

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861268

研究課題名(和文)細胞外基質への接着に伴う Np63発現低下を介した膀胱癌の浸潤転移機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of metastasis of bladder cancer cells via decreased expression of delta N p63 caused by adhesion to extracellular matrix

研究代表者

吉田 栄宏 (Yoshida, Takahiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座助教

研究者番号：80583624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌は尿を介して癌細胞が播種することで、尿路内に多発する。癌細胞播種の機序を明らかにすることが、膀胱癌の膀胱内再発を抑制する治療法の開発につながる。本研究では、浮遊している膀胱癌細胞塊が細胞外基質に接着すると転写因子 Np63 が急速に分解されることを発見した。さらに尿路内播種実験モデルを独自に開発し、この実験モデルを用いて Np63 の分解が癌細胞の播種に関与している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The dissemination of bladder cancer cells is supposed to be a major cause of multicentricity of bladder cancer. Clarifying mechanism of the dissemination can lead to development of new therapy to suppress intravesical relapse. We discovered that Np63 was rapidly degraded when clusters of bladder cancer cells attached to extracellular matrix. We originally developed experimental model which mimic the dissemination of cancer cells. Using this experimental model, degradation of Np63 was shown to be involved in the dissemination.

研究分野：膀胱癌、分子生物学

キーワード：膀胱癌 転移 p63 細胞外基質

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌や上部尿路癌の90%以上は、尿路を覆う尿路上皮から発生する尿路上皮癌である。尿路上皮癌の臨床像の大きな特徴は、尿路に空間的・時間的に多発することである。筋層非浸潤膀胱癌は経尿道的に治癒切除後、約50%が膀胱内に再発する。また上部尿路癌は腎尿管摘除により治癒切除後、約50%が膀胱内に再発する。これら尿路再発のメカニズムとして、癌細胞が尿を介して尿路に播種すると考えられている。

転写因子のひとつである Np63 が膀胱癌細胞では上皮間葉転換を介して浸潤転移に重要な役割を果たすことが報告されている。しかし Np63 の発現調節メカニズムは明らかではない。われわれは癌細胞を三次的な癌細胞塊として培養することで、浮遊状態の癌細胞塊が細胞外基質に接着すると癌細胞の Np63 の発現が劇的に低下することを見出した。

癌細胞が細胞基質に接着することは、体液を介した癌細胞の転移巣形成のための必須の行動様式である。そこで本研究では尿路上皮癌の尿路内転移巣形成における Np63 の関与について検討した。

2. 研究の目的

- 1) 細胞外基質への接着により Np63 の発現が低下するメカニズムを同定する。
- 2) 膀胱癌細胞を細胞塊として扱った場合の Np63 の機能を解析する。
- 3) 臨床手術検体において膀胱癌細胞と Np63 発現の関連を臨床病理学的に解析する。

3. 研究の方法

1) 癌細胞塊の作製

膀胱癌細胞株 (RT4、5637) を、高分子 (Poly-HEMA) でコーティングした培養皿を用いて高密度で培養することで、癌細胞塊を作製した。また初代培養癌細胞の癌細胞塊の作製には CTOS 法 (Okuyama, J Urol, 2013、Yoshida, Cancer Sci, 2015) を用いた。

2) Np63 の発現解析

癌細胞塊を浮遊状態と接着状態で培養し、Np63 の発現を比較検討した。蛋白の発現量はウエスタンブロット法にて、またその局在は蛍光免疫染色法にて、mRNA の発現量は RT-PCR 法を用いた。Proteasome の関与については、MG312 および SB216763 を用いて検討した。

3) Np63 の機能解析

癌細胞塊としての機能を解析するための実験系を新たに開発した。卵巣癌細胞塊が腹壁に着床する実験系を参考に (Iwanicki, Cancer Discov, 2011)、正常尿路上皮由来細胞 (SV-HUC) を培養皿上でコンフルエントの

状態にし、その上に癌細胞塊を静置した。時間とともに癌細胞塊は SV-HUC を排除して直接培養皿に接着する。SV-HUC には GFP を導入しており、GFP 蛍光の検出されない面積を測定することでがん細胞の接着面積の定量が可能である。本実験系を用いて、Np63 の過剰発現株・発現抑制株を用いることにより、Np63 の接着播種能について検討した。

4) Np63 発現と膀胱内再発との相関

臨床病理学的因子を統一した非筋層浸潤性膀胱癌臨床検体を、Np63 抗体を用いて免疫組織染色を行った。染色強度と染色面積をスコア化し、Np63 染色スコアとして算出した。1年以内に再発をきたした群と、2年以上再発のない群で染色スコアを比較検討した。

4. 研究成果

1) 癌細胞塊としての浮遊培養

上述の条件で培養することで、通常接着で培養する癌細胞株を (図1、上段) 浮遊状態の癌細胞塊として培養が可能となった (図1、下段)。また初代培養癌細胞は通常浮遊状態の癌細胞塊として培養するが、コラーゲンゲル上に静置することで接着した (図2)。

図1 癌細胞株の接着培養と浮遊培養

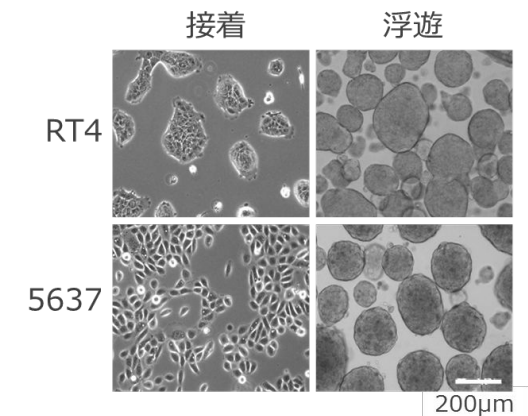
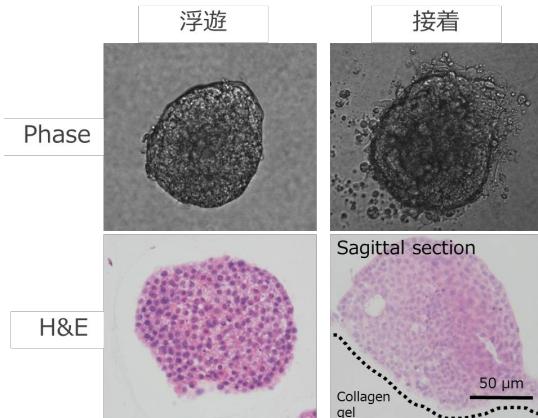


図2 初代培養癌細胞の浮遊培養と接着培養

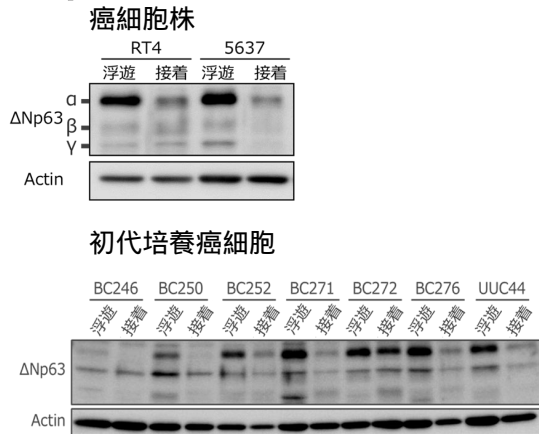


2) 細胞外基質への接着により Np63 が分解される

接着状態では癌細胞の Np63 の蛋白発

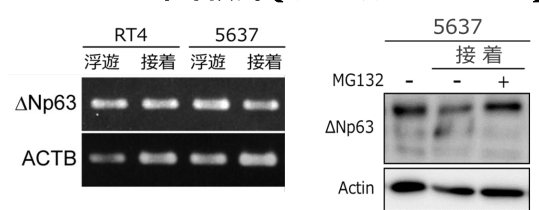
現量が低下した(図3)。

図3 Np63の蛋白発現量(ウエスタンブロット)



接着状態と浮遊状態で Np63 の mRNA 発現量に変化はなかったが、蛋白発現量の低下が MG132 に抑制されたことから(図4)、proteasome が関与していた。

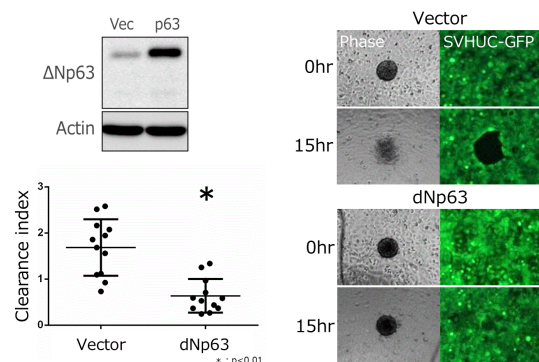
図4 Np63の、mRNA発現量(RT-PCR)と、MG132による阻害効果(ウエスタンブロット)



3) Np63 は癌細胞塊が SV-HUC 下の細胞外基質への接着に関与する

膀胱癌細胞株 5637 に Np63 を強制発現させて癌細胞塊を作製し、GFP 導入 SV-HUC 上に静置した。15 時間後、癌細胞は SV-HUC を排除して接着したが、接着面積が強制発現株では減少した(図5)。同様の実験を Np63 発現抑制株でも行い、発現抑制株では接着面積が増大した。

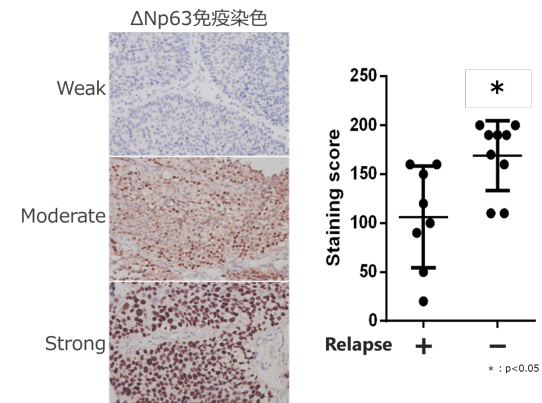
図5 Np63 を過剰発現すると、接着面積が減少した



4) 膀胱癌臨床検体の Np63 発現と膀胱内非再発率は相関する

これまでの研究で、Np63 は主に低～中悪性度の膀胱癌に発現していること、また初代培養細胞は筋層非浸潤性癌から培養可能であったことから、血液を介した遠隔転移ではなく尿を解した尿路内転移に着目した。1年以内に再発した群は、2年以上再発のない群よりも膀胱癌の Np63 染色スコアが低かった(図6)。

図6 再発群は非再発群に比べて膀胱癌の Np63 染色スコアが低い



以上1)～4)の結果より、膀胱癌細胞は塊として尿中を移動し、尿路壁に着床することをきっかけに癌細胞の Np63 が分解され、尿路上皮下の細胞外基質に接着すると考えた。そしてこの過程が尿を介した癌細胞の播種に関与しており、尿路上皮癌の多中心発生の原因であることが示唆される。

癌細胞の播種の機序を解明することで、播種を抑制する方法の開発につながる。すなわち尿路再発を抑制する治療法が開発期待できる。また浮遊から接着への移行は、尿路再発のみならず遠隔臓器転移の形成にも必須の行動様式である。今後も浮遊から接着への移行に着目し、尿路再発・遠隔臓器転移形成の機序を明らかにする研究を進める予定である。

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 2 件)

1: Yoshida T, Okuyama H, Nakayama M, Endo H, Tomita Y, Nonomura N, Nishimura K, Inoue M. Dynamic Change in p63 Protein Expression during Implantation of Urothelial Cancer Clusters. Neoplasia. 2015 Jul;17(7):574-85

2: Yoshida T, Okuyama H, Nakayama M, Endo H, Nonomura N, Nishimura K, Inoue M. High-dose chemotherapeutics of intravesical chemotherapy rapidly induce mitochondrial dysfunction in bladder cancer-derived spheroids. Cancer Sci. 2015 Jan;106(1):69-77

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 吉田栄宏、奥山裕照、井上正宏 尿路上皮癌の尿路腔内播種における Np63 の関与 第 24 回がん転移学会 2015 年 7 月 23 日 大阪市

2. 吉田栄宏、中山雅志、奥山裕照、西村和郎、井上正宏、野々村祝夫 膀胱癌腔内播種 in vitro 実験モデルを用いた腔内播種メカニズムの解明： Np63 の分解は膀胱癌の腔内播種に関与する 第 103 回日本泌尿器科学会総会 2015 年 4 月 18 日 金沢市

3. 吉田栄宏、奥山裕照、中山雅志、西村和郎、井上正宏、野々村祝夫 膀胱癌腔内播種における Np63 の関与 第 24 回泌尿器分子細胞研究会 2015 年 2 月 28 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 栄宏 (TAKAHIRO YOSHIDA)

大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座
助教

研究者番号：80583624