

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09705

研究課題名(和文)膀胱癌の脂質代謝を介したがん微小環境における浸潤メカニズムの解明

研究課題名(英文)Lipid metabolism-mediated mechanisms of bladder cancer invasion in the cancer microenvironment

研究代表者

河合 弘二 (Kawai, Koji)

国際医療福祉大学・国際医療福祉大学成田病院・教授

研究者番号：90272195

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)：我々はPLD1とPLD2のうち、PLD1がNF- κ Bシグナル経路を介したMMP-13の発現調節を介して、膀胱癌の浸潤を促進することを明らかとした。続いて、がん微小環境におけるPLD1およびPLD2の役割について、マウスBBN膀胱癌モデルおよびマウス膀胱癌細胞株MB49の皮下接種モデルにおいて、PLD1ノックアウト(KO)群では浸潤性膀胱癌の発生抑制を認め一方で、PLD2-KO群では反対に浸潤性膀胱癌の発生増加を認めた。今後はこれら2つのモデルを用いて、がん微小環境におけるPLD1/PLD2の役割の解明に向けた検討を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱癌が筋層非浸潤性膀胱癌から筋層浸潤性膀胱癌へ進展するメカニズムのうち、特に脂質代謝を介した経路に立脚した治療戦略は未だ存在しない。本研究により、脂質代謝酵素のひとつであるホスホリパーゼD1(PLD1)を介した筋層浸潤性膀胱癌への進展に関する新規分子機序が解明された。今後、低分子化合物の開発が進んでいるPLD1を標的とすることにより、膀胱癌のみならず、多くの癌種において浸潤転移を制御する新規治療法の開発への発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Among PLD1 and PLD2, we demonstrated that PLD1 promotes bladder cancer invasion through regulation of MMP-13 expression via the NF- κ B signaling pathway. Next, we examined the role of PLD1 and PLD2 in the tumor microenvironment using a mouse bladder carcinogenesis model and a subcutaneous transplantation model of the mouse bladder cancer cell line MB49. The PLD1 knockout (KO) group showed a suppression of invasive bladder cancer development, while the PLD2-KO group showed an opposite increase. We will continue to elucidate the role of PLD1 and PLD2 in the tumor microenvironment using these two mouse models.

研究分野：膀胱癌

キーワード：膀胱癌 PLD1 PLD2 腫瘍浸潤 がん微小環境 PA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋層非浸潤性膀胱癌は、膀胱癌の約 70% を占める。その治療上の最大の問題点は、膀胱内再発を繰り返し、さらに再発腫瘍が筋層浸潤性膀胱癌へ進展することである。我々は腎癌での脂質代謝の研究から、脂質代謝酵素であるホスホリパーゼ D (PLD) がフォスファチジン酸 (PA) を介してがんの浸潤を促進することを見出した。膀胱癌における PLD-PA シグナルを介したがん浸潤メカニズムを明らかにし、その分子機構に基づく新規治療法の開発が期待される。

2. 研究の目的

膀胱癌の腫瘍微小環境における PLD-PA シグナルによる浸潤メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

1) PLD-PA シグナルを介した膀胱がん浸潤メカニズムの解明

膀胱癌患者における遺伝子発現レベルと予後の関連は、生存情報、臨床病理学的データ、RNA シークエンス (RNA-seq) データを含む TCGA データベースを用いて *in silico* にて検討した。ヒト膀胱癌細胞株は、5637、253J を使用し、レンチウイルスベクターを用いて PLD1 遺伝子発現抑制株を樹立した。MMP-13、RELA 遺伝子の発現抑制は siRNA を用いた。mRNA 発現およびタンパク発現は、それぞれ qRT-PCR、ウエスタンブロットを用い検討した。さらに、PLD1 遺伝子発現抑制による発現変動遺伝子解析は PCR アレイを用いて行った。細胞浸潤能はマトリゲルインベーションアッセイを用いて評価した。

in vivo における膀胱発癌モデルでは、野生型、PLD1 ノックアウト (KO) マウスに BBN を自由飲水させ、8-20 週後に膀胱を摘出し HE 染色および RNA 抽出を行った。腫瘍浸潤に関連する遺伝子は、RNA-seq による網羅的トランスクリプトーム解析を用いて検討した。パスウェイ解析、上流制御因子解析は IPA を用いて行った。

2) 膀胱がん微小環境における PLD1/PLD2 の役割の解明

野生型、PLD1-KO、PLD2-KO マウスを用い、上記の BBN 膀胱発癌モデルのほか、マウス膀胱癌細胞株 MB49 皮下接種モデルおよび膀胱内注入モデル (正所性モデル) により表現型の検討を行った。

4. 研究成果

1) PLD-PA シグナルを介した膀胱がん浸潤メカニズムの解明

膀胱癌患者では PLD1 の発現亢進が予後不良と関連することが明らかとなった。(図 1) *in vitro* では PLD1 遺伝子発現抑制により、両株で細胞浸潤が有意に抑制された。(図 2) PCR アレイで得られた発現変動遺伝子を、膀胱癌患者の予後および PLD1 発現との相関で選別した結果、MMP-13 が候補遺伝子に挙がった。

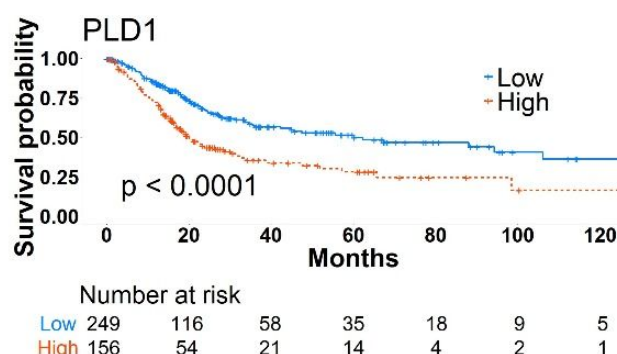


図1. PLD1発現レベルと膀胱癌患者の予後

BBN 膀胱発癌モデルでは、PLD1-KO 群において浸潤癌発生の抑制を認め (図 3) RNA-seq 解析では *in vitro* と同様に、PLD1-MMP-13 経路が腫瘍浸潤を促進する可能性が示唆された。

上流制御因子解析および文献検索により、NF- κ B p65 Ser536 のリン酸化が MMP-13 の発現制御に関わる可能性が示唆されたため、PLD1 遺伝子発現抑制株における変化を検討した結果、両株ともにリン酸化レベルの低下を認めた。また、PLD1 遺伝子発現抑制に伴い低下した MMP-13 発現レベルは、PA の添加により、NF- κ B p65 Ser536 リン酸化レベルの増加傾向とともに有意な増加を認めた。(図 4)

2) 膀胱がん微小環境における PLD1/PLD2 の役割の解明

まず BBN 膀胱発癌モデルを用いて検討したところ、PLD1-KO 群では浸潤性膀胱癌の発生抑制を認めた一方で、PLD2-KO 群では反対に浸潤性膀胱癌の発生増加を認めた。さらに、MB49 を用いたマウス皮下接種モデルで検討した結果、PLD1-KO 群ではコントロール群と比較して腫瘍

増殖の抑制を認めた一方で、PLD2-KO 群では反対に腫瘍増殖の増大を認めた。続いて、正所性モデルとして MB49 の膀胱注入モデルを作成し、コントロール群、PLD1-KO 群、PLD2-KO 群における膀胱腫瘍形成や浸潤の様子を複数回比較検討した。いずれの実験でも 3 群ともに安定して浸潤性膀胱癌の形成を認めたが、これまでの発癌モデルや皮下接種モデルのような明瞭な表現型の差は見られなかった。

今後はこれら 3 つのマウスモデルのうち、発癌モデルと皮下接種モデルの 2 つを用いて、がん微小環境における PLD1/PLD2 の役割の解明に向けた検討を行う予定である。

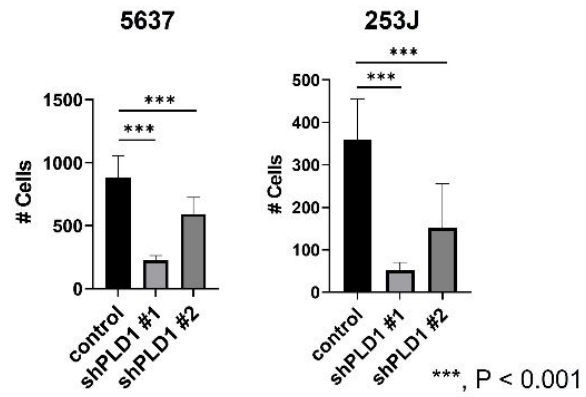


図2. PLD1遺伝子発現抑制による細胞浸潤への影響

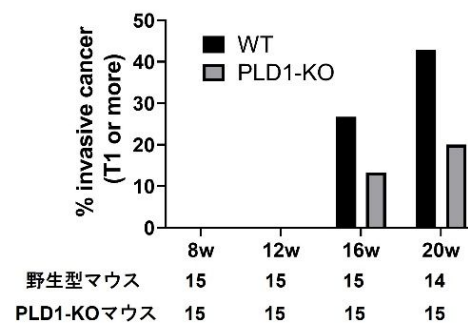


図3. 野生型とPLD1-KOマウスにおける浸潤性膀胱癌の発生割合

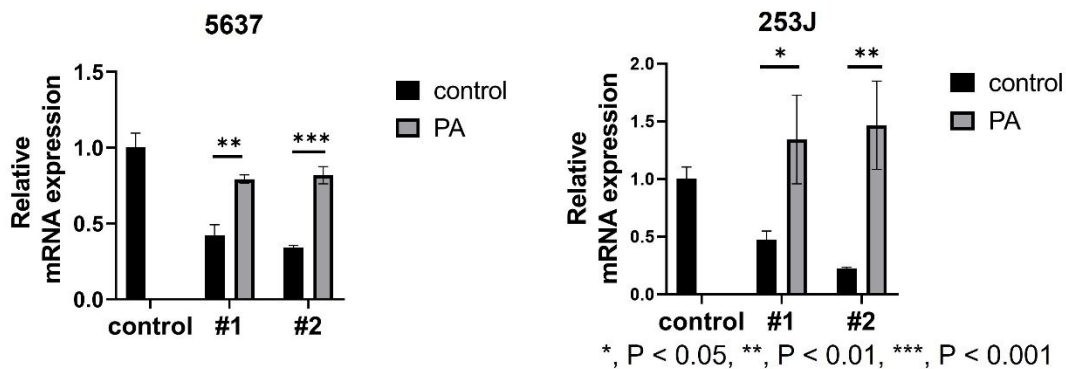


図4. PA添加によるPLD1遺伝子発現抑制株におけるMMP-13発現レベル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagumo Yoshiyuki, Kawai Koji, Kojima Takahiro, Shiga Masanobu, Kojo Kosuke, Tanaka Ken, Kandori Shuya, Kimura Tomokazu, Kawahara Takashi, Okuyama Ayako, Higashi Takahiro, Nishiyama Hiroyuki	4. 巻 50
2. 論文標題 Prognostic significance of non-urothelial carcinoma of bladder: analysis of nationwide hospital-based cancer registry data in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1068 ~ 1075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa072	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 南雲義之
2. 発表標題 膀胱発癌におけるホスホリパーゼD1の役割
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 南雲義之
2. 発表標題 膀胱癌におけるPLD1を介した浸潤メカニズムの解明
3. 学会等名 第30回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2021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	西山 博之 (Nishiyama Hiriyuki) (20324642)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究分担者	神鳥 周也 (Kandori Shuya) (50707825)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	
研究分担者	根来 宏光 (Negoro Hiromitsu) (80708595)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	
研究分担者	星 昭夫 (Hoshi Akio) (90453711)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	

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