

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791750

研究課題名（和文）尿路上皮癌における S100 ファミリー蛋白発現の意義

研究課題名（英文） The evaluation of S100-family proteins in urothelial cancer.

研究代表者

杉山 貴之 (SUGIYAMA TAKAYUKI)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：70444346

研究成果の概要（和文）：

S100 ファミリー遺伝子発現様式を、膀胱癌細胞・臨床検体を用い、臨床病理組織学的所見と合わせて検討を行った。膀胱癌細胞株 T24 (p53 変異株) および肺癌細胞株 H1299 (p53 欠損株) を用い mRNA の発現を確認したが、HEK293 細胞と比較し S100A2 では T24 で過剰発現を認めた一方、S100A4 では H1299 で発現低下をみたが T24 では腎癌細胞株と差がなく、2 つの遺伝子は全く異なる変化を示していた。ヒト膀胱癌 30 例では、S100A2 では腎癌と異なりほぼ全例で mRNA 発現が認められたが、臨床病理データとの関連ははっきりせず。T2 以上の浸潤癌で S100A10 発現減弱が 3/4 例である一方、pT1 のうち 6/8 例は S100A10 は減弱していなかった。

研究成果の概要（英文）：

The aim of the present study is to evaluate the expression level S100A2 mRNA in human bladder cancer. In cultured cell, T24 (p53-mutant) expressed S100A2mRNA, but there were little difference for S100A4mRNA expression. H1299 (p53-null) showed diminished expression of S100A4. We showed the diminished expression of S100A2mRNA in human clear cell RCC, but all bladder cancer cases had the expression of S100A2mRNA. We couldn't find any correlation the expression of S100A2 and clinicopathological factors. S100A10 seem to be low expression level in invasive cases, especially above T2 stage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,400,000 円	720,000 円	3,120,000 円

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：尿路上皮癌 S100 ファミリー蛋白

1. 研究開始当初の背景

S100 蛋白は約 20 種類がファミリーを形成し、組織特異的に発現し、標的分子と結合し

機能を発揮している。ヒトではそのうち S100A1-A16 が、pseudogene を含め 19 種類の遺伝子が 1q21 領域に cluster として存在し

ている(Marenholz I: BBA, 2006)。我々のグループはこれまでに S100A1 と S100A10 が腎癌組織に特異的に発現し、非癌組織では S100A5 が発現していること、および健康人の尿中には S100A5 が確認できることを報告してきた(Teratani T et al; Cancer Lett 2002, Teratani T, et al; BBRC 2002, Domoto T, et al Cancer Sci. 2007)。また本研究代表者は、平成 21 年度科研費：若手研究（スタートアップ：課題番号 21890094。腎癌における S100ファミリー蛋白と細胞周期 G1 期制御因子との関連の検討）のもとに、腎癌組織において S100A2 は正常部位より減弱する一方、病理組織学的に静脈浸潤の認める症例で S100A4 の過剰発現の可能性を示し(杉山貴之ほか、2010 年日本泌尿器科学会総会発表)、また HEK293 細胞とヒト腎癌細胞 Caki-1 において、シスプラチン負荷状態で S100A4 発現様式の差異が認められることを報告した(2010 年日本癌学会総会発表)。

2. 研究の目的

本研究の目標は、癌との関わりが示唆されている S100 ファミリー遺伝子と癌抑制遺伝子 p53 との発現様式の関連を尿路上皮癌臨床検体を用い、病理組織学的所見、臨床経過との合わせて評価を行い、S100 ファミリー遺伝子と癌抑制遺伝子 p53 の発現様式の関連を臨床的パラメーターと合わせて検討をすることで、S100 ファミリー遺伝子の発現様式が尿路上皮癌の治療における予後規定因子・再発転移の指標となりうるか、あるいは抗悪性腫瘍剤の効果予測マーカーとなりうるかを検討することである。

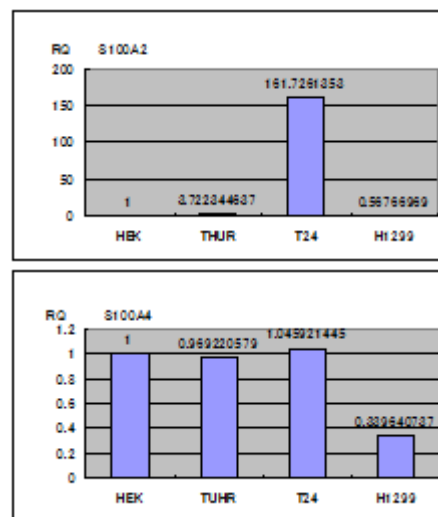
3. 研究の方法

ヒト尿路上皮癌、とくに膀胱癌手術症例を対象に、PCR 法、免疫染色法を用い S100 ファミリー遺伝子、蛋白の発現を確認する。臨床経過・病理組織診断と対比させ尿路上皮癌で

の S100 ファミリー遺伝子の発現の意義を検討する。また、ヒト尿路上皮癌培養細胞を用い、抗悪性腫瘍剤添加などで外的刺激を加えることにより、S100 蛋白の発現変化を PCR、ウェスタンブロット法などで確認し、p53 発現誘導による殺細胞効果・アポトーシス誘導による S100 蛋白の発現様式との関係を、MDM2 などの p53 制御因子、ならびに p53 により誘導される Bax、Caspase ファミリーなど apoptosis シグナル群の発現変化の測定により検討を行うことを方法論として設定した。

4. 研究成果

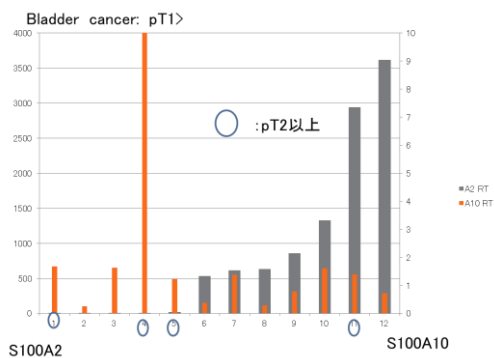
まず、現在浜松医科大学泌尿器科学講座にて所有している膀胱癌細胞株 T24 (p53-mutant), および肺癌細胞株 H1299 (p53-null) を用い mRNA の発現を確認したところ、HEK293 細胞と比較し S100A2 では p53 変異株とされる T24 で過剰発現を認めた一方、S100A4 では H1299 で発現低下をみたが T24 では HEK293、および腎癌細胞株 TUHR14TKB と大きな差がなく、2つの遺伝子座が近いにもかかわらず全く異なる変化を示していた(下図)。



次に、当院にて 2009 年 6 月より、臨床的に膀胱癌と判断し経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TUR-BT) が施行された 30 例を対象として、

腫瘍検体を採取ののち、ゲノム DNA, RNA を抽出。cDNA を作成し特異的プライマーによる RT-PCR、リアルタイム RT-PCR を施行した。S100A2 のプロモーターメチル化に関しては COBRA assay (combined bisulfite restriction analysis). を施行した。S100A2 では腎癌のシリーズと異なり、ほぼ全例で RT-PCR のシグナルが認められた。リアルタイム RT-PCR では、正常ドナー (3 検体使用) と比べ、S100A10 mRNA 発現亢進は 3 例 (21 例解析) で、いずれも非浸潤癌。S100A2 のメチル化例 9 例 (23 例解析) で、7 例は非浸潤癌であった。S100A2 においては、プロモーターの非メチル化と mRNA の発現亢進が関与していることがすでに示されていることより、S100A2 の発現亢進と膀胱がんの局所浸潤との関連性の可能性を示唆するものであった。

ここで選択した S100A2 と A10 の発現が関連があるか検討したが、粘膜下層以上に浸潤した例 (pT1 以上、12 例) で検討したところ、T2 以上の浸潤癌で S100A10 発現減弱が 3/4 例であり、S100A2 はいずれも高発現。一方 8 例の pT1 のうち 6 例は S100A10 は減弱していなかった。S100A2 についてはこの少数例では傾向を見出すことができなかった。



S100A10 のプロモーターメチル化につき検討を行うべく、メチル化特異 PCR を設計し、コントロール genomicDNA を用いて PCR を行

ったが、設定が定まらなかったため再設計・制限酵素切断法などへ変更を検討している。現在、臨床検体の p53 変異の確認作業を行っている。

今回のヒト検体シリーズの制限は、進行例と非進行例 (筋層非浸潤例が多数を占めた) の症例数差が多く、また観察期間が少ない点である。今後長期経過との関連を確認していく必要があると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 9 件)

① 当科で経験した透析患者の尿路上皮腫瘍の検討。杉山貴之, 高山達也, 松本力哉, 鈴木孝尚, 伊藤寿樹, 永田仁夫, 大塚篤史, 古瀬 洋, 麦谷荘一, 大園誠一郎。第 56 回 (社) 日本透析医学会学術集会・総会 2011. 06. 18

② Evaluation of the expression alevels of S100A2 mRNA in renal cell carcinoma. Sugiyama T 2012 Genitourinary Cancers Symposium 2012. 2. 4

③ 膀胱癌乳腺転移の 1 例。甲斐文丈, 永田仁夫, 田村啓多, 加藤大貴, 鈴木孝尚, 杉山貴之, 大塚篤史, 高山達也, 石井保夫, 古瀬洋, 麦谷荘一, 大園誠一郎, 伊藤寿樹。第 255 回日本泌尿器科学会東海地方会 2012. 03. 11

④ 膀胱尿路上皮癌 Nested variant の 1 例。加藤大貴, 鈴木孝尚, 大塚篤史, 谷島崇史, 田村啓多, 甲斐文丈, 杉山貴之, 永田仁夫, 高山達也, 石井保夫, 古瀬 洋, 麦谷荘一, 大園誠一郎。第 256 回日本泌尿器科学会東海地方会 2012. 06. 09

⑤ 人間ドック受診者における泌尿器癌と喫煙との関係。野畑俊介, 木内正太郎, 渡辺めぐみ, 臼田多佳夫, 森 厚嘉, 福田崇典, 杉山貴之, 永田仁夫, 高山達也, 古瀬 洋, 麦谷荘一, 大園誠一郎。第 21 回日本腎泌尿器疾患予防医学研究会。2012. 07. 13

⑥ 胃癌治療中縮小を見た再発膀胱腫瘍の 1 例谷島崇史, 杉山貴之, 高山達也, 鈴木孝尚, 甲斐文丈, 永田仁夫, 大塚篤史, 石井保夫, 古瀬 洋, 麦谷荘一, 大園誠一郎。第 257 回日本泌尿器科学会東海地方。2012. 09. 08

⑦ Evaluation of the Expression of S-100A2 mRNA in Human Bladder Cancer. Sugiyama T, Takayama T, Miyazaki M, Furuse H, Mugiya S, Ozono S 第 32 回国際泌尿器科学会総会。2012. 10. 01-03

⑧ 早期腎細胞癌における S 100A4 mRNA 発現の検討。杉山貴之, 高山達也, 宮崎美紀, 甲斐文丈, 麦谷荘一, 大園誠一郎 第 50 回日本癌治療学会学術集会 2012. 10. 25

⑨ 当科における膀胱全摘除術の臨床的検討。古瀬 洋, 谷島崇史, 田村啓多, 加藤大貴, 鈴木孝尚, 甲斐文丈, 杉山貴之, 永田仁夫, 大塚篤史, 高山達也, 石井保夫, 平野恭弘, 栗田 豊, 麦谷荘一, 大園誠一郎 第 50 回日本癌治療学会学術集会 2012. 10. 26

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山貴之 (SUGIYAMA TAKAYUKI)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 70444346