HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	膀胱癌の浸潤・転移メカニズムの検討［全文の要約］
Author(s)	松本, 隆児
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：2168 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/58832
Type	doctoral thesis
File Information	Ryuji_Matsumoto_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

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）

2015 年 3 月

北海道大学

松本隆児

研究１：浸潤性膀胱癌同所性移植転移モデルを用いた新規転移関連分子の探索と機能解析

【背景】

進行膀胱癌に対する治療成績の向上には、癌の臨床的特性を示す分子機構を探索し、それに基づく新規治療標的分子の同定が重要と考えられる。これまでにも膀胱癌の転移あるいは予後不良と関連する多くの分子が報告されている。しかしこれらの報告は、実際の癌の浸潤・転移過程、すなわち癌細胞の原発巣からの離脱、間質内への浸潤、脈管の破壊、脈管内への定着、脈管外への浸潤、転移先臓器への生着という過程を反映したものとはいえない。動物実験モデルの中でも同所性移植モデルを用いることで、より臨床的特性に近い癌浸潤・転移過程の解析が可能と考えられる。Luciferase による発光イメージングを用いた動物実験モデルは報告されて久しく、膀胱癌同所性移植モデルにおいてもその有用性が報告されている。近年、Luciferase を改良し数個の細胞から *in vivo* で検出できる Luciferase-2 (luc2)が発表され、膀胱癌転移モデルへの応用も報告されている。我々はこのモデルを改良して、膀胱癌同所性移植から転移細胞の分離培養を行い、マイクロアレイを用いて転移に関連する遺伝子発現変化を解析し、転移癌特異的治療標的の探索とその機能解析を行った。

【実験方法】

ヒト浸潤性膀胱癌細胞株 UM-UC-3 に発光酵素 luc2 と赤色蛍光蛋白質 tdTomato を遺伝子導入し、FACS を用いて tdTomato 陽性細胞を sorting し、100%陽性の UM-UC-3-tdTomato-luc2 細胞を樹立した。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 106 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、骨への転移を確認でき、膀胱原発腫瘍細胞と各転移細胞株を樹立した。膀胱細胞と各転移細胞の間の遺伝子発現変化をマイクロアレイにて網羅的に解析した。

【結果】

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(aldo-keto reductase family1, member C1)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。転移細胞で発現亢進していた炎症性サイトカインである IL-6 と IL-1βを浸潤性膀胱癌細胞株に添加したところ、IL-1βの添加で AKR1C1 の発現が亢進した。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、チロシンキナーゼ Src、FAK のリン酸化と Rac の発現が低下した。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、転移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。

【考察】

浸潤性膀胱癌の転移先臓器は、肺・肝・骨が多いと報告されている。本研究では、まず UM-UC-3-tdTomato-luc2 細胞を使って、臨床と同様に膀胱から肺・肝・骨に転移する膀胱癌同所移植転移モデルを用いて、それぞれの転移細胞株を分離培養した。臨床的に転移巣を切除することが少ない癌種においては、マウスを用いた同所性移植転移モデルは転移による遺伝子変化をみるのに適したモデルといえる。本研究で取り上げた AKR1C1 は、AKR1C ファミリーの 1 種であり、もともとはステロイドホルモンの代謝調節に関わる酵素としてしられていたが、近年では発がんとの関連や抗癌剤耐性との関連が報告されている。同じ AKR1C ファミリーである AKR1C3 では、最近前立腺癌や子宮頸癌において転移との関連が報告されているが、AKR1C1 と癌の浸潤・転移についての報告は本研究が初めてとなる。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：膀胱癌の浸潤・転移におけるシグナル伝達アダプター分子 CRK の役割

【背景】

シグナル伝達アダプター分子 CRK（CT10 regulator of kinase）は，ニワトリの肉腫誘導レトロウイルスがコードする癌遺伝子産物 viral-Crk から分離された癌遺伝子であり、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。CRK はチロシンキナーゼ Src の酵素活性調性領域である Src homology domain (SH) 2、SH3 を持ち、SH2-SH3 からなる CRK-Ⅰ、SH2-nSH3-cSH3 からなる CRK-Ⅱ、CRK-Ⅱと遺伝子座は

異なるものの CRK-Ⅱと同一の SH 領域からなる CRK-L が CRK の相同体として知られている。CRK の SH2 領域の標的分子として p130Cas、paxillin が、SH3 領域の標的分子として C3G、Dock180 が知られている。C3G、Dock180 は、グアニンヌクレオチド交換因子と呼ばれ、低分子量 G タンパクである R-Ras、Rap1、Rac を活性化している。Small hairpin RNA（shRNA） を用いた CRK を恒常的に発現抑制した系から、これら CRK のシグナルは細胞の増殖、運動、接着を制御していることが判明しており、最近では癌の浸潤・転移との関与を示唆する結果も報告されている。CRK が様々なヒト癌種において過剰発現していること、悪性度に関与する分子であることは判明しているが、これまで腎泌尿器科領域での報告は少なく、本研究では膀胱癌の浸潤・転移における CRK の役割を解析した。

【実験方法】

ヒト膀胱癌手術検体における CRK の発現を免疫組織化学染色と RT-PCR で確認した。次に、ヒト膀胱癌細胞株における CRK およびその関連タンパクの発現をウエスタンブロッティング、免疫沈降法を用いて検討した。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・浸潤能を野生株と比較解析した。CRK knockdown により CRK の上流因子である増殖因子受容体のリン酸化の発現変化および CKR の下流因子である EMT(epithelial mesenchymal transition)関連分子発現変化を検討した。さらに、同所性移植転移モデルを用いて、CRK knockdown による転移能の変化を比較検討した。

【結果】

ヒト膀胱癌手術検体において正常尿路上皮に比べ CRK の mRNA およびタンパク発現亢進を認めた。浸潤性膀胱癌細胞株では CRK-L より CRK と Dock180 および C3G の結合量が多いことがわかった。5637 細胞と UM-UC-3 細胞に対して shRNA 法を用いて CRK knockdown 細胞を樹立することができた。いずれの細胞でも CRK knockdown で細胞運動能、浸潤能、p130Cas のリン酸化が有意に低下していた。CRK 発現による EGFR、SMAD2、c-Met、PDGFR のリン酸化を検討した結果、いずれの細胞でも c-Met のリン酸化の発現低下を認めた。c-Met の唯一のリガンドである HGF の発現を検討したところ、UM-UC-3 細胞では全ての CRK knockdown 細胞で HGF の発現低下を認めたが、5637 細胞では c-Met リン酸化低下を認めるにもかかわらず HGF 発現量の低下していない CRK knockdown 細胞を認めた。CRK knockdown による EMT 関連分子の発現変化を検証したところ、N-cadherin の発現は CRK knockdown によりいずれの細胞でも mRNA、タンパク発現ともに有意に低下した。E-cadherin の発現は、CRK knockdown 効率のよい細胞で発現亢進を認めた。Vimentin、Zeb1 の

発現は UM-UC-3 CRK knockdown 細胞でのみ発現低下した。MMP-2 は 5637 細胞で knockdown 効率が良い細胞で発現低下を、MMP-9 は UM-UC-3 細胞で knockdown 効率が良い細胞で発現低下を認めた。HGF-c-Met/CRK シグナルが EMT 関連分子の発現を調整していると考え、c-Met 阻害剤である SU11274 を投与し EMT 関連分子の mRNA 発現レベルをコントロールと比較したところ、UM-UC-3 細胞では、E-cadherin の発現亢進、N-cadherin、Vimentin、Zeb1 の発現低下を認めた。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腫瘍形成能・浸潤能・転移能を抑制することを確認できた。

【考察】

本研究では、まず、膀胱癌における CRK の過剰発現を免疫組織染色と半定量的 RT-PCR 法で確認した。さらに今回の検証では、浸潤性膀胱癌において CRK を shRNA で knockdown すると c-Met のリン酸化は抑制され、さらに細胞内における HGF の発現量も抑制されることを見出した。また、それに伴って EMT 関連分子の発現も抑制されて細胞の浸潤・転移能は低下したと考えられる。これらの結果は、高悪性度癌である浸潤性膀胱癌に対する治療ターゲットして CRK が有望であることを支持するものと考えられる。

【研究１、研究２の結論】

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、浸潤性膀胱癌の浸潤・転移に関わる新たな治療標的候補分子として AKR1C1 および CRK を同定した。