

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592333

研究課題名(和文) 中心体複製異常を指標とした新しい膀胱癌治療の試み

研究課題名(英文) New treatment strategy of bladder cancer indexed by centrosome amplification

研究代表者

松山 豪泰 (MATSUYAMA, Hideyasu)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70209667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は中心体複製異常(以下CA)の責任遺伝子を制御するmicroRNA導入治療により中心体複製異常およびパクリタキセル耐性を克服できるかを検討することである。Array-CGH法にてCA陽性例と陰性例の間でコピー数が有意に異なる遺伝子をピックアップし、同定された遺伝子の標的microRNAを検索し、hsa-miR-1225-5pおよびGBASがリストアップされた。同遺伝子をCA非発現培養細胞株(KK47)に強制発現させた株ではCAが有意に増加し、CA陽性株となった。現在、親株と樹立株の間で増殖、浸潤能、パクリタキセル感受性について検討中である。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study were to identify the relevant gene of centrosome amplification (CA) and its regulating microRNA (miR) in bladder cancer, to establish the CA-positive from CA-negative (KK-47) bladder cancer cell line by the gene transfer technique, and to compare the invasive phenotype, or sensitivity of paclitaxel between parent and gene-transferred cell line. To pick-up the relevant genes to CA, array CGH technique was applied and referred the open miR database to find the relevant miR regulating such genes. As a result, hsa-miR-1225-5p and GBAS was selected as miR and relevant gene to control CA, respectively. The GBAS transferred KK-47 cell lined showed significantly higher cell population with CA than parent KK-47 cell lines. Comparison of invasive phenotype, sensitivity of paclitaxel between parent and gene-transferred cell line are under investigation.

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 中心体複製異常 薬剤感受性 パクリタキセル

1. 研究開始当初の背景

癌細胞では中心体複製異常 (Centrosome Amplification 以下 CA) が発生し、染色体不安定性を誘導することが報告されている。Taxane 系抗ガン剤の作用機序は細胞分裂時 microtubule の重合により中心体複製異常および分裂期チェックポイントを誘導、mitotic catastrophe による殺細胞効果である。しかし p53 遺伝子変異の多い浸潤性膀胱癌において CA 症例は細胞周期 G1/G2 期および分裂期チェックポイント機能が働かず、抗癌剤投与後生き残った細胞は細胞回転が進行し、Taxane 系抗癌剤の耐性化を誘導することが明らかになっている。われわれはこれまで泌尿器癌のゲノム変異と予後との関連を FISH (fluorescence in situ hybridization) 法にて解析報告し、ゲノム変異が泌尿器癌の予後予測に有用であることを明らかにしてきた。また中心体に関連する一連の研究で CA がヒト膀胱癌臨床検体の約 6 割で発生し、再発や腫瘍進展予測の独立予後因子であることをはじめて発見報告した。また膀胱癌継代培養細胞株をもちいた検討で CA 陽性細胞株は、陰性株に比べ有意にパクリタキセル感受性が低下していることが報告されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は膀胱癌の腫瘍進展に強い影響を与える中心体複製異常の責任遺伝子の臨床検体における発現を検討し、同遺伝子を制御する microRNA (以下 miR) 導入治療により中心体複製異常を改善できるか、また複製異常は正によりパクリタキセル耐性を克服できるかを検討することである。

3. 研究の方法

膀胱癌継代培養細胞株 (KK47, 5637, J82, T24, TCCSup) および臨床検体を用いて蛍光免疫染色法により CA を判定後、(1) array-CGH 法を用いて CA 陽性症例と陰性症例間で遺伝子コピー数の差異を指数関数の重みを用いた重み付き t 検定により比較検討、さらに(2) Aurora-A 関連遺伝子を制御する miR のうち同定された遺伝子群をターゲットとしている可能性のある miR を公開データベースで検索し、標的 miR およびそのターゲット遺伝子を絞り込んだ。さらに(3)同定された遺伝子を CA 非発現培養細胞株 (KK47) に強制発現させた株を用いて親株との差異を検討した。

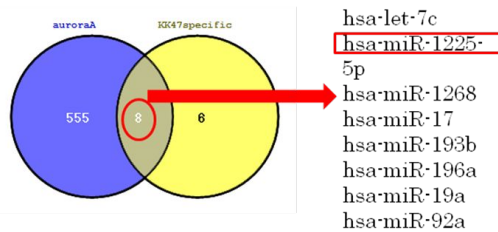
4. 研究成果

(1)の結果より ABI1、C10orf51、ZNF253、ZNF93、XRCC5、SPOP、SLC35B1、ZNF713、MRPS17、GBAS、PSPH、CCDC83 の遺伝子群が CA 陽性例で有意のコピー数変異をきたしていた。

Chromosome Locus	Array-CGH (mean)		CA+ Copy number	Candidate gene
	CA+	CA-		
10p12.1	0.0214	-0.0961	gain	ABI1, C10orf51,
7p11.2	0.0894	-0.0199	gain	ZNF713, MRPS17, GBAS, PSPH
17q21.33	0.1237	-0.0380	gain	SPOP, SLC35B1,
19p12	0.0773	-0.0627	gain	ZNF253, ZNF93,
2q35	-0.1435	0.0054	loss	XRCC5,
2q36.3	-0.1724	-0.0117	loss	
2q37.3	-0.1656	0.0203	loss	

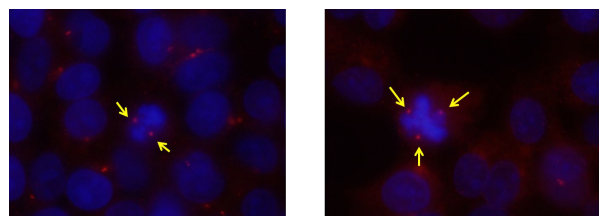
これらの結果について論文(1)(2)として報告した。

(2)の結果より AuroraA 関連遺伝子を制御し、KK47 で特異的に変動している miR として hsa-let-7c、hsa-miR-1225-5p、hsa-miR-1268、hsa-miR-17、hsa-miR-193b、hsa-miR-196a、hsa-miR-19a、hsa-miR-92a がリストアップされ、(1)の遺伝子群をターゲットとしている可能性のある関連を 2 つの異なる公開データベースで検索した結果、共通する microRNA およびそのターゲット遺伝子として hsa-miR-1225-5p および GBAS がリストアップされた。



systematic_name	T_24	TCC_SUP	KK47	s5637	J82
hsa-let-7c	142.312002	146.92148	414.849808	84.8226768	115.79298
hsa-miR-1225-5p	62.705784	0.1	286.932832	2.44146	0.1
hsa-miR-1246	83.054379	0.1	897.63902	3.356462	0.1
hsa-miR-1268	65.185756	13.786076	336.483324	27.8075656	32.528058
hsa-miR-17	367.667204	435.10248	128.13236	536.18464	367.667204
hsa-miR-193b	48.35866	90.33314	294.617266	73.4238736	68.902521
hsa-miR-196a	23.712536	21.49794	115.79298	18.5085942	24.5810458
hsa-miR-19a	286.932632	272.878418	83.054379	435.10248	247.820454
hsa-miR-2861	15.156568	0.1	113.975992	2.17986	7.654836
hsa-miR-3656	47.60204	0.1	314.83818	9.376604	0.1
hsa-miR-4299	0.1	0.1	146.92148	0.1	0.1
hsa-miR-638	33.005642	0.1	203.968842	4.964022	15.156568
hsa-miR-92a	203.968842	169.6802848	59.157866	211.87664	191.7067232
hsa-miR-99a	9.7956278	0.1	142.312002	0.1	0.1

CA 陰性である KK47 株に GBAS を強制発現させた株を樹立し、親株と比較検討したところ、CA は有意に増加し、CA 陽性株であることが確認された。



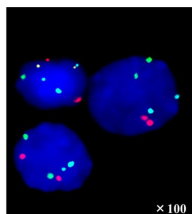
KK47親株 %CA 2.0%
KK47 GBAS強制発現株 %CA 20.3%

* 矢印は中心体を示す。%CA: 中心体複製異常細胞(中心体数≥3/cell)の割合

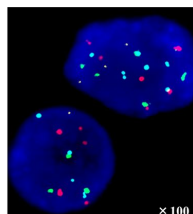
現在、親株と樹立株の間で増殖、浸潤能、パクリタキセル感受性について検討中である。

また膀胱洗浄液を用いた CA 検出法を確立し、CA 陽性臨床例は腫瘍進展の独立予後因子であることを証明し論文(3)として報告した。さらに膀胱洗浄液を用いた FISH 法による遺伝子コピー数解析結果より、膀胱再発と腫瘍進展が異なる遺伝子変異が関与していることを発見し、論文(4)として報告した。

Representative cases with positive 9p21 deletion (a) and positive mean variant fraction (b)



(a) Grade 1, pTa
%9p21del: 38%



(b) Grade 3, pTis.
Mean variant fraction: 47%

chromosome 3 (green), 7 (red), 17 (aqua), 9p21 (gold)

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 6 件)

- (1) Matsuyama H, Ikemoto K, Eguchi S, Oga A, Kawauchi S, Yamamoto Y, Kawai Y, Matsumoto H, Hara T, Nagao K, Sakano S, Sasaki K. Copy number aberrations using multicolour fluorescence in situ hybridization (FISH) for prognostication in non-muscle-invasive bladder cancer (NIMBC). *BJU Int.* 2014;113:662-7. 査読有
- (2) Miyachika Y, Yamamoto Y, Matsumoto H, Nishijima J, Kawai Y, Nagao K, Hara T, Sakano S, Matsuyama H. Centrosome amplification in bladder washing cytology specimens is a useful prognostic biomarker for non-muscle invasive bladder cancer. *Cancer Genet.* 2013;206:12-8. 査読有
- (3) Misumi, T, Yamamoto Y, Miyachika Y, Eguchi S, Chochi Y, Nakao M, Nagao K, Hara T, Sakano S, Furuya T, Oga A, Kawauchi S, Sasaki K, Matsuyama H. DNA copy number aberrations associated with Lymphovascular invasion in upper urinary tract urothelial carcinoma. *Cancer Genet.* 2012, 205: 313-8. 査読有
- (4) Yamamoto Y, Misumi T, Eguchi S, Chochi Y, Kitahara S, Nakao M, Nagao K, Hara T, Sakano S, Furuya T, Oga A, Kawauchi S, Sasaki K, Matsuyama H. Centrosome amplification as a putative prognostic biomarker for the classification of urothelial carcinomas. *Hum Pathol.* 2011;42:1923-30. 査

読有

- (5) 池本健三・江口 賢・古屋智子・小賀厚徳・河内茂人・松山豪泰・佐々木功典・Multicolor-FISH を用いた尿路上皮癌の診断と grade 分類の基礎的検討. *Cytometry Res.* 21: 65-70, 2011. 査読なし
- (6) 松山豪泰・筋層非浸潤性膀胱癌の予後(総説). *西日泌尿*. 73: 538-547, 2011. 査読なし

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) Matsuyama, H. Centrosome amplification (CA) leads chromosomal instability (CIN) in non-muscle invasive bladder cancer. Korean Urological Association annual meeting 2013.11.29. (Seoul, Korea)
- (2) Matsuyama, H. Clinical significance and cytogenetic analysis of false positive mucosa of the photodynamic diagnosis (PDD) using 5-aminolevulinic acid (5-ALA). East Asian GU cancer meeting. 2013.3.29. (Seoul, Korea)
- (3) 松山豪泰・池本健三・江口 賢・佐々木功典. 膀胱洗浄細胞診検体を用いた multi-color FISH による膀胱癌の診断と予後予測の試み. 第 53 回日本臨床細胞学会総会 2012.6.2. (幕張メッセ国際会議場, 千葉)
- (4) Miyachika, Y., Yamamoto, Y., Matsumoto, H., Nishijima, J., Kawai, Y., Hara, T., Sakano, S., Matsuyama, H. Centrosome amplification in bladder washing cytology samples may become prognostic marker in non-muscle invasive bladder cancer. AUA annual meeting. 2012. 5.22. (Atlanta, USA)

〔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〕

松山豪泰：膀胱癌．今日の臨床サポート．永井良三，福井次矢，木村健二郎，上村直実，桑島巖，今井靖，嶋田元，編．エルゼビア・ジャパン，2013（ウェブサイト：<http://clinicalsup.jp/jpoc/>）

6．研究組織

(1)研究代表者

松山 豪泰（MATSUYAMA, Hideyasu）
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70209667

(2)研究分担者

佐々木 功典（SASAKI, Kohsuke）
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80116722

原 貴彦（HARA, Takahiko）
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70511715