

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03790

研究課題名(和文) 浸潤性膀胱癌の病態を再現可能なマウスモデルの確立とその応用

研究課題名(英文) Establishment of a novel mouse model that recapitulates human muscle invasive bladder cancer

研究代表者

小林 恭 (Kobayashi, Takashi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：00642406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌の真のドライバー遺伝子や起源細胞は十分に解明されておらず、治療薬研究に有用な動物モデルが不足している。我々は、マウス膀胱化学発癌モデルを用いた予備実験から起源細胞をKrt5陽性細胞と定め、ヒト膀胱癌とマウス膀胱化学発癌モデルに共通の変異遺伝子をドライバー遺伝子の候補として抽出した。

そこで、Krt5陽性細胞特異的にTrp53変異とCas9を発現する遺伝子改変マウスを作成し、Pten・Kmt2cのsgRNA搭載アデノ随伴ウイルスを膀胱注入することで膀胱Krt5陽性細胞特異的にPten・Kmt2cノックアウトする実験系を確立した。その結果、一部のマウスで膀胱発癌を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果により、膀胱尿路上皮へのウイルスベクター感染効率の最適化を達成し、標的細胞特異的に遺伝子編集を誘導する実験系が確立された。少数ながら発癌を確認することができたが、現状では遺伝子編集効率が悪く、安定したマウスモデル樹立には至っていない。現在、オルガノイド技術を用いたより高確率で腫瘍形成するモデルの作成に取り組んでおり、一部の遺伝子型で腫瘍形成を確認している。今後、安定的に供給できる膀胱癌モデルが確立できれば、投薬実験を通じた薬剤耐性メカニズムの解明や新規薬剤の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：The useful animal models of bladder cancer that accurately recapitulate the human disease is lacking because the true driver genes and cell of origin is not well understood. From our previous results, we hypothesized that muscle invasive bladder cancer comes from Krt5 expressing urothelial cells and filtered driver gene candidates which are common in both human and mouse chemically induced bladder cancer model. We demonstrated that bladder injection of adeno-associated virus with Pten and Kmt2c sgRNA into transgenic mice expressing Trp53 mutation and Cas9 protein specifically in Krt5 positive cells induces Pten and Kmt2c knockout in target cells using CRISPR/Cas9 system. As a result, we could confirm the carcinogenesis of bladder cancer in some mice.

研究分野：膀胱癌

キーワード：浸潤性膀胱癌 マウスモデル 遺伝子改変マウス CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

本邦の膀胱癌による死亡者数は 8,400 人/年で、高齢化に伴い罹患数・死亡数は増加傾向にある。なかでも筋層浸潤性・転移性膀胱癌の 5 年生存率はそれぞれ 50%・20%と非常に予後が悪く、長期にわたって予後が改善していない。近年、新規の抗 PD-1/PD-L1 抗体による腫瘍免疫 (IO) 治療が導入されたが、効果は限定的であり、本治療の作用発現機序、耐性獲得機序、効果予測因子などを研究する適切な実験系が不足している。その最大の要因の一つとして、有用な動物モデルが不足していることが挙げられる。

次世代シーケンス研究の結果、膀胱癌は極めて変異頻度が高い(いわゆるパッセンジャー変異が多い)ことが明らかとなったが、真のドライバー変異は解明されていない。また、膀胱の尿路上皮は被蓋細胞・中間細胞・基底細胞の 3 層から形成されるが、膀胱癌の起源となる細胞は未だ不明である。これらを解明するためには、特定の遺伝子の変異を起源細胞に誘導し、膀胱癌が発生することを実証する必要がある。

以上のことから、膀胱癌の発生メカニズム、すなわち、ドライバー変異と起源細胞を解明すると共に、IO 治療時代に有用な膀胱癌マウスモデルの開発が急務であると考えられた。

2. 研究の目的

申請者らは膀胱癌の病態メカニズムにおいて『どの遺伝子変異が「どの細胞」に起これば尿路上皮細胞のがん化が起こるのか?』、つまり実証論的には、マウスを用いた場合、『どの遺伝子変異を「どの細胞」に入ればマウス膀胱癌を誘導することができるか?』という問いに対して探索を行ってきた。

ドライバー遺伝子: ヒト膀胱癌のシーケンスデータ (自験データ及び TCGA) とマウス膀胱化学発癌モデルのエクソームシーケンス (自験データ) から両者に共通の変異遺伝子として *TP53* (マウス *Trp53*) に加え、*KMT2C*, *KMT2D*, *KDM6A* などのヒストンメチルトランスフェラーゼ複合体構成因子を同定した (図 1)。さらに、腫瘍抑制遺伝子 *PTEEN* はヒト浸潤性膀胱癌において発現低下が報告されており、申請者らはマウス膀胱癌での発現低下を確認したことから、これもドライバー遺伝子候補とした。

起源細胞: 膀胱化学発癌モデルの Lineage tracing 法を用いて、基底細胞・中間細胞の一部をなす *Krt5* (サイトケラチン 5) 陽性細胞及び被蓋細胞・中間細胞の一部をなす *Upk2* 陽性細胞を起源細胞と定め、さらにこれらの細胞に *Trp53* 変異を加えた解析を行った。その結果、*Krt5* 陽性細胞に *Trp53* 変異を誘導した *Krt5-p53^{+/mut}* マウスで、扁平上皮分化を伴う筋層浸潤性膀胱癌を最も効率的に誘導できることを見出した [1] (図 2)。このことは本細胞が膀胱癌の中でも予後不良なサブタイプの起源細胞であることを示すものである。

これらの結果を基に、*Krt5* 陽性細胞における *Trp53*, *Pten*, ヒストンメチルトランスフェラーゼの不活化が膀胱癌を誘導するとの仮説を立てるに至った。

上記を踏まえ、本研究の目的は我々が既に得ている膀胱癌の病態メカニズムに関する仮説を実証し、ヒト膀胱癌の遺伝学的特徴及び組織学的特徴を兼ね備えたマウスモデルを確立することである。これにより膀胱癌の真のドライバー変異及び起源細胞の同定、さらなる病態解明や新規治療開発への応用が可能になると考える。

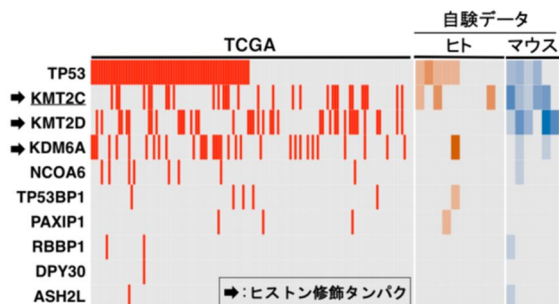


図 1. エクソームシーケンスから種間共通の変異遺伝子として *TP53* や *KMT2C* を抽出

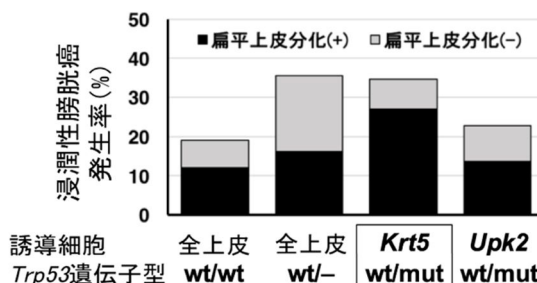


図 2. *Krt5-p53^{+/mut}* マウスで最も効率よく扁平上皮分化を伴う筋層浸潤膀胱癌が発生

3. 研究の方法

Krt5^{CreERT2/+}:Trp53^{+/-mut}:LSL-Cas9 マウスにタモキシフェンを投与し、*Krt5* 発現細胞特異的に *Trp53* 変異と *Cas9* を発現させたのちに、膀胱内に *Pten*・*Kmt2c* の一方及び両者の sgRNA 発現アデノ関連ウイルス (AAV) を注入し、CRISPR/Cas9 システムを用いて標的細胞に *Pten*, *Kmt2c* ノックアウトを誘導した。その後は小動物用超音波検査装置を用いて腫瘍発生を追跡した。AAV の感染効率を向上させるため、膀胱の前処置の最適化を行った。

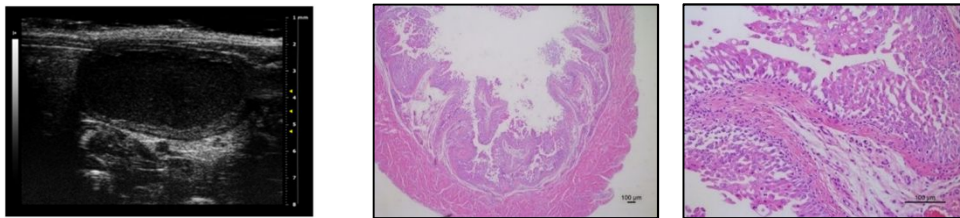
4. 研究成果

(1) 成果

膀胱尿路上皮はグリコサミノグリカン (GAG) 層によるバリア機能があるため、AAV ベクターによる十分な導入効率を得ることは大きな課題であった。そのため、尿路上皮に効率的に AAV 感染を起こすための条件検討を行った。その結果、0.1N HCl を 4 分間膀胱注す前処置を行うことで感染効率を最適化することができ、報告した [2]。

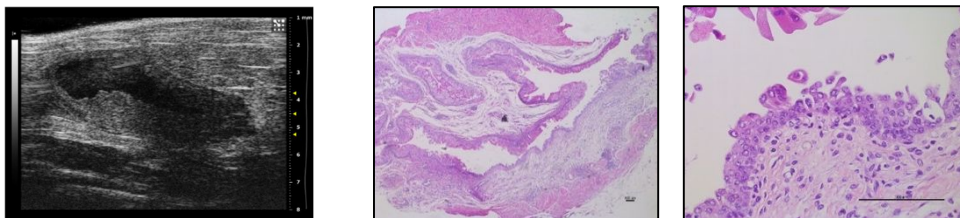
遺伝子改変マウスへの AAV 膀胱注を系統的に行ったところ、*Krt5^{CreERT2/+}:Trp53^{+/-mut}:LSL-Cas9* マウスに AAVsg*Pten*+sg*Kmt2c* を膀胱注入した 1 例に非筋層浸潤性膀胱癌の発生を確認した (図 3)。また、*Krt5^{CreERT2/+}:Trp53^{+/-}:LSL-Cas9* マウスに AAVsg*Trp53*+sg*Pten* を膀胱注入したもので 1 例膀胱上皮内癌の発生を確認した (図 4)。

図 3. *Trp53^{+/-mut}* マウス, AAVsg*Pten*+sg*Kmt2c*



【病理】 G1,pTa Urothelial Carcinoma

図 4. *Trp53^{+/-}* マウス, AAVsg*Trp53*+sg*Pten*



【病理】 G2-3,Urothelial Carcinoma in situ

(2) 今後の展望

本モデルで膀胱発癌を確認できたものの、106 例中わずかに 2 例のみであり、*in vivo* での安定した膀胱発癌モデルの作成は困難と思われた。原因としては前処置の最適化を十分に行ったとしても尿路上皮にウイルス形質導入が確認されたマウスは全体の 35% であり、それらの形質導入が確認されたマウスにおいても形質導入効率は中央値で 14.5% という低いものであったことが考えられる。

現在は 3D 培養系である Organoid を利用した *ex vivo* の実験系を用いることで、より高効率の形質導入の手法を確立しており、今後はこの Organoid 技術を併用して、genotype と腫瘍形成能の関連性を検証していく予定である。

(参考文献)

[1] Masuda N, Kobayashi T, et al.: *Trp53* mutation in *Krt5*-expressing basal cells facilitates the development of basal squamous-like invasive bladder cancer in the chemical carcinogenesis of mouse bladder. **Am J Pathol**, 2020.

[2] Hamada A, Kobayashi T, et al.: Enhancement of transduction efficiency using Adeno-associated viral vectors by chemical pretreatment to mice bladder urothelium. **J Virol Methods** 279: 113854, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hamada Akihiro, Kita Yuki, Murakami Kaoru, Matsumoto Keiyu, Sakatani Toru, Sano Takeshi, Ogawa Osamu, Kobayashi Takashi	4. 巻 279
2. 論文標題 Enhancement of transduction efficiency using Adeno-associated viral vectors by chemical pretreatment to mice bladder urothelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virological Methods	6. 最初と最後の頁 113854 ~ 113854
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jviromet.2020.113854	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Masuda Norihiko, Murakami Kaoru, Kita Yuki, Hamada Akihiro, Kamada Mayumi, Teramoto Yuki, Sakatani Toru, Matsumoto Keiyu, Sano Takeshi, Saito Ryoichi, Okuno Yasushi, Ogawa Osamu, Kobayashi Takashi	4. 巻 190
2. 論文標題 Trp53 Mutation in Keratin 5 (Krt5)-Expressing Basal Cells Facilitates the Development of Basal Squamous-Like Invasive Bladder Cancer in the Chemical Carcinogenesis of Mouse Bladder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1752 ~ 1762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2020.04.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akihiro Hamada, Yuki Kita, Kaoru Murakami, Keiyu Matsumoto, Toru Sakatani, Takeshi Sano, Osamu Ogawa, Takashi Kobayashi
2. 発表標題 Enhancement of transduction efficiency of Adeno-associated viral vectors by chemical agents in mice bladder urothelium
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiro Hamada, Yuki Kita, Hideaki Takada, Kenji Nakamura, Toru Sakatani, Takeshi Sano, Takashi Kobayashi
2. 発表標題 Establishment of a bladder cancer model using organoids derived from bladder epithelium in genetically engineered mice
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱田彬弘、北悠希、高田秀明、中村健治、酒谷徹、佐野剛視、小林恭
2. 発表標題 遺伝子改変マウスの膀胱上皮由来オルガノイドを用いた膀胱癌モデルの樹立
3. 学会等名 第31回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihiro Hamada, Yuki Kita, Hideaki Takada, Kenji Nakamura, Toru Sakatani, Takeshi Sano, Takayuki Goto, Atsuro Sawada, Shusuke Akamatsu, Takashi Kobayashi
2. 発表標題 Establishment of a bladder cancer model using organoids derived from bladder epithelium in genetically engineered mice
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022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	小川 修 (Ogawa Osamu) (90260611)	京都大学・医学研究科・名誉教授 (14301)	
研究分担者	吉野 喬之 (Yoshino Takayuki) (40734348)	京都大学・医学研究科・特定病院助教 (14301)	

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
---------	---------