

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592330

研究課題名(和文) CXCR4 - arrestin2 - ERK 経路を利用した膀胱癌早期診断治療法の開発

研究課題名(英文) Development of bladder cancer early diagnosis and treatment method using the CXCR4-beta arrestin2-ERK pathway

研究代表者

西山 博之 (Nishiyama, Hiroyuki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20324642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究はレドックス関連因子であるTXNIPならびにERK経路の膀胱発癌におけるクロストークの解明を目的とした。膀胱発癌モデルマウスや膀胱癌細胞株におけるCXCR4-ERK経路、TXNIP-ARRB2経路の遺伝子、タンパク発現の結果からTXNIPはCXCR4-ERK活性を抑制することで膀胱発癌抑制に寄与していることが明らかとなり、TXNIPは今後、膀胱癌の早期診断、治療のための新規標的マーカーとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The result of gene and protein expression of CXCR4-ERK pathway and TXNIP-ARRB2 pathway in mouse bladder cancer model and bladder cancer cell lines. We indicate that TXNIP negatively regulates bladder carcinogenesis by attenuating SDF-1-CXCR4-induced ERK activation. This signal transduction pathway can be a potent target in preventing or treating bladder cancer.

研究分野：泌尿器科学

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：CXCR4 ARRB2 TXNIP bladder carcinogenesis

1. 研究開始当初の背景

一般的に筋層非浸潤性膀胱癌は治療しても過半数は膀胱内再発し、更に一部は浸潤性癌へと進行する。膀胱癌治療成績を向上させるためには、この浸潤性癌へと移行する可能性があるハイリスク膀胱癌をより早期に発見して治療することが肝要であるが、従来の尿細胞診や膀胱鏡検査では炎症性変化などによる修飾のため診断に難渋することが多かった。その対処として、我々は網羅的解析手法を用いた研究から、尿中 mRNA 定量 PCR や尿中 CXCL1 高感度 ELISA など新規膀胱癌早期診断法を提唱してきた (Holyoake et al., Clin Cancer Res 2008; Kawanishi et al., Clin Cancer Res 2008) が、今回は新たに見出した膀胱早期発癌機序に基づいた新規尿路上皮癌診断法や分子標的治療の開発に取り組みたいと考えている。

実際には、我々は、細胞癌化シグナルとして重要な ERK の上流分子である CXCR4 が上皮内癌 (CIS) を含めた高悪性度の膀胱癌で高発現していること (Nishizawa et al., Int J Cancer 2010)、CXCR4 アンタゴニスト TF14016 により膀胱癌細胞株において ERK 活性化が抑制される (図 1) ことから、

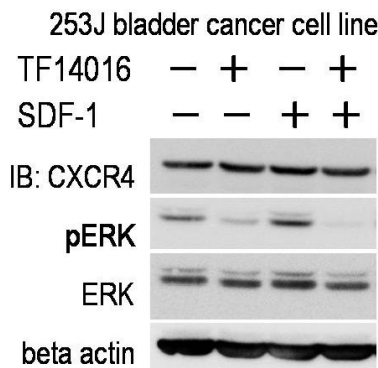


図 1 膀胱癌細胞株における TF14016 による ERK 活性化抑制

CXCR4-ERK 経路が膀胱発癌において重要な役割を果たしていると考えている。さらに、この経路において重要な調節機構をになう scaffold 蛋白 β -arrestin2 が、癌化機構に密接に関係するといわれるレドックス関連分子 TXNIP によって制御を受ける可能性を予備実験の結果から得たことから、「 β -arrestin2 を中心とした CXCR4-ERK 経路と TXNIP レドックス関連経路のクロストークの解明が尿路上皮初期発癌機構の解明につながり、その知見をもとに新規の治療・診断法を確立できるのではないか。」(図 2) という着想に至ったのが今研究の背景である。

β -arrestin2 は尿路上皮癌だけでなく他癌腫においても重要な分子であると報告されており、その制御機構を解明し臨床応用することは尿路上皮癌だけでなく、多くの難治性悪性腫瘍研究の進展に寄与するものと考えられる。

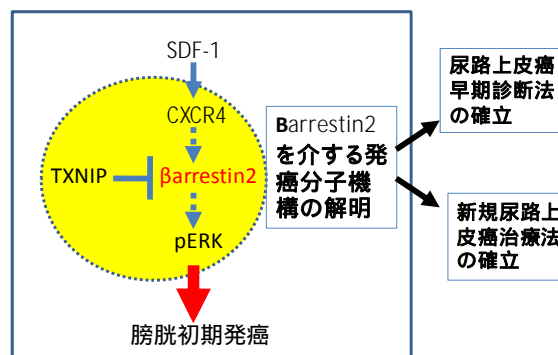


図 2 研究の背景

2. 研究の目的

(1) 膀胱癌の発癌初期段階の分子機構の解明
TXNIP による β -arrestin2 発現調節機構ならびに CXCR4-ERK 活性化膀胱発癌機構について膀胱癌細胞株などを用いて in vitro のレベルで解明する。

マウスを用いた発癌実験によって当経路が持つ膀胱発癌過程における重要性を in vivo レベルで証明する。

(2)新規の膀胱癌再発 早期診断法、予防法の開発

CXCR4 アンタゴニストである TF14016 が CXCR4- arrestin2-ERK シグナルを介した細胞増殖を阻害することで、膀胱発癌の抑制効果が得られるかマウスモデルを用いて検討したい。

3. 研究の方法

(1)膀胱癌の発癌初期段階の分子機構の解明

細胞株 (TXNIP 非発現細胞株および TXNIP 強制発現細胞株) およびマウス発癌モデル (TXNIP w/t マウスおよび TXNIP K/O マウス) を用い、TXNIP や -arrestin2 ならびに pERK の遺伝子発現レベル・蛋白レベルでの調節機構を明らかにする。

(2)新規の膀胱癌再発 早期診断法、予防法の開発

CXCR4 アンタゴニストである TF14016 が CXCR4- arrestin2-ERK シグナルを介した細胞増殖を阻害することで、膀胱発癌の抑制効果が得られるかマウスモデルを用いて検討したい。

4. 研究成果

(1)膀胱癌の発癌初期段階の分子機構の解明

膀胱発癌マウスモデルにおける TXNIP の発癌調整

TXNIP w/t, k/o マウスを用いた BBN 膀胱発癌モデルにおいて w/t では発癌過程で TXNIP のタンパク、mRNA (図 3) レベルでの発現低下を認め、さらに TXNIP k/o マウスでは膀胱発癌が促進されることを認めた(図 4)。また、これらのマウスにおいて発癌に伴い、ERK の活性化もタンパクレベルで確認されており、以上の知見から、TXNIP は膀胱発癌早期において CXCR4-ERK 経路を介した発癌調整を行っていることが見いだされた。

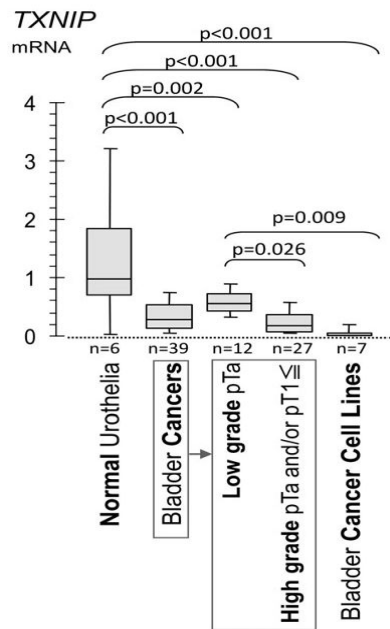


図 3 膀胱発癌過程における TXNIP の mRNA 発現変化

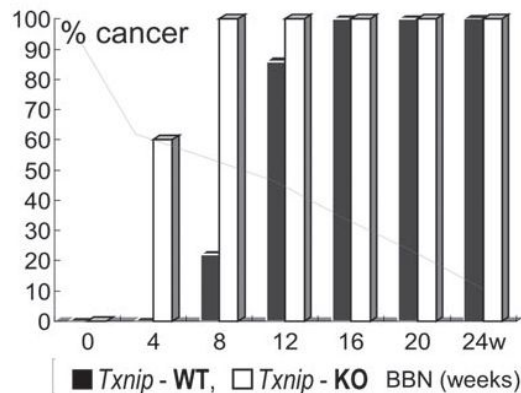


図 4 TXNIP による膀胱発癌調整

TXNIP の CXCR4-ERK 経路活性化調整

TXNIP 強制発現膀胱癌細胞株では SDF1 刺激による CXCR4 を介した ERK 活性化が抑制されていることを認めた(図 5)。また、BBN 発癌モデルマウスでは TXNIP k/o において ERK の活性化を認めた(図 6)。これらの知見より、TXNIP は CXCR4-ERK 経路活性化調整を行うことで膀胱発癌に関与していることが示された。

TXNIP による -arrestin2 発現調節

TXNIP 強制発現膀胱癌細胞株において

arrestin2 の発現低下を認め、さらに ERK 抑制を認めた(図 7)。

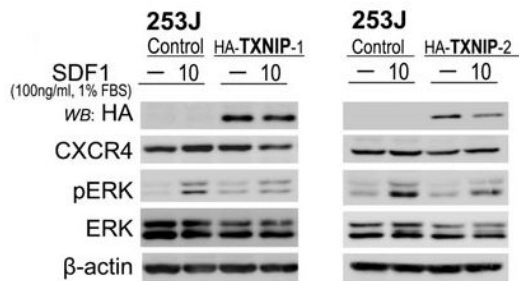


図 5 TXNIP 強制発現による ERK 抑制

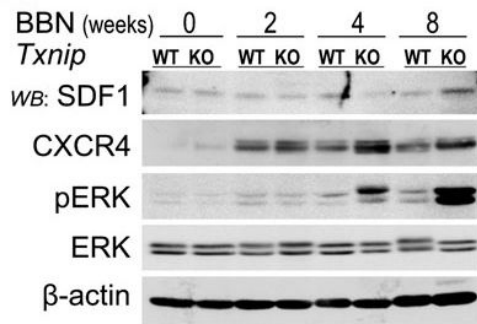


図 6 TXNIP k/o マウスにおける ERK の活性化

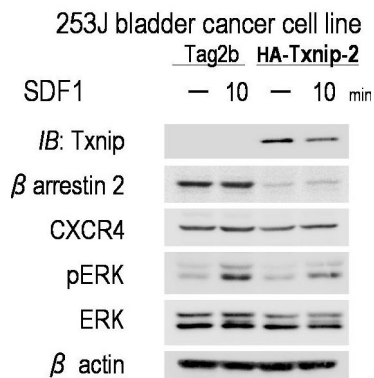


図 7 TXNIP による arrestin2 発現調整
以上、 - の結果より膀胱癌発癌初期段階において、TXNIP による CXCR4-ERK 経路活性化調整が行われていること、そこには arrestin2 の発現調整機構も関与しているこ

とが示された。

(2) CXCR4- arrestin2-ERK 経路活性制御による新たな尿路上皮癌治療法の確立

BBN 膀胱発癌マウスモデルにおいて TXNIP w/t, k/o マウスいずれにおいても CXCR4 アンタゴニストである TF14016 投与下では BBN 発癌が抑制されることが示された(図 8)。

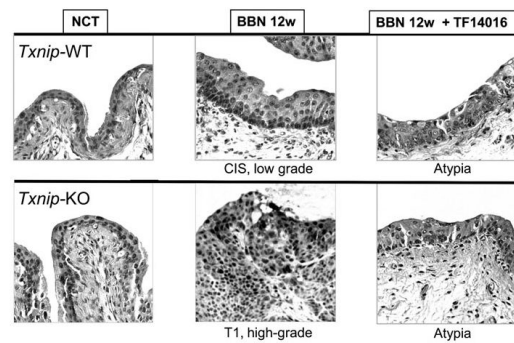
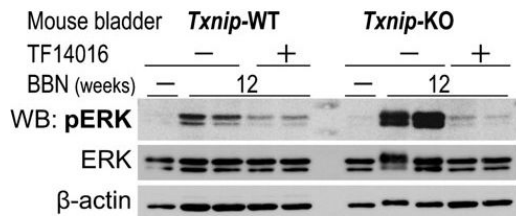


図 8 TF14016 の抗腫瘍効果

また、それらの組織においても TF14016 によって ERK が抑制されており(図 9)、TF14016



の、新たな尿路上皮癌治療薬としての可能性が見いだされた。

以上より、TXNIP- arrestin2 と CXCR4-ERK 経路のクロストークが膀胱発癌において重要な働きをしていることが示されたが、今後はレンチウイルスベクターを用いた arrestin2 強制発現細胞株の樹立を行い、さらなる発癌調整機構の解析を試みたい。また、癌幹細胞発現や細胞増殖、浸潤など他のシグナル pathway との interaction を網羅的に検索し、TXNIP- arrestin2 と CXCR4-ERK 経路のクロストークがそれらにどのように影響

を与えているのか検討していきたいと考えている。

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23件)

Kajita Y, Nishiyama H. (他11人,8番目)

The transcription factor Sp3 regulates the expression of a metastasis-related marker of sarcoma, actin filament-associated protein 1-like 1 (AFAP1L1). *PLoS One.* 2013;8(1):e49709. doi: 10.1371/journal.pone.0049709. 査読有

Kawai K, Ichioka D, Inai H, Miyazaki J, Nishiyama H. Assessment and Management of Renal Impairment in Chemotherapy for Urogenital Cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2013 Sep 12. doi: 10.1093/jjco/hyt132. 査読有 [Epub ahead of print]

Miyazaki J, Hinotsu S, Ishizuka N, Naito S, Ozono S, Akaza H, Nishiyama H. Adverse Reactions Related to Treatment Compliance During BCG Maintenance Therapy for Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2013 Aug;43(8):827-34. doi: 10.1093/jjco/hyt086. 査読有

Takaoka E, Miyazaki J, Kawai K, Nishiyama H. (他8人1,4,8,12番目) Risk factors for intravesical recurrence in patients with high-grade T1 bladder cancer in the second TUR era. *Int J Urol.* 2013 Jul;20(7):716-22. doi: 10.1093/jjco/hyt016. 査読有

Kimura T, Onozawa M, Miyazaki J, Kawai K, Nishiyama H., Hinotsu S, Akaza H. Validation of the prognostic grouping of the seventh edition of the tumor-nodes-metastasis classification

using a large-scale prospective cohort study database of prostate cancer treated with primary androgen deprivation therapy. *Int J Urol.* 2013 Sep;20(9):880-8. doi: 10.1111/iju.12064. 査読有

Inai H, Kawai K, Ikeda A, Ando S, Kimura T, Oikawa T, Onozawa M, Miyazaki J, Uchida K, Nishiyama H. Risk factors for chronic kidney disease after chemotherapy for testicular cancer. *Int J Urol.* 2013 Jul;20(7):716-22. doi: 10.1111/iju.12017. 査読有

Kawai K, Miyazaki J, Joraku A, Nishiyama H., Akaza H. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. *Cancer Sci.* 2013 Jan;104(1):22-7. doi: 10.1111/cas.12075. 査読有

Shimazui T, Yoshikawa K, Miyazaki J, Kojima T, Inai H, Ando S, Uemura H, Uchida K, Nishiyama H. Systemic transduction of p16INK4A antitumor peptide inhibits the growth of MBT-2 mouse bladder tumor cell line grafts. *Int J Oncol.* 2013 Feb;42(2):543-8. doi: 10.3892/ijo.2012.1752. 査読有

Yamasaki T, Nishiyama H. (他9人,10番目) Tumor microvasculature with endothelial fenestrations in VHL null clear cell renal cell carcinomas as a potent target of anti-angiogenic therapy. *Cancer Sci.* 2012 Nov;103(11):2027-37. doi: 10.1111/j.1349- 査読有

Li B, Nishiyama H. (他8人,8番目) Overexpression of ETS-1 is associated with malignant biological features of prostate cancer. *Asian J Androl.* 2012

Nov;14(6):860-3. doi: 10.1038/aja. 査読有

Onozawa M, Miyazaki J, Kawai K, Nishiyama H, (他 8 人 4,8,11 番目). Analysis of Intravesical Recurrence After Bladder-preserving Therapy for Muscle-invasive Bladder Cancer. JJC0. 2012 Sep;42(9):825-30. doi: 10.1093/jjco/hys105. 査読有

Ikeda A, Kawai K, Miyazaki J, Nishiyama H. (他 8 名, 2, 11, 12 番目), Management of ureteral obstruction in advanced testicular tumor with lymph node metastasis. 2012 Aug;42(8):748-52. doi: 10.1093/jjco/hys094. 査読有

Sekido N, Joraku A, Okada H, Wakamatsu D, Matsuya H, Nishiyama H. A novel animal model of underactive bladder: Analysis of lower urinary tract function in a rat lumbar canal stenosis model. Neurourol Urodyn. 31(7):1190-6. 2012 doi: 10.1002/nau.21255. 査読有

Masuda T, Nishiyama H, (他 14, 11 番目) Cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) interacts with Dyrk1b/Mirk and promotes proliferation of immature male germ cells in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jul 3;109(27):10885-90. doi: 10.1073/pnas.1121524109. 査読有

Saito R, Nishiyama H, (他 18 人, 3 番目) Downregulation of Ral GTPase-activating protein promotes tumor invasion and metastasis of bladder cancer. Oncogene. 2012 Mar 26. doi: 10.1038/onc. 査読有

Kanno T, Nishiyama H, (他 11 人, 11 番目), JunB promotes cell invasion and angiogenesis in VHL-defective renal cell carcinoma. Oncogene. 2012 Jun 21;31(25):3098-110. doi: 10.1038/onc. 査

読有

Nishizawa K, Nishiyama H, (他 10 人, 2 番目), Thioredoxin-interacting protein suppresses bladder carcinogenesis, Carcinogenesis. 2011 Oct;32(10):1459-66. Epub 2011 Jul 18. doi: 10.1093/carcin/bgr137. 査読有

Miyazaki J, Nishiyama H, Kawai K, (他 7 名, 2 番目). The therapeutic effects of R8-liposome-BCG-CWS on BBN-induced rat urinary bladder carcinoma. Anticancer Res. 2011 Jun;31(6):2065-71. http://ar.iiarjournals.org/content/31/6/2065. long 査読有

Ratanajaraya C, Nishiyama H, (他 9 名, 2 番目) A polymorphism of the POLG2 gene is genetically associated with the invasiveness of urinary bladder cancer in Japanese males, J Hum Genet., Epub ahead of print, 2011. doi: 10.1038/jhg. 査読有

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西山 博之 (NISHIYAMA, Hiroyuki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号 : 20324642

(2) 研究分担者

宮崎 淳 (MIYAZAKI, Jun)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号 : 10550246

及川 剛宏 (OIKAWA, Takehiro)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号 : 00361345

末富 崇弘 (SUETOMI, Takahiro)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号 : 10574650