

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16710

研究課題名（和文）尿路上皮癌微小環境における新規上皮間葉転換制御機構の解明

研究課題名（英文）Epithelial to mesenchymal transition in urothelial cancer

研究代表者

大門 達明（DAIMON, TATSUAKI）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：40573275

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：ヒト尿路上皮癌細胞株におけるEPB4.1L5の発現と各種転写因子等、EMT関連タンパクの発現の検討として浸潤能が異なる各種ヒト尿路上皮癌の細胞株T24、UMUC-3、5637を用い EPB4.1L5の発現を検討した。タンパク発現量はUMUC-3>T24>5637の順にであり、浸潤能の傾向と一致した。低酸素状態ではEMT関連転写因子の発現は高くなるものの、EPB4.1L5の発現はむしろ低下する結果となった。また、HIF-1 阻害剤下においても、発現に変化は認めなかった。シスプラチン耐性株での検討を行ったところ、EMT関連転写因子の発現は高くなるものの、EPB4.1L5の発現に変化は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

浸潤、転移を有する難治性尿路上皮癌に対して集学的治療が行われるが、効果は限定的であり、新規治療戦略の確立が急務である。Arf6-AMAP1シグナル経路とその中心的な役割を果たすものとしてEPB4.1L5を介した上皮間葉転換の制御機構が近年新たに注目され、腫瘍の浸潤、転移、薬剤耐性との関連が報告されてきた。我々は尿路上皮がん患者においてEPB4.1L5の高発現症例で予後が悪いことを報告した。尿路上皮癌細胞株を用いて薬剤耐性と低酸素状態において検討したが、今回の検討においては、明らかなEPB4.1L5、Arf6-AMAP1シグナル経路の関与は認めなかった。

研究成果の概要（英文）：We examined the protein expression of EPB4.1L5 and EMT related transcriptional factors by western blotting in human urothelial cell lines, UMUC-3, T24 and 5637. The protein expression accorded with a tendency of the invasion ability in order of UMUC-3>T24>5637. In the hypoxic state, although the expression of EMT-related transcription factor became higher, the protein expression of EPB4.1L5 became lower unexpectedly. In addition, there was no significant difference in the protein expression of EPB4.1L5 with or without the HIF-1 inhibitor. Although the expression of EMT-related transcription factors like Snail were higher in the cisplatin-resistant T24 cell line compared with the original T24 cell line, there was no difference between the expression of the protein of the two cell lines.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿路上皮癌 上皮間葉転換

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

浸潤、転移を有する難治性尿路上皮癌に対して集学的治療が行われるが、効果は限定的であり、新規治療戦略の確立が急務である。Arf6-AMAP1 シグナル経路 (Nat Cell Biol. 2008) とその中心的な役割を果たすものとして Erythrocyte protein band 4.1-like5 (EPB4.1L5) (J. Cell Biol. 2008) を介した上皮間葉転換 Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) の制御機構が近年新たに注目され、腫瘍の浸潤、転移、薬剤耐性との関連が報告されてきた (Nat Commun. 2016, Oncogenesis. 2016)。今回、新たな癌治療戦略の確立に向け、尿路上皮癌を対象に、EPB4.1L5 の制御機構と Androgen receptor とに注目し、EPB4.1L5 を介した新規上皮間葉転換制御機構の解明を目的とした。

### 2. 研究の目的

今回の検討では、低酸素環境、薬剤耐性に着目し、E-cadherin のエンドサイトーシスを通して EMT の制御に関与している EPB4.1L5、Arf6-AMAP1 シグナル経路について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト尿路上皮癌細胞株における EPB4.1L5 の発現と各種転写因子等、EMT 関連タンパクの発現の検討

浸潤能が異なる各種ヒト尿路上皮癌の細胞株 T24、UMUC-3、5637 を用い EPB4.1L5 の発現を検討する。Arf6-AMAP1 シグナル経路、細胞接着因子、間葉系マーカー、各種転写因子の発現を検討する。尿路上皮癌細胞株でも EPB4.1L5 が ZEB1 による制御を受けているか検討する。また一方で、尿路上皮癌においては転写因子として Snail の関与が重要と考えられている。大腸癌において ZEB1 が Snail により誘導されるとの研究 (J Biol Chem 2002) もあり、ZEB1 を siRNA を用いてノックダウンすることにより、ZEB1 を介した EPB4.1L5 制御の可能性について検討を行う。

(2) 低酸素状態でのヒト尿路上皮癌細胞株における EPB4.1L5 の発現と EMT 関連転写因子、EMT 関連タンパクの発現の検討: HIF-1 阻害による EPB4.1L5 の発現、各種転写因子の発現の検討

低酸素状態における EPB4.1L5 や転写因子等、各種関連タンパクの発現について検討する。低酸素状態では HIF-1 による転写制御が重要な役割を果たしており、多くの癌種で悪性化との関連が指摘されている。HIF-1 は ZEB1 を介して EMT を誘導することの報告もある。本研究に先駆けて、申請者は正常酸素下で HIF-1 が発現が高い細胞株ほど浸潤能が高く、この際に HIF-1 阻害剤を用いたところ EMT が抑制されたことを観察した。HIF-1 阻害剤または siRNA を用い HIF-1 を阻害した際の EPB4.1L5 や ZEB1 等の発現の変化を解析する。

(3) シスプラチン耐性尿路上皮癌細胞株での EPB4.1L5 の発現と EMT 関連転写因子、EMT 関連タンパクの発現と抗癌剤感受性の検討

当教室ではシスプラチン耐性尿路上皮癌細胞株を作成し、これまで尿路上皮癌と薬剤耐性について検討を進めてきた (Br J Cancer. 2011, JCI insight 2017)。シスプラチン耐性株ではより Snail や ZEB1 等の転写因子や EMT 関連タンパクの発現が高く、また浸潤能も高い可能性を報告してきた。本研究では、当教室で確立した T24、5637 シスプラチン耐性株を用いて EPB4.1L5 の発現について検討を行う。非耐性株と比較し発現が増強している転写因子についても siRNA を用いてノックダウンし、EPB4.1L5 の発現をまずは検討する。

これらの実験から、尿路上皮癌においてシスプラチン耐性に EPB4.1L5 の発現や Arf6-AMAP1 経路が関連しているかどうか、EPB4.1L5 が浸潤能や遊走能に関与するかどうかについて明らかに

する。

また、低酸素環境ではHIFを介し、薬剤耐性を助長するとの報告もあり(Trends Mol Med 2012)、これらの実験を低酸素環境でも行うことで、シスプラチン耐性と本経路、EPB4.1L5 との関連について検討する。

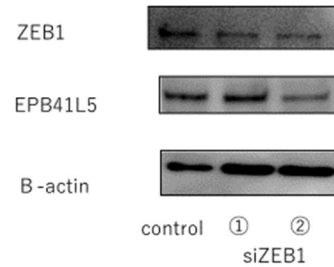
#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト尿路上皮癌細胞株におけるEPB4.1L5の発現と各種転写因子等、EMT関連タンパクの発現の検討

浸潤能が異なる各種ヒト尿路上皮癌の細胞株T24、UMUC-3、5637を用いEPB4.1L5の発現を検討した。タンパク発現量はUMUC-3>T24>5637の順にであった。(細胞株ごとの浸潤能はUMUC-3>T24>5637)UMUC-3に関して、転写因子であるZEB1の発現を検討した。siZEB1にてEPB4.1L5の発現は低下した。EPB4.1L5は尿路上皮癌においてもZEB1による制御を受けている可能性が示唆された。(Figure 1)

Figure 1

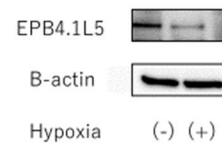
UMUC-3におけるsiZEB1でのEPB4.1L5の発現



(2) 低酸素状態でのヒト尿路上皮癌細胞株におけるEPB4.1L5の発現とEMT関連転写因子、EMT関連タンパクの発現の検討 まず、低酸素状態におけるHIF-1とEPB4.1L5の発現を検討した。これまでの報告では低酸素状態においてはsnail等のEMT関連転写因子の発現が強くなり、癌細胞におけるEMTを誘導し浸潤能が高くなることが報告されてきた。当教室においてもEMT関連転写因子であるSnailは低酸素状態において核内での発現が上昇し、細胞浸潤能に影響があることを報告している。しかしながら、今回の検討では、EPB4.1L5に関しては、低酸素状態において同タンパクの発現は低下するという結果になった(Figure 2)。また、HIF-1阻害剤下においては、特にタンパク発現に変化は認めなかった。

Figure 2

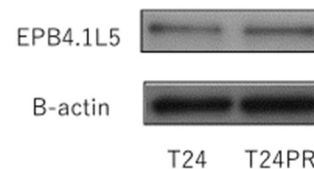
UMUC-3におけるHypoxiaでのEPB4.1L5の発現



当教室ではシスプラチン耐性尿路上皮癌細胞株(細胞株:T24)を作成し、これまで尿路上皮癌と薬剤耐性について検討を進めてきた。シスプラチン耐性株ではよりSnailやZEB1等のEMT関連転写因子の発現が高く、また浸潤能も高い可能性を報告してきた。当教室で確立したT24シスプラチン耐性株を用いてEPB4.1L5の発現についてWestern blottingにて検討を行ったところ、T24とそのシスプラチン耐性株とではEMT関連転写因子の発現はシスプラチン耐性株で高くなるもののEPB4.1L5の発現に関しては違いは認められなかった(Figure 3)。T24シスプラチン耐性株における浸潤能、遊走能に関して、あるいはEMT関連タンパクの高発現に関して、EPB4.1L5の発現との関連は本研究では明らかとならなかった。

Figure 3

シスプラチン耐性株における検討(T24)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----