

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592331

研究課題名(和文) 尿路上皮癌の悪性進展における上皮間葉転換の分子生物学的検討

研究課題名(英文) The role of EMT on malignant progression of urothelial carcinoma.

研究代表者

村蒔 基次 (Muramaki, Mototsugu)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10448178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：表在膀胱癌においてN-cadherinの発現亢進症例において有意に高頻度に術後膀胱内再発が高く、独立した予後因子であることを確認した。腎盂尿管癌において術後膀胱内および膀胱外再発のいずれについてもN-cadherin発現亢進は独立した予測因子であることを確認した。いずれの知見も査読のある泌尿器科専門誌に投稿し受理された。

研究成果の概要(英文)：The loss of E-cadherin and gain of N-cadherin expression in on NMIBC appeared to be significantly associated with postoperative recurrence; therefore, the switch from E-cadherin to N-cadherin expression might be involved in the mechanism underlying intravesical recurrence of on NMIBC. Expression profiles of E-cadherin and N-cadherin, particularly the gain of N-cadherin rather than loss of E-cadherin expression, in UC-UUT appeared to be significantly associated with disease recurrence after nephroureterectomy.

研究分野：医学研究

科研費の分科・細目：基盤研究(C)

キーワード：膀胱癌 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

尿路上皮癌は主に膀胱、腎盂、尿管より発生する。その中で膀胱癌が最も発生頻度が高く、人口 10 万人あたり、男性 5 人、女性 1.5 人と報告されている。膀胱癌は臨床的に筋層非浸潤膀胱癌と筋層浸潤膀胱癌に分類される。約 70%の初発膀胱癌は筋層非浸潤膀胱癌であり、内視鏡的切除により膀胱を温存することが可能である。筋層非浸潤膀胱癌が筋層浸潤膀胱癌に進展するのは 20-30%である。腎盂癌の発生頻度は全尿路上皮腫瘍のうち約 5%で、尿管癌はさらに低頻度である。筋層非浸潤膀胱癌に対しては経尿道的膀胱腫瘍切除術が、筋層浸潤膀胱癌に対しては膀胱腺摘除術が第一選択として施行される。転移を有さない腎盂尿管癌に対しては腎尿管全摘除術が施行される。膀胱癌、腎盂尿管癌ともに pT3 以上の症例の予後が極めて不良である。これは尿路上皮癌が早期に浸潤および転移を起こしやすい生物学的特徴を反映しているものと考えられている (Jemal AT, et al, CA Cancer J Clin, 2005; , Bellmunt J, et al, Semin Oncol, 2007)。従って、尿路上皮癌の転移・浸潤の詳細な分子機構を解明する研究は、転移・浸潤を制御する治療薬の創薬に発展する可能性を有しており、現在多くの研究が進行中である。

上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) は 1980 年代にその概念が提唱されて以来、発生、創傷治癒、繊維化の過程で起こる現象として広く認められている。EMT の組織細胞学的定義は、(1) 細胞形態(morphology)の変化、(2) a E-cadherin などの上皮系タンパクの発現低下、b Vimentin, N-cadherin, fibronectin などの間葉系タンパクの

発現亢進、(3) 運動能(motility)の獲得または亢進が挙げられる。近年、癌細胞にも高頻度に EMT が起こることが証明されている。さらにそれら EMT を起こした癌細胞において遊走能と浸潤能亢進することが示されており、EMT は癌の進展に非常に重要な役割を担っていると考えられている。さらに最近の研究によると、EMT を起こした癌細胞は薬剤耐性や免疫寛容能や自己複製能などの幹細胞様能力も獲得することが分かってきており、癌幹細胞 (Cancer stem cell) との関連も指摘されている (Mani SA, et al, Cell, 2008)。また EMT を起こした癌細胞が再び上皮細胞化する間葉上皮転換 (MET) も原発巣および転移巣に関わらず比較的恒常的に発生しているものと考えられている。膀胱癌を含む種々の固形癌において、転移巣の組織像が必ずしも EMT 様ではなく、原発巣に類似した組織形態を取りがちであることを支持する所見であり、上記のモデルが提唱されるに至っている (Chaffer CL, et al, Differentiation, 2007)。EMT を起こした細胞以外にも転移・浸潤する細胞の存在も想定されるため、未だ明らかでは無い点が多いが、EMT/MET を制御する分子機構を解明することが急務となっている。

まず我々は E-cadherin に注目した。E-cadherin は上皮細胞の代表的な接着分子であり、細胞間接着に寄与しており、尿路上皮癌を含む数多くの癌の悪性度とその発現が逆相関することが知られている (Mialhe A, et al, Invasion Metastasis, 1997)。当教室でも従来から膀胱癌における E-cadherin の発現と癌の悪性度および臨床経過との相関関係を研究してきた (Fujisawa

M, et al, World J Urol, 1996)。しかしながら、おそらく E-cadherin タンパクの発現減少または機能低下は癌の悪性進展の比較的早期におこるため、既知の予後因子と比較して、より強力な予後予測因子となりにくいことは膀胱癌を含む種々の癌において明らかになりつつある。Cadherin は膜 1 回貫通型の糖タンパクであり、E-cadherin を含む数種のファミリーが存在することが知られている。N-cadherin は間葉系細胞に主に発現することから、EMT マーカーの一つとされる。N-cadherin は近年、膀胱癌を含む数種の固形癌で発現が亢進していることが示された (Rieger-Christ KM, et al, Oncogene, 2004)。我々の組織学的検討においても、表在膀胱癌において N-cadherin の発現亢進症例において有意に高頻度に術後膀胱内再発が高く、独立した予後因子であること (Muramaki M, et al, Urol Oncol, 2010)、腎盂尿管癌において術後膀胱内および膀胱外再発のいずれについても N-cadherin 発現亢進は独立した予後因子であること (Muramaki M, et al ; 投稿中)を確認している。さらに腎細胞癌において N-cadherin 発現亢進は早期例および進行例いずれにおいても術後再発または進行と相関し、多変量解析において病理学的 T 分類と遠隔転移の有無とともに独立した予後予測因子であることも確認している (未発表データ)。これらのデータは N-cadherin の発現亢進を中心におこる EMT と尿路上皮癌の悪性進展が密接に関連していることを強く示唆していると考えられる。

2 . 研究の目的

癌における上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) は、癌細胞に浸潤・転移能をもたらす主要な機構の一つと考えられており、E-cadherin の発現低下と N-cadherin の発現亢進を伴うことが多い。さらに癌幹細胞の発生、維持に EMT が関与していることも明らかになりつつある。我々は尿路上皮癌臨床検体において E-cadherin の発現低下と N-cadherin の発現亢進が独立した予後予測因子であることを報告してきた。本研究の目的は、尿路上皮癌における EMT の意義を検討し、その制御機構ならびに癌幹細胞との関連を明らかにすることである

3 . 研究の方法

(1) 膀胱癌培養細胞のスクリーニング

In vitro 実験に備えて、当科で保有する膀胱癌細胞株のスクリーニングを行う。すなわち、E-cadherin および N-cadherin の mRNA レベルおよびタンパクレベルでの発現をそれぞれ、リアルタイム RT-PCR 法およびウエスタンブロット法にて解析する。培養細胞株のほとんどは進行性膀胱癌より樹立されており、E-cadherin の発現は低下または消失している可能性が高いと考えられる。さらに他の EMT マーカーである Vimentin および Fibronectin についても mRNA レベルおよびタンパクレベルでの発現スクリーニングを行う。

(2) N-cadherin 発現ベクターの開発

N-cadherin 強発現膀胱癌細胞株を同定し、N-cadherin 全長を増幅する PCR プライマーを用いて N-cadherin CDS をクローニングする。この PCR 産物を pcDNA3.1 発現ベクターに導入し、N-cadherin 発現ベクターを作成する。

(3) N-cadherin 過剰発現株の作成

E-cadherin 発現陰性かつ N-cadherin 発現陰性の膀胱癌細胞株に N-cadherin 発現ベクターを導入する。G418 によるクローン選択を行い、N-cadherin 安定過剰発現株を作成する。E-cadherin 発現陽性かつ N-cadherin 発現陰性の膀胱癌親細胞株をスクリーニングにより確認している場合には、市販の E-cadherin に対する short hairpin siRNA 導入ベクターを購入し、これらのベクターを段階的に導入する。すなわち、E-cadherin 発現陽性かつ N-cadherin 発現陰性の膀胱癌親細胞株に対し、まず E-cadherin のノックダウンを行い安定株を得る、その後、N-cadherin 過剰発現株を作成する。

(4) 当院における尿路上皮癌に対する手術症例の摘出標本に対し、免疫組織学的検討を行った。すなわち、パラフィン抱埋された標本に E-cadherin および N-cadherin 抗体を用いた免疫組織学染色を行い、発現パターン

および臨床病理学的因子と予後との関係を解析した。

4. 研究成果

我々の組織学的検討により、表在膀胱癌においてN-cadherinの発現亢進症例において有意に高頻度に術後膀胱内再発が高く、独立した予後因子であることが確認されたため、腎盂尿管癌についても免疫組織学的検討を加えていた。腎盂尿管癌において術後膀胱内および膀胱外再発のいずれについてもN-cadherin発現亢進は独立した予測因子であることを投稿中であったが、さらに上部尿路尿路上皮癌におけるEMT関連免疫組織学的知見を、本研究の一環として投稿中論文に追加し、再投稿した。その結果、Urology 2011, 78(6): 1443 e7-12に掲載された。

E-cadherinおよびN-cadherinのmRNAレベルおよびタンパクレベルでの発現をそれぞれ、リアルタイムRT-PCR法およびウエスタンブロット法にて解析した。その結果、我々が所有するヒトおよびマウス膀胱癌培養細胞のうち数種類からN-cadherin過剰発現を認めた(未公開)。VimentinおよびFibronectinについてもmRNAレベルおよびタンパクレベルでの発現スクリーニングを行った。これら過剰発現株よりN-cadherin全長CDSをPCR法により増幅、精製し、ヒト発現ベクターを作成した。

E-cadherin 発現陽性かつ N-cadherin 発現陰性の膀胱癌親細胞株をスクリーニング確認したため、市販の E-cadherin に対する short hairpin siRNA 導入ベクターを購入し、E-cadherin のノックダウンを行い安定株を得た。N-cadherin 過剰発現系が実験途上のため E-cadherin のノックダウン安定株は冷凍保存している。現在 E-cadherin 発現陽性かつ N-cadherin 発現陽性膀胱癌株にたいし、E-cadherin ノックダウンを行い、安定株の樹立を試みたが、困難であり、研究期間内での樹立を断念した。本研究で得られる可能性のあった N-cadherin 発現陽性かつ E-cadherin 発現陰性膀胱癌株を用いた in vitro および in vivo 実験の実施を断念した。しかしながら本研究と同様の免疫組織学的検討を腎細胞癌手術施行症例に対して行ったところ、N-cadherin と E-cadherin の発現パターンが術後非再発生存率と有意に相関しており、独立した予後因子であることを見いだした。

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 2 件)

Expression profile of E-cadherin and N-cadherin in non-muscle-invasive bladder cancer as a novel predictor of intravesical recurrence following transurethral resection.

Muramaki M¹, Miyake H, Terakawa T, Kumano M, Sakai I, Fujisawa M.

Urol Oncol. 2012 Mar-Apr;30(2):161-6. (査読あり)

Expression profile of E-cadherin and N-cadherin in urothelial carcinoma of the upper urinary tract is associated with disease recurrence in patients undergoing nephroureterectomy.

Muramaki M¹, Miyake H, Terakawa T, Kusuda Y, Fujisawa M.

Urology. 2011 Dec;78(6):1443.e7-12. (査読有り)

[学会発表](計 2 件)

2013 癌学会総会 発表者名 村蒔基次; 発表演題 Expression profile of E-cadherin, N-cadherin and P-cadherin in localized prostate cancer as prognostic indicators. 発表年月日 2013.10.5; 発表場所 京都

2012 癌学会総会 発表者名 村蒔基次; 発表演題 Expression profile of E-cadherin, N-cadherin and P-cadherin in renal cell carcinoma as prognostic indicators.; 発表年月日 2012.9.20; 発表場所 札幌

[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 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村蒔 基次 (Muramaki Mototsugu)
神戸大学 医学部附属病院 泌尿器科
講師
研究者番号：10448178

(2) 研究分担者

三宅 秀明 (Miyake Hideaki)
神戸大学 医学部研究科 泌尿器科学分
野
研究者番号：60379435

(3) 連携研究者

()

研究者番号：