HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	膀胱癌の浸潤・転移メカニズムの検討［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	松本, 隆児
Description	配架番号：2168
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11686号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58831
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryuji_Matsumoto_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　松本　隆児

学 位 論 文 題 名

膀胱癌の浸潤・転移メカニズムの検討
(Studies on mechanisms of invasion and metastasis in bladder cancer)

【背景】膀胱癌は腫瘍が粘膜層にのみ存在する筋層非浸潤性膀胱癌と、筋層にまで浸潤し転移する可能性がある浸潤性膀胱癌に大別される。浸潤性膀胱癌と診断されると根治的手術および尿路変更が必要となり、術後も再発・転移の確率が 50%以上と高い。一度再発・転移が認められると、治療薬は現在のところプラチナ製剤ベースの化学療法のみと限られており、5 年生存率は 10%未満と極めて予後不良である。以上より、膀胱癌の浸潤・転移を抑制する新たな治療薬の開発が望まれており、その基盤となる分子生物学的メカニズムの更なる解明が必要である。

従来の *in vitro* での癌細胞の解析は、実臨床における癌細胞の特性とは遺伝子発現や性質が異なることが明らかとなっており、癌の浸潤・転移メカニズムの解明には、個体レベルで癌細胞の周囲組織への浸潤や遠隔転移の一連の過程を解析することが重要と考えられる。そのために近年では動物実験モデルとして、さまざまな癌種において本来の癌発生臓器への移植（同所性移植）モデルを用いた浸潤・転移メカニズムの分子生物学的解析が行われている。膀胱癌の同所性移植転移モデルを使った検討はほとんどなく、同所性移植転移モデルを使用した浸潤・転移機能の解析は新たな知見や治療標的を導くのに有用と考えられる。

CRK（CT10 regulator of kinase）は，チロシンキナーゼと低分子量 G タンパク質活性化因子をリンクするが、自身は酵素活性をもたないアダプター分子であり、細胞の増殖、運動、接着を制御し、癌の浸潤・転移とも深く関与していることが知られている。様々なヒト癌種において悪性度に関与する分子であることが判明しているが、これまで腎泌尿器科領域での報告は少なく、高悪性度癌である浸潤性膀胱癌における CRK の機能解析を行うことは、その治療に結びつく可能性がある。

【目的】浸潤性膀胱癌に対して現在行われている治療は改善の余地があり、特に浸潤・転移の抑制は治療成績の向上に必須といえる。そのため現行の治療法に替わる、あるいは併用に耐えうる新規治療標的分子の発見を本研究の目的とした。

【方法】研究 1: ヒト浸潤性膀胱癌の転移・浸潤メカニズムを明らかにするために、ヌードマウスの膀胱にヒト浸潤性膀胱癌細胞株を同所移植し、*in vivo* imaging システムを用いて癌細胞の局所増殖・浸潤・転移を観察、膀胱浸潤部と転移巣から腫瘍細胞を初代培養・株化してその性質を解析した。*In vivo* マウスでの浸潤・転移の観察のために、luciferase2 および蛍光タンパク質 tdTomato をヒト浸潤性膀胱癌細胞株 UM-UC-3 に遺伝子導入した。同所移植には、6〜8 週齢雌のヌードマウスを使用した。24G の血管留置針をマウスの膀胱内に挿入し、癌細胞の付着を促すため poly-L-lysine を注入後 PBS で洗浄し、5 x 10^6 個の細胞を膀胱内に接種した。膀胱内に癌細胞が生着したマウスに対して、週 2 回 IVIS Spectrum を使用し、原発巣の増大および転移巣の有無を観察した。肺、肝臓、骨への転移を確認後、膀胱原発腫瘍細胞と各転移細胞株を樹立し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現変化を検

討、新たに見出した膀胱癌新規転移関連分子から Aldo-keto reductase (AKR) 1C1 に着目し、膀胱癌の転移・浸潤機構および化学療法耐性への関与についての解析を行った。
研究 2: アダプター分子 CRK に着目し、ヒト膀胱癌手術検体および浸潤性膀胱癌細胞株 T24、UM-UC-3、5637 において CRK の発現を免疫組織化学染色、半定量的 RT-PCR 法、ウエスタンブロッティング法にて検討した。CRK の過剰発現が認められた細胞株において、shRNA 法にて CRK ノックダウン細胞株を樹立し、それらの運動能・浸潤能・転移能を野生株と比較解析した。
【結果】研究 1: 同所性移植転移モデルを用いて、2 匹のマウスより膀胱原発細胞、肺・肝・骨への各転移細胞を分離培養することができた。網羅的遺伝子発現解析の結果、膀胱原発細胞に比べ肺・肝・骨転移細胞各々で共通して 2 倍以上発現が上昇している遺伝子を 8 つ認めた。特に発現亢進が著明な AKR1C1 について、real-time PCR 法とウエスタンブロット法により転移細胞における AKR1C1 が発現亢進していることを確認した。AKR1C1 の機能解析を目的に、siRNA 法で AKR1C1 knockdown したところ、invasion assay で浸潤能の有意な低下を認めた。AKR1C1 の発現亢進は、様々な癌種において抗癌剤耐性との関連が示されている。AKR1C1 発現亢進が著明な肝転移細胞、骨転移細胞で CDDP に対する感受性を調べたところ、AKR1C1 knockdown 細胞では野生型細胞に比べ CDDP 感受性が有意に低下していることを認めた。さらに AKR1C 阻害剤であるフルフェナム酸投与により肝転移細胞・骨転移細胞における CDDP 感受性の低下は解除された。ヒト膀胱癌検体の原発巣と転移巣で AKR1C1 の発現を real-time PCR と免疫組織染色で比較した結果、転移巣における AKR1C1 の発現は上昇していた。
研究 2: ヒト膀胱癌手術検体と膀胱癌細胞株で CRK の発現亢進を確認した。浸潤性膀胱癌細胞株 UM-UC-3 と 5637 細胞で CRK knockdown 細胞の運動能・浸潤能は野生型と比べ低下し、また、CRK knockdown 細胞において、HGF/c-Met シグナルと EMT 関連分子の発現が抑制された。ヌードマウスを用いた同所性移植転移モデルによって、CRK を抑制することが浸潤性膀胱癌の浸潤・転移を抑制することを確認できた。
【考察】研究 1: ヌードマウスを用いたヒト浸潤性膀胱癌同所性移植転移モデルによって、肺・肝・骨と多臓器から転移細胞株を樹立することができた。転移細胞と原発細胞との遺伝子発現変化を網羅的に調べた結果、新たな膀胱癌転移関連分子として AKR1C1 を見出した。ヒト手術検体でも転移による AKR1C1 の発現亢進を確認することができた。AKR1C1 の発現は細胞の浸潤・シスプラチン耐性と関連しており、膀胱癌に対する新たな治療標的分子として有望と考えられた。
研究 2: 浸潤性膀胱癌 の CRK knockdown 細胞を用いた検討で、CRK の発現を抑制することが HGF/c-Met シグナルおよび EMT の抑制につながり、*in vitro* で運動能・浸潤能が低下することを見出した。また、ヌードマウスを用いた同所性移植転移モデルによって、CRK 発現の低下により浸潤性膀胱癌の浸潤・転移を抑制でき、CRK をターゲットとした治療により浸潤性膀胱癌の治療成績が改善される可能性が示された。
【結論】膀胱癌同所性移植転移モデルによる *in vivo* での検討、*in vitro* での機能解析、およびヒト膀胱癌手術検体を用いた検討で浸潤性膀胱癌の新たな治療標的候補分子として AKR1C1 および CRK を同定した。