B は MDR1 の転写因子であるが⁶³, ゲムシタビン処理 2 時間後の HMVEC において NF- κ B のリン酸化がみられた (図 3C). さらに, NF- κ B 阻害剤 (BAY11-7082) 処理によりゲムシタビンによる MDR1 mRNA 発現亢進がキャンセルされた (図 3D). これらの結果から, ゲムシタビンは NF- κ B の活性化を介して MDR1 mRNA 発現を上昇させることが示唆された.

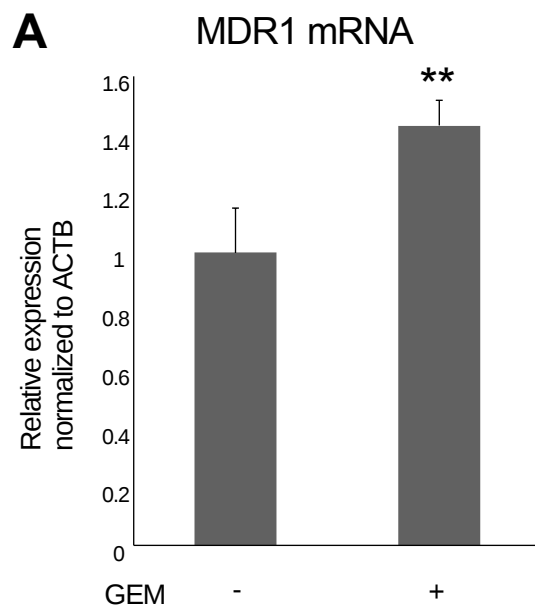


図 3A) ゲムシタビン処理による HMVEC の MDR1 mRNA 発現解析 (qRT-PCR 法).

** $P < 0.01$

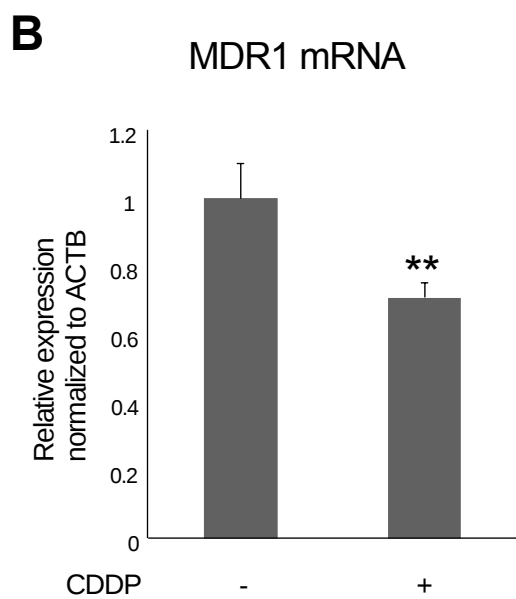


図 3B) シスプラチン処理による HMVEC の MDR1 mRNA 発現解析 (qRT-PCR 法) .

** $P < 0.01$

C

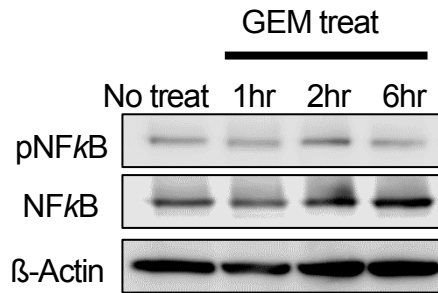


図 3C) ゲムシタビン処理による HMVEC の NF-κB リン酸化レベルの解析 (ウェスタンブロッティング法). β-Actin はインナーコントロール.

D

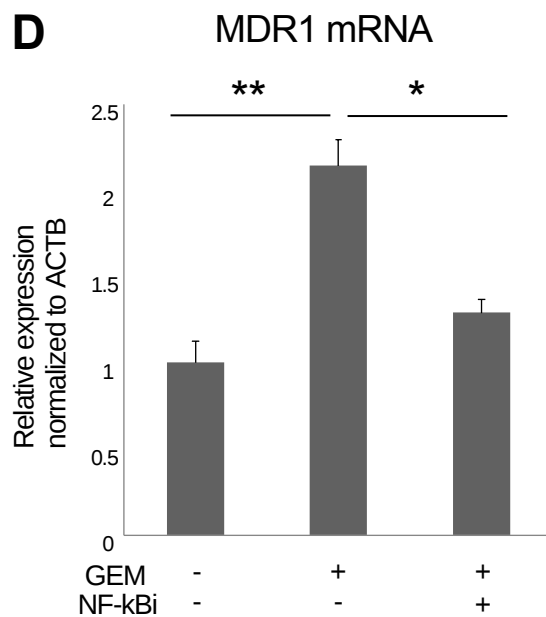


図 3D) ゲムシタビンと NF-κB 阻害剤 (BAY11-7082, NF-kBi) 処理による HMVEC の MDR1 mRNA 発現解析 (qRT-PCR 法). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

抗癌剤による腫瘍細胞 IL-8 分泌増加と血管内皮細胞の MDR1/ABCB1 発現レベル上昇

次に、腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 発現亢進メカニズムとして、抗癌剤による腫瘍細胞の形質変化の関与について検討することにした。ゲムシタビンとシスプラチンで処理された膀胱癌細胞株 UMUC3 と HMVEC を非接触共培養すると、HMVEC における MDR1 mRNA 発現レベルが上昇した (図 4A)。次に、ゲムシタビンまたはシスプラチン処理後

の UMUC3 の培養上清を HMVEC に処理したところ、どちらの抗癌剤処理後の培養上清によっても HMVEC の MDR1 mRNA 発現レベルが上昇した (図 4B)。これらの結果より、抗癌剤により変化する UMUC3 由来の液性因子が血管内皮細胞の MDR1 発現亢進に関与することが示唆された。

これまで、いくつかのサイトカインが ABCB1 発現を誘導することが報告されている⁶⁴。そこで、ゲムシタビンまたはシスプラチン処理による UMUC3 におけるサイトカインの発現量の変化を PCR array により解析した。どちらの抗癌剤処理によっても発現が上昇する遺伝子として、IL-8 が選出された (図 4C)。さらに、ゲムシタビンまたはシスプラチン耐性 UMUC3 株を樹立したところ、どちらの細胞株においても IL-8 mRNA 発現レベルは親株 UMUC3 に比べて高いことがわかった (図 4D)。これらのことから、ゲムシタビンおよびシスプラチンにより腫瘍細胞の IL-8 発現量が増加することが示唆された。

次に、血管内皮細胞への IL-8 の影響を解析した。リコンビナント IL-8 処理により HMVEC における MDR1 の転写因子 NF- κ B が活性化され (図 4E)、MDR1 mRNA 発現レベルが上昇した (図 4F)。一方、IL-8 中和抗体の添加により、抗癌剤処理後 UMUC3 培養上清による血管内皮細胞の MDR1 mRNA 発現レベルは低下した (図 4G, H)。これらの結果から、抗癌剤による腫瘍細胞の IL-8 分泌増加が血管内皮細胞の MDR1 発現亢進のメカニズムのひとつであることが示唆された。

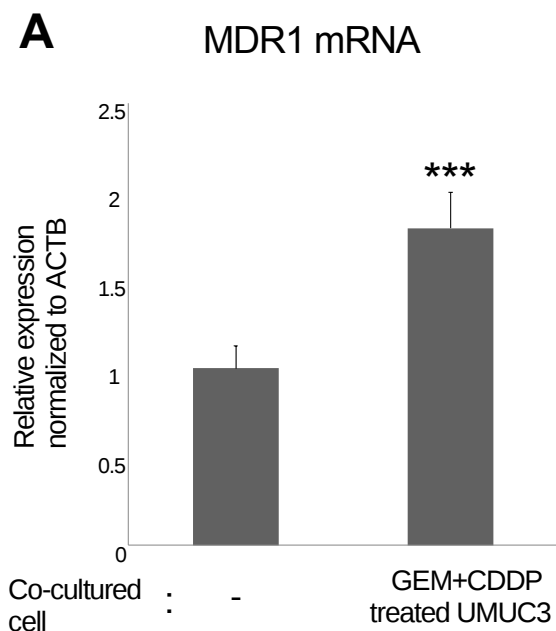


図 4A) ゲムシタビン+シスプラチンで処理された UMUC3 との非接触共培養による HMVEC の MDR1 mRNA 発現解析 (qRT-PCR 法)。*** $P < 0.001$

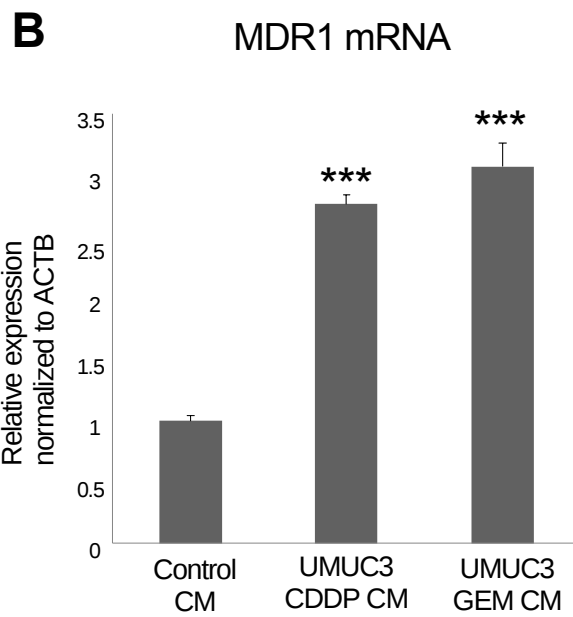


図 4B) ゲムシタビンまたはシスプラチン処理後の UMUC3 培養上清 (CM) 処理による HMVEC の MDR1 mRNA 発現解析 (qRT-PCR 法). *** $P < 0.001$

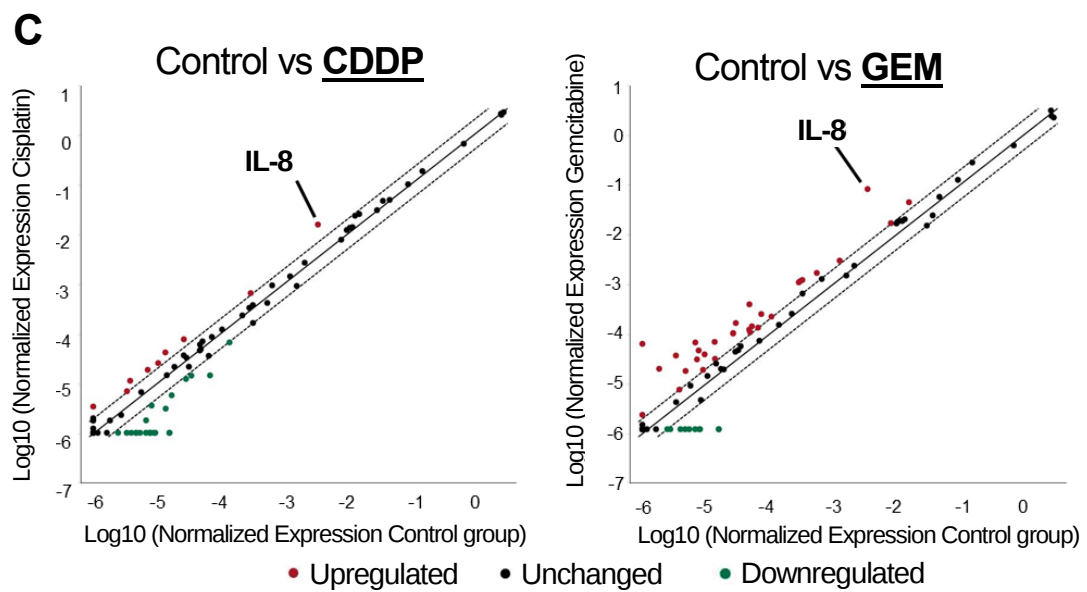


図 4C) ゲムシタビン (右) またはシスプラチン (左) 処理による UMUC3 における PCR array を用いたサイトカインの発現量変化解析.

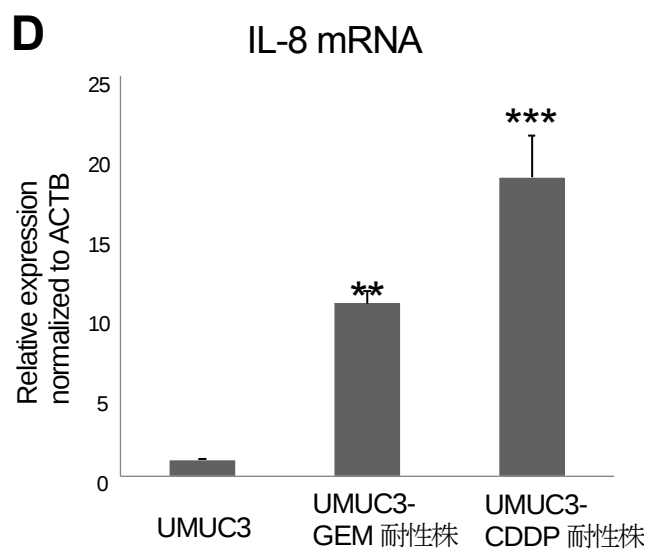


図 4D) ゲムシタビンまたはシスプラチン耐性 UMUC3 における IL-8 mRNA 発現解析 (qRT-PCR 法). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

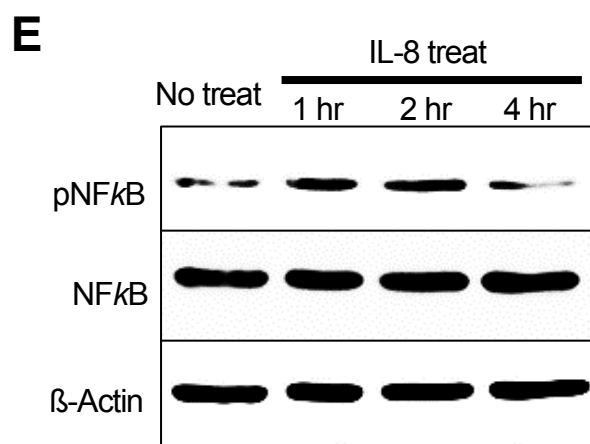


図 4E) リコンビナント IL-8 (rIL-8) 処理による HMVEC の NF- κ B リン酸化レベルの解析 (ウェスタンブロッティング法). β -Actin はインナーコントロール.

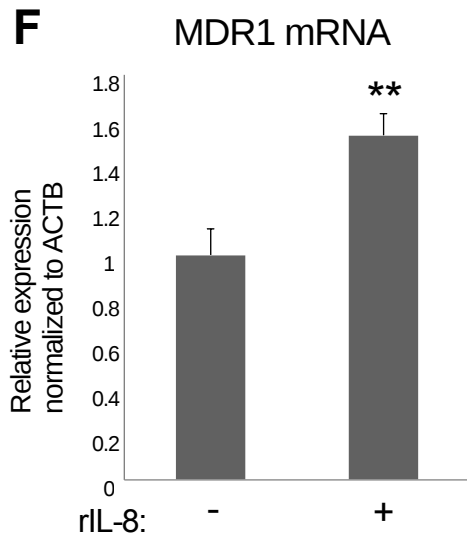


図 4F) リコンビナント IL-8 (rIL-8) 処理による HMVEC の MDR1 mRNA 発現解析 (qRT-PCR 法). ** $P < 0.01$

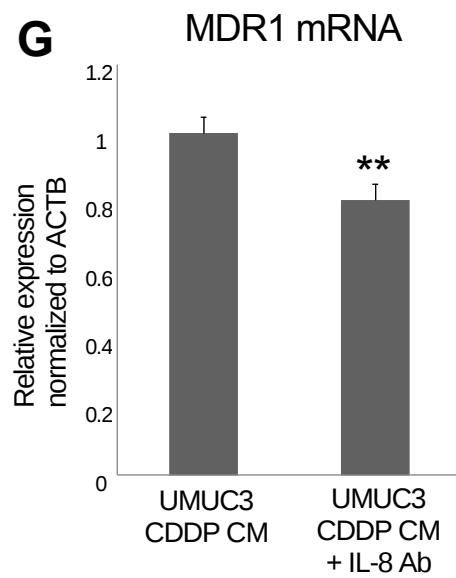


図 4G) シスプラチン処理後の UMUC3 培養上清 (CM) と IL-8 中和抗体 (IL-8 Ab) 処理による HMVEC の MDR1 mRNA 発現解析 (qRT-PCR 法). ** $P < 0.01$

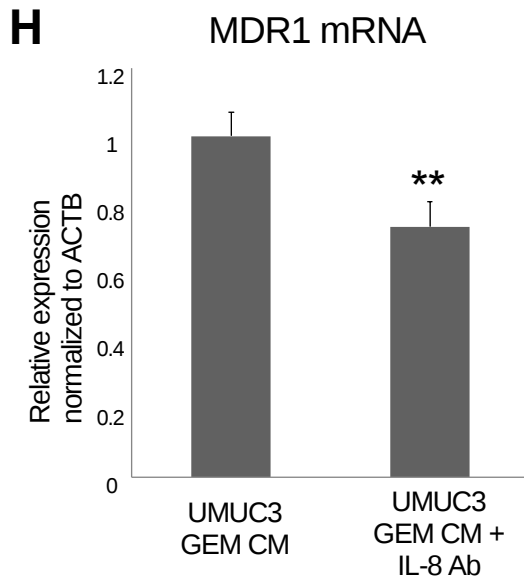


図 4H) ゲムシタビン処理後の UMUC3 培養上清 (CM) と IL-8 中和抗体 (IL-8 Ab) 処理による HMVEC の MDR1 mRNA 発現解析 (qRT-PCR 法). ** $P < 0.01$

次に、前述の *in vitro* の実験結果が *in vivo* においても当てはまるかどうか検討した。UMUC3 担癌マウスにゲムシタビン、シスプラチンを投与し、抗癌剤投与後の UMUC3 腫瘍から腫瘍血管内皮細胞を分離した。分離された腫瘍血管内皮細胞の MDR1 mRNA 発現レベルは、コントロール腫瘍内の腫瘍血管内皮細胞に比べ上昇していた (図 5A)。また、ABCB1 免疫染色によってもコントロール腫瘍内と比較して、抗癌剤投与後の腫瘍において、ABCB1 陽性の腫瘍血管内皮細胞が増加していた (図 5B)。これらは、ヒト尿路上皮癌の抗癌剤治療前後の腫瘍血管の変化 (図 2D) を裏付ける結果であると考えられた。

UMUC3 腫瘍組織より RNA を抽出し、ヒト特異的な IL-8 プライマーを用いて qRT-PCR を行ったところ、抗癌剤処理により腫瘍細胞の IL-8 mRNA 発現レベルが上昇していた (図 5C)。また、腫瘍組織の IL-8 免疫染色においても、抗癌剤投与により IL-8 陽性領域が増加した (図 5D)。さらに、抗癌剤投与により腫瘍体積あたりのマウス血清中 IL-8 レベルも上昇していた (図 5E)。これらの結果より、*in vivo* マウス腫瘍においても抗癌剤により腫瘍細胞の IL-8 産生、分泌が誘導されることが示された。

次に、腫瘍細胞由来の IL-8 が腫瘍血管内皮の MDR1/ABCB1 発現に与える影響を解析した。IL-8 をノックダウンした UMUC3 を皮下移植し、抗癌剤投与を行ったのち腫瘍組織における ABCB1 免疫染色を行った。コントロールの UMUC3 腫瘍と比較し、IL-8 ノックダウン UMUC3 腫瘍において、ABCB1 陽性腫瘍血管が減少していた (図

5F). これらの結果より, 抗癌剤による腫瘍細胞の IL-8 分泌促進を介して腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 発現が亢進することが示唆された.

A

MDR1 mRNA expression in UMUC3-TEC

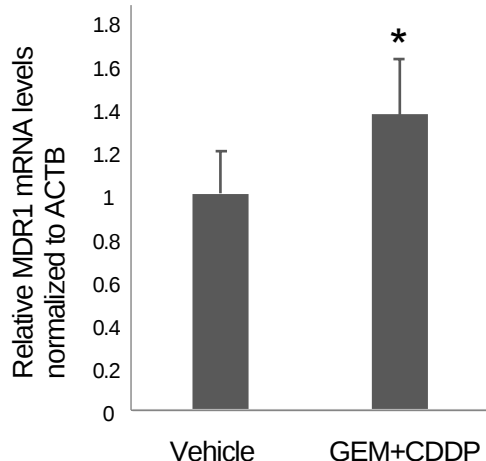


図 5A) Vehicle またはゲムシタビン+シスプラチン処理後の UMUC3 腫瘍より分離した腫瘍血管内皮細胞における MDR1 mRNA 発現解析 (qRT-PCR 法). *

$P < 0.05$

B

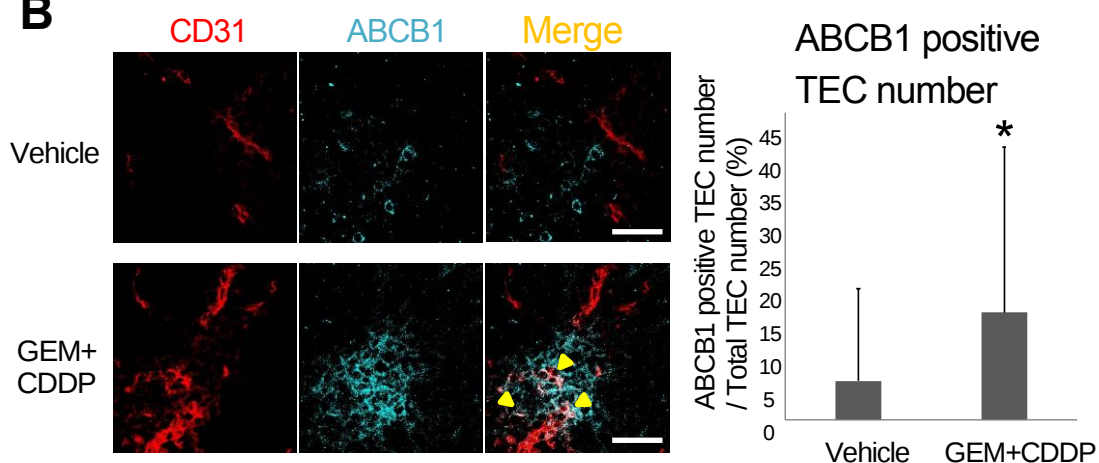


図 5B) CD31, ABCB1 蛍光二重免疫染色による UMUC3 腫瘍組織内の血管内皮細胞における ABCB1 発現解析 (左). 黄矢頭; ABCB1 陽性腫瘍血管, Vehicle またはゲムシタビン+シスプラチン処理後の UMUC3 腫瘍血管における ABCB1 陽性率の定量解析結果 (右). * $P < 0.05$

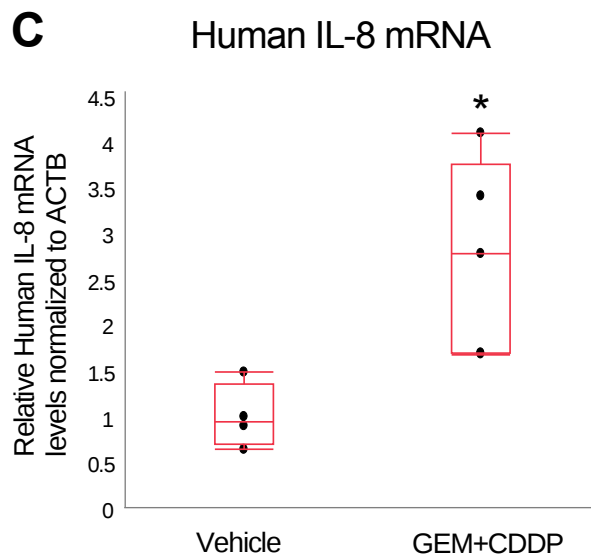


図 5C) Vehicle またはゲムシタビン+シスプラチン処理後の UMUC3 腫瘍組織におけるヒト IL-8 mRNA 発現解析 (qRT-PCR 法). * $P < 0.05$

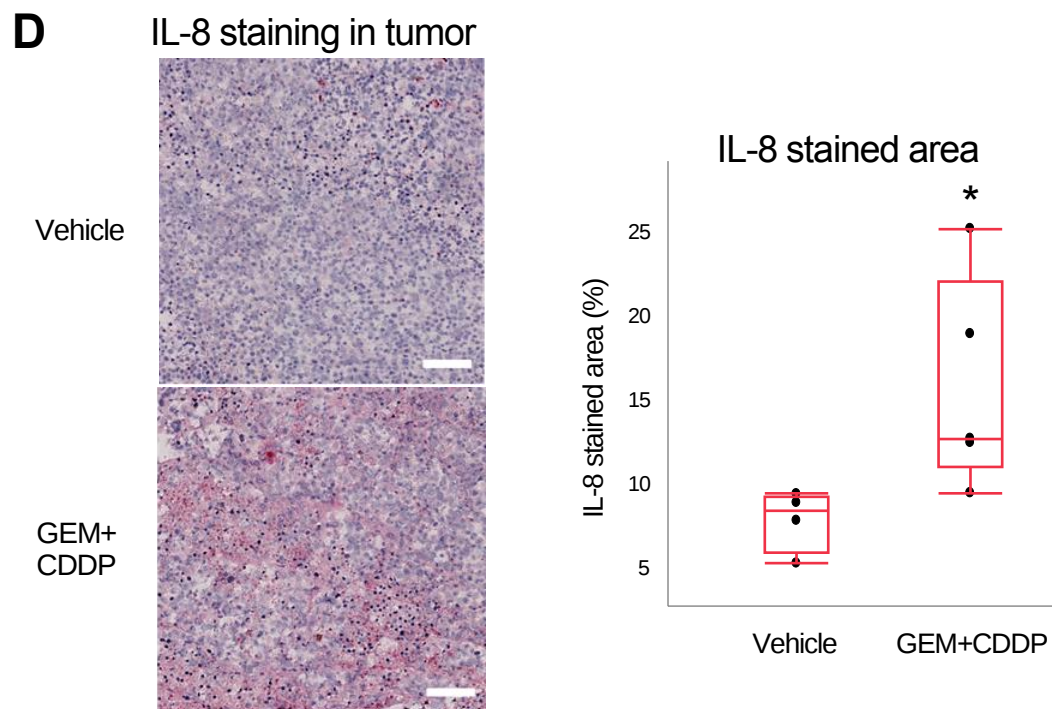


図 5D) IL-8 免疫染色による UMUC3 腫瘍組織内の IL-8 発現解析 (左). Vehicle またはゲムシタビン+シスプラチン処理後の UMUC3 腫瘍における IL-8 陽性領域の定量解析結果 (右). * $P < 0.05$

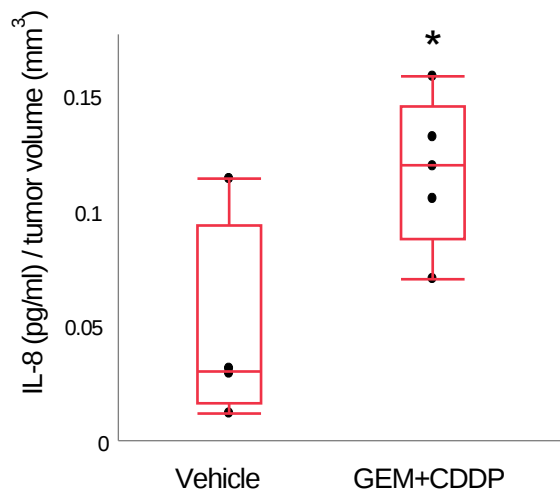
F**Human IL-8 level in blood**

図 5E) ELISA による UMUC3 担癌マウス血清中の IL-8 濃度解析, 腫瘍体積あたりの IL-8 量で算出. * P<0.05

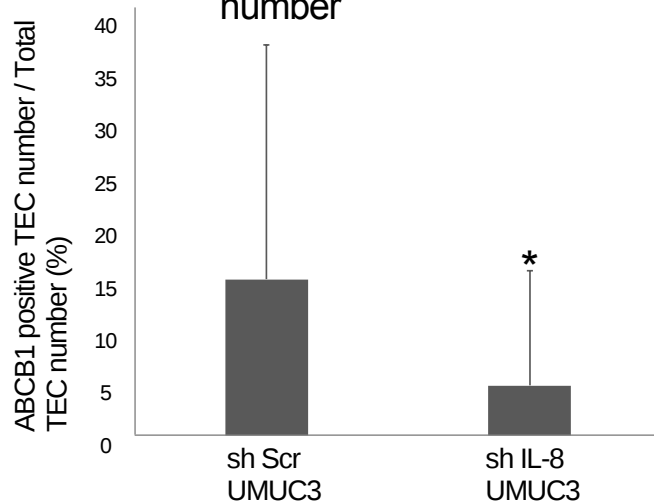
F**ABCB1 positive TEC number**

図 5F) ゲムシタビン+シスプラチン投与後のコントロールおよび IL-8 ノックダウン UMUC3 担癌マウスの腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 陽性率の定量解析結果. CD31, ABCB1 蛍光二重免疫染色により腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 発現を解析. * P<0.05

腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 発現レベルと予後との相関

膀胱癌症例における腫瘍組織の IL-8 発現と予後との関係について、PrognScan データベースを用いて解析した。IL-8 高発現群は、低発現群と比較して疾患特異的生存率が低かった (図 6A)。これまでの結果より、腫瘍細胞の IL-8 が腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 発現に関与していることが示唆されたため、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 発現との関連を検証した。1 次化学療法後の腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 陽性率により、ABCB1 が高い群 (ABCB1 high group), 低い群 (ABCB1 low group) の 2 群に分けて解析した。ABCB1 high group では ABCB1 low group に比べ、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より多かった (図 6B)。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したところ、ABCB1 high group は low group と比較して、全生存期間が有意に短かった (図 6C)。これらの結果から、尿路上皮癌症例において、抗癌剤により誘導された腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 発現が、薬剤耐性、予後不良の原因となる可能性が示された。

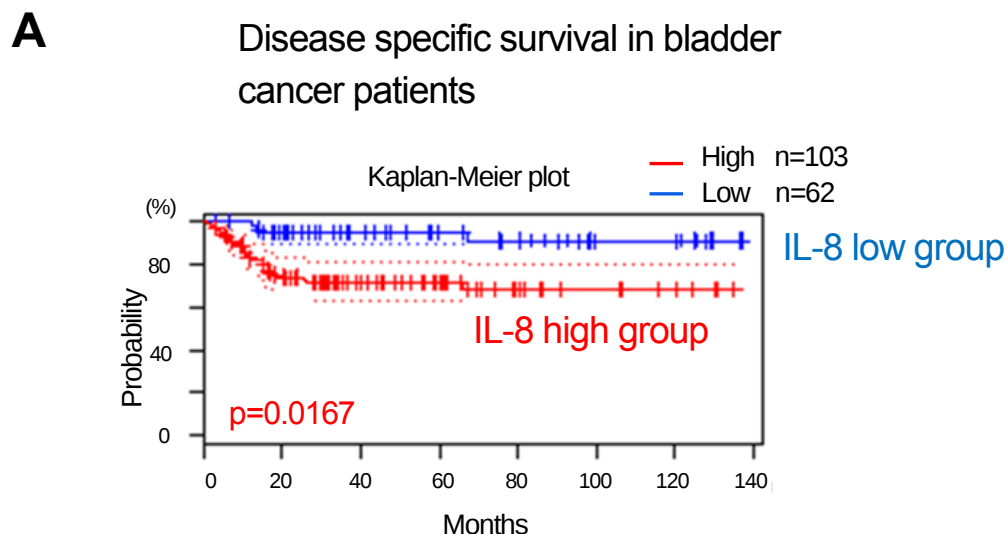


図 6A) PrognScan データベースの膀胱癌症例におけるカプランマイヤー生存曲線 (疾患特異的生存率)。ログランク検定による IL-8 高発現群と低発現群の群間の比較。

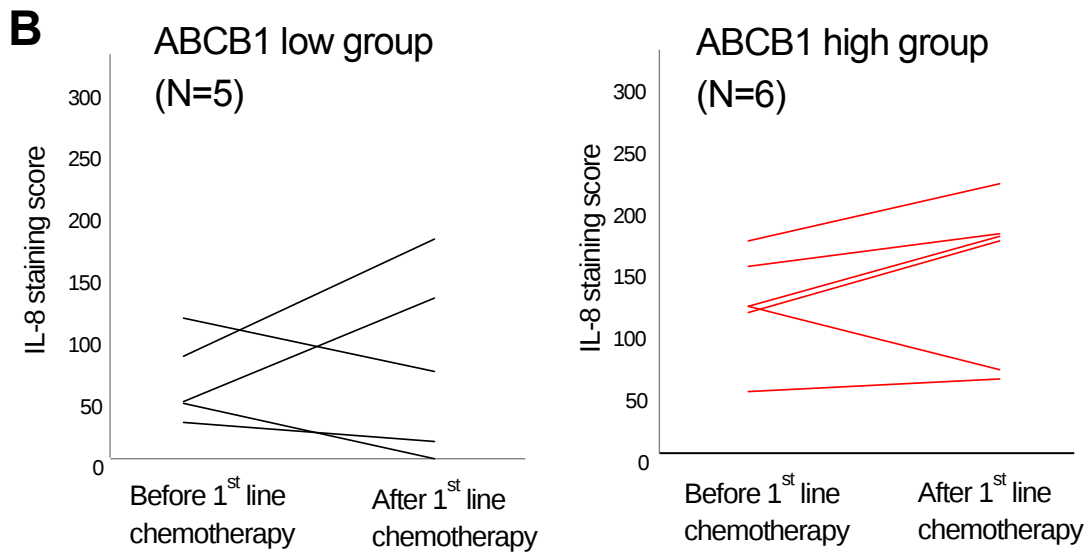


図 6B) 組織免疫染色による 1 次化学療法前後の尿路上皮癌における IL-8 発現解析. 腫瘍血管 ABCB1 high group (N=6, 右) と ABCB1 low group (N=5, 左) において IL-8 染色レベルを定量解析 (同一症例の化学療法前後の染色スコアを線で結ぶ)

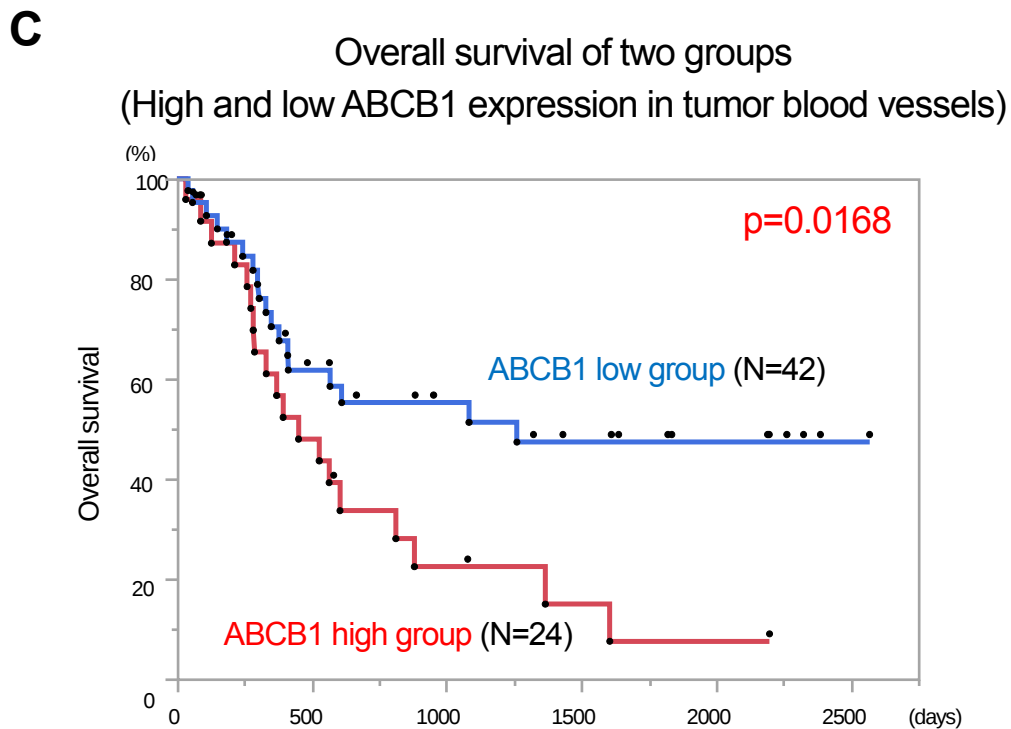


図 6C) 尿路上皮癌患者全症例 (N=66) の全生存期間のカプランマイヤー生存曲線. ログランク検定による腫瘍血管 ABCB high group (N=24) と low group (N=42) の群間の比較.

パクリタキセルを用いた2次化学療法における ABCB1 阻害剤の併用についての検討

尿路上皮癌において1次化学療法による腫瘍血管内皮細胞のABCB1発現亢進が、2次化学療法に対する耐性の原因となっているのであれば、ABCB1阻害剤併用により2次化学療法の治療効果改善につながる可能性が高いと考えられる。我々は以前、ABCB1阻害剤ベラパミルが腫瘍血管内皮細胞へのパクリタキセルの効果を増強させることを報告している⁶¹。さらに、*in vivo*マウス高転移性メラノーマ腫瘍において、ベラパミル併用がパクリタキセルの抗腫瘍効果、血管新生阻害効果を増強し、肺転移を抑制することを見出している⁶²。

そこで、マウス尿路上皮癌モデルを用いて、腫瘍血管のABCB1阻害がパクリタキセル治療効果に及ぼす影響を解析した。Luc2導入UMUC3を移植した担癌マウスに、臨床の治療方法と同様に1次治療としてゲムシタビン、シスプラチンを投与した。その後の2次治療としてはパクリタキセルを用い、そこにABCB1阻害剤ベラパミルの併用の有・無ならびにコントロール (Vehicleのみ) の3群に分けて解析した(図7A)。パクリタキセルとベラパミルの併用群において、パクリタキセル単独群に比較して1次治療終了後からの腫瘍の増大率が減少していた(図7B)。また、cleaved caspase 3染色により、パクリタキセルとベラパミルの併用群において腫瘍血管内皮細胞のアポトーシスが増加していることがわかった(図7C)。さらに、IVISを用いた*in vivo*イメージング解析では、ベラパミル併用群における肺のルシフェラーゼ活性の減少が(図7D)、またqRT-PCRにおいては肺におけるLuc2遺伝子の発現低下が認められたことから(図7E)、肺転移の減少が示された。これらの結果より、ゲムシタビン・シスプラチン1次治療後のパクリタキセル2次治療において、ABCB1阻害剤の併用は血管新生阻害効果ならびに抗腫瘍効果をもたらすことが示唆された。以上のことから、ヒト尿路上皮癌の臨床においても2次化学療法のパクリタキセルにABCB1阻害剤の併用が有用であることが示唆された。

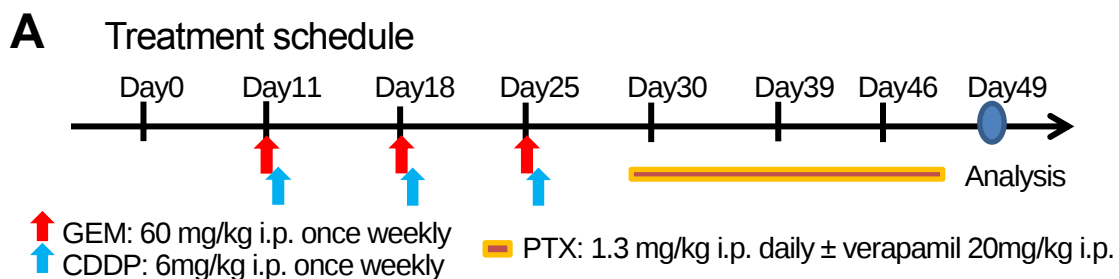


図 7A) Luc2 導入 UMUC3 担癌マウスへのゲムシタビン/シスプラチンによる1次治療およびパクリタキセル+ベラパミルによる2次治療の治療デザイン。

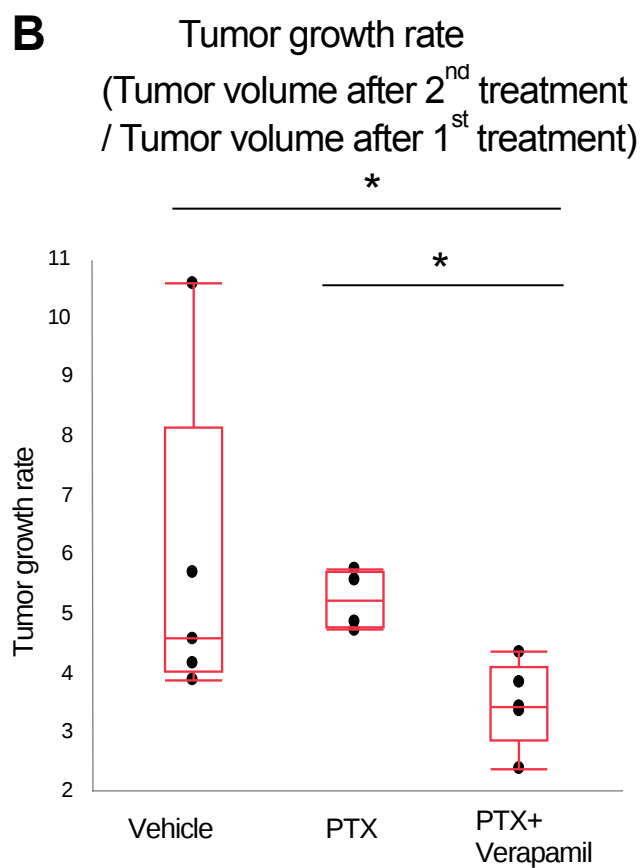


図 7B) Vehicle 群, パクリタキセル群, パクリタキセル+ベラパミル併用群における, 1 次治療終了後からの腫瘍増大率の解析結果. * P<0.05

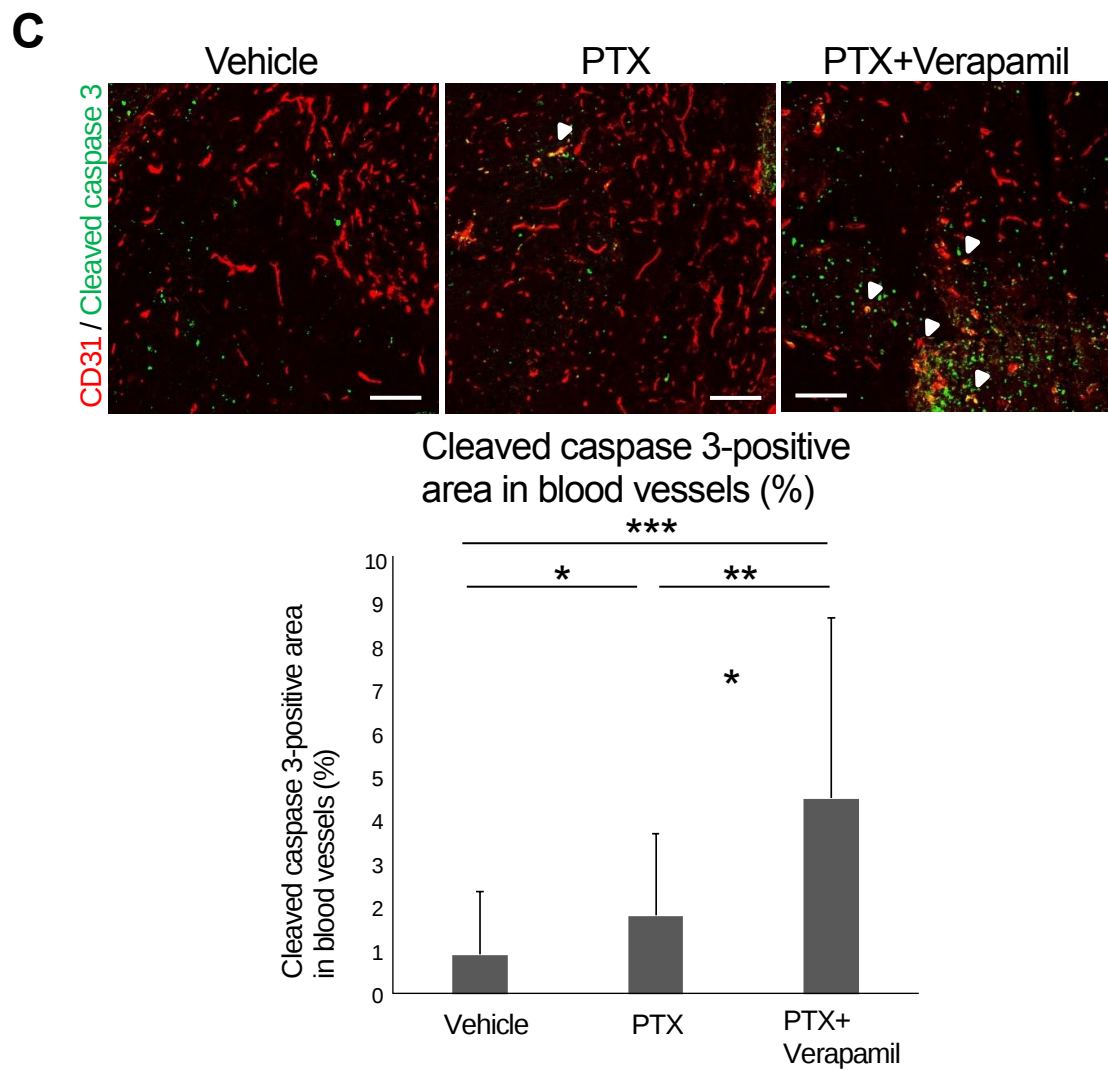


図 7C) CD31, cleaved caspase 3 の蛍光二重染色による腫瘍血管内皮細胞のアポトーシス解析 (上). Vehicle 群, パクリタキセル群, パクリタキセル+ベラパミル併用群における, 腫瘍血管内皮細胞の cleaved caspase 3 陽性率の解析結果 (下). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

D Lung metastasis by IVIS

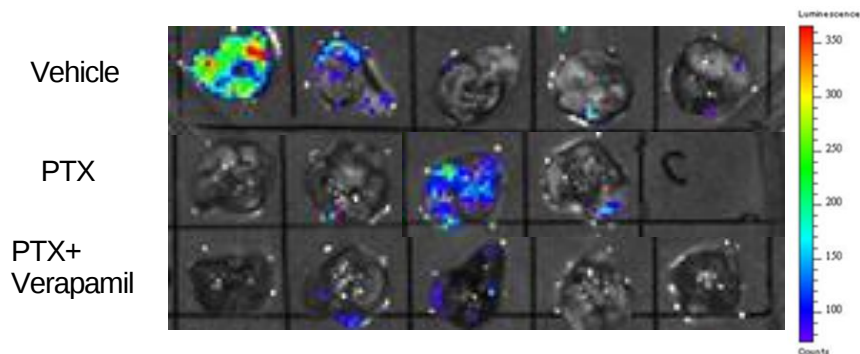


図 7D) Vehicle 群, パクリタキセル群, パクリタキセル+ベラパミル併用群における IVIS を用いた in vivo イメージングによる肺転移解析. 標識された転移腫瘍細胞が視覚化された.

E Luc2 expression in lung

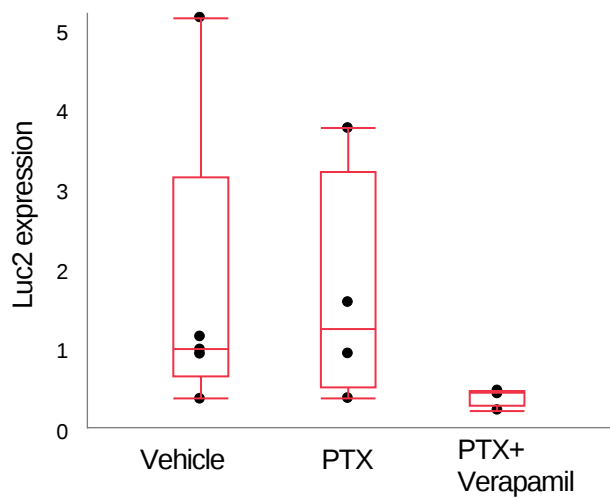


図 7E) Vehicle 群, パクリタキセル群, パクリタキセル+ベラパミル併用群の肺組織における Luc2 mRNA 発現解析 (qRT-PCR 法).

考察

ABCB1 は ATP 結合カセット輸送体の一つである。ABCB1 発現細胞は、ビンカルカロイド、タキサンなどの抗癌剤を含む様々な化合物に対する耐性を示す⁶⁵。ABCB1 の発現は癌幹細胞で亢進しており、ABCB1 による細胞外への薬剤排出によって細胞死を免れることが、癌幹細胞の薬剤耐性の主なメカニズムである^{32,34}。一般的には ABCB1 発現レベルが高い腫瘍は予後不良である。また、抗癌剤治療により腫瘍細胞の ABCB1 発現が亢進することが報告されている。その機序として MDR1 遺伝子のプロモーターのエピジェネティクス変化や MDR1 の転写因子 NF- κ B 活性化などが報告されている^{66,67}。一方で、腫瘍微小環境を構成する間質細胞における ABCB1 発現に関する報告は少ない。正常組織においては、肝臓の毛細胆管や腎臓の尿細管など、代謝産物などを排泄する臓器において ABCB1 発現が認められている⁶⁸。また、血液脳関門を構成する内皮細胞も ABCB1 を高いレベルで発現しており⁶⁹、有害物質から脳を保護している。しかし、ABCB1 により脳内への薬剤移行が抑制されることから、脳転移の治療抵抗性の要因のひとつにもなっている^{70,71}。腫瘍血管内皮細胞は、これまでは正常血管内皮細胞と同様に遺伝学的には安定で均一な細胞集団と考えられていたが、現在では多様な細胞集団であることがわかっている^{50,51}。さらに我々のものを含むこれまでの報告から、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た。その一つに MDR1 や ALDH などの幹細胞マーカーの発現亢進や、スフェロイド形成能、side population 細胞の存在など、幹細胞性を有していることが報告されている^{61,59,60}。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^{61,72}。さらにはそうした幹細胞性をもつ細胞は、血管新生能が高いことも報告されている⁵⁹。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る。これまで癌の耐性と血管との関連については、未熟で漏れやすい腫瘍血管の構造からおこる腫瘍間質圧の亢進により血行不良が生じ、抗癌剤の薬剤移行が妨げられていることが知られていた⁷³。しかし、我々のこれまでの研究結果より、腫瘍血管内皮の ABCB1 が抗癌剤の血管から腫瘍組織内への移行を妨げることにより、ドラッグデリバリーを不良にしている可能性も考えられる。しかしながら、実際に腫瘍血管内皮の ABCB1 が薬剤移行を妨げているかにどうかについては腫瘍組織内の抗癌剤濃度の測定などにより検証する必要があり、さらなる研究が待たれる。

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⁷⁴。IL-8 を分泌する細胞は、マクロファージや線維芽細胞、

血管内皮細胞など多岐にわたる⁷⁵⁻⁷⁷。また腫瘍血管新生を促進するサイトカインとしても有名である⁷⁸。さまざまな癌腫において腫瘍細胞の IL-8 発現が亢進していること、さらに IL-8 が高発現している症例は予後不良であることが知られている⁷⁹⁻⁸¹。今回の研究において、抗癌剤投与により腫瘍細胞の IL-8 発現が亢進することが示された。なお、腫瘍細胞のみならず、腫瘍微小環境を構成するさまざまな間質細胞においても抗癌剤治療により IL-8 分泌が増加すると考えられる。一方で、IL-8 の腫瘍間質細胞への影響はいくつか解明されており、IL-8 が CAF 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がある⁸²。本研究においても、IL-8 が腫瘍血管内皮細胞の ABCB1 発現を亢進させ、薬剤耐性を誘導することを示した。このように、抗癌剤によってもたらされる腫瘍微小環境の変化は、IL-8 発現誘導を介して、腫瘍の悪性化を促進すると考えられる。実際に、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。抗癌剤治療後の尿路上皮癌において、NF- κ B によって転写される ABC トランスポーターの発現が腫瘍血管内皮細胞において亢進していたという結果は、血管内皮細胞の炎症性変化を示唆している。血管内皮に炎症性変化が起きる代表的な病態としては動脈硬化などが有名であるが、そこには DAMPs (damage-associated molecular patterns) が中心的な役割を果たしている⁸³。また、近年では血管内皮細胞から分泌される DAMPs が腫瘍細胞の血管外侵入、転移を促進することが知られている⁸⁴。さらに、我々は高転移性腫瘍由来の腫瘍血管内皮細胞が DAMPs のひとつである Biglycan を分泌し、腫瘍細胞の転移を促進することを報告している⁵⁴。これらのことから、抗癌剤治療により誘導された炎症性サイトカインによって腫瘍血管内皮細胞の形質が変化し、Biglycan のような DAMPs の分泌により転移が誘導されることが、抗癌剤治療後の癌の再発転移の原因になっている可能性もあるかもしれない。

進行性尿路上皮癌の全身治療は、抗癌剤投与が一般的である。さまざま化学療法がプレクリニカル、クリニカルスタディで行われているが、良好な治療成績を残しているものは少なく、特に、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となっている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⁸⁵が行われ、腫瘍血管を念頭にお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、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⁶¹。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て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 標的のための手段は複数存在するものと考えられる⁸⁶。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し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が示唆された。

総括および結論

① 本研究全体から得られた新知見

- ・尿路上皮癌において1次化学療法後にABCB1腫瘍血管内皮細胞の割合が増加する.
- ・抗癌剤により誘導された腫瘍細胞由来IL-8により血管内皮細胞のMDR1/ABCB1発現が亢進する.
- ・尿路上皮癌症例において腫瘍血管内皮細胞のABCB1発現が予後と相関する.
- ・ABCB1阻害剤の併用により,尿路上皮癌2次化学療法におけるパクリタキセルの治療効果が増強する.

② 新知見の意義

癌が薬剤耐性を獲得する一つのメカニズムとして,抗癌剤により引き起こされた腫瘍血管内細胞の異常性(ABCB1発現)が関わるということが証明された.これまで,癌の薬剤耐性は腫瘍細胞の性質に着目した研究がほとんどであり,薬剤トランスポーターの解析も腫瘍細胞に着目しているものばかりであった.癌の薬剤耐性克服には腫瘍細胞のみならず,腫瘍血管内皮細胞の異常性を考慮する必要があると考えられる.

③ 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

腫瘍血管内皮細胞の異常性獲得を防ぎ,正常化をはかることは癌治療において重要な治療戦略の一つと考えられている.抗癌剤により誘導された腫瘍細胞由来のIL-8が,腫瘍血管内皮細胞の異常性獲得の一つのメカニズムであり,それを防ぐ戦略が展開されると期待される.また,癌の薬剤耐性克服にむけた治療戦略としては,異常性を獲得した腫瘍血管もターゲットにした治療が必要と考えられる.その異常性の一つであるABCB1を標的とするために,有用な阻害剤の開発や効果的な投与法についても研究が進むものと思われる.

④ 今後の課題

腫瘍血管内皮細胞の異常性獲得には様々なメカニズムが複雑に絡み合っていると考えられ,一つの分子を標的とした治療を行っても,別の機序が補填することで異常性が維持,もしくは増悪されることが考えられる.腫瘍血管は薬剤耐性の原因になっているが,腫瘍細胞への栄養,酸素の供給源であり,転移の経路となる重要な組織である.また,抗癌剤のデリバリーにおいても腫瘍血管は重要である.今後さらなる異常性獲得のメカニズムの解明が必須である.

また、ABCB1 阻害剤が腫瘍血管内皮細胞をターゲットとした治療において有用であることが示唆されたが、実臨床において至適な投与方法は不明であり、今後のさらなる研究が必要である。

謝辞

本研究にあたり，御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院腎泌尿器外科学講座篠原信雄教授に謝意を表します．また，直接の御指導を賜りました，北海道大学遺伝子制御研究所フロンティア研究ユニット血管生物学的研究室 樋田京子特任准教授，間石奈湖助教に深く感謝申し上げます．また，今回の研究にあたり様々な面でご協力頂きました，北海道大学大学院医学研究院循環器外科・呼吸器外科学講座 樋田泰浩准教授，北海道大学大学院医学研究院腎泌尿器外科学講座の皆様および北海道大学遺伝子制御研究所フロンティア研究ユニット血管生物学的研究室の皆様に心よりお礼申し上げます．

引用文献

- 1 Wein, A. J., Kavoussi, L. R., Partin, A. W. & Peters, C. *Campbell-Walsh urology*. Eleventh edition. edn.
- 2 Ploeg, M., Aben, K. K. & Kiemeny, L. A. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J. Urol.* 27, 289-293 (2009).
- 3 Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. & Jemal, A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* 65, 87-108 (2015).
- 4 Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. & Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359-386 (2015).
- 5 Hori, M., Matsuda, T., Shibata, A., Katanoda, K., Sobue, T., Nishimoto, H. & Japan Cancer Surveillance Research, G. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2009: a study of 32 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 45, 884-891 (2015).
- 6 Dinney, C. P., McConkey, D. J., Millikan, R. E., Wu, X., Bar-Eli, M., Adam, L., Kamat, A. M., Siefker-Radtke, A. O., Tuziak, T., Sabichi, A. L., Grossman, H. B., Benedict, W. F. & Czerniak, B. Focus on bladder cancer. *Cancer Cell* 6, 111-116 (2004).
- 7 Hedegaard, J., Lamy, P., Nordentoft, I., Algaba, F., Hoyer, S., Ulhøi, B. P., Vang, S., Reinert, T., Hermann, G. G., Mogensen, K., Thomsen, M. B. H., Nielsen, M. M., Marquez, M., Segersten, U., Aine, M., Hoglund, M., Birkenkamp-Demtroder, K., Frisrup, N., Borre, M., Hartmann, A., Stohr, R., Wach, S., Keck, B., Seitz, A. K., Nawroth, R., Maurer, T., Tulic, C., Simic, T., Junker, K., Horstmann, M., Harving, N., Petersen, A. C., Calle, M. L., Steyerberg, E. W., Beukers, W., van Kessel, K. E. M., Jensen, J. B., Pedersen, J. S., Malmstrom, P. U., Malats, N., Real, F. X., Zwarthoff, E. C., Orntoft, T. F. & Dyrskjot, L. Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell* 30, 27-42 (2016).
- 8 Knowles, M. A. Bladder cancer subtypes defined by genomic alterations. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.*, 116-130 (2008).
- 9 van Rhijn, B. W., Vis, A. N., van der Kwast, T. H., Kirkels, W. J., Radvanyi, F., Ooms, E. C., Chopin, D. K., Boeve, E. R., Jobsis, A. C. & Zwarthoff, E. C.

- Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome. *J. Clin. Oncol.* 21, 1912-1921 (2003).
- 10 Wolff, E. M., Liang, G. & Jones, P. A. Mechanisms of Disease: genetic and epigenetic alterations that drive bladder cancer. *Nat. Clin. Pract. Urol.* 2, 502-510 (2005).
 - 11 Kim, J., Akbani, R., Creighton, C. J., Lerner, S. P., Weinstein, J. N., Getz, G. & Kwiatkowski, D. J. Invasive Bladder Cancer: Genomic Insights and Therapeutic Promise. *Clin. Cancer Res.* 21, 4514-4524 (2015).
 - 12 Robertson, A. G., Kim, J., Al-Ahmadie, H., Bellmunt, J., Guo, G., Cherniack, A. D., Hinoue, T., Laird, P. W., Hoadley, K. A., Akbani, R., Castro, M. A. A., Gibb, E. A., Kanchi, R. S., Gordenin, D. A., Shukla, S. A., Sanchez-Vega, F., Hansel, D. E., Czerniak, B. A., Reuter, V. E., Su, X., de Sa Carvalho, B., Chagas, V. S., Mungall, K. L., Sadeghi, S., Pedamallu, C. S., Lu, Y., Klimczak, L. J., Zhang, J., Choo, C., Ojesina, A. I., Bullman, S., Leraas, K. M., Lichtenberg, T. M., Wu, C. J., Schultz, N., Getz, G., Meyerson, M., Mills, G. B., McConkey, D. J., Network, T. R., Weinstein, J. N., Kwiatkowski, D. J. & Lerner, S. P. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell* 171, 540-556 e525 (2017).
 - 13 Grossman, H. B., Natale, R. B., Tangen, C. M., Speights, V. O., Vogelzang, N. J., Trump, D. L., deVere White, R. W., Sarosdy, M. F., Wood, D. P., Jr., Raghavan, D. & Crawford, E. D. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N. Engl. J. Med.* 349, 859-866 (2003).
 - 14 International Collaboration of, T., Medical Research Council Advanced Bladder Cancer Working, P., European Organisation for, R., Treatment of Cancer Genito-Urinary Tract Cancer, G., Australian Bladder Cancer Study, G., National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G., Finnbladder, Norwegian Bladder Cancer Study, G., Club Urologico Espanol de Tratamiento Oncologico, G., Griffiths, G., Hall, R., Sylvester, R., Raghavan, D. & Parmar, M. K. International phase III trial assessing neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastine chemotherapy for muscle-invasive

- bladder cancer: long-term results of the BA06 30894 trial. *J. Clin. Oncol.* 29, 2171-2177 (2011).
- 15 Rosenblatt, R., Sherif, A., Rintala, E., Wahlqvist, R., Ullen, A., Nilsson, S., Malmstrom, P. U. & Nordic Urothelial Cancer, G. Pathologic downstaging is a surrogate marker for efficacy and increased survival following neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy for muscle-invasive urothelial bladder cancer. *Eur. Urol.* 61, 1229-1238 (2012).
 - 16 Giannarini, G., Kessler, T. M., Thoeny, H. C., Nguyen, D. P., Meissner, C. & Studer, U. E. Do patients benefit from routine follow-up to detect recurrences after radical cystectomy and ileal orthotopic bladder substitution? *Eur. Urol.* 58, 486-494 (2010).
 - 17 Yafi, F. A., Aprikian, A. G., Fradet, Y., Chin, J. L., Izawa, J., Rendon, R., Estey, E., Fairey, A., Cagiannos, I., Lacombe, L., Lattouf, J. B., Bell, D., Saad, F., Drachenberg, D. & Kassouf, W. Surveillance guidelines based on recurrence patterns after radical cystectomy for bladder cancer: the Canadian Bladder Cancer Network experience. *BJU Int.* 110, 1317-1323 (2012).
 - 18 von der Maase, H., Hansen, S. W., Roberts, J. T., Dogliotti, L., Oliver, T., Moore, M. J., Bodrogi, I., Albers, P., Knuth, A., Lippert, C. M., Kerbrat, P., Sanchez Rovira, P., Wersall, P., Cleall, S. P., Roychowdhury, D. F., Tomlin, I., Visseren-Grul, C. M. & Conte, P. F. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J. Clin. Oncol.* 18, 3068-3077 (2000).
 - 19 von der Maase, H., Sengelov, L., Roberts, J. T., Ricci, S., Dogliotti, L., Oliver, T., Moore, M. J., Zimmermann, A. & Arning, M. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J. Clin. Oncol.* 23, 4602-4608 (2005).
 - 20 Raggi, D., Miceli, R., Sonpavde, G., Giannatempo, P., Mariani, L., Galsky, M. D., Bellmunt, J. & Necchi, A. Second-line single-agent versus doublet chemotherapy as salvage therapy for metastatic urothelial cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Oncol.* 27, 49-61 (2016).

- 21 Terakawa, T., Miyake, H., Yokoyama, N., Miyazaki, A., Tanaka, H., Inoue, T. & Fujisawa, M. Clinical outcome of paclitaxel and carboplatin as second-line chemotherapy for advanced urothelial carcinoma resistant to first-line therapy with gemcitabine and cisplatin. *Urol. Int.* 92, 180-185 (2014).
- 22 Katz, H., Wassie, E. & Alsharedi, M. Checkpoint inhibitors: the new treatment paradigm for urothelial bladder cancer. *Med. Oncol.* 34, 170 (2017).
- 23 Mooso, B. A., Vinall, R. L., Mudryj, M., Yap, S. A., deVere White, R. W. & Ghosh, P. M. The role of EGFR family inhibitors in muscle invasive bladder cancer: a review of clinical data and molecular evidence. *J. Urol.* 193, 19-29 (2015).
- 24 Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A. & Dalton, W. S. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 93, 1658-1667 (1999).
- 25 McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A. M. & Franklin, R. A. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1263-1284 (2007).
- 26 Al-Hajj, M., Becker, M. W., Wicha, M., Weissman, I. & Clarke, M. F. Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 43-47 (2004).
- 27 Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111 (2001).
- 28 Hatina, J., Parmar, H. S., Kripnerova, M., Hepburn, A. & Heer, R. Urothelial Carcinoma Stem Cells: Current Concepts, Controversies, and Methods. *Methods Mol. Biol.* 1655, 121-136 (2018).
- 29 Ho, P. L., Lay, E. J., Jian, W., Parra, D. & Chan, K. S. Stat3 activation in urothelial stem cells leads to direct progression to invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 72, 3135-3142 (2012).

- 30 Li, Y., Lin, K., Yang, Z., Han, N., Quan, X., Guo, X. & Li, C. Bladder cancer stem cells: clonal origin and therapeutic perspectives. *Oncotarget* 8, 66668-66679 (2017).
- 31 Zhu, F., Qian, W., Zhang, H., Liang, Y., Wu, M., Zhang, Y., Zhang, X., Gao, Q. & Li, Y. SOX2 Is a Marker for Stem-like Tumor Cells in Bladder Cancer. *Stem Cell Reports* 9, 429-437 (2017).
- 32 Dean, M., Fojo, T. & Bates, S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer* 5, 275-284 (2005).
- 33 Hong, W. K. & American Association for Cancer Research. *Holland Frei cancer medicine* 8. 8th edn, (People's Medical Pub. House, 2010).
- 34 Gottesman, M. M., Fojo, T. & Bates, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2, 48-58 (2002).
- 35 Holland, I. B. *ABC proteins : from bacteria to man*. (Academic Press, 2003).
- 36 Dean, M., Rzhetsky, A. & Allikmets, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 11, 1156-1166 (2001).
- 37 Fletcher, J. I., Haber, M., Henderson, M. J. & Norris, M. D. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat. Rev. Cancer* 10, 147-156 (2010).
- 38 Casanovas, O., Hicklin, D. J., Bergers, G. & Hanahan, D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8, 299-309 (2005).
- 39 Farmer, P., Bonnefoi, H., Anderle, P., Cameron, D., Wirapati, P., Becette, V., Andre, S., Piccart, M., Campone, M., Brain, E., Macgrogan, G., Petit, T., Jassem, J., Bibeau, F., Blot, E., Bogaerts, J., Aguet, M., Bergh, J., Iggo, R. & Delorenzi, M. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat. Med.* 15, 68-74 (2009).
- 40 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674 (2011).
- 41 Pietras, K. & Ostman, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp. Cell Res.* 316, 1324-1331 (2010).
- 42 Yuan, Y., Jiang, Y. C., Sun, C. K. & Chen, Q. M. Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications (Review). *Oncol. Rep.* 35, 2499-2515 (2016).

- 43 Bhowmick, N. A., Neilson, E. G. & Moses, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332-337 (2004).
- 44 Loeffler, M., Kruger, J. A., Niethammer, A. G. & Reisfeld, R. A. Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J. Clin. Invest.* 116, 1955-1962 (2006).
- 45 Rasanen, K. & Vaheri, A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp. Cell Res.* 316, 2713-2722 (2010).
- 46 Shimoda, M., Mellody, K. T. & Orimo, A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 19-25 (2010).
- 47 Gabrilovich, D. I. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* 5, 3-8 (2017).
- 48 Ostrand-Rosenberg, S. & Sinha, P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J. Immunol.* 182, 4499-4506 (2009).
- 49 Qian, B. Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39-51 (2010).
- 50 Langenkamp, E. & Molema, G. Microvascular endothelial cell heterogeneity: general concepts and pharmacological consequences for anti-angiogenic therapy of cancer. *Cell Tissue Res.* 335, 205-222 (2009).
- 51 Ohga, N., Ishikawa, S., Maishi, N., Akiyama, K., Hida, Y., Kawamoto, T., Sadamoto, Y., Osawa, T., Yamamoto, K., Kondoh, M., Ohmura, H., Shinohara, N., Nonomura, K., Shindoh, M. & Hida, K. Heterogeneity of tumor endothelial cells: comparison between tumor endothelial cells isolated from high- and low-metastatic tumors. *Am. J. Pathol.* 180, 1294-1307 (2012).
- 52 St Croix, B., Rago, C., Velculescu, V., Traverso, G., Romans, K. E., Montgomery, E., Lal, A., Riggins, G. J., Lengauer, C., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 289, 1197-1202 (2000).
- 53 Cao, Z., Scandura, J. M., Inghirami, G. G., Shido, K., Ding, B. S. & Rafii, S. Molecular Checkpoint Decisions Made by Subverted Vascular Niche Transform Indolent Tumor Cells into Chemoresistant Cancer Stem Cells. *Cancer Cell* 31, 110-126 (2017).

- 54 Maishi, N., Ohba, Y., Akiyama, K., Ohga, N., Hamada, J., Nagao-Kitamoto, H., Alam, M. T., Yamamoto, K., Kawamoto, T., Inoue, N., Taketomi, A., Shindoh, M., Hida, Y. & Hida, K. Tumour endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan. *Sci. Rep.* 6, 28039 (2016).
- 55 Yin, M., Zhou, H. J., Zhang, J., Lin, C., Li, H., Li, X., Li, Y., Zhang, H., Breckenridge, D. G., Ji, W. & Min, W. ASK1-dependent endothelial cell activation is critical in ovarian cancer growth and metastasis. *JCI Insight* 2 (2017).
- 56 Akino, T., Hida, K., Hida, Y., Tsuchiya, K., Freedman, D., Muraki, C., Ohga, N., Matsuda, K., Akiyama, K., Harabayashi, T., Shinohara, N., Nonomura, K., Klagsbrun, M. & Shindoh, M. Cytogenetic abnormalities of tumor-associated endothelial cells in human malignant tumors. *Am. J. Pathol.* 175, 2657-2667 (2009).
- 57 Hida, K., Hida, Y., Amin, D. N., Flint, A. F., Panigrahy, D., Morton, C. C. & Klagsbrun, M. Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res.* 64, 8249-8255 (2004).
- 58 Dudley, A. C., Khan, Z. A., Shih, S. C., Kang, S. Y., Zwaans, B. M., Bischoff, J. & Klagsbrun, M. Calcification of multipotent prostate tumor endothelium. *Cancer Cell* 14, 201-211 (2008).
- 59 Naito, H., Wakabayashi, T., Kidoya, H., Muramatsu, F., Takara, K., Eino, D., Yamane, K., Iba, T. & Takakura, N. Endothelial Side Population Cells Contribute to Tumor Angiogenesis and Antiangiogenic Drug Resistance. *Cancer Res.* 76, 3200-3210 (2016).
- 60 Ohmura-Kakutani, H., Akiyama, K., Maishi, N., Ohga, N., Hida, Y., Kawamoto, T., Iida, J., Shindoh, M., Tsuchiya, K., Shinohara, N. & Hida, K. Identification of tumor endothelial cells with high aldehyde dehydrogenase activity and a highly angiogenic phenotype. *PLoS One* 9, e113910 (2014).
- 61 Akiyama, K., Ohga, N., Hida, Y., Kawamoto, T., Sadamoto, Y., Ishikawa, S., Maishi, N., Akino, T., Kondoh, M., Matsuda, A., Inoue, N., Shindoh, M. & Hida, K. Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDR1 up-regulation via VEGF signaling in tumor microenvironment. *Am. J. Pathol.* 180, 1283-1293 (2012).

- 62 Akiyama, K., Maishi, N., Ohga, N., Hida, Y., Ohba, Y., Alam, M. T., Kawamoto, T., Ohmura, H., Yamada, K., Torii, C., Shindoh, M. & Hida, K. Inhibition of multidrug transporter in tumor endothelial cells enhances antiangiogenic effects of low-dose metronomic paclitaxel. *Am. J. Pathol.* 185, 572-580 (2015).
- 63 Bark, H. & Choi, C. H. PSC833, cyclosporine analogue, downregulates MDR1 expression by activating JNK/c-Jun/AP-1 and suppressing NF-kappaB. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65, 1131-1136 (2010).
- 64 Liu, J., Zhou, F., Chen, Q., Kang, A., Lu, M., Liu, W., Zang, X., Wang, G. & Zhang, J. Chronic inflammation up-regulates P-gp in peripheral mononuclear blood cells via the STAT3/Nf-kappab pathway in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis mice. *Sci. Rep.* 5, 13558 (2015).
- 65 Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I. & Gottesman, M. M. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 361-398 (1999).
- 66 Baker, E. K., Johnstone, R. W., Zalcberg, J. R. & El-Osta, A. Epigenetic changes to the MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs. *Oncogene* 24, 8061-8075 (2005).
- 67 Sun, Y., Guan, Z., Liang, L., Cheng, Y., Zhou, J., Li, J. & Xu, Y. NF-kappaB signaling plays irreplaceable roles in cisplatin-induced bladder cancer chemoresistance and tumor progression. *Int. J. Oncol.* 48, 225-234 (2016).
- 68 Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J. R. & Melamed, M. R. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 38, 1277-1287 (1990).
- 69 Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I. & Willingham, M. C. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 159-164 (1989).
- 70 Gallo, J. M., Li, S., Guo, P., Reed, K. & Ma, J. The effect of P-glycoprotein on paclitaxel brain and brain tumor distribution in mice. *Cancer Res.* 63, 5114-5117 (2003).

- 71 Regina, A., Demeule, M., Laplante, A., Jodoin, J., Dagenais, C., Berthelet, F., Moghrabi, A. & Beliveau, R. Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier. *Cancer Metastasis Rev* 20, 13-25 (2001).
- 72 Hida, K., Maishi, N., Akiyama, K., Ohmura-Kakutani, H., Torii, C., Ohga, N., Osawa, T., Kikuchi, H., Morimoto, H., Morimoto, M., Shindoh, M., Shinohara, N. & Hida, Y. Tumor endothelial cells with high aldehyde dehydrogenase activity show drug resistance. *Cancer Sci.* (2017).
- 73 Jain, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307, 58-62 (2005).
- 74 Harada, A., Mukaida, N. & Matsushima, K. Interleukin 8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory diseases. *Mol. Med. Today* 2, 482-489 (1996).
- 75 Koch, A. E., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Harlow, L. A., DiPietro, L. A., Elner, V. M., Elner, S. G. & Strieter, R. M. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258, 1798-1801 (1992).
- 76 Kunkel, S. L., Standiford, T., Kasahara, K. & Strieter, R. M. Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung. *Exp. Lung Res.* 17, 17-23 (1991).
- 77 Wolff, B., Burns, A. R., Middleton, J. & Rot, A. Endothelial cell "memory" of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies. *J. Exp. Med.* 188, 1757-1762 (1998).
- 78 Arenberg, D. A., Kunkel, S. L., Polverini, P. J., Glass, M., Burdick, M. D. & Strieter, R. M. Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. *J. Clin. Invest.* 97, 2792-2802 (1996).
- 79 Balasoiu, M., Balasoiu, A. T., Mogoanta, S. S., Barbalan, A., Stepan, A. E., Ciurea, R. N., Alexandru, D. O., Enescu, A. & Mogoanta, L. Serum and tumor microenvironment IL-8 values in different stages of colorectal cancer. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 55, 575-578 (2014).
- 80 Liu, Y. N., Chang, T. H., Tsai, M. F., Wu, S. G., Tsai, T. H., Chen, H. Y., Yu, S. L., Yang, J. C. & Shih, J. Y. IL-8 confers resistance to EGFR inhibitors by inducing stem cell properties in lung cancer. *Oncotarget* 6, 10415-10431 (2015).

- 81 Singha, B., Gatla, H. R., Manna, S., Chang, T. P., Sanacora, S., Poltoratsky, V., Vancura, A. & Vancurova, I. Proteasome inhibition increases recruitment of IkappaB kinase beta (IKKbeta), S536P-p65, and transcription factor EGR1 to interleukin-8 (IL-8) promoter, resulting in increased IL-8 production in ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.* 289, 2687-2700 (2014).
- 82 Maxwell, P. J., Neisen, J., Messenger, J. & Waugh, D. J. Tumor-derived CXCL8 signaling augments stroma-derived CCL2-promoted proliferation and CXCL12-mediated invasion of PTEN-deficient prostate cancer cells. *Oncotarget* 5, 4895-4908 (2014).
- 83 Zheng, Y., Gardner, S. E. & Clarke, M. C. Cell death, damage-associated molecular patterns, and sterile inflammation in cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2781-2786 (2011).
- 84 Strilic, B., Yang, L., Albarran-Juarez, J., Wachsmuth, L., Han, K., Muller, U. C., Pasparakis, M. & Offermanns, S. Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature* 536, 215-218 (2016).
- 85 Petrylak, D. P., de Wit, R., Chi, K. N., Drakaki, A., Sternberg, C. N., Nishiyama, H., Castellano, D., Hussain, S., Flechon, A., Bamias, A., Yu, E. Y., van der Heijden, M. S., Matsubara, N., Alekseev, B., Necchi, A., Geczi, L., Ou, Y. C., Coskun, H. S., Su, W. P., Hegemann, M., Percent, I. J., Lee, J. L., Tucci, M., Semenov, A., Laestadius, F., Peer, A., Tortora, G., Safina, S., Del Muro, X. G., Rodriguez-Vida, A., Cicin, I., Harputluoglu, H., Widau, R. C., Liepa, A. M., Walgren, R. A., Hamid, O., Zimmermann, A. H., Bell-McGuinn, K. M., Powles, T. & investigators, R. s. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel in patients with locally advanced or metastatic urothelial carcinoma after platinum-based therapy (RANGE): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet* (2017).
- 86 Bani, M., Decio, A., Giavazzi, R. & Ghilardi, C. Contribution of tumor endothelial cells to drug resistance: anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors act as p-glycoprotein antagonists. *Angiogenesis* 20, 233-241 (2017).