

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09138

研究課題名(和文)放射線被曝間質細胞が尿路上皮癌の生存・増殖・浸潤に及ぼす影響について

研究課題名(英文)Irradiated fibroblast-induced bystander effects on the apoptosis, growth and invasive of urothelial carcinoma under cancer&#8211;stromal cell interaction

研究代表者

川崎 麻己(MAKI, KAWASAKI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：00448474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：放射線被曝ATSCsは非筋層浸潤性膀胱癌の増殖抑制、アポトーシス促進因子として、筋層浸潤性膀胱癌は、放射線被曝ATSCsは増殖抑制・浸潤促進因子として働いた。増殖関与moleculeとして ERK, p38, Akt, mTOR, p-70S6kinase, p-CREB, p-HSP27, JNKなどの分子が発現変化あり、癌細胞動態の仲介因子と考えられた。放射線被曝ATSCsによるRadiation-induced bystander effectsにより、53BP1が、細胞質から核内に集積が移行した。浸潤形態により、異なるMAPK経路の細胞動態制御因子が癌の進展に関与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋層浸潤性膀胱癌の一般的な治療法は、膀胱全摘術と尿路変更術、抗癌剤や放射線治療である。近年、高齢化社会に伴い手術が困難な局所の浸潤・転移を伴う症例や、根治術に耐えられない全身状態の高齢者患者が増加しており、治療法に苦慮している。腎機能障害のため化学療法や放射線療法が十分に施行できない症例もある。最近、PD1抗体などの免疫治療薬と放射線療法併用療法の治験が開始されている。今回、我々が確立した膀胱癌一放射線被曝間質細胞モデルは、シンプルかつ明瞭解析可能なモデルであり、薬剤投与を行い薬剤耐性・治療効果判定などに応用できる可能性が高いと考える。

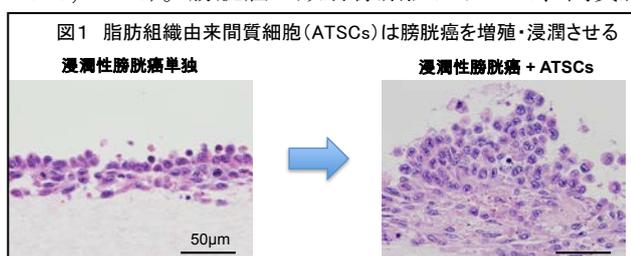
研究成果の概要(英文)：Irradiated adipose tissue stromal cells (ATSCs) significantly inhibited the growth and promoted apoptosis of non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) than that of ATSCs. In contrast, irradiated ATSCs inhibited growth of muscle invasive bladder cancer (MIBC) than that of ATSCs. Irradiated ATSCs promoted the invasion of MIBC. 53BP1 translocation into the nucleus was observed due to the bystander effect in bladder cancer. Irradiated ATSCs controlled the expression of extracellular signal-regulated kinase 1/2, p38, Akt in UC. Irradiated ATSCs promotes invasion and inhibited growth of MIBC, in contrast that inhibited the growth of NMIBC by MAPK molecules mediated bystander mechanism. Our alternative culture model may provide a promising tool for the further radiation therapy into many types of cancer.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：bystander effect 膀胱癌 間質細胞 脂肪組織由来間質細胞 癌-間質相互作用

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌の放射線療法では、癌組織に存在する癌細胞だけではなく、線維芽細胞や脂肪細胞などの間質細胞も放射線に被曝し影響を受ける。近年、放射線被曝細胞が、近傍の細胞に活発な影響を与えることが示唆されており、この放射線被曝細胞が誘導する影響は、“Radiation-induced bystander effects” と呼ばれている (Mothersill C and Seymour C. *Curr Cancer Drug Targets* 6: 447-454, 2006)。放射線に被曝した線維芽細胞や脂肪細胞などの間質細胞が、膀胱癌細胞に与える影響は不明である。一方、癌-間質細胞相互作用は、癌生物学の中心課題の1つである。即ち、間質細胞が癌細胞の増殖・浸潤・転移を調節し、さらに、上皮細胞に腫瘍化シグナルを誘導し、発癌にも関与することが知られている (Tlsty TD, et al. *Curr Opin Genet Dev* 11: 54-59, 2001)。我々は、膀胱組織の周囲や間質内に存在する間質細胞が、浸潤性膀胱癌細胞の増殖や浸潤を促進することを見いだした (図1) (Nanri M, Toda S, et al. *International Journal of Urology* 23: 510-519, 2016)。膀胱癌の放射線療法において、間質細胞の線維芽細胞や脂肪細胞が放射線により影響を受けて



変容し、膀胱癌細胞の生存・増殖・浸潤・遊走・転移巢形成に、活発に影響を与えていると推測される。しかし、膀胱癌細胞と放射線被曝間質細胞との相互作用は重要であるにもかかわらず、その研究は、国内外に報告はなく、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

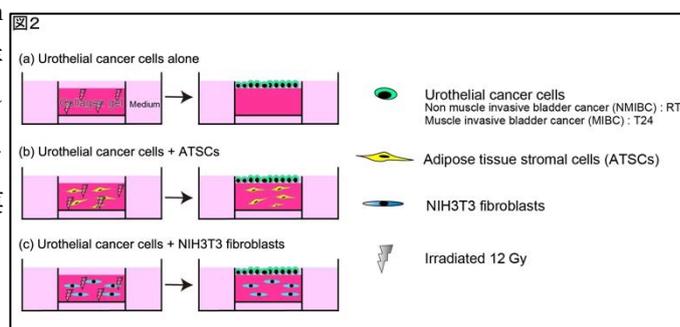
本研究では、膀胱癌細胞の生存・増殖・浸潤・遊走・転移巢形成における、放射線被曝線維芽細胞や脂肪細胞の役割とその制御機構を解明するが目的である。本研究により①膀胱癌の間質細胞標的放射線法の開発②放射線療法後の2次発癌の発病機構の解明が期待できる。

3. 研究の方法

1) **材料**: ① 癌細胞: 膀胱癌細胞株(筋層非浸潤性膀胱腫瘍: RT4 筋層浸潤性膀胱腫瘍: T24) ② 間質細胞: a) 生後1週間の wister rat の皮下脂肪から単離した脂肪組織由来間質細胞(Adipose tissue stromal cells): と線維芽細胞株 (NIH3T3s) b) 同じく皮下脂肪を細切した脂肪組織

2) 培養システム: Collagen gel invasion assay system

を用いる (図2)。外皿に間質細胞である線維芽細胞や脂肪細胞 (100 万個) を I 型コラーゲンゲル内に包埋し、1日培養後 12 Gy の放射線を照射する。その後、底面がニトロセルロース膜から成る内皿に、コラーゲンゲル層を作製し、そのゲル上に、癌細胞 (100 万個) を播種し、この内皿を外皿に入れ培養する。



3) 細胞の生存・増殖・浸潤・遊走の解析:

培養1,2週毎で、癌細胞のアポトーシス/増殖を Ki-67, CC3 の免疫染色で検討し、癌細胞のゲル内浸潤を染色切片にて測定した。さらに、細胞浸潤・遊走関連分枝である MAPK pathway, MMP-1, 2, 7, 9, filamin A の発現を免疫染色、Western blot を用いて解析する。

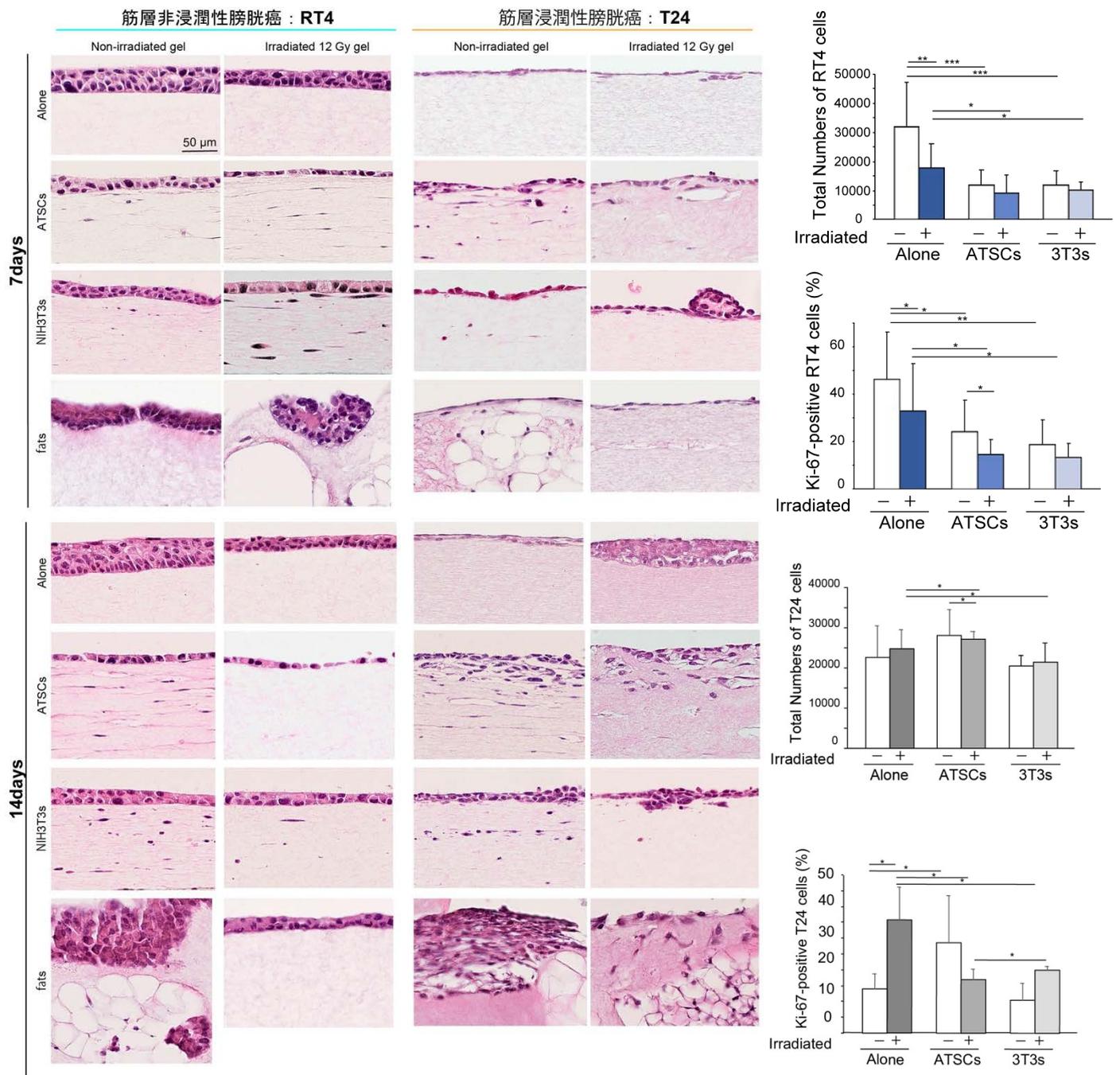
4) 放射線被曝間質細胞の癌細胞に与える影響の可逆性、不可逆性の検討：

癌細胞における遺伝子不安定性マーカーである 53BP1 の発現を蛍光免疫染色で比較検討する。以上の実験により、放射線被曝線維芽細胞と脂肪細胞の癌細胞の生存・増殖・浸潤・遊走能及び遺伝子不安定性に与える影響とその相違を解明する。

4. 研究成果

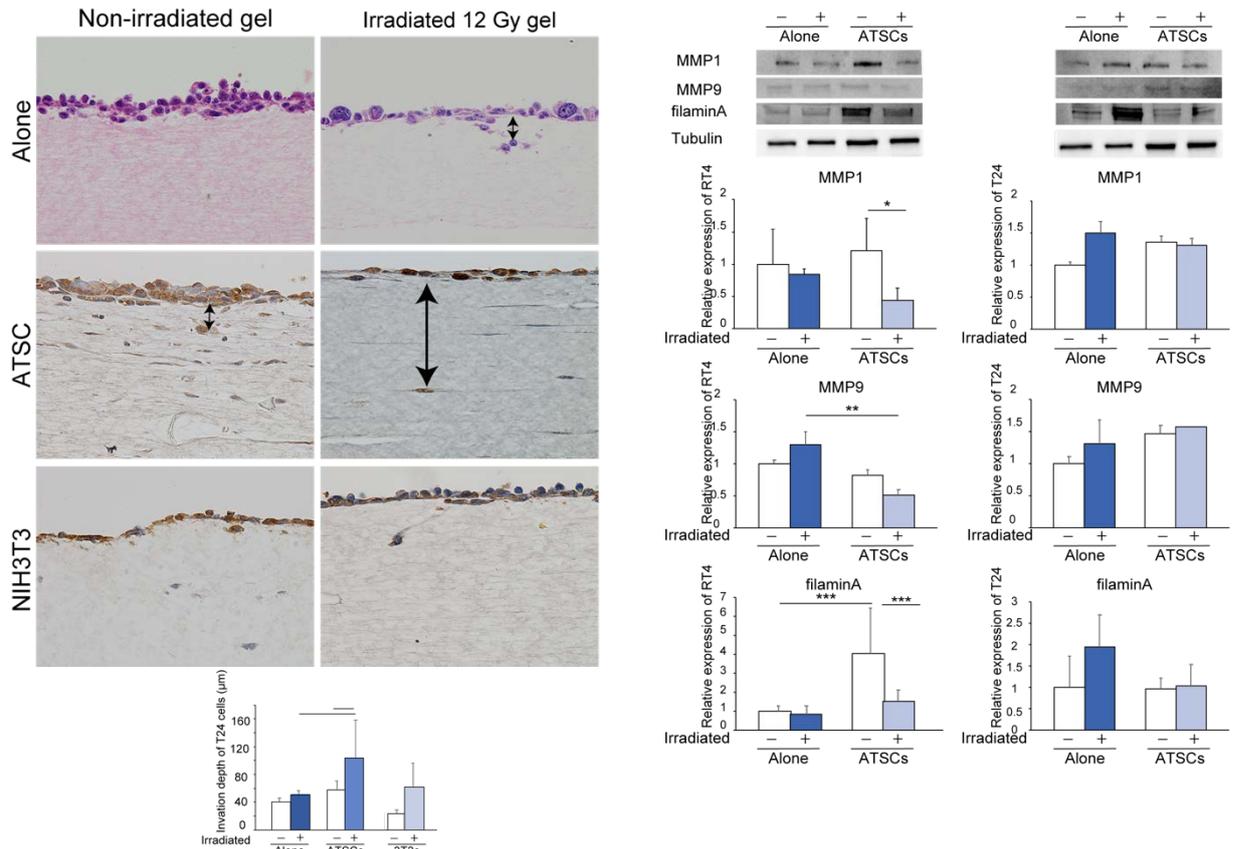
1. 脂肪組織由来被曝間質細胞 (ATSCs)、脂肪細胞が膀胱癌の生存・増殖・浸潤に与える影響

放射線被曝間質細胞 (ATSCs/NIH3T3s) は、間質細胞と比較し、筋層非浸潤膀胱癌に対して増殖抑制、アポトーシス促進の働きを増強させた。筋層浸潤膀胱癌においては、放射線被曝間質細胞は癌細胞の増殖抑制をしたが、ゲル内浸潤は促進された。一方、脂肪細胞は、筋層非浸潤膀胱癌・筋層浸潤膀胱癌ともに2週間の培養で、増殖浸潤能を促進させた。放射線被曝脂肪細胞は、初代培養の脂肪細胞が2週間培養できず、ゲル内でアポトーシスを起し、再現性が見られなかった。よって以下の実験は、放射線被曝間質細胞 (ATSCs/NIH3T3s) が膀胱癌細胞に与える影響について解析を行なった。



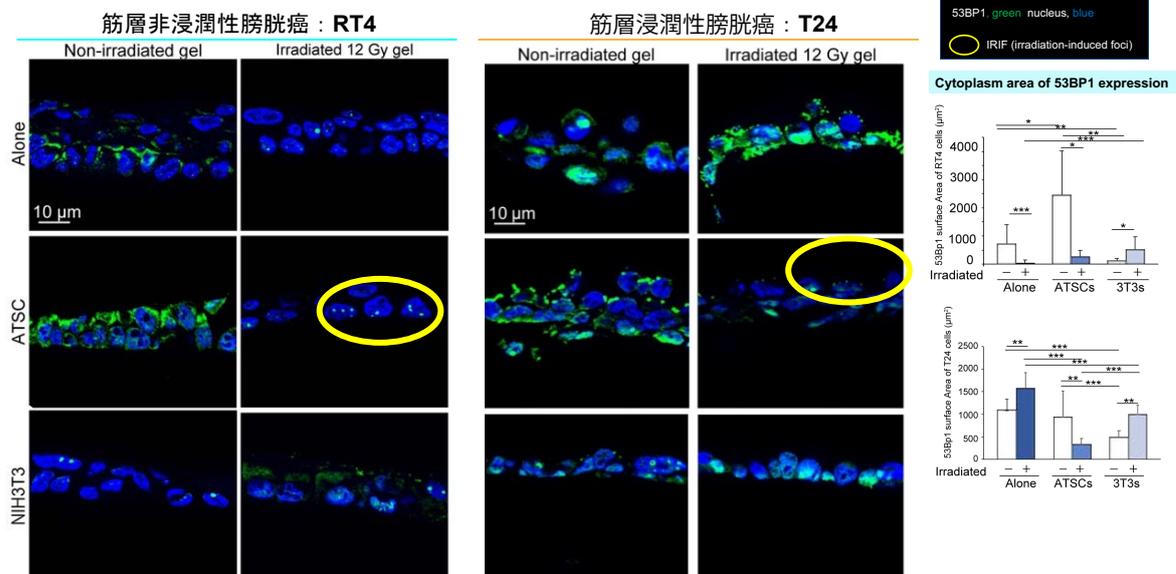
2. 脂肪組織由来被曝間質細胞(ATSCs)が筋層浸潤性膀胱癌の浸潤形態に与える影響

放射線被曝 ATSCs により、筋層浸潤性膀胱癌のゲル内浸潤が促進された、1 週間より 2 週間の方がより浸潤が促進された。放射線被曝 NIH3T3 fibroblasts との共培養でも同様ゲル浸潤が促進されたが、ATSCs との共培養群の方が浸潤の強度が大きかった。浸潤関連因子として MMP-1, -9, filaminA の癌内タンパク発現を western blots 法にて解析した。ゲル内浸潤を起さなかった筋層非浸潤性膀胱癌では、放射線被曝 ATSCs との共培養で発現が優位に低下していたが、筋層浸潤性膀胱癌ではタンパクの発現の差は見られなかった。これらの発現抑制がかかることにより筋層非浸潤性膀胱癌では、ゲル内浸潤が見られなかったと示唆された。



3. 遺伝子不安定性マーカーである 53BP1 の核内集積発現の検討

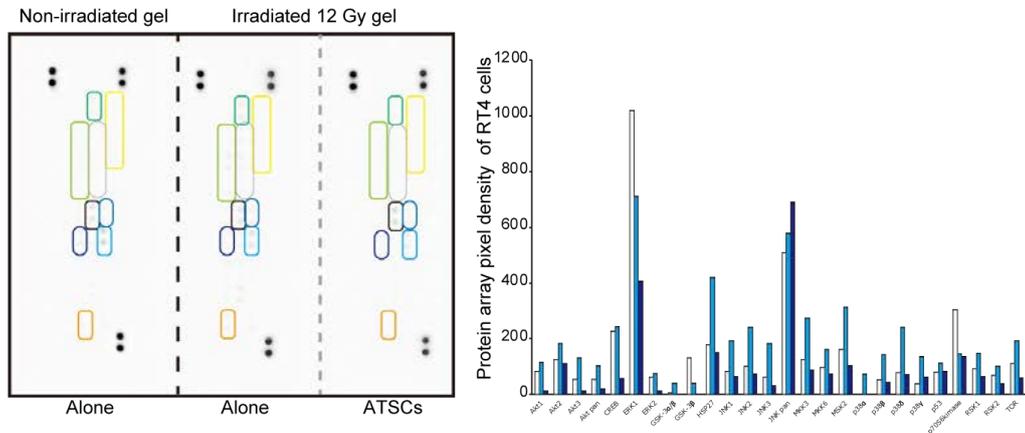
53BP1 は非浸潤性膀胱癌では細胞質、浸潤性膀胱癌では核内に発現していた。ゲル内に照射のみで非浸潤性膀胱癌では核内集積が見られ、逆に浸潤性膀胱癌では、核外へと移行した。非浸潤性膀胱癌・浸潤性膀胱癌ともに、放射線被曝 ATSCs による Radiation-induced bystander effects により、53BP1 が、細胞質から核内に集積が移行した。放射線被曝 3T3s により非浸潤性膀胱癌・浸潤性膀胱癌とも核内集積発現が促進された。



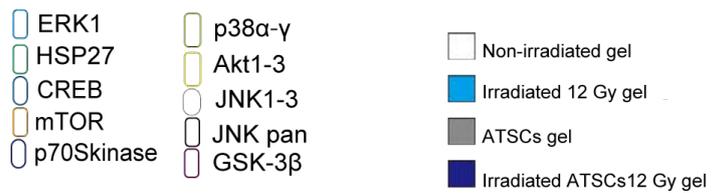
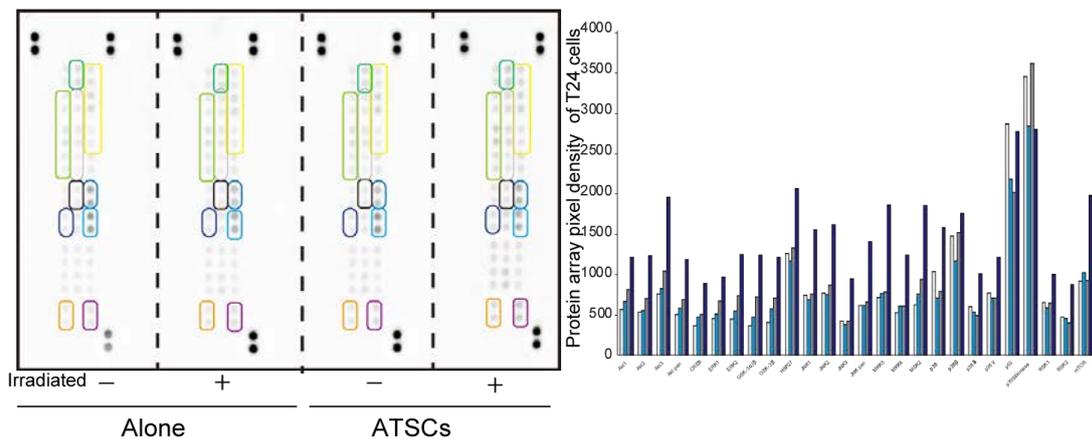
3. 脂肪組織由来被曝間質細胞(ATSCs)が筋層浸潤性膀胱癌に与える影響

抗体 array や Western blot で増殖に関与する MAPKK 系の molecule の検索を行った。p-ERK/ERK, p-p38/p38, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR, p-70S6kinase, p-CREB, p-HSP27, p-JNK/JNK などの分子が発現し、癌細胞動態の仲介因子と考えられた。

筋層非浸潤性膀胱癌：RT4



筋層浸潤性膀胱癌：T24



上記より、Radiation-induced bystander effects により、ATSCs が非浸潤性膀胱癌ではアポトーシス促進因子となるが、浸潤性膀胱癌では増殖・浸潤促進因子になることが示唆された。非浸潤性膀胱癌と浸潤性膀胱癌では、それぞれ異なる MAPK 経路の細胞動態制御因子が癌の進展に関与すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 南里 麻己
2. 発表標題 放射線被曝線間質細胞が及ぼす膀胱癌の生存・増殖・浸潤への影響
3. 学会等名 第29回泌尿器分子・細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南里 麻己
2. 発表標題 Bystander effect of adipose tissue stromal cells regulates the malignant potential of urothelial carcinoma
3. 学会等名 日本泌尿器科学会総会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南里 麻己
2. 発表標題 放射線被曝繊維芽細胞が膀胱癌に与える影響についての検討
3. 学会等名 泌尿器分子細胞研究会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	野口 満 (Mitsuru Noguchi) (00325648)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	東武 昇平 (Shohei Tobu) (50647021)	佐賀大学・医学部・准教授 (17201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関