

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18096

研究課題名（和文）ゲノム不安定性に着目した浸潤性膀胱がん遺伝子治療の開発

研究課題名（英文）Development of invasive bladder cancer gene therapy focusing on genomic instability

研究代表者

山田 健司（Yamada, Kenji）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：80566232

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）：膀胱がんモデルマウスを用いて染色体レベルでのゲノムの不安定性(Chromosomal instability: CIN)を検討することにより、ヒト膀胱発がんに関わる遺伝子の同定と解析を行うことを目的として研究を行った。短期間で作成可能な筋層非浸潤性膀胱癌マウス動物モデルの作成方法を確立した。発癌や筋層非浸潤性膀胱癌から筋層浸潤性膀胱癌への進行には「核-細胞質間輸送」も重要なポイントと考え、発癌に関する酸化ストレス負荷時の「核-細胞質間輸送」について検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱発がんに関与する遺伝子 UQCRB を同定した。UQCRB の CNA は浸潤がんで減少する傾向が、モデルマウスのみならず、ヒトにおいても確認された。短期間で作成可能な筋層非浸潤性膀胱癌モデルの作成方法を確立したことは、本研究を始め、膀胱癌に対する治療法の開発や、基礎研究に役立つものであり、学術的に意義があると考えている。酸化ストレス負荷時の「核-細胞質間輸送」となるタンパク質HIKESHIのノックダウンにより、がん治療の効果が上がる可能性があることが判明した。社会的にも学術的にも意義があると考えている。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to identify and analyze the genes involved in human bladder carcinogenesis by examining the genomic instability (CIN) at the chromosomal level using bladder cancer model mice. We established a method for creating a mouse animal model of non-muscle-invasive bladder cancer that can be created in a short period of time. We believe that "nucleus-cytoplasmic transport" is also an important point for carcinogenesis and progression from non-muscle-invasive bladder cancer to muscle-invasive bladder cancer. We examined "nuclear-cytoplasmic transport" during oxidative stress, which is involved in carcinogenesis.

研究分野：泌尿器系腫瘍学

キーワード：膀胱癌 UQCRB ゲノム不安定性 動物モデル 核-細胞質間輸送 HIKESHI

## 1. 研究開始当初の背景

膀胱がんの膀胱内再発率は約 80%と高く、再発後の 10~30%が浸潤性がんとなり、浸潤性がんの生存率は予後不良である。表在性から浸潤性がんへの移行の分子機構はいまだ明確に解明されておらず、有用な分子マーカーもない。それ故、表在性膀胱がん治療後の再発時には浸潤性がんとなっており根治切除不可能な症例や、根治的膀胱全摘除術を行ったもののなかに overtreatment である症例が存在する可能性も否定できない。従って、浸潤性がんへの移行を示唆するバイオマーカーが存在すれば、表在性膀胱がんの経過観察中に、より早い段階での浸潤性がんの診断、的確な治療に結びつけることができると考えられる。しかし現在、浸潤性膀胱がんにおいて、いくつか特定の染色体領域のコピー数の変化についての報告がされているのみで、特異的な指標としての十分な検討はいまだ報告されていない。また転移を伴うような進行膀胱がんに対する治療は、複数の抗がん剤を用いての治療が一般的で、その効果は期待されるものに及ばず、新規治療法の開発が必要である。

これまでに、BHBN 誘発膀胱がんラット及びマウスの CNA における解析報告はない。それらの遺伝子発現プロファイルについての報告はあるが、我々のターゲット領域にある遺伝子はオーバーラップされていないため、本研究によりその関与を検討することで、新規のマーカー、治療薬となりうる可能性があると考えている。UQCRB はヒト Chromosome8q22 領域に存在する遺伝子で、ミトコンドリア呼吸鎖のうち複合体 III を形成する 11 個のサブユニットの一つとして ATP 産生に寄与している。またミトコンドリアは apoptosis の過程を制御する主要な器官であり、apoptosis におけるもっとも強力な活性化因子の一つが cytochrome c である。Cytochrome c が細胞質へ放出されることで、caspase というカスケードを活性化させ apoptosis を引き起こす。その cytochrome c と結合する UQCRB は他のがん種においては CNA の報告があるが、膀胱がん細胞株及び腫瘍組織とも特定の遺伝子領域における CNA の解析は報告されていない。

## 2. 研究の目的

- 1) 膀胱の発がん進展過程は未だ不明な点が多い。近年、がんは遺伝子変化の集積に伴って多段階で生じ、染色体レベルでのゲノムの不安定性(Chromosomal instability: CIN)がみられることが解明されてきた。しかし、膀胱がん患者は遺伝・環境背景が多様で CIN の解析は困難であった。このことから私は、膀胱がんモデルマウスを用いて CIN を検討することにより、ヒト膀胱発がんに関わる遺伝子の同定と解析を行うことを目的とした。
- 2) 筋層非浸潤性膀胱癌の動物モデルは BBN 自由飲水ラットモデルが有名であるが作成に半年から 10 ヶ月時間がかかることと、BBN 発癌物質であり、研究者にリスクを伴う。このために本研究を加速させるためにも、BBN 自由飲水ラットモデル以外のモデルで、かつ簡便に作成可能なモデルを確立することが必要であると考え今年度はマウスモデルの作成を試みた。
- 3) NMIBC から MIBC へ進行する段階での UQCRB の発現について検討する予定であった。しかし、発癌や NMIBC から MIBC への進行には「核-細胞質間輸送」も重要なポイントと考え、発癌に関与する酸化ストレス負荷時の「核-細胞質間輸送」について検証した。

## 3. 研究の方法

- 1) 1array comparative genomic hybridization(CGH)解析:6 週齢の C57BL/6N 雄マウスに 0.05% N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine を自由飲水投与し、膀胱がんモデルマウスを作成した。本モデルマウスは投与開始後 4 週で過形成、12 週で高度異形成、20 週から 26 週にかけて浸潤性膀胱がんを発生するため、各々の時期の膀胱組織より DNA を抽出した。Agilent Mouse Genome CGH Oligo Microarray kit(244K)(Agilent Technologies)

を用いて array CGH を行った(投与 20 週後:n=2、26 週後:n=3)。コントロールとして 6 週齢のマウスの肝臓を用いた。CIN の指標として Copy number aberrations(CNA)を 観察した。CNA を認めた染色体領域にある遺伝子群について定量 PCR 法を用いてそれぞれの CNA を再検討した。その中よりヒトとの相同性のある ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein (UQCRB)に着目し、以下の検討を進めた。

モデルマウスを用いた解析:膀胱組織の病変部から Pinpoint™ Slide DNA Isolation System (Zymo Research Corporation)を用いて DNA を抽出し、UQCRB の CNA 比を定量 PCR 法を用いて各群間で比較検討した(投与 4、12、26 週後:各群 n=3)。コントロールとして 6 週齢のマウスの正常膀胱粘膜を用いた。また UQCRB と inducible nitric oxide synthase (iNOS)の発現を免疫組織染色で経時的に検討した。

ヒト膀胱がん組織を用いた解析:同一検体のがん部と正常粘膜部から Pinpoint™ Slide DNA Isolation System を用いて DNA を抽出した。定量 PCR 法を用いて CNA 比を各群間で比較した(pTa: n=3、pT1:n=4、pT2:n=3、pT3:n=6)。また UQCRB の免疫組織染色を行い、その局在を検討した。

- 2) C57BL/6J マウス 7 週齢メスに経尿道的にカテーテルを挿入。粘膜バリアを破壊するためにトリプシンを膀胱注。次に膀胱癌細胞浮遊液を膀胱注し、3.6.8 日後に膀胱を摘出するものである。
- 3) ヒト前立腺癌細胞株 LNCap に熱ストレスを与えるため 43 ° の水槽で 1 時間加温する。細胞増殖を検証した。熱ストレス負荷後、再度 37 ° の適した条件で培養。そのときの HSP70 と HIKESHI の発現について Western blotting で検証した。

#### 4. 研究成果

##### 1) CGH 解析

array CGH 解析:array CGH の結果、2D、9F2、11C-D、13B3、14C2 の 5 領域にコピー数の増加を認めた。その領域にある 19 個の遺伝子の中で、1 コピー以上の増加を認め、ヒトとの相同性が明らかな遺伝子は UQCRB のみであった。

モデルマウスを用いた解析:UQCRB の CNA 比は 4 週後より増加傾向を示し、12 週後でピークを認め、26 週後では減少する傾向にあった。また、免疫組織学的検討では UQCRB、iNOS とともに 4、12 週後と徐々に発現の上昇を認めたが、26 週後では、浸潤がん部で発現が低下する傾向にあった。

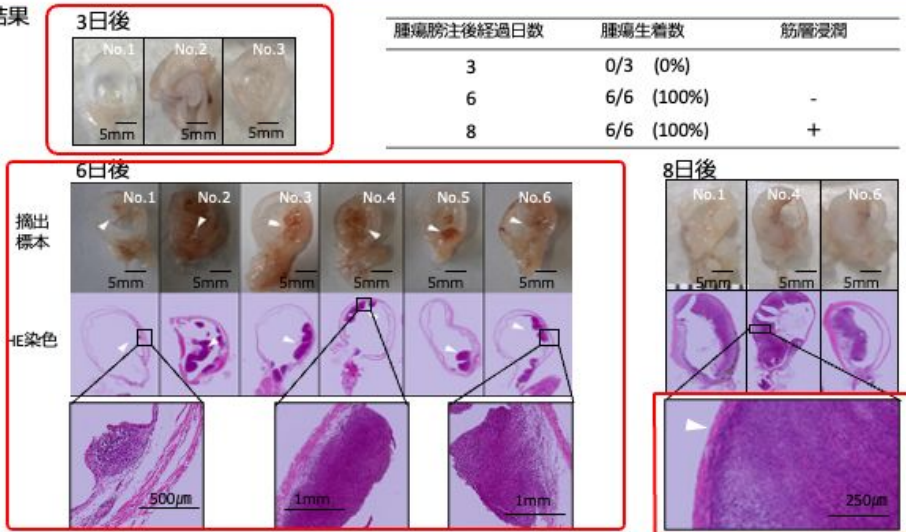
ヒト膀胱がん組織を用いた解析:深達度の上昇に伴い CNA 比は減少する傾向にあった。免疫組織学的検討において、UQCRB は表在がんでは強く均一に発現していたが、浸潤がん部では不均一な発現傾向を認めた。

以上の検討より膀胱発がんに関与する遺伝子 UQCRB を同定した。UQCRB の CNA は浸潤がんでは減少する傾向が、モデルマウスのみならず、ヒトにおいても確認された。さらに UQCRB の CNA はタンパク発現と相関していた。UQCRB はミトコンドリア内に存在し、血管新生を促進することが報告されており、今回の検討では、同じく血管新生に関わる iNOS と同様の染色パターンを示したことから、ヒト膀胱発がんの過程に iNOS を介して関与していることが示唆された。

##### 2) 簡便に作成可能な筋層非浸潤性膀胱がんマウスモデル

3 日後は生着せず、6 日目以降で 100%生着。8 日目は筋層浸潤を認めた。6 日目が適切と思われる(図 1)。

結果

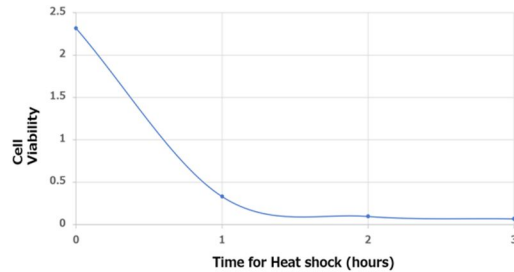


3) HIKESHI

(1)細胞増殖

熱ストレスを与え続けると、細胞増殖は低下することが示された(図2)。

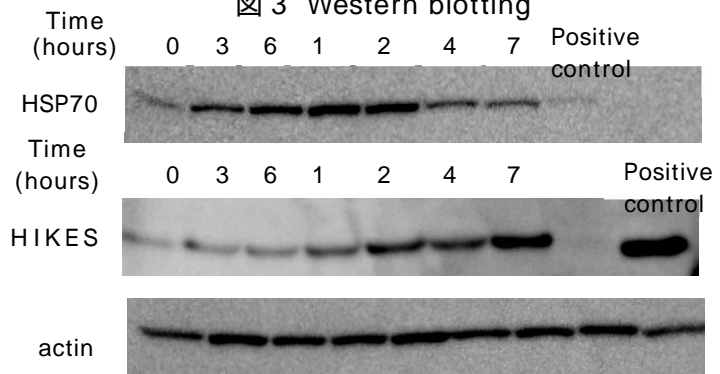
図 2 細胞増殖曲線



(2) Western blotting

HSP70 と HIKESHI は時間依存性に出現している。HSP70 の出現ピークは 24 時間後である。HIKESHI の出現ピークは 72 時間後かそれ以降である。

図 3 Western blotting



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田健司
2. 発表標題 短期間で作成可能なマウス筋層非浸潤性膀胱癌モデルの確立と時期温熱治療法の効果の検証
3. 学会等名 第7回 日本泌尿器腫瘍学会
4. 発表年 2021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
---------	---------