

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15506

研究課題名（和文）膀胱癌において慢性腎臓病（CKD）が担う分子機能的役割の解明

研究課題名（英文）The molecular and functional role of chronic kidney disease in bladder cancer

研究代表者

小畠 浩平（Kobatake, Kohei）

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：10749998

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、過去に筋層非浸潤性膀胱癌患者における経尿道的膀胱腫瘍切除術前の腎機能を評価し、術前に慢性腎臓病（CKD）を有する患者群（特にeGFR<45）では術後の再発率が有意に高い事を明らかにした。CKDは現在Common diseaseの一つであり、今後も増加が見込まれている。我々はその背景にある分子機序を解明することを目的とし本研究を行った。その結果、膀胱癌を含む種々の癌腫の発症進行に關与するとされる遺伝子の発現上昇を認めた。本研究の成果は新規膀胱癌治療法開発の基礎となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱癌のうち、筋層非浸潤性膀胱癌は進展リスクこそ高くないものの、全ての固形癌の中で最も局所再発を起こしやすい癌として知られる。また慢性腎臓病は現在罹患率が上昇傾向であり、今後も患者数の増加が見込まれている。筋層非浸潤性膀胱癌の治療コストは長期にわたる経過観察と治療により増加し、また患者QOLは著しく低下する。少しでも再発率を低下させる事は喫緊の課題と得る。我々の研究成果を基に新規阻害剤を開発することで、これらの問題を解決しうるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We previously evaluated the renal function before transurethral bladder tumor resection in patients with non-muscle-invasive bladder cancer, and we demonstrated a significantly higher recurrence rate after surgery in patients with preexisting chronic kidney disease (CKD), particularly those with an eGFR (estimated glomerular filtration rate) < 45. CKD is currently recognized as a common disease and is expected to continue increasing in prevalence. In this study, our objective was to elucidate the molecular mechanisms underlying this association. As a result, we observed an upregulation of genes known to be involved in the development and progression of various tumors, including bladder cancer. The findings from this study provide a foundation for the development of novel therapeutic approaches for bladder cancer.

研究分野：膀胱癌

キーワード：膀胱癌 慢性腎臓病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### ・膀胱癌の問題点

膀胱癌は男女比約 4 対 1 で男性に多く、世界全体の年齢調整発生率は、女性で 10 万人当たり 2.5、男性では 10 万人当たり 10.1 にも達する。膀胱癌は、筋層非浸潤性膀胱癌 (NMIBC) および筋層浸潤性膀胱癌 (MIBC) に大別され、NMIBC であれば膀胱は温存される。しかしその場合でも再発率は 48-71% と極めて高く、再発に応じた追加治療及び生涯にわたる経過観察を必要とする。膀胱癌の局所再発予防として、Bacillus Calmette-Guérin (BCG) の膀胱内注入療法が最も一般的であるが、種々の副作用のため完遂率は高くない。そのため膀胱癌は再発率の高さのみならず、最も医療コストのかかる悪性腫瘍の一つであることも問題となっている。

#### ・膀胱癌と CKD の臨床的関連

CKD は腎障害や腎機能の低下が持続する疾患であり、その背景には加齢や生活習慣病が深く関与している。腎機能と癌には関連があるとされ、古くは末期腎不全患者における透析腎癌が有名である。興味深い事に、近年 1,190,538 人を対象として固形癌と CKD の発症率を調査した報告によると、CKD 患者(特に eGFR < 30ml/min./m<sup>2</sup>) では腎細胞癌の発症率に加えて、尿路上皮癌(そのうち 95% が膀胱癌) の発症率が有意に増加した(1)。

さらに、申請者らの報告(2)を含め複数の施設からの報告により、NMIBC, MIBC のいずれにおいても CKD が膀胱癌治療後の再発危険因子である事が示された。しかしながら、これらは全て後ろ向きコホート研究であり、CKD がなぜ膀胱尿路上皮における、発癌および再発リスクを増加させるのかを直接的に解明した報告はない。

### 2. 研究の目的

CKD は急性腎障害、糖尿病、心血管病変など多種多様な患者背景が発症に関与する疾患であり、正確な罹患期間も不明な事が多い。膀胱癌もまた、喫煙歴や化学染料への暴露など、種々のリスク因子が発症に関与する。一方で、膀胱癌における CKD の真の影響を明らかにするためには、患者背景をなるべく厳密に揃えた集団において、膀胱組織や尿検体における遺伝子発現変化を検証する必要がある。申請者らは、この問題の解決のためにはヒト検体の検討のみでは不十分であり、マウスモデルを用いる事で、可能な限り同一の背景を持つ集団の解析が可能になると考えた。本研究はマウスモデルを用いて、膀胱癌における慢性腎臓病 (CKD) が担う分子機能的役割を解明する事を目的とする。

### 3. 研究の方法

1) CKD マウスモデルと対照群を作製し、膀胱特異的発癌物質により膀胱癌を誘導する。2) 膀胱組織および尿を採材し、病理組織学的、分子生物学的特徴を比較検証する。

1) について具体的行程を示す。

本研究では 8 週齢の野生型オス C57BL/6 を用いる。CKD 群は、既報に準じて左腎血管のクリッピングによる腎阻血を 21-24 分行った後再灌流する。その後 2 週間の回復期間を設け、右腎摘を行う。対照群は、右腎摘のみを行う。各群は、2 週間の回復期間を設けた後さらに、0.05% BBN 含有水を最長 12 週、自由飲水により摂取させる群 (BBN 内服群) と、BBN 非内服群) に分ける。

2) について具体的内容を以下に記す。

全ての群で、研究開始前および、0, 4, 8, 12 週に採血および尿の採取を行う。

血液検体 ; 1 回当たり 80μl の血清を分離可能な量を採取する。外注検査で尿素窒素、クレアチニン値の測定を行う事で、腎機能の経時的な変化を観察する。

尿検体 ; 各タイミングで複数回に分けて合計 500μl 収集し、セルフリー DNA 抽出キットによる DNA 精製を行う。次世代シーケンサーを用いた網羅的な尿中遺伝子発現解析を行い、膀胱発癌に関わる CKD に特異的な尿中因子の探索を行う。

尿路上皮 ; 過去の報告および自験例から、野生型マウスの BBN 投与は 8 週で異形成、12 週以降で上皮内癌を生じる。各群 4 週毎にマウス膀胱を採材、正中で 2 分割し、一方は病理組織学的検査 (および免疫組織学的検査) 用にホルマリン固定する。他方は 1 型コラゲナーゼ処理により尿路上皮を単離する。尿路上皮から Total RNA 抽出後、mRNA-sequencing を行う。得られた発現データから Gene Set Enrichment Analysis を行い、遺伝子単独のみならず遺伝子群としての発現変化を比較検証する事で、CKD に特異的な癌関連遺伝子を同定する。

### 4. 研究成果

#### ・CKD モデルの作成

CKD モデルマウス (片側腎摘 + 片側腎阻血モデル) を既報に準じて作成した。C57BL/6 マウスを用い、麻酔下に左腎を露出させ、腎血管にクリップをかけて 21 - 23 分間腎阻血を行った。その後閉創し、回復期間を 2 週間設けた。次に再度麻酔下に右腎摘を行った。片側腎摘のみのマウス (シャムマウス) をコントロールとして用いた。BBN 内服なしで発がん誘導が得られるか

を調査するため、まずは各マウスを3か月自然経過観察（自由飲水、通常飼料）した。

#### ・腎機能比較

野生型、CKDモデルマウス、コントロールマウスそれぞれに対して、額下静脈採血を施行した。約200 $\mu$ l採血を施行してエッペン・ドルフに収集したのち、室温で一晩静置した。その後spin-downして上清のみを採取し、外注検査にて尿素窒素（BUN）・クレアチニン（Cre）値を測定した。その結果、野生型、コントロール、CKDモデルの順にCre値が上昇している事が判明した（ $p = 0.0462$ ）。一方でBUN値には各群で有意差を認めなかった。

#### ・尿路上皮の採材

次に、CKDマウス（2匹）とコントロールマウス（1匹）の膀胱を採材した。腹膜を開放し、膀胱を視認したのち周囲を剥離して膀胱頸部抹消側で離断、PBS添加した培養 Dish 上に置き、倒立顕微鏡下に縦方向に2分割した。片方は、顕微鏡下に膀胱尿路上皮と筋層の境界を同定し、撮子で把持して尿路上皮を剥離、1型コラゲナーゼ処理にて尿路上皮細胞を単離しクライオチューブに入れて-80 $^{\circ}$ Cで保存した。もう片方は形態を保ったままクライオチューブに入れて予備組織として-80 $^{\circ}$ Cで保存した。肉眼的には尿路上皮に異型細胞を確認できなかった。

#### ・尿路上皮における遺伝子発現比較

保存した尿路上皮細胞をメッセンジャーRNA-sequencing に提出した。得られたデータを基に、相対的 FPKM 値（コントロールと比較してCKDモデル2匹それぞれにおいて作成）を算出した。Cut-off 値をコントロールマウス側で FPKM  $\geq 1.0$  とし、各比較においてCKDモデル側で5倍以上上昇している遺伝子について調査した。まず、既報からCKD患者の血中および尿中バイオマーカーとなる遺伝子をピックアップし、同一の遺伝子を検索したが特定できなかった。一方で、CKDモデル側で発現が上昇している遺伝子上位30位のうち、17遺伝子が膀胱癌または他癌腫において、発がんまたはがんの進行と関連していることが判明した。

次に発現値を用いて Gene set enrichment analysis を施行した（CKDモデル2匹対コントロール1匹）。その結果、CKDモデルで正に濃縮されており、NOM  $p < 0.05$  および FDR- $q < 0.25$  を満たす gene set は4種類のみ（WP\_ELECTRON\_TRANSPORT\_CHAIN、WP\_OXIDATIVE\_PHOSPHORYLATION、WP\_CYTOPLASMIC\_RIBOSOMAL\_PROTEINS、WP\_GLUTATHIONE\_METABOLISM であった。

研究開始当初はBBNを内服させる事で発がんを誘導する予定であったが、自然経過観察のみにおいて大規模な遺伝子発現変化が尿路上皮に起きている事を確認できたため、この結果を基にヒト組織での解析を行う予定を追加した。

#### ・ヒト膀胱癌組織を用いた検証

CKDモデルマウスで発現が上昇した特定の遺伝子のうち、我々はDGKA (diacylglycerol kinase, alpha) に着目した（コントロールに対するFPKM相対的発現はCKDモデル1において17.99倍、CKDモデル2において17.38倍）。DGKAは複数の癌腫において癌の進行への関与やPD-1抗体に対する抵抗性への関与が報告されている。この遺伝子がコードするタンパクについて、実際の発現上昇が膀胱癌の挙動に影響を及ぼすかを検証する事とした。

実臨床検体を用いて免疫染色を行うため、当科で筋層浸潤性膀胱癌に対して膀胱全摘除術を施行した症例のサンプルのうち1999年から2011年までの期間を対象とし、全て術前抗癌化学療法未施行の76検体（一部は同一患者の異なる部位の組織）のパラフィンブロックを用意した。全症例の術前患者背景因子および、画像学的な水腎の有無を調査した。次に、これら検体から切り出した薄切を用いて免疫組織化学的染色を行い、患者背景因子および術前腎機能と染色強度を比較検討する予定である。

#### ・ヒト膀胱癌細胞株を用いた検証

さらなる検証のためにヒト膀胱癌細胞株を6種類用意した(UMUC3, UMUC13, 5637, RT112, RT4, T24)。DGKAに対するウエスタンブロッティングを行い、全ての細胞株においてDGKAタンパクの発現を確認した（UMUC3、UMUC13ではやや発現が弱い一方でその他の細胞株では全て発現が高い）。これらの細胞株を用いてRNA interferenceによってDGKA遺伝子発現を抑制し、その後の細胞株の挙動を観察する事を目的として、異なる配列をターゲットとしたsiRNAを2種類購入した（siDGKA-1, -2）。

当科ではsiRNAを用いた遺伝子抑制実験のプロトコールを以前から確立している。今後はこれらによって作成したDGKA抑制細胞株とコントロール株を用いて、我々のプロコールに沿って細胞増殖能の比較（MTS assay）、細胞浸潤能の比較（wound-healing assay）、細胞転移能の比較（invasion assay）を行う。最終的にはCKDを有する膀胱癌患者ではDGKAの発現が上昇しており、発がんまたは癌の進行に寄与する事を証明し報告する予定である。

参考文献 (1) Lowrance WT, et al. J Am Soc Nephrol. 2014

(2) Kobatake K, et al. Int J Urol. 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------