

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462410

研究課題名(和文)代謝関連オミックス解析を用いた膀胱癌の新規発癌・進展経路の解明

研究課題名(英文)Elucidation of novel carcinogenesis / development pathway of bladder cancer by using metabolism-related omics analysis

研究代表者

寺田 直樹 (Terada, Naoki)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60636637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：正常尿路上皮細胞株、非浸潤性膀胱癌細胞株、浸潤性膀胱癌細胞株の順にPGAM1の発現が上昇していることを確認した。また公共データベースでの解析でも膀胱癌でのPGAM1発現上昇が確認できた。しかし、TMAでのヒト臨床検体での解析では、浸潤の程度とPGAM1の染色レベルに相関は認めなかった。続いてshRNAを用いてPGAM1の発現を抑制すると、浸潤能・遊走能には変化が認められなかったが、増殖能が低下した。また、野生型およびPGAM1トランスジェニックマウスにBBNを10週投与したところ、PGAM1トランスジェニックマウス群の方が有意に発癌率が高かった。

研究成果の概要(英文)：It was confirmed that expression of PGAM1 was elevated in the order of normal urothelial cell line, noninvasive bladder cancer cell line, invasive bladder cancer cell line. In addition, analysis by public databases also confirmed an increase in expression of PGAM1 in bladder cancer specimens. However, in the analysis of tissue micriarrays of human clinical specimens, there was no correlation between the degree of invasion and the staining level of PGAM1. Subsequently, when expression of PGAM1 was suppressed using shRNA, no change was observed in invasive and migratory ability, but the proliferative ability was decreased. In addition, when BBN was administered to wild type and PGAM 1 transgenic mice for 10 weeks, the PGAM 1 transgenic mouse group had a significantly higher carcinogenic rate.

研究分野：前立腺癌

キーワード：膀胱癌 細胞老化

1. 研究の背景

筋層浸潤性膀胱癌や遠隔転移性尿路上皮癌の2年生存率はそれぞれ約50%、15%程度と不良であるため、特に筋層浸潤性膀胱癌の発癌・転移メカニズムを解明し、それに基づく新規治療法を開発することが急務である。

膀胱癌の発生メカニズムは未だに不明な点が多く、十分に解明されたとは言い難い (Knowles et al. *Nat Rev Cancer* 2015)。当研究室でもレドックス関連遺伝子 TXNIP の発現低下が CXCR4 シグナルの活性化により浸潤性膀胱癌の発癌を促進することを見出した (Nishizawa et al. *Carcinogenesis* 2011)。

生体内における主なエネルギー産生経路には嫌氣的な解糖系代謝と好氣的な TCA 経路 - ミトコンドリア酸化的リン酸化経路がある。嫌氣的代謝では好氣的代謝に比べて ATP 産生効率が低いにも関わらず、細胞がいずれの代謝系を利用するのには単純な ATP 合成効率の観点のみではなく、アミノ酸や核酸、脂質代謝など他の代謝経路とのバランスなど他の要因が大きく影響する。

実際に、好氣的代謝が可能な環境にあっても嫌氣的代謝を第一選択としない場合があり、その一例として酵母は酸素が豊富にある環境においてもグルコースが大量にあると嫌氣的エタノール発酵を使用することはよく知られている。

興味深いことに、ほとんどの癌細胞では通常酸素分圧下においても嫌氣的解糖系代謝が主に使用される (Altenberg et al. *Genomics* 2004)。この現象は1930年代にオットー・ワールブルグによって初めて報告されたことから「ワールブルグ効果」と呼ばれ、実際に今日の医療現場で癌の診断に応用・利用されている (Warburg. *Science* 1956)。

ワールブルグ効果は固形癌の腫瘍増大に伴い血管新生が追いつかないことで中心部に生じる低酸素環境に順応するための合目的反応と考えられてきた。しかし実際には上述の通り通常酸素濃度下で培養したがん細胞においても解糖系は亢進したままであることから、低酸素適応だけではワールブルグ効果を説明できない。ワールブルグ効果の真の生物学的意義はいまだに完全には解明されていないが、近年の研究によりさまざまな代謝経路や遺伝子発現に影響し、増殖能亢進、不死化、抗アポトーシス、浸潤能獲得、低栄養環境における生存といった癌細胞の持つさまざまな特性との関連が指摘されている

(Mikawa et al. *Cell Mol Life Sci* 2015)。

共同研究者の近藤らは、マウス胎児線維芽細胞 (MEF) を用いた細胞老化抑制スクリーニングから解糖系を構成する酵素の一つである PGAM を同定した (Kondoh et al. *Cancer Res* 2005)。MEF 細胞はストレスに感受性が高く、通常数回から十数回程度の継代によってテロメア非依存的なストレス老化を起こして増殖を停止するが、PGAM を過剰に発現させた MEF 細胞では癌抑制遺伝子 p53 を欠失した場合と同様、細胞老化の表現型を示さず増殖を続ける。逆に PGAM の発現をノックダウンした MEF 細胞では早期の細胞老化が誘導されることから、老化に伴う PGAM の発現低下が細胞老化を誘導すると考えられた。その後、他のグループからも PGAM の持つさまざまな機能に関する報告が相次ぎ、PGAM の癌代謝における重要性が注目されている (近藤ら *生化学* 2016)。

その後の研究で PGAM 一遺伝子のみでの過剰発現により MEF 細胞では解糖系代謝の亢進がみられることから、細胞老化の過程において PGAM を介した解糖系制御が存在することが予想された。実際に細胞老化の過程では PGAM のタンパク量の低下に伴って解糖系代謝も低下していくことも分かっている。このことから、PGAM は解糖系制御を介して、細胞老化を抑制していることが示唆された。

膀胱癌は高齢者に多い癌で特に浸潤性膀胱癌は p53 変異との関連が強い。膀胱癌の発癌・進行における細胞老化からのエスケープ機構や代謝機構の変化については不明な点も多い。本研究では代謝経路の重要分子である PGAM が膀胱癌の発癌・進行に果たす役割に着目し、これを解析して明らかにすることで、新規治療戦略に結び付けたいと考えた。

2. 研究の目的

PGAM1 の発現は細胞老化抑制遺伝子として p53 遺伝子により抑制され、HIF-1 の制御を受けない唯一の解糖系代謝酵素であり、大腸癌との関連も示唆されている。すでに PGAM1 発現が筋層浸潤性膀胱癌由来細胞株において正常尿路上皮・非浸潤性膀胱癌由来細胞株に比して亢進しているというデータを得ている。

本研究では PGAM1 と発癌や進展の関わりを解析し新規治療法開発へとつなげるために、さらに以下のことを明らかにすることを目的とする。

膀胱癌細胞株における PGAM1 の発現を

評価し、細胞株のタイプや p53 変異の有無との関連を検証する。

膀胱癌臨床検体における PGAM1 の発現を評価するとともに、腫瘍の臨床的悪性度との相関を検証する。

PGAM1 の機能解析：細胞株における PGAM1 の発現を変化させ、表現型に与える影響を評価する。

PGAM1 の生体内における機能解析：遺伝子改変マウスを用いて膀胱発癌・進行に与える影響を評価する。

3. 研究の方法

膀胱癌細胞株における PGAM1 の発現：膀胱癌細胞株の cDNA・タンパクを抽出し、それぞれ RT-PCR、ウェスタンブロット (WB) を用いて評価する。すでに細胞株の p53 をはじめとした代表的遺伝子の変異のプロファイルは確立しており、これらの変異の有無と PGAM1 の発現の関連を検証する。

すでに当科では膀胱癌の腫瘍検体を収集し、Tissue Microarray (TMA) を作成済みである。TMA 標本を用いて PGAM1・p53 等の免疫染色を行い、PGAM1 染色性と p53 染色性、TNM 分類や組織学的グレードなどの病理学的所見、膀胱内・尿路外再発や患者生存等の臨床アウトカムなどとの関連性を検討する。

膀胱癌細胞株に発現ベクターを用いて遺伝子導入を行い、抗生剤および蛍光マーカーを用いて選択することで安定発現株を樹立する。それらの細胞株を用いて以下の項目を検討する。

- 1) 浸潤能：Matrigel® invasion assay
- 2) 遊走能：Scratch wound-healing assay
- 3) 増殖能：MTT assay

で評価した細胞の *in vivo* における増殖能を、Xenograft モデルを用いて評価する。

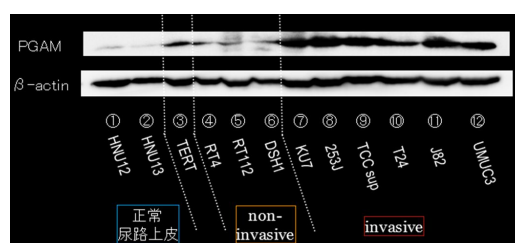
遺伝子改変マウスを用いた検討：

PGAM1 トランスジェニックマウスと野生型マウスに対して N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (以下 BBN) 投与を行い、発生した膀胱癌の表現型を比較する。

4. 研究成果

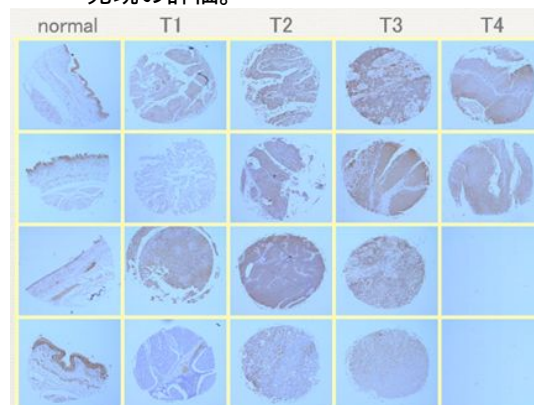
正常尿路上皮細胞株、非浸潤性膀胱癌細胞株、浸潤性膀胱癌細胞株の順に PGAM1 の発現が上昇していることを確認した (Fig. 1)。また公共データベースでの解析でも膀胱癌での PGAM1 発現上昇が確認できた。今回用いた正常尿路上皮細胞株と非浸潤性膀胱癌細胞株は p53 野生型であるのに対し、浸潤性膀胱癌細胞株は全て p53 の変異を有している。今回観察された浸潤性膀胱癌細胞株における PGAM1 の発現上昇は p53 の機能欠失を反映したものである可能性も十分に考えられる。

Fig. 1 膀胱癌細胞株における PGAM1 の発現 (WB)。β-actin はローディングコントロール。



ヒト正常膀胱および膀胱癌組織の TMA を用いた免疫組織学的染色での解析では、浸潤の程度 (T stage) と PGAM1 の染色レベルに相関は認めなかった (Fig. 2)。今回 p53 の染色はまだ行っていないため不明だが、p53 の変異と関連がある可能性があると考えている。

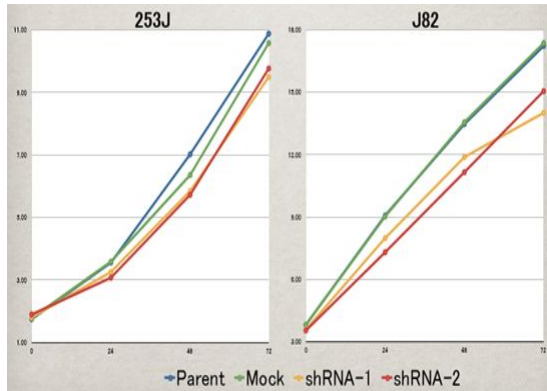
Fig. 2 正常膀胱および膀胱癌組織の TMA を用いた免疫組織学的染色による PGAM1 発現の評価。



浸潤性膀胱癌細胞株 253J, J82 で、2 種類の shRNA を使って PGAM1 の発現を抑制した。Matrigel® invasion assay を用いた浸潤能評価・Scratch wound-healing assay を用い

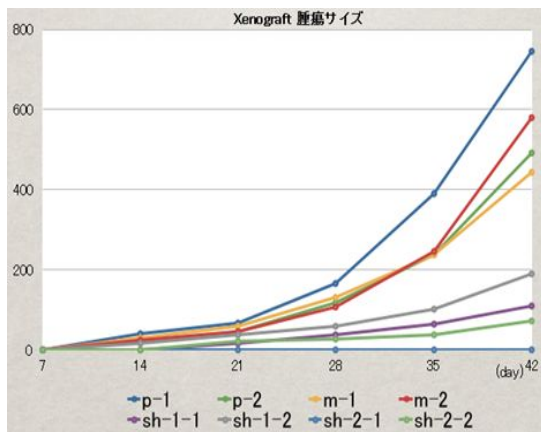
た遊走能評価を行ったが、PGAM1 ノックダウンによる有意な影響は認められなかった (data not shown)。一方、MTT assay を用いた増殖能評価の結果、PGAM1 ノックダウンによる増殖抑制効果が確認された (Fig.3)

Fig. 3 253J 細胞・J82 細胞の PGAM1 ノックダウンによる培養系における増殖抑制効果 (MTT assay)



と同様、浸潤性膀胱癌細胞株 253J, J82 で、2 種類の shRNA を使って PGAM1 の発現を抑制した後に、ヌードマウスの背部皮下に移植した。その後生着した腫瘍のサイズを経時的に評価すると、PGAM1 ノックダウン細胞は *in vivo* でも増殖能が低下することを確認した (Fig. 4)

Fig. 4 253J 細胞・J82 細胞の PGAM1 ノックダウンによる *in vivo* における増殖抑制効果 (Xenograft モデルの腫瘍体積)



遺伝子改変マウスを用いた検討：

メスの PGAM1 トランスジェニックマウス (PGAM-Tg) と野生型マウス (WT) に対して BBN 投与を行い、10 週後にマウスを解剖し、膀胱における癌発生の有無を評価した。その結果、WT に比べて PGAM1-

Tg において有意に発癌率が高かった (Table. 1)

Table. 1 PGAM1 トランスジェニックマウス (PGAM-Tg) と野生型マウス (WT) を用いた BBN 膀胱化学発癌モデルの膀胱発癌率の評価

All female ♀	WT	PGAM-Tg
	UC, pIa (G1) non-invasive × 1 only dysplasia × 18 /n=19	UC, pIis (G2-3) non-invasive × 2 UC, pIis (G3) non-invasive × 1 UC, pIa (G1) non-invasive × 2 UC, pIis (G2) non-invasive × 1 only dysplasia /n=27
BBN 0.05% 10weeks投与	発癌率: 1/19 = 5.56%	発癌率: 6/27 = 22.2%

考察と今後の予定

浸潤性膀胱癌細胞株を用いた検討では、PGAM1 は腫瘍細胞増殖を促進する機能を有している可能性が示唆された。今後さらに細胞株を増やして検討し、より確証を得られるようにしたいと考えている。

PGAM1-Tg における発癌促進作用もこれを支持する結果であると考えているが、BBN 投与後比較的早期の 10 週時点でのデータのため、より後期のデータも検証する必要があると考えている。

浸潤性膀胱癌細胞株における PGAM1 高発現が p53 変異によるものなのか、その他の高悪性度形質によるものであるのかは未だ不明であるため、今後 p53 変異を誘導する等の実験を行い、p53 変異あるいは欠失との因果関係を明らかにしていく必要があると考えている。

ヒト膀胱癌の免疫組織学的染色による解析では、腫瘍の T stage や組織学的グレードと PGAM1 発現との間に有意な相関は認めなかったが、これに関しては抗体の最適化から再度行う必要があると考えている。また、p53 変異との関連にも着目して再検討する予定である。

ここまでのデータは PGAM1 が p53 変異を伴う膀胱癌細胞株において増殖に関わり、治療標的となる可能性を示唆するものであるが、その因果関係がより確かなものとなった場合には、その詳細なメカニズムに関しても検討する予定である。

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 7 件)

1. Inoue T, Terada N, Kobayashi T, Ogawa O. Patient-derived xenografts as in vivo models for research in urological malignancies. Nat Rev Urol. 2017; Feb 21.
2. Kobayashi T. Understanding the biology of urothelial cancer metastasis. Asian J Urol. 2016;3(4):211-22.
3. Sano T, Kobayashi T, Negoro H, Sengiku A, Hiratsuka T, Kamioka Y, Liou LS, Ogawa O, Matsuda M. Intravital imaging of mouse urothelium reveals activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced intravesical release of ATP. Physiol Rep. 2016;4(21).
4. Kurobe M, Kojima T, Nishimura K, Kandori S, Kawahara T, Yoshino T, Ueno S, Iizumi Y, Mitsuzuka K, Arai Y, Tsuruta H, Habuchi T, Kobayashi T, Matsui Y, Ogawa O, Sugimoto M, Kakehi Y, Nagumo Y, Tsutsumi M, Oikawa T, Kikuchi K, Nishiyama H. Development of RNA-FISH assay for detection of oncogenic FGFR3-TACC3 fusion genes in FFPE samples. PLoS One. 2016;11(12):e0165109.
5. Goodison S, Ogawa O, Matsui Y, Kobayashi T, Miyake M, Ohnishi S, Fujimoto K, Dai Y, Shimizu Y, Tsukikawa K, Furuya H, Rosser CJ. A multiplex urinary immunoassay for bladder cancer detection: analysis of a Japanese cohort. J Transl Med. 2016;14(1):287.
6. Sun D, Sawada A, Nakashima M, Kobayashi T, Ogawa O, Matsui Y. MK2206 potentiates cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis through an interaction of inactivated Akt signaling pathway. Urol Oncol. 2015;33(3):111 e17-26.
7. Nakashima M, Matsui Y, Kobayashi T,

Saito R, Hatahira S, Kawakami K, Nakamura E, Nishiyama H, Ogawa O. Urine CXCL1 as a biomarker for tumor detection and outcome prediction in bladder cancer. Cancer Biomark. 2015;15(4):357-64.

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

寺田 直樹 (Terada Naoki)
京都大学医学研究科助教
研究者番号：60636637

(2)研究分担者

小林 恭 (Kobayashi Takashi)
京都大学医学研究科助教
研究者番号：00642406

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()