

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791531

研究課題名（和文）ras膀胱発がんモデルにおけるテストステロンの関与

研究課題名（英文）The involvement of testosterone in ras model animal of invasive bladder cancer

研究代表者 磯谷 周治（ISOTANI SHUUJI）

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：70398741

研究成果の概要（和文）：筋層浸潤性膀胱癌モデル動物としての、ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子導入トランスジェニックマウス rasH2 の有用性を検討した。rasH2 と野生型マウス（WT）に BBN を 20 週間経口投与し、膀胱化学発癌を行った。全ての膀胱癌発生頻度は差を認めなかったが、浸潤性膀胱癌の発生頻度 rasH2 が WT より有意に高かった。BBN 投与後平均生存期間は rasH2（23.2 週）が野生型（24.3 週）と比べて有意に短かった。したがって rasH2 は浸潤性膀胱癌のモデル動物として有用であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

I evaluated the usefulness of rasH2 with human c-Ha-ras proto-oncogene as the animal model of muscle-invasive bladder cancer. I administered 0.05% BBN for 20 weeks. Although there are no significant differences in the incidence of all bladder cancer, as far as the incidence of bladder invasive cancer is concerned, rasH2 has the higher frequency compared with WT. The mean survival time of rasH2 (23.3 weeks) was significantly shorter compared with WT (24.3 weeks). Consequently, rasH2 is a high susceptibility to bladder chemical carcinogenesis with the use of BBN. In particular, this study indicated the usefulness of rasH2 as model animals of invasive bladder cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：膀胱癌,ras,テストステロン

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌の多段階発癌モデルから提唱されてから久しい。しかしいずれのモデルも、実際のヒト膀胱癌の発生・進展においてそれが立証されておらず、未だ膀胱癌では責任遺伝子が確立されていない。膀胱癌の中でも、特に浸潤性膀胱癌に対する現在の治療成績は決して満足できるものではない。手術療法や薬物治療、放射線療法などの集学的治療を受けても、多くの患者が癌死する。つまり浸潤性膀胱癌は、非浸潤性膀胱癌と比べて生命予後に大きく影響する。

RAS 遺伝子は 1980 年代初頭に膀胱癌細胞株から発見された最初のヒト癌遺伝子であるが、膀胱癌における *RAS* の正確な役割は不明なままである。膀胱癌の発生には活性型 H-*RAS* が強く関与するとされているが、H-*RAS* の遺伝子変異頻度は 0-80%とばらつきがあり、initiation のみへの関与か、progression にどのように関与するかも明らかになっていない。

2. 研究の目的

ヒトプロト型 c-Ha-*ras* 遺伝子 3 コピーが導入されたトランスジェニックマウス rasH2 は、その高い発がん性が報告されている。われわれは c-Ha-*RAS* 遺伝子の膀胱癌開始や進展における関与、および rasH2 が膀胱化学発癌の有用なモデル動物であるかどうかを調べるため、膀胱化学発癌を誘導することが知られている *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) に対する感受性を調べた。

過去に膀胱癌のモデル動物はいくつか報告されているが、浸潤性膀胱癌の発生に特化したモデルマウスは報告されていない。今回の研究では rasH2 の浸潤性膀胱癌モデル動物としての有用性を検討したので報告する。

3. 研究の方法

動物実験

ヒトプロト型 c-Ha-*ras* 遺伝子 3 コピー (図 1a)

が導入された C57BL/6 バックグラウンドトランスジェニックマウス rasH2 とその littermate の C57BL/6 バックグラウンド野生型 (WT) を実験に用いた。マウスに 0.05% *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) を生後 6 週から 25 週まで 20 週間経口投与し、膀胱化学発癌を行った。BBN はナカライテスク株式会社 (東京) より購入した。rasH2 55 匹と WT57 匹を実験に用いた。rasH2 および WT それぞれ 12 匹ずつ (オス 8 匹、メス 4 匹)、rasH2 16 匹 (オス 8 匹、メス 8 匹) と WT 20 匹 (オス 10 匹、メス 10 匹) はそれぞれ BBN 投与後 10 週、20 週終了後に膀胱を摘出し、膀胱発癌の有無および病期を検討した。目的とする時期に、頸椎脱臼施行後マウス開腹し膀胱摘出。重量測定後、膀胱の半分は病理学的診断に使い、残り半分は遺伝子および蛋白解析に用いた。他の全ての臓器は開腹時に異常所見の有無を確認した。別の rasH2 27 匹、WT25 匹は BBN 投与終了後も飼育しその体重および生存率を比較した。

全てのマウスは 12 時間明暗サイクルで、室温 23・2° C、湿度 60・5%、飲水および経口摂取は自由に行える環境下で飼育した。BBN 投与中のマウスは全て個飼いで飼育した。マウスは帝京大学医学部中央動物室で飼育した。全ての実験は遺伝子組換え生物実験安全委員会 (承認番号: 0909091A1b) および動物実験委員会 (承認番号: 09-022) の承認を得て行った。

病理診断

摘出した膀胱の半分は PBS/ホルムアルデヒドに 24 時間浸透させ、矢状断で 4μm の切片を作成し、10 枚おきにヘマトキシリン&エオジン (H&E) 染色 (Muto Pure Chemicals CO., Ltd. Tokyo, Japan) を行った。癌の確定診断を得るために、核の大きさ、核の不整、クロマチン凝縮、核細胞質比、核小体や分裂像の存在などの特

微的な所見を調べた。もし癌が筋層まで浸潤していた場合浸潤性膀胱癌と診断した。

Western blotting 法

生後 30 週の BBN 未投与 rasH2 および WT の膀胱を摘出し H-RAS 蛋白の発現を Western blotting 法にて比較した。標本は薄切片蛋白分解酵素阻害剤を含んだ RIPA buffer (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA) に浸して溶解した。組織は清潔な刃を用いて可能な限り細かく切断した。超音波処理器 (BIORUPTER, UCW-310, Cosmo) で 310W にて 30 秒間隔で 10 回、それぞれ 30 秒間処理すること組織破壊し、4°C、12,000 xg、10 分間遠心し上清を回収保管した。この上清を用いて Western blotting 法にて蛋白発現を検討した。H-RAS 蛋白の発現はラビットポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA) を濃度 1/1,000 にて用いた。上清 2µg を SDS-PAGE 法にて分離し、polyvinylidene difluoride 膜 (Millipore, Billerica, MA, USA) へ転写した。その膜を 0.1% Tween-20 と 5% non-fat milk を含んだ Tris-buffered saline にて 1 時間室温でブロックし、一次抗体と 4°C、overnight で反応させた。二次抗体と反応させた後、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare UK, Ltd. NA, England) で発色させ、LAS-3000 mini detection system (Fujifilm, Inc. Tokyo, Japan) を用いて観察した。Internal control は β actin (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) を用いた。

免疫染色法

c-MYC に対して免疫染色法を用いてその発現を検討した。パラフィン固定した 4µm 切片を用いた。キシレンにて脱パラフィン化した後、内因性ペロキシダーゼ活性を PBS に加えた 3% H₂O₂ に 20 分浸透させることで阻害した。また、非特異的染色は Power Block™ Universal Blocking agent (Biogenex, San Ramon, CA, USA) に標本を浸透させることで阻害した。一次抗体はマウス

モノクローナル抗 c-MYC 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA) を用い、1/200、4°C、overnight で反応させた。二次抗体は室温、30 分反応させ (EnVision+ System Labelled Polymer-HRP, Dako Japan, Ltd, Tokyo, Japan)、DAB 染色を行った (EnVision+ Kit/HRP, Dako Japan, Ltd, Tokyo, Japan)。対比染色として、核を Mayer's hematoxylin (Muto Pure Chemicals CO., Ltd. Tokyo, Japan) にて染色した。染色の評価は 400 倍で観察し代表される 3 か所を選んだ。400 倍で観察しうる全ての上皮細胞 (癌細胞を含む) を、染色の濃さによって陰性 (全く染まらない、Staining Intensity 0)、弱陽性 (internal control より弱い、Staining Intensity 1)、中等度陽性 (internal control と同じ染まり方、Staining Intensity 2)、強陽性 (internal control より強い、Staining Intensity 3) の 3 段階で評価した⁸⁾。細胞数とそれぞれの濃さに染色された細胞個数を数えた。複合スコアは染色濃度 0 の細胞割合 X0 + 染色濃度 1 の細胞割合 X1 + 染色濃度 2 の細胞割合 X2 + 染色濃度 3 の細胞割合 X3 と計算した。Composite score = Staining Intensity (1-3) × Percentage of Immunopositive Cells (0-100%)。したがってこのスコアの結果は 0-300 であらわされ、300 は全ての癌細胞が強陽性であることを示している。internal control は線維芽細胞や血管内皮細胞を用いた。

統計

BBN 投与前後における体重および膀胱重量の有為差検定には t 検定を用いた。また BBN 投与後膀胱癌発生頻度は χ^2 二乗検定を用いて差を検証した。Kaplan-Maier 法にて生存率曲線を作成し、Cox 比例ハザードモデルを用い Log rank 検定にて rasH2 と WT の生存期間の比較を行った。有意水準 $p < 0.05$ の場合、統計的な有意差があると判定した。

4. 研究成果

BBN 投与前の膀胱における H-RAS 蛋白の発

現は rasH2 が野生型と比べて多い(図 1b)。したがって rasH2 は活性化型 *H-RAS* 遺伝子導入マウスであるが、膀胱においても H-RAS 蛋白が過剰発現していることが確認された。

BBN 投与後の体重の推移は、開始 5 週後 (rasH2: 20.4 ± 2.8g、WT: 21.1 ± 2.5g、P=0.4410)、10 週後 (rasH2: 22.4 ± 3.0g、WT: 22.7 ± 3.3g、P=0.2778)、15 週後 (rasH2: 24.0 ± 3.4g、WT: 24.7 ± 4.2g、P=0.1772)、20 週後 (rasH2: 22.8 ± 4.7g、WT: 25.9 ± 5.2g、P=0.0203)、25 週後 (rasH2: 21.6 ± 3.3g、WT: 25.8 ± 4.0g、P=0.0083) と投与開始 20 週以降、rasH2 の方が WT と比べて有意に少なかった。実験経過中を通して rasH2 と WT の間で飲水量に差は認められなかった。

BBN 投与開始 10 週後、20 週後の膀胱病理所見を表に示す。BBN 投与開始 10 週後では WT12 匹中 9 匹に膀胱癌が観察されたのに対して rasH2 では 12 匹全例に膀胱癌が認められた ($\chi^2=3.4286$, $p=0.0641$)。20 週後では WT20 匹中 18 匹に膀胱癌が観察されたのに対して rasH2 では 16 匹全例に膀胱癌が認められた ($\chi^2=1.6941$, $p=0.1931$)。このように rasH2 では BBN 投与開始 10 週後でも 20 週後でも 100% に膀胱癌の発症が確認されたが、野生型でも 100% ではないにしても高頻度に膀胱癌が発生し有意な差は認められなかった。しかし、BBN 投与 20 週後に摘出した膀胱重量を測定すると rasH2 では WT より有意に重かった (rasH2: 0.6 ± 0.4、WT: 0.1 ± 0.3g、P=0.0146)。そこで膀胱癌のなかでもより病期が進行した浸潤性膀胱癌の発生頻度を検討した。

BBN 投与開始 10 週後では、オス、メスいずれでも浸潤性膀胱癌発症頻度は rasH2 が WT より有意に高かった (オス, rasH2: 8/8 (100.0%), WT: 3/8 (37.5%), $\chi^2=7.2747$, $p=0.0070$, メス, rasH2: 4/4 (100.0%), WT: 1/4 (25.0%), $\chi^2=4.8000$, $p=0.0285$)。また、BBN 投与

開始 20 週後でも、オス、メスいずれも浸潤性膀胱癌発症頻度は rasH2 が WT より有意に高かった (オス, rasH2: 8/8 (100.0%), WT: 5/10 (50.0%), $\chi^2=5.5385$, $p=0.0186$, メス, rasH2: 7/8 (87.5%), WT: 3/10 (30.0%), $\chi^2=5.9513$, $p=0.01478$)。

BBN 投与前後の WT と rasH2 の膀胱病理所見を比較したが両者ともに尿路上皮癌であり明らかな違いを認めなかった。

別のグループでは BBN 投与 20 週間終了後も飼育を続け生存期間を検討した(図 2)。平均生存期間は rasH2 (23.2 週) が野生型 (24.3 週) と比べて有意に ($P=0.0328$) 短かった。rasH2、WT ともに死亡時に明らかな転移巣は認められなかった。しかし、全例で水腎症を認めたことから局所進展に伴う水腎症による腎不全が死因であると想像された。

H-RAS 蛋白の過剰発現がどのような細胞内シグナルで膀胱癌に関与しているか検討するために、c-MYC の蛋白発現を免疫染色にて検討した(図 3)。BBN 投与 20 週後に (rasH2 10 匹、WT 10 匹) 検討すると、rasH2 (図 3a) における膀胱癌の方が WT (図 3b) と比べて c-MYC 蛋白の発現が亢進していた。Composite score は rasH2 122.1 ± 17.2、WT 95.9 ± 26.9 と有意に ($P=0.0138$) rasH2 の方が高値であった(図 3c)。

ヒト膀胱癌症例におけるテストステロン値を検討した。TUR-Bt を施行し表在性膀胱癌と診断された 180 例中男性症例 146 例を対象とし血清テストステロン値を検討した。再発あり群と再発なし群で年齢(再発あり群: 67.2 ± 12.4 歳、再発なし群: 68.1 ± 10.2 歳、 $p=0.7244$) および遊離テストステロン(再発あり群: 5.9 ± 2.0、再発なし群: 68.1 ± 10.2 歳、 $p=0.7244$) に差を認めなかったが、テストステロン値を比較すると、有意に再発あり群の方が低かった(再発あり群: 411.8 ± 194.4 ng/ml、再発なし群: 515.9 ± 214.9 ng/ml、 $p=0.0396$)。

BBN膀胱発癌. 第98回日本泌尿器科学会総
会. 2010年4月27-30日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯谷 周治 (ISOTANI SHUUJI)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号: 70398741

図 1

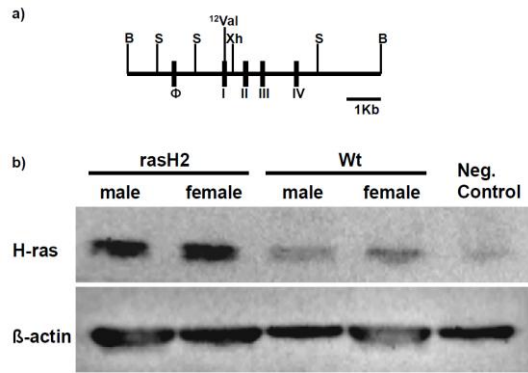


図 2

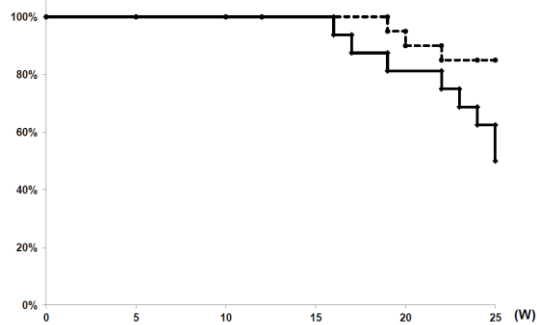
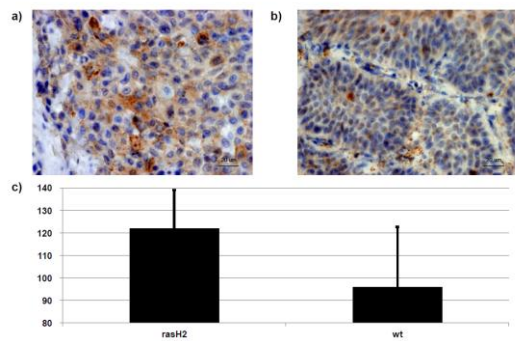


図 3



5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- ① 武藤 智、磯谷周治、堀江重郎. ヒトプロト型 H-ras トランスジェニックマウス rasH2 に対する BBN 膀胱発癌. 第 15 回日本がん分子標的治療学会学術集会. 2011 年 6 月 23 日.
- ② 于 净松、陸 彦、木村美恵、磯谷周治、井手久満、武藤 智、堀江重郎. ヒトプロト型 H-ras トランスジェニックマウス rasH2 に対する