

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20791100
 研究課題名（和文）
 膀胱癌における AKT-PI3K pathway の解析と制御にむけての研究
 研究課題名（英文）
 The analysis and control of the AKT-PI3K signaling pathway in the bladder cancer
 研究代表者
 鶴田 大 (TSURUTA HIROSHI)
 秋田大学・医学部・助教
 研究者番号：90466590

研究成果の概要（和文）：

膀胱癌の発癌、進展、転移に重要と考えられる AKT-PI3K pathway への入力系で、特に尿中に含まれるサイトカインなどに注目し、その濃度を測定したところ RANTES が膀胱癌の尿中に多く分泌されていることが分かった。RANTES は他の癌でも、転移、浸潤など関与が指摘されているサイトカインであり、膀胱癌において、この RANTES の主な受容体である CCR5 の組織染色でもより悪性度、浸潤度が高くなるに伴って、有意にその発現が増強していることが分かった。この結果より、尿中 RANTES が新たな膀胱癌のマーカーになりうることが示唆され、さらに CCR5 の膀胱癌組織での発現レベルが、膀胱癌の悪性度、浸潤度のマーカーとなりうることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We focused on the AKT-PI3K pathway related urinary cytokines which is important to carcinogenesis, progression and metastasis of the bladder cancer.
 We measured the urinary cytokines using ELISA, and found that mean urinary RANTES level were significantly higher than that of healthy control. Immunohistologically, the expression of CCR5, which is main receptor of RANTES, was found in primary bladder tumors. There was a statistically significant association between increased CCR5 expression in the cytoplasm and tumor stage or tumor grade. The high grade or high stage tumors had significantly higher expression levels of CCR5.
 Our results suggest that the high level of urine RANTES may be a candidate novel marker of the presence of bladder cancer. Furthermore, the increased CCR5 expression in the cytoplasm of bladder cancer cells may be associated with aggressive type of bladder cancer and be a marker for disease progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍学、膀胱癌

1. 研究開始当初の背景

膀胱移行上皮癌の発生・進展への分子機構については近年の分子生物学・遺伝学の発達により、多くの知見が得られてきた。すなわち、遺伝学的には、表在性乳頭状癌の初期発生には FGFR3 や PIK3 の変異、染色体 9p 欠失、9q 欠失、TSC1 変異などが示されている。一方、非乳頭状浸潤癌の前駆病変とされる CIS には p53 変異や Rb (染色体 13q) などの異常を伴い、CIS から浸潤癌へは 9p (p16 の変異) や 9q (遺伝子不明) の欠失を伴うことが多いとされてきた。これらは一見、TCC の発症進展が非常にバリエーションに富んだものと見られるが、近年の分子生物学的な解析により細胞内シグナル伝達系から考えると、膀胱癌の発生・進展には PI3K-AKT 系の亢進が非常に重要である可能性がでてきた。一方、我々は、膀胱移行上皮特異的 PTEN の欠失マウスを作成し、高率に自然発症膀胱癌が生じることを示した。さらにヒト臨床検体での膀胱癌でも PTEN の発現異常が 50%以上で認められることが示された。一方、以前に、当講座主任教授である羽瀨らは、実際のヒト膀胱癌においては PTEN 遺伝子そのものの変異頻度はそう高いものではないことを発表してきた。このことは PTEN が関与する経路が重要であることを示している。我々のヒト臨床検体の所見や移行上皮特異的 PTEN の欠失マウスのデータから、表在性乳頭状癌や浸潤性膀胱癌の発生には、PI3K-AKT 系の異常がキープレイヤーである可能性が示唆されている。分子生物学の進歩による分子標的薬の成果は一部の腫瘍領域では優れた成果があげられている。CML における BCL-ABL 転座をターゲットとした

Gleevec、肺癌での EGFR をターゲットとした Iressa、腎癌における VEGF (→VHL のターゲット) を標的とした Sunitinib や Sorafenib は程度の差こそあれ、良い例である。これらは各癌におけるキープレイヤーを同定し、その標的分子を確定しえたことが大きな breakthrough となっている。その点からいうと、未だ移行上皮癌では特異的なキープレイヤーが同定されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では膀胱癌、特に浸潤癌へのキープレイヤーを同定し、これをヒト膀胱癌に当てはめることが出来るかを検討し、できるならとくに治療に難渋するヒト浸潤性膀胱癌のキープレイヤーとなる標的分子を同定する足がかりを見つけることを目的とする。

3. 研究の方法

1) ヒト膀胱癌における AKT-PI3K pathway への入力系(特に Growth factor や cytokine)に注目し、膀胱癌でどのような分子が大きく関与しているかを、尿中のサイトカイン分泌量測定、あるいは組織の免疫染色などを用いて検討する。

4. 研究成果

(1) 尿中の成長因子やサイトカインを網羅的に調べるために、Bio-Plex サスペンションアレイシステムを用いて、18 種類の因子に関して、その尿中の分泌量を測定したところ、RANTES というケモカインが健常者と比較して膀胱癌患者で多く分泌されていることが分かった。

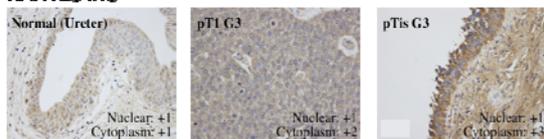
(patients 49.4 ± 24 pg/ml; control 5.1 ± 1.0 pg/ml; $p=0.001$, Mann-Whitney U

test)

しかし、膀胱癌の進行度（浸潤度）あるいは悪性度とケモカインの分泌量との相関は認められなかった。

(2) RANTES およびその主な受容体である CCR5 は進行性乳癌や前立腺癌においてその発癌や癌の浸潤、転移に関与していることが分かっている。そこで、膀胱癌組織における RANTES と CCR5 の免疫染色を行い、その染色性と膀胱癌の浸潤度あるいは悪性度との相関を検討した。その結果、正常尿路上皮（腎移植ドナーの尿管を使用）と膀胱癌組織の比較をすると、RANTES では両者の染色性に大きな違いはなかったが、CCR5 では細胞質における CCR5 の発現が膀胱癌組織で増強していることが分かった（下図）。また、膀胱癌組織でも、より悪性度が高く、浸潤癌になるほど細胞質における CCR5 が強発現していることが分かった。（grade 1-2 vs grade 3; $p=0.0003$, Ta-1 vs T2-4; $p=0.01$, Mann-Whitney U test）

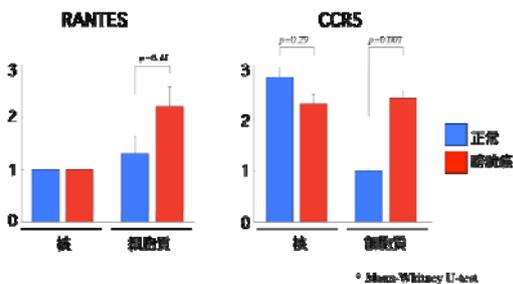
RANTES IHC



CCR5 IHC



RANTES, CCR5 免疫染色



(3) 膀胱癌患者で RANTES が増えている 1 つの原因として、遺伝子多型などによる RANTES

蛋白質の増加があげられる。そこで、RANTES のプロモーター領域にある RANTES-403 多型 (G→A の一塩基多型、膀胱癌との関連あり) に注目し膀胱癌患者でのこの多型の出現頻度を健常者と比較し、膀胱癌患者群の中でも膀胱癌の悪性度、浸潤度との関連を検討した。しかし、明らかな関連は認められなかった。

RANTES-403多型における膀胱癌発症リスクの検討

Genotype	Overall			Men		
	BCa (N=245)	Control (N=265)	P value	BCa (N=195)	Control (N=199)	P value
GG	105 (42.9%)	103 (38.9%)	0.65	88 (45.1%)	75 (37.7%)	0.27
GA	101 (41.2)	118 (44.5)		79 (40.5)	87 (43.7)	
AA	39 (15.9)	44 (16.6)		28 (14.4)	37 (18.6)	
G	311 (63.5%)	324 (61.1%)	0.44	255 (65.4%)	237 (59.5%)	0.09
A	179 (36.5)	206 (38.9)		135 (34.6)	161 (40.4)	

Women		
BCa (N=50)	Control (N=66)	P value
17 (34.0%)	28 (42.4%)	0.22
22 (44.0)	31 (47.0)	
11 (22.0)	7 (10.6)	
56 (56.0%)	87 (65.9%)	0.12
44 (44.0)	45 (34.1)	

RANTES-403多型と病理学的所見との検討

	GG	GA/AA	P value
Tumor Grade	1+2: 58 3: 46	71: 67	0.50
Tumor Stage	pTa/T1: 58 >pT2: 34	84: 41	0.52
	pTa: 44 pTis: 12	54: 13	0.78
膀胱壁内リンパ管浸潤 (ly)	Positive: 24 Negative: 18	27: 29	0.25
膀胱壁内静脈浸潤 (v)	Positive: 13 Negative: 28	19: 35	0.72

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

①鶴田大, 成田伸太郎, 堀川洋平, 熊澤光明, 齊藤満, 湯浅健, 佐藤滋, 土谷順彦, 羽瀨友則, 「膀胱癌における RANTES 多型の検討」日本泌尿器科学会総会, 2009 年 4 月 16 日, 岡山

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴田 大 (TSURUTA HIROSHI)
秋田大学・医学部・助教
研究者番号：90466590

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：