

令和元年6月14日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16821

研究課題名(和文) セリン・スレオニンキナーゼBUB1の尿路上皮がんにおける悪性化寄与の機構解明

研究課題名(英文) Exploring the mechanism by which BUB1 confers malignant potential in urothelial carcinoma

研究代表者

小村 和正 (Komua, Kazumasa)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：10789853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱がん細胞株でDNA損傷誘導効果のある抗がん剤の耐性株を樹立し、BUB1の発現レベルをみたところ、複数の細胞株で有意にBUB1発現レベルの上昇が見られたため、マウスを用いて、BUB1を選択的に発現低下させて抗がん剤の効果を見ると、著明に効果があがることがわかった。DNA Damage Agent耐性細胞においてBUB1の過剰発現が修復エラーを引き起こしながら二重鎖切断を直すことにより、がん細胞が正常細胞とかけ離れたDNAをもつ機構の一端を解明した。BUB1阻害薬を用いて、この抗がん剤耐性機能を抑制することができる可能性があり、更なる研究を続けている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在国内で行われているゲノム医療の普及促進の一つの課題として、解析後のアウトプットとなる臨床治験を含む治療選択肢の拡充が挙げられると考えている。癌治療、研究において特定のKey Moleculeによる多彩な形質変化を明らかにすることは、患者様の発現差異による層別化を可能にし、さらにその変化に伴う治療ターゲットの発見がテーラーメイド医療を可能にする。本研究においてもBUB1 inhibitorによる治療効果予測因子を明らかにすることにより、個別化医療Precision Medicineへの発展を目指すとともに、来るべきゲノム医療で加療選択され得る治療オプションの一つとなる可能性を明らかにしたい。

研究成果の概要(英文)：TMT-based quantification analysis between treatment-naive and chemo-radiation resistant tumors identified 1640 proteins. We confirmed that GO term analysis of UniProtKB key words for upregulated proteins exhibited significantly upregulated DNA damage repair pathways and revealed that BUB1 (budding uninhibited by benzimidazoles 1) is the most significantly upregulated protein in chemo-resistant clones compared to treatment-naive tumor. We next developed experimental model to analyze the function of aberrant BUB1 expression upon DNA damage using digital droplet PCR and CRISPR-Cas9 system and revealed that upregulation of BUB1 activated alternative non-homologous end joining repair creating deletion and insertion sites at double strand break. In dataset analysis, upregulation of BUB1 is associated with poor outcome and notably, there was a significant correlation between increased BUB1 expression and tumor mutation burden suggesting the link to the effect of immune-checkpoint inhibition.

研究分野：泌尿器科

キーワード：膀胱癌 DNAダメージ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

日常、診療にて経験する泌尿生殖器がんは大きく大別して尿路上皮がん、腎細胞がん、前立腺がんに分類される。近年の報告でもみられるように、本邦でも高齢化社会に伴いこれらのがんは増加の一途を辿っている。

尿路上皮がんのうち膀胱がんは90%以上を占める悪性腫瘍であり、一般に欧米男性での発生頻度が高いとされる（全てのがんの新規診断における割合は2015年で4.6%）。本邦においても2015年度の新規診断予測数は21,300例（全てのがんでの新規診断における割合で約2.2%）、1年あたりの膀胱がんによる死亡数は約8100人であるが、尿管、腎盂内の尿路上皮から発生するがんを含めると更に多くなると推測される。

膀胱がんは大別すると、筋層非浸潤がん（Non-Muscle Invasive Bladder Cancer : NMIBC）と筋層浸潤がん（Muscle Invasive Bladder Cancer : MIBC）に分けられ、その治療予後は大きく異なる。NMIBCでは経尿道的膀胱腫瘍切除術、膀胱内薬剤注入療法により5年生存率は約90%となっているが、膀胱内再発率は約40-50%であり粘膜内に繰り返す再発が問題となる。さらに、腫瘍組織が粘膜層を超えて筋層に浸潤しMIBCとなってしまうと、より集学的な加療が必要となり5年生存率も約50%（Stage II : 約63%、Stage III : 約46%）と予後も悪くなる。転移を有しStage IVとなると5年生存率は約15%であり、現在も抗がん剤化学療法以外に有意に予後を改善し得る治療ターゲットはほとんど示されていない。

申請者は、これまでに泌尿生殖器系のがんにおいて特定の染色体が病状の進行により細胞分裂時に細胞核より抜け落ちる、もしくは重複することを示唆するデータを発表した（Komura et al. 2016, Proc Natl Acad Sci U S A）。これは、がん細胞内において細胞分裂時に染色体が均等に分配されないためにおこるとされており染色体不安定性（Chromosomal Instability）と呼ばれる。染色体不安定性を示す細胞は染色体の数が増えたり減ったりする異数性（Aneuploidy）を示す。異数性は、がん遺伝子のコピー数の増加やがん抑制遺伝子のコピー数の減少・欠失を介し、細胞のがん化だけでなくがん細胞の形質の悪性化の引き金にもなると考えられている。申請者は、膀胱がんにおいてNMIBCとMIBCで発現に差異の見られるBUB1遺伝子について注目している。BUB1は細胞の分裂期チェックポイントで働き細胞周期を正常に作動するために必須のセリン・スレオニンキナーゼとして約30年前に同定されたが、その後、BUB1が分裂期においてヒストンH2Aの120番目のスレオニン残基をリン酸化することにより、微小管による姉妹染色分体の二方向性接続、均等な染色体の分配に中心的な役割を果たしていることが近年示された（Kawashima et al. 2010, Science）。さらにBUB1の機能不全が染色体不安定性をもたらす発がんへとつながる可能性を示すデータが報告され（Baker et al. 2009, Cancer Cell）、BUB1はがん抑制遺伝子として広く知られることとなった。これに対し、2011年、トランスジェニックマウスを用いた研究によりBUB1の過剰な発現が、細胞分裂時の動原体周辺微小管に局在するAurora B蛋白の異常活性化につながり、結果的に染色体不安定性を引き起こすことにより発がんプロセスに寄与する、という相反するデータが発表された（Ricke et al. 2011, J Cell Biol）。同グループは、翌年さらにBUB1の機能不全は染色体分配エラーと異数性を引き起こすが、発がんへの作用は見られなかった、と報告している（Ricke et al. 2012, J Cell Biol）。本邦においては同じ泌尿器がんである腎細胞がんにおいて、予後の悪いとされるDNAメチレーションパターン（CpG island methylator phenotype : CIMP）をもつ群において、細胞分裂期のチェックポイント遺伝子群が高発現しており、BUB1の発現が高いことが示されている（Arai et al. 2015, Int J Cancer）。さらに、近年、BUB1がTGF-beta受容体群と結合することによりそのパスウェイの活性化に重要な働きをしていることが明らかにされ、実際にBUB1のノックダウンにより、上皮間葉転換（Epithelial-mesenchymal transition : EMT）、遊走能、浸潤能などが抑制されることが示されており（Nyati et al. 2015, Sci Signal）、がん細胞におけるBUB1の分子生物学的な重要性が再認識されつつある。

2. 研究の目的

本研究では尿路上皮がんにおけるセリン・スレオニンキナーゼ蛋白BUB1の機能を解明し、治療ターゲットとしての可能性を明らかにする。従来、転移を有する進行性尿路上皮がんへの治療は抗がん剤化学療法が主に施行されるが、最終的には薬剤耐性獲得による病状進行により5年生存率は約15%に留まっている。申請者は進行性膀胱がんにおいてBUB1の発現レベルが有意に上昇している点に注目し、本研究において既に構築しているin vitro, in vivo実験系によりBUB1の分子生物学的な機能解析を実施、さらに治療への応用の可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

現時点において、尿路上皮がんにおいての詳細な BUB1 の機能解析と治療ターゲットとしての可否を検討したデータは発表されていない。
研究期間内に次の 3 点を明らかにする。

- *in vitro* 実験系を用いて、BUB1 の発現レベルにより膀胱がん細胞株に起こる形質変化を明らかにする。
- 臨床サンプルを用いて、BUB1 とその他の Clinical Factors との相関について検討し、発現レベルの臨床予後への影響を明らかにする。
- *in vitro* 実験系の結果をもとに、BUB1 もしくはその近傍の治療ターゲットを同定、*in vivo* 実験系にて検証し、臨床応用への可能性を明らかにする。

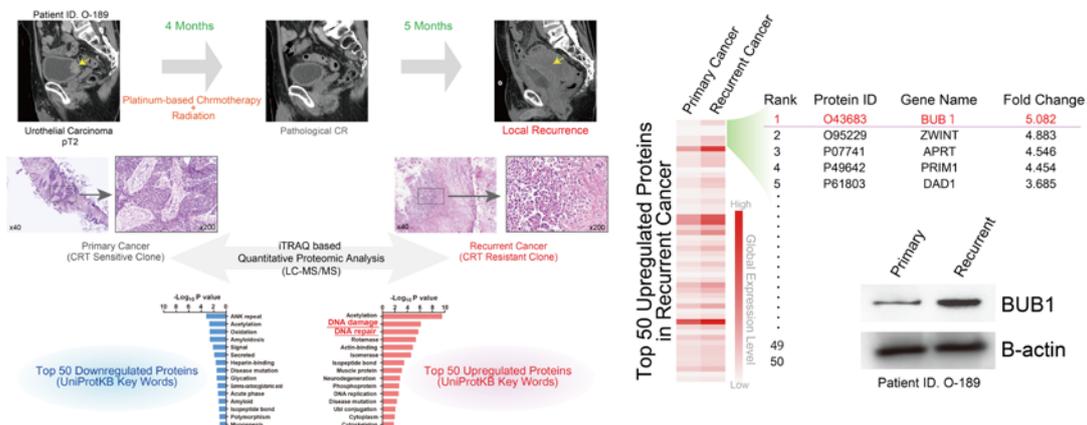
初年度においては、申請者が既に実施しているデータをもとに *in vitro* 実験系をもちいて BUB1 の発現レベル変化による分子細胞学的な解析をおこなう。具体的には siRNA によるノックダウンの実験結果をもとに、最適と考えられる膀胱がん細胞株を用いて shRNA をデザインし、レンチウイルスベクターを用いて Stable 細胞株を樹立し、Endogenous の BUB1 の機能解析に用いる。また、並行して臨床サンプルを用いた BUB1 の免疫組織染色のプロトコールについても最適化を図る。

2 年目以降においては、初年度に実験結果により *in vivo* での BUB1 機能解析をおこなう。Stable 細胞株を用いての Xenograft による解析の他に、得られるデータから明らかになるパスウェイ、標的分子の阻害薬等を用いてマウスでの治療効果について検証する。また、臨床サンプルでの発現レベルの差異と臨床予後との相関についても明らかにする。

4. 研究成果

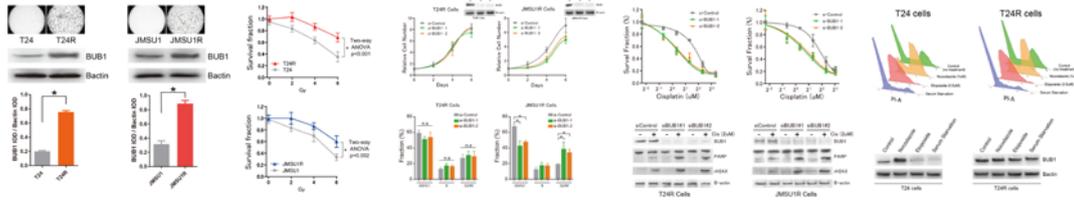
本学バイオバンク検体をもちいて、同一症例での Chemoradiation 加療後再発症例の加療前後の検体を用いて iTRAQ based Quantitative Proteomic Analysis (LC-MS/MS) でタンパク発現を網羅的に解析した。解析で明らかになった 1640 の蛋白のうち、CRT 再発症例で発現が上昇、低下していた Top 50 のタンパク質について UniProtKB Key Words で GO term 解析をおこなった。CRT 耐性クローンにおいて発現上昇のみられるタンパク群では DNA-damage, DNA-repair pathway の亢進がみられおり、臨床での DNA damaging agent への耐性をよく反映していた。CRT 再発クローンで有意に発現亢進のみられているタンパク質として BUB1 を Top candidate として同定した。

1: 網羅的タンパク発現解析による、放射線化学療法 CRT 施行再発症例での BUB1 (Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1) の同定



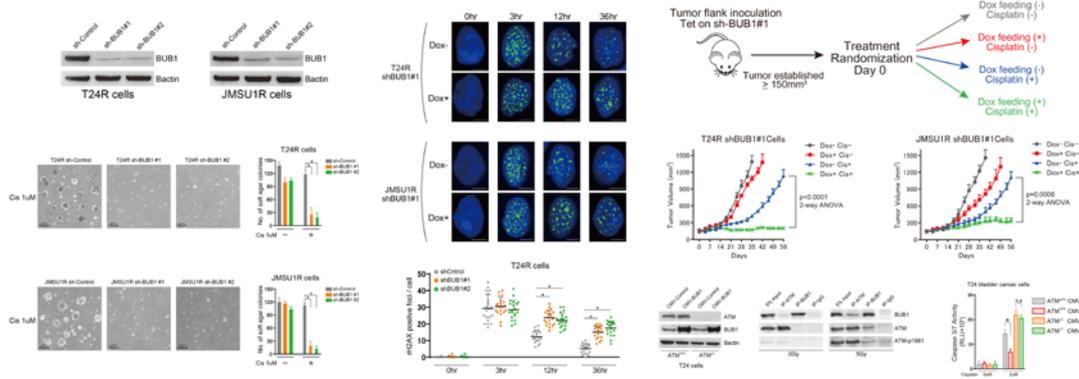
尿路上皮がん細胞株 T24、JMSU1、5637、2 5 3 JBV を用いて、シスプラチン耐性株を樹立した。そのうち T24R、JMSU1R 細胞株にて有意な BUB1 の発現亢進をみとめ、シスプラチン含有 Soft Agar での足場非依存的増殖の亢進と、Radiation への体制を確認した。Cell Cycle Assay では JMSU1R では BUB1 ノックダウンにより G2/M での停滞が見られていたが、T24R では見られなかった。このことから、BUB1 の発現上昇が、従来報告されている M phase の Spindle Checkpoint での作用だけにとどまらない可能性があると考えられた。T24R、JMSU1R 細胞株ともに BUB1 ノックダウンによりシスプラチンへの感受性回復がみられた。また、BUB1 発現を細胞周期同調剤で処理したうえで確認すると、Parent Cell では G2/M 期で特異的に発現が見られているが、耐性株では、この細胞周期ごとの発現調整がなくなり、Constitutive Active の状態となっていることが明らかになった。

2: シスプラチン耐性尿路上皮がん細胞株 T24R、JMSU1R での BUB1 発現上昇、CRT 耐性の確認と従来の BUB1 の作用以外に DNA 修復への寄与を示唆する、G1/S phase での恒常的発現上昇



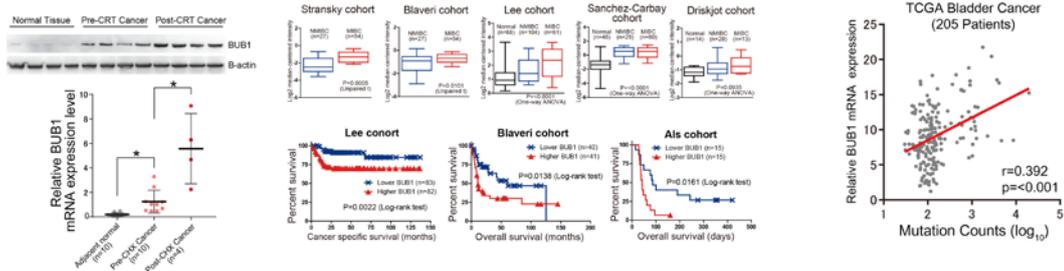
T24R、JMSU1R 細胞株への PLKO-tet-on sh-BUB1 の導入により、両細胞を Doxycycline 10ng/ml、シスプラチン 1μM 添加下の Soft Agar で培養した。BUB1 ノックダウンによるシスプラチンへの感受性の上昇を認めた。また、Radiation 5Gy 照射後に DNA 二重鎖切断のマーカである rH2AX の発現量を経時的に評価したところ、Doxycycline 添加による BUB1 ノックダウンの状態では、優位に rH2AX positive foci 陽性の遷延が見られていた。In vivo にて T24R、JMSU1R の Flank Inoculation での Xenograft 実験系を樹立し、DOX feeding の有無によるシスプラチン感受性を確認したところ、In vitro と同じく BUB1 ノックダウンによるシスプラチン耐性の消失が見られた。さらに、T24 細胞株にて CRISPR-cas9 にて s g ATM を導入後、シングルセルクローニングにて ATM homozygous deletion のクローンを樹立して、CO-IP にて BUB1 との相互作用を解析した。放射線照射による ATMp-1981 が BUB1 と Physical Interaction を示すこと、また BUB1 発現上昇による DNA Repair 亢進が ATM 依存性であることを明らかにした。

3: Teton-Inducible sh-BUB1 細胞株での BUB1 ノックダウンによる CRT 耐性形質の消失と、シングルセルクローニングによる ATM homozygous loss 細胞株での ATM に依存した BUB1 の DNA repair への寄与



本学バイオバンク検体をもちいて CRT 耐性症例での BUB1 発現亢進、データベースで予後不良因子としての確認をおこなった。BUB1 発現亢進と遺伝子変異数は有意に正相関しており、Error-Prone Repair 仮説をサポートするものであった。

4: CRT 耐性クローンでの BUB1 発現上昇と、予後との相関、Errone-Prone Repair による遺伝子変異数との正相関



これにより、DNA Damage Agent 耐性クローンにおいて BUB1 の過剰発現が Error-Prone DNA Repair を亢進しており、さらに Genomic Instability を引き起こすことにより、Tumor Heterogeneity を獲得していることを明らかにした。現在 BUB1 阻害薬を使用することにより、抗がん剤耐性への影響と、PD1 阻害薬との併用等について更なる研究を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- ① Kuranaga Y, Sugito N, Shinohara H, Tsujino T, Taniguchi K, Komura K, Ito Y, Soga T, Akao Y. SRSF3, a Splicer of the PKM Gene, Regulates Cell Growth and Maintenance of Cancer-Specific Energy Metabolism in Colon Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 査読有. 19(10):pii: E3012 online.2018.doi: 10.3390/ijms19103012.
- ② Inamoto Teruo, Uehara Hirofumi, Akao Yukihiko, Ibuki Naokazu, Komura Kazumasa, Takahara Kiyoshi, Takai Tomoaki, Uchimoto Taizo, Saito Kenkichi, Tanda Naoki, Yoshikawa Yuki, Minami Koichiro, Hirano Hajime, Nomi Hayahito, Kato Ryuji, Hayashi Tetsuya, Azuma Haruhito. A Panel of MicroRNA Signature as a Tool for Predicting Survival of Patients with Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Disease Markers*. 査読有. online.2018.doi: 10.1155/2018/5468672.
- ③ Sun Tong, Du Shin-Yi, Armenia Joshua, Qu Fangfang, Fan Jingyu, Wang Xiaodong, Fei Teng, Komura Kazumasa, Liu Shirley X., Lee Gwo-Shu Mary, Kantoff Philip W. Expression of lncRNA MIR222HG co-transcribed from the miR-221/222 gene promoter facilitates the development of castration-resistant prostate cancer. *Oncogenesis* 査読有. 7(3):30.2018. doi: 10.1038/s41389-018-0039-5.
- ④ Tsujino T, Komura K, Matsunaga T, Yoshikawa Y, Takai T, Uchimoto T, Saito K, Tanda N, Oide R, Minami K, Uehara H, Jeong SH, Taniguchi K, Hirano H, Nomi H, Ibuki N, Takahara K, Inamoto T, Azuma H. Preoperative Measurement of the Modified Glasgow Prognostic Score Predicts Patient Survival in Non-Metastatic Renal Cell Carcinoma Prior to nephrectomy. *Ann Surg Oncol*. 査読有. 24(9):2787-93.2017. doi:10.1245/s10434-017-5948-6.
- ⑤ Takuya Tsujino, Kazumasa Komura, Atsushi Ichihashi, Takeshi Tsutsumi, Tomohisa Matsunaga, Yuki Yoshikawa, Ryoichi Maenosono, Kyohei Okita, Tomoaki Takai, Rintaro Oide, Koichiro Minami, Hirofumi Uehara, Kohei Taniguchi, Hajime Hirano, Hayahito Nomi, Naokazu Ibuki, Kiyoshi Takahara, Haruhito Azuma. The combination of preoperative platelet count and neutrophil lymphocyte ratio as a prognostic indicator in localized renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 査読有. 8(66):110311-25.2017.doi: https://doi.org/10.18632/oncotarget.22688.
- ⑥ Inamoto T, Matsuyama H, Sakano S, Ibuki N, Takahara K, Komura K, Takai T, Tsujino T, Yoshikawa Y, Minami K, Nagao K, Inoue R, Azuma H. The systemic inflammation-based Glasgow Prognostic Score as a powerful prognostic factor in patients with upper tract urothelial carcinoma. *Oncotarget*. 査読有. 8(68):113248-57.2017. doi: 10.18632/oncotarget.22641. eCollection 2017 Dec 22.

〔学会発表〕(計 6 件)

- ① 小村 和正, 伊夫貴 直和, 稲元 輝生, 東 治人. 限局性前立腺癌の高密度焦点式超音波療法での PSA Flare の意義の検討. 第 31 回日本泌尿器内視鏡学会総会. 2017 年.
- ② Kazumasa Komura, Seong Ho Jeong, Kunihiko Hinohara, Gwo-Shu Mary Lee, Christopher J. Sweeney, Haruhito Azuma, and Philip W. Kantoff. Decreased Expression of Male Specific Histone Demethylase “KDM5D” is Prognostic for Development of Castration-Resistant Prostate Cancer. AUA 2017 Annual Meeting. 2017.
- ③ Kazumasa Komura, Takuya Tsujino, Naokazu Ibuki, Teruo Inamoto, Haruhito Azuma. combination of platelet count and neutrophil to lymphocyte ratio (COP-NLR) for prediction of treatment outcome for patients with localized renal cell carcinoma. 2018 Genitourinary Cancers Symposium. 2018.

④ Komura K, Inamoto T, Ibuki N, Sweeney C, Azuma H, Kantoff P. Aggressive prostate cancer by the loss of male specific histone demethylase 'KDM5D'.EAU 2018.

⑤ 小村和正, 稲元輝生、伊夫貴 直和、上原博史、西田 剛、小山耕平、平野 一、能見勇人、東 治人. 放射線化学療法耐性尿路上皮がんにおける Error-Prone DNA Repair の異常亢進と臨床への治療応用. 第 107 回日本泌尿器科学会総会. 2019 年

⑥ Komura K, Inamoto T, Uehara H, Ibuki , Minami K, Tsujino T, Azuma H. Aberrant Error-Prone DNA Damage Repair as a Potential Therapeutic Target in Advanced Urothelial Carcinoma.EAU2019.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。