

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592386

研究課題名(和文) Ral 関連分子ネットワークに着目した膀胱癌進展機序の解明

研究課題名(英文) Identification of mechanism of bladder cancer development with Ral associated molecular network

研究代表者

松井 喜之 (Matsui, Yoshiyuki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00582107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：RalGAP 2の発現低下によるRal活性上昇が膀胱発癌に関わる可能性を見出し、同時に発現が低下するFilamin Aに着目した。ヒト膀胱癌組織ではFilamin Aの免疫染色強度は膀胱癌の悪性度や浸潤度と相関し、また膀胱癌細胞では高発現細胞株で発現抑制することにより増殖能が低下することを確認した。しかし細胞遊走能や浸潤能の有意な変化は認めなかった。次に低発現細胞株への強制発現を試みたが遺伝子導入に成功しなかった。またFilamin A発現抑制株で皮下及び腎被膜下Xenograftを作成してFilamin A発現による腫瘍増殖能、局所浸潤の影響有無を検討したが有意差は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We recognized that the activation of Ral induced by the down-regulation of RalGAP 2 had a possibility to be related to the bladder carcinogenesis, through suppressing Filamin A expression. We confirmed that the immunostaining intensity of Filamin A in human bladder cancer tissue was correlated with pathological aggressiveness and infiltration. Suppression of Filamin A led to reduced proliferation in bladder cancer cell lines, whereas we did not observe significant changes in cell migration and invasion. Filamin A did not affect the tumor growth and local invasion ability in subcutaneous and renal subcapsular xenograft models.

研究分野：膀胱癌

キーワード：膀胱癌

1. 研究開始当初の背景

本邦における膀胱がんの年齢調整死亡率は男性で緩やかな増加傾向にあり、逆に女性では緩やかな減少傾向にある。一方 70 歳代の男性では年齢階級別罹患率が約 100 人/人口 10 万人で、同死亡率は約 30 人/人口 10 万人と、高齢男性で増加傾向にある癌腫である。従って超高齢化社会を迎えた我が国では、膀胱癌の治療成績や患者 QOL の向上は臨床的に重要である。膀胱癌の約 70%は筋層非浸潤性癌で、約 30%は筋層浸潤性癌である。非浸潤性癌の多くは内視鏡的切除術と膀胱内薬剤注入療法を中心とした非侵襲的治療で制御可能であるが、約 60%が膀胱内再発を繰り返し、約 20%が筋層浸潤性癌への進展を来す。筋層浸潤性癌では膀胱全摘除術及び尿路再建術等の侵襲的外科治療、Platinum 製剤を基本とした化学療法、放射線治療あるいはこれらの治療の組み合わせによる集学的治療が行われる。しかし筋層浸潤性癌が進行し遠隔転移を来すと根治は極めて困難であるため、筋層浸潤性癌の 5 年生存率は約 50%程度にとどまる。以上より膀胱癌の臨床では膀胱癌と進展のメカニズムの理解に基づく新規治療法の開発が急務である。現在まで膀胱癌のバイオロジーに關与するいくつかの分子機序が分かっている。例えば、FGFR3 と Ras の点突然変異は非浸潤性癌の細胞増殖に、p53 点突然変異、RB、PTEN の機能喪失は浸潤性癌の発癌と進展に關与すると報告されている(Wu Xue-Ru, *Nat. Rev. Canc.* 2005)。しかし膀胱癌では、これらのシグナルを標的とした治療は未だ実現していない。Ras サブファミリー低分子量 G タンパク質のひとつである Ral の異常活性化が膀胱癌を含む様々なヒトの癌における細胞増殖や腫瘍進展に關与することがわかってきている(Bodemann BO, White M. *Nat. Rev. Cancer* 2008)。Ral は GEF(guanine nucleotide exchange factor)により GTP 結合型(活性型)となり、GAP(GTPase-activating protein)により GDP 結合型(不活性型)となる。2009 年に同定された RalGAP (Shirakawa, et al. *JBC* 2009)は、ヒトの癌における発現量や機能について全くわかっていないが、我々は RalGAP 活性を持つ 2 サブユニットが Ral 不活化を介して膀胱癌細胞の浸潤・転移を抑制しうること、RalGAP 2 が浸潤性膀胱癌組織の 90 %以上で低下していることを見出した。一方で Ral/RalGAP 経路において、どのような Ral エフェクター分子が膀胱癌の進展に關与しているのかはよく分かっていない。

2. 研究の目的

これまで同定されている Ral のエフェクター分子のうち、RalBP1(Ral-binding-protein)

が膀胱癌細胞の肺転移に關与すると報告されている(Wu Z, *Neoplasia* 2011)。アクチン架橋分子として細胞遊走や Focal adhesion の形成に關与する Filamin A もまた Ral エフェクター分子の一つであるが、膀胱癌での発現と機能については今まで全く分かっていない。ONCOMINE データベースの検索では Filamin A の mRNA 発現量は非浸潤性癌よりも浸潤性癌で高かった。さらに、膀胱癌細胞株では RalGAP 2 と Filamin A の蛋白発現量が逆相関することを見出している。一方、既知の Ral エフェクター分子は、Ral 分子の強制発現/発現抑制や活性型 Ral を bait とした affinity アッセイにより同定された分子であり、これらの実験系における Ral 活性化状態は非生理的であるという問題点がある。これまで、生理的レベルでの Ral 経路活性化がどのような下流シグナル変化をもたらすのかは分かっていなかったが、本研究で用いる RalGAP 発現量を操作する実験系は、Ral 分子の総量を変化させずに、活性型 Ral と非活性型 Ral の比を変化させることができるので、新規の Ral エフェクター分子を同定できる可能性がある。以上より本研究において我々は、Filamin A をはじめとする Ral エフェクター分子が、どのように膀胱癌(特に浸潤性)の発癌・進展に關与するのかを明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

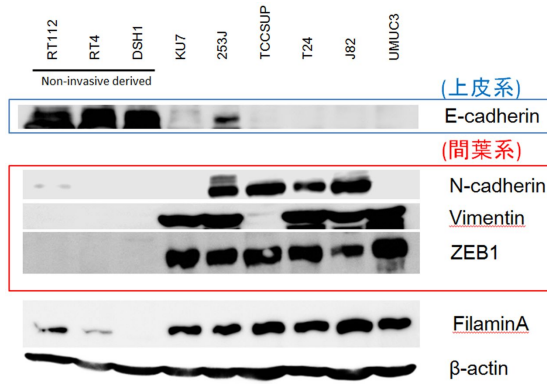
- 1) ヒト膀胱癌臨床検体を用いて Filamin A 発現量と悪性度及び臨床病期との相関性を検討する。
- 2) マウス膀胱化学発癌モデルを用いて膀胱癌の発癌・浸潤の過程においてどのように Filamin A の発現量が変化するかを検討する。
- 3) 膀胱癌細胞株を用いて、Filamin A 発現量の変化により膀胱癌細胞の表現型にどのような影響が生じるかを検討する。
- 4) 膀胱癌細胞株をマウス皮下、腎被膜下に移植し、Filamin A 発現による腫瘍増殖能などを検討する。

最終的には RalGAP/Ral 経路を介した膀胱癌発癌と進展の分子機序の更なる解明と新規治療標的分子の同定を目的とする。

4. 研究成果

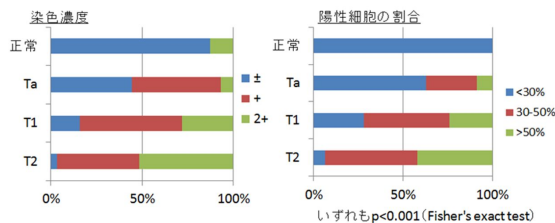
- 1) 膀胱癌細胞株での FilaminA の蛋白発現を解析したところ上皮系の性質が優位な日浸潤性膀胱癌由来の細胞株と比較して、間葉系優位な筋層浸潤性癌由来の細胞株で FilaminA の発現は亢進していた(Fig.1)。

Fig.1



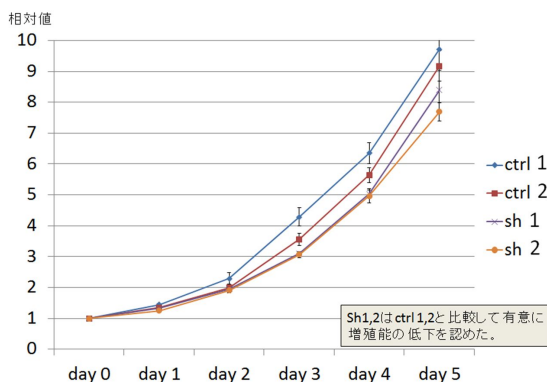
2) 膀胱癌細胞株に対して Filamin A の免疫組織化学染色を行ったところ、表在性(Ta)の膀胱癌と粘膜下浸潤(T1)、または筋層浸潤性膀胱癌(T2)とでは染色強度、陽性細胞の比率に有意差をみとめた(Fig.2)。しかし RalGAP 2 と Filamin A との染色程度に相関はみられなかった。

Fig.2



3) Filamin A を高発現している膀胱癌細胞株 (TCCSUP) に対して shRNA を用いて Filamin A の発現を抑制したところ細胞増殖能が低下することを認めた(Fig.3)。しかし細胞遊走能や浸潤能の有意な変化は認めなかった。

Fig.3



4) Filamin A の低発現膀胱癌細胞株 (RT112) に Filamin A の強制発現を試みたが、ベクターへの遺伝子導入に成功しなかった。また Filamin A の発現を抑制した膀胱癌細胞

株をマウスの皮下、または腎被膜下に移植して Filamin A 発現による腫瘍の増殖能、局所浸潤への影響有無を検討したが有意な差は認められなかった。

結語

Ral エフェクター分子である Filamin A の発現量と膀胱癌の発癌、進展との関係を調べた。筋層浸潤癌の細胞で Filamin A タンパクは強く発現しており、また免疫染色による評価でも悪性度の高い方が強く Filamin A を発現していることがわかった。Filamin A の発現抑制により細胞増殖能の低下を来すこと確認したが、発現増強の手技を確立できず、またマウスを用いた実験では Filamin A の膀胱癌細胞への影響は確認できなかった。

高齢者では前立腺癌も重要な課題であり同様の進展機序が考えられることから、前立腺での機能解析を今後の課題と考えている。

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 1 件)

- Saito R, Matsui Y (他 17 名、7 番目), Ogawa O, Horiuchi H. Downregulation of Ral GTPase-activating protein promotes tumor invasion and metastasis of bladder cancer. 査読有 *Oncogene*, 2013; 32(7): 894-902 DOI: 10.1038/onc.2012.101

[学会発表](計 3 件)

- 中嶋正和、「マイクロ RNA(miRNA)チップアレイプロファイリングによる膀胱癌における上皮間葉移行(EMT)関連 miRNA の新規同定」第 21 回 泌尿器科分子細胞研究会、平成 24 年 2 月 11 日、北海道大学医学部学友会館フラテ(札幌)
- 齊藤 亮一、「低分子量 G タンパク質 Ral 不活化因子(RalGAP)を介した前立腺癌転移抑制機序の同定」第 100 回 日本泌尿器科学会総会、H24 年 4 月 22 日、パシフィコ横浜(横浜)
- 中嶋正和、「チップアレイプロファイリングによる膀胱癌関連マイクロ RNA の探索および新規同定」第 100 回 日本泌尿器科学会総会、H24 年 4 月 22 日、パシフィコ横浜(横浜)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

京都大学医学研究科泌尿器科学教室 HP

<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松井 喜之 (MATSUI, Yoshiyuki)

京都大学 医学研究科 講師

研究者番号：00582107

(2)研究分担者

小川 修 (OGAWA, Osamu)

京都大学 医学研究科 教授

研究者番号：90260611

(3)連携研究者

無し