

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18612

研究課題名（和文）尿路上皮癌の多段階進展機構の先進的病態解明と革新的治療開発

研究課題名（英文）Pathogenesis of multi-step progression of urothelial carcinoma and development of innovative treatment

研究代表者

大豆本 圭（DAIZUMOTO, Kei）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教

研究者番号：10745516

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）：Preclinical modelでの抗腫瘍効果の検証を施行しDDX31相互蛋白質との相互部位のアミノ酸配列を同定しdominant negative peptideを作成し抗腫瘍効果を認めた。尿路上皮癌発癌機構におけるDDX31発現変化とp53変異についての検証を行い、尿路上皮癌発癌モデルとしてN-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN)による尿路上皮癌発癌モデルでp53及びDDX31についての関連性を検討し、DDX31の経時的な膀胱組織でのRNA発現上昇をコントロール群と比較して認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路上皮癌の遺伝子変異で大きく病態として分かれるのはTP53変異である。これまでの研究から尿路上皮癌・初期段階のTP53 wild type、中期段階のTP53 mutation、後期段階のEGFRやHER2などReceptor of Tyrosine kinase (RTK)の活性化の病態解明にはまだ未解明な部分が多く、詳細に解析することで治療法の開発につながることを期待される。最終的に、尿路上皮癌の多段階進展機能のさらなる新機能発見と新規治療法の開発につながっていくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：The anti-tumor effect of DDX31 was verified in a preclinical model, and the amino acid sequence of the reciprocal site of DDX31 was identified to create a dominant negative peptide. We also examined the relationship between p53 and DDX31 in the uroepithelial carcinogenesis model using N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) as a uroepithelial carcinogenesis model. The results showed that DDX31 RNA expression was upregulated in the bladder tissue over time compared to the control group.

研究分野：尿路上皮癌

キーワード：尿路上皮癌 DDX31 TP53 p53 多段階進展

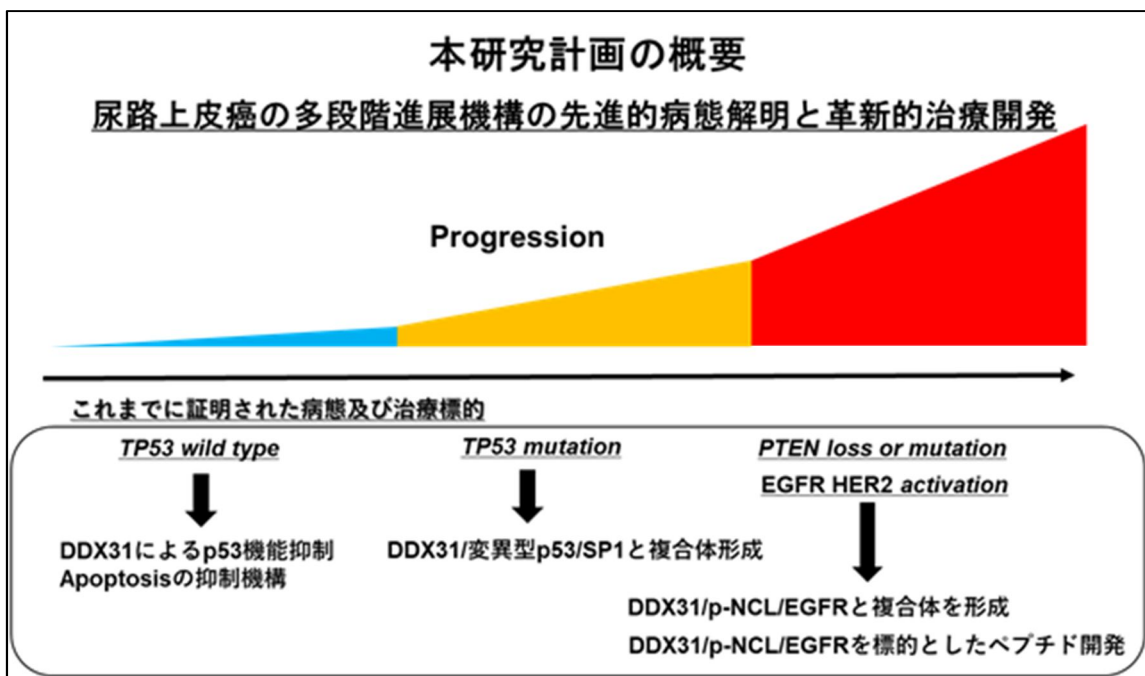
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

尿路上皮癌は非筋層浸潤性と筋浸潤性に分類され再発率が高く、転移進行例では全身化学療法や免疫チェックポイント阻害薬による全身治療を行うが多くが治療抵抗性となるのが現状である。悪性度の高い尿路上皮癌の病態解明研究は 2000 年以降のマイクロアレイ解析、次世代シーケンズ解析など網羅的なゲノム解析・遺伝子発現解析技術の進歩によりその遺伝子異常の全貌が明らかになってきている。特に筋層浸潤性膀胱癌を対象とした癌ゲノムアトラス (TCGA: The Cancer Genome Atlas) 研究ネットワーク解析では TP53 変異が約 50%で認め、EGFR 増幅・高発現、FGFR3 変異、HER2 の増幅・高発現や変異が明らかとなった。膀胱癌の進展の病態には TP53 変異、Receptor of Tyrosine Kinase(RTK)やその下流シグナルの活性化が起きていることは明らかとなった(Nature volume 507, pages 315-322 (20 March 2014))。

研究代表者は浸潤性尿路上皮癌を対象とした遺伝子発現解析にて同定された DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 31 (DDX31) について解析を行い、下記のことを明らかとした (Daizumoto K et al Cancer Res. 2018 May 1;78(9):2233-2247.)。

- (1) 臨床検体を用いた免疫染色解析で DDX31 高発現かつ p53 高発現であることと膀胱癌予後との間に強い関連を認めた。
- (2) 膀胱癌細胞株を用いた DDX31 のノックダウン実験と過剰発現実験により、DDX31 高発現は浸潤能、遊走能及び足場非依存性増殖を促進した。
- (3) DDX31 は変異型 p53 と Sp1 transcription factor (SP1) と複合体を形成し、この複合体形成が遊走能および浸潤能の亢進に関連する Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1 Like 4B (EPB41L4B) の転写亢進を誘導することが示された。
- (4) DDX31 は主に核内に存在するが、進行した浸潤性膀胱癌細胞では、核内から細胞質に移行して、リン酸化 nucleolin (p-NCL)と EGFR との三者複合体を形成し、EGFR の安定化および Akt シグナルの活性化を誘導した。
- (5) DDX31-NCL 相互作用を標的とした DDX31 アミノ酸配列由来のドミナントネガティブペプチドによる DDX31-NCL 複合体の形成阻害は、EGFR の不安定化および Akt シグナル阻害を介し、顕著な in vivo 抗腫瘍効果を示した。



### 2. 研究の目的

本研究では野生型 p53 の癌抑制機能の欠失メカニズム、変異型 p53 機構の促進メカニズム、RTK の活性化メカニズムを、癌特異的分子である DDX31 を中心に解析することで多段階進展機構を解明すること、治療薬開発を行うことが目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) Preclinical model での抗腫瘍効果の検証

DDX31 相互蛋白質との相互部位のアミノ酸配列を同定し dominant negative peptide を作成し抗腫瘍効果を検証する。研究代表者はすでに患者組織由来の Patient derived Xenograft (PDX) model を確立しており、これを基に 3次元培養モデルの樹立を行っている。3次元培養モデルと PDX モデルによる抗腫瘍効果を評価する。

#### (2) 尿路上皮癌発癌機構における DDX31 発現変化と p53 変異についての検証

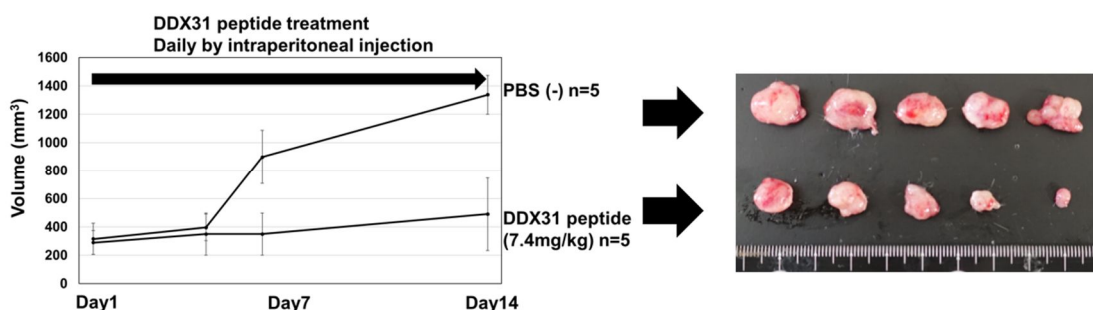
尿路上皮癌発癌モデルとして N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN)による発癌では上皮内癌から浸潤性膀胱癌と多段階に発癌すること、ヒトの尿路上皮癌と同様に p53 変異は DNA

binding domain (DBD)におけるミスセンス変異であることが報告されている(Oncogene (2018) 37:1911-1925)。BBN 投与による尿路上皮癌発癌モデルで p53 及び DDX31 についての関連性を検討する。

#### 4. 研究成果

尿路上皮癌の多段階進展機構において DDX31 は重要な因子であることがわかっている。DDX31 は核から細胞質へ移行し細胞膜直下で EGFR-NCL-DDX31 の複合体を作り癌進展を促進することを示している。すでに作成している DDX31 peptide は DDX31 高発現癌に対して抗腫瘍効果が期待される。2019 年度の研究実績は Preclinical model での DDX31 peptide の抗腫瘍効果の検証である。研究代表者はすでに患者組織由来の Patient derived Xenograft (PDX) model の樹立方法を確立しており、2019 年度は尿路上皮癌の PDX モデルを多数作成した。作成し安定樹立できたモデルの腫瘍からタンパクを抽出し DDX31 の発現をウエスタンブロット法で確認した。2 モデルで DDX31 高発現を確認した。1 モデルを用いて遺伝子変異解析を行ったところ、TP53 のミスセンス変異、EGFR 高発現をみとめた。PDX モデルを用いてコントロール群と DDX31 peptide を 5 匹ずつに振り分け、腹腔内投与を施行した。DDX31 peptide 群は有意差をもって抗腫瘍効果を認めた。Preclinical model での DDX31 peptide の抗腫瘍効果が示唆された。HE 染色による腫瘍の病理学的な評価ではコントロール群は充実性の癌細胞癌充満しているのに対して、DDX31 peptide 群では腫瘍細胞は疎となっており、壊死所見を認めた。これらの成果は 2020 年日本癌学会学術集会で発表した。

### DDX31 peptide suppresses growth of PDX models



**DDX31-peptide (7.4 mg/kg) and PBS (-) as a control were administered daily by intraperitoneal injection for 7 days. DDX31-peptide induced significant inhibition of tumor growth compared to mice treated with PBS (-).**

次に尿路上皮癌の多段階進展機構における DDX31 の経時的な変化を確認するために、尿路上皮癌発癌モデルの 1 つである N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) による発癌モデルに着目した。BBN モデルでは上皮内癌から浸潤性膀胱癌と多段階に発癌すること、ヒトの尿路上皮癌と同様に p53 変異は DNA binding domain (DBD) におけるミスセンス変異であることが報告されている(Oncogene (2018) 37:1911-1925)。DDX31 の生理的な機能を理解するために DDX31 のノックアウトマウスを作成した。DDX31 ノックアウトマウスを作成し、重要なキープクターである DDX31 が発現しない状態で BBN 投与による発がんの経過の違いを検討する方針で研究をすすめた。2020 年度の研究成果は BBN 飲水投与発がんモデルでの DDX31 発現変化と DDX31 遺伝子のノックアウトマウスの作成を試みて凍結胚まで作成した。尿路上皮癌の多段階進展機構における DDX31 の経時的な変化を確認するために、尿路上皮癌発癌モデルの 1 つである N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) による発癌モデルに着目した。BBN モデルでは上皮内癌から浸潤性膀胱癌と多段階に発癌すること、ヒトの尿路上皮癌と同様に p53 変異は DNA binding domain (DBD) におけるミスセンス変異であることが報告されている。今回、BBN 飲水開始後、4 週ごとに膀胱を摘出し、RNA 抽出し DDX31 発現を qPCR 法で確認した。DDX31 は時間依存的に発現上昇し、コントロールで BBN 未投与のマウスでは発現上昇がなかった。また DDX31 の生理的な機能を理解するために DDX31 のノックアウトマウスを作成するために、CRISPER-Cas9 法を用いて凍結胚を作成した。DDX31 が発現しない状態で BBN 投与による発がんの経過の違いを今後進めていく方針である。

本研究では詳細な病態が解明されていない尿路上皮癌で、癌進展において重要な DDX31 についての機能解析をすることで今後、新規治療法の確立につながる重要性がある。

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 大豆本圭、金山博臣、上原久典、宇都義浩	4. 巻 46
2. 論文標題 鶏卵を用いた次世代患者由来がんモデルの開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 59-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大豆本圭、福原弥生、尾崎啓介、津田恵、楠原義人、森英恭、布川朋也、山本恭代、山口邦久、福森知治、高橋正幸、金山博臣、上原久典
2. 発表標題 当科における患者腫瘍組織移植PDX (patient-derived xenograft)モデル作製の取り組みとMicropapillary urothelial carcinomaのPDX modelの樹立
3. 学会等名 日本泌尿器科学学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎啓介、高橋正幸、大豆本圭、津田恵、楠原義人、森英恭、布川朋也、山本恭代、山口邦久、金山博臣
2. 発表標題 徳島大学病院における進行性腎癌に対するニボルマブの使用経験
3. 学会等名 腎癌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大豆本圭、矢野哲弘、佐々木雄太郎、尾崎啓介、上野恵輝、津田恵、楠原義人、森英恭、布川朋也、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣、宇山直人、坂東良美、上原久典
2. 発表標題 ニボルマブ+イピリムマブ併用療法が著効した肉腫様腎細胞癌の1例
3. 学会等名 日本泌尿器科学会 四国地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福原弥生、大豆本圭、布川朋也、上原久典、小和田実、福森知治、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 淡明細胞型腎細胞癌のPDC (Patient-Derived Cell)の樹立
3. 学会等名 日本癌学会学術總會
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大豆本圭、福原弥生、上原久典、宇都義浩、小和田実、布川朋也、福森知治、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 徳島大学病院におけるPDXモデルの確立と微小乳頭状尿路上皮癌における有効な治療法の開発
3. 学会等名 日本癌学会学術總會
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大豆本圭、矢野哲弘、佐々木雄太郎、尾崎啓介、上野恵輝、津田恵、楠原義人、森英恭、布川朋也、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 当院における進行性尿路上皮癌に対するベムプロリズマブ症例の検討
3. 学会等名 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋正幸、大豆本圭、佐々木雄太郎、尾崎啓介、上野恵輝、津田恵、楠原義人、森英恭、布川朋也、山本恭代、山口邦久、金山博臣
2. 発表標題 転移性腎細胞癌に対しニボルマブ・イピリムマブ併用療法を施行した4例の症例報告
3. 学会等名 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大豆本圭、矢野哲弘、佐々木雄太郎、尾崎啓介、上野恵輝、津田恵、楠原義人、森英恭、布川朋也、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣、宇山直人、上原久典
2. 発表標題 当院における筋層浸潤性膀胱癌に対する術前化学療法の検討
3. 学会等名 西日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 布川朋也、矢野哲弘、尾崎啓介、大豆本圭、佐々木雄太郎、上野恵輝、津田恵、楠原義人、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 転移性腎癌に対する転移巣切除後の臨床的検討
3. 学会等名 西日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野哲弘、大豆本圭、上原久典、宇山直人、佐々木雄太郎、尾崎啓介、上野恵輝、津田恵、楠原義人、布川朋也、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 当院における転移・再発をきたした乳頭状腎細胞癌の検討
3. 学会等名 西日本泌尿器科学会 四国地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大豆本圭、矢野哲弘、佐々木雄太郎、尾崎啓介、上野恵輝、津田恵、楠原義人、森英恭、布川朋也、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣、住田智志、上原久典、宇山直人
2. 発表標題 病勢コントロールが困難であった前立腺原発yolk sac tumor の1例
3. 学会等名 西日本泌尿器科学会 四国地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoharu Fukumori, Kei Daizumoto, Megumi Tsuda, Keisuke Ozaki, Yoshito Kusahara, Hidehisa Mori, Tomoya Fukawa, Yasuyo Yamamoto, Kuniyoshi Yamaguchi, Masayuki Takahashi, Hiro-omi Kanayama,
2. 発表標題 Galectin-3 is involved in the tumor progression and drug resistance induced by taxane chemotherapy and poly(adenosine diphosphate [ADP]-ribose) polymerase (PARP) inhibitor in castration-resistant prostate cancer
3. 学会等名 AUA (国際学会)
4. 発表年 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
---------------------------	-----------------------	----

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