

平成30年6月15日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20095

研究課題名(和文)膀胱癌の病態生理におけるEpacの役割

研究課題名(英文)Role of Epac in bladder cancer

研究代表者

逸見 百江 (ITSUMI, Momoe)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40585890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒト正常膀胱組織と比べヒト膀胱癌組織においてEpac1, Epac2の発現が共に低下していることを見出し、その役割を明らかにすることを目的に研究を行った。膀胱上皮癌由来細胞株(kk47細胞、UMUC3細胞)も同様にEpac1/2の発現が正常膀胱上皮細胞よりも低下していた。そこで、膀胱癌細胞株にEpac-1を強制発現させ癌形質に及ぼす影響をみた。Epac1の強制発現は細胞間接着の増加を示したが、細胞の増殖や生存に影響しなかった一方で、癌細胞の遊走能の顕著な低下を誘導した。これらは、膀胱癌細胞においてEpac1発現の誘導は細胞の遊走性を抑制することに重要であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：We report that EPAC1 and EPAC2 expression levels were significantly lower in bladder cancer tissue than in normal bladder tissue. In addition, bladder cancer cell lines showed reduced EPAC1 mRNA expression. Furthermore, EPAC1 overexpression in bladder cancer cell lines induced morphologic changes and markedly suppressed cell migration without affecting cell viability. The overexpressed EPAC1 preferentially localized at cell-cell interfaces. In conclusion, reduced EPAC1 expression in bladder tumors and poor migration of EPAC1-overexpressing cells implicate EPAC1 as an inhibitor of bladder cancer cell migration.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：膀胱癌 遊走能

1. 研究開始当初の背景

膀胱は移行上皮からなっており、拡張および収縮を行うことで排尿を行っている器官である。膀胱癌は、再発率が非常に高く、難治性の癌の一つであり、それゆえ、新規の治療法が望まれている。女性に比べ男性に多くみられる癌であり、近年の研究で膀胱がんに対する様々なバイオマーカーが同定された。それは、がん抑制遺伝子、がん遺伝子、ホルモン受容体、細胞接着分子など多岐にわたる。

cAMP は細胞内で重要なシグナル伝達物質であり、その経路は PKA 依存的とされていた。しかしながら、近年、PKA を介さない別の経路 Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) 存在が明らかになった (Kawasaki et al. 1998, *Science* 282: 2275-2279, de Rooij J et al. 1998, *Nature* 396: 474-477)。Epac は cAMP 依存的グアニンヌクレオチド交換因子 (Guanine nucleotide exchange factor: GEF) である。2つのアイソフォーム Epac1, Epac2 が存在する。これらは cAMP と結合することで構造が変化し、低分子量 GTP アーゼ (small GTPase) である Ras-related protein (Rap) の結合ドメインを露出する。そこに Rap が結合することで下流にシグナルが伝達される。これらのシグナルは細胞の接着、増殖、分化、アポトーシスなど様々な現象を誘導することが知られている。

Epac1 を欠損したマウスは心筋細胞内のカルシウムの減少と心臓運動の低下を示すことが報告されるなど諸臓器における役割が明らかにされつつある (Okumura S et al. 2014, *J Clin Invest.* Jun 2;124(6):2785-801.)。そこで我々は、膀胱排尿筋における Epac の生理的機能に注目した。その過程において、膀胱上皮にも Epac の発現がみられることを見出した。さらに興味深いことに、膀胱上皮癌由来細胞株 KK47 細胞、UMUC3 細胞における Epac1, Epac2 の発現を解析したところ、正常な膀胱組織で発現していた Epac の発現は膀胱癌細胞株において有意に抑制されていることを見出した。この癌細胞株で見られた Epac の発現減少は患者から抽出した膀胱癌組織を用いた解析から、癌細胞株の結果と同様に、患者の癌組織においてもまた Epac 発現が低下していることを認めた。これらのことから Epac が膀胱癌の病態生理に関与していることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、膀胱癌における Epac の役割を癌の特徴である細胞接着、増殖、分化に焦点を当て明らかにする。これは、膀胱癌における新規治療法の開発につながると考えられる。

3. 研究の方法

臨床検体の正常膀胱組織 (男性: n = 6、女性: n = 2) および膀胱腫瘍組織 (男性: n = 12、女性: n = 7) から total RNA を抽出し、

EPAC1/2 の mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。同一患者組織 (n = 3) から癌部、非癌部を単離し、RNA 抽出とタンパク質抽出を行い、定量的 RT-PCR 法またはウエスタンブロッティング法により各々の内在性 EPAC1/2 の発現を比較した。膀胱癌細胞株 RT4, KK-47, 5637, T-24, TCCSUP, UMUC3 および初代培養正常膀胱移行上皮細胞における EPAC1/2 の発現を定量的 RT-PCR 法により解析した。EPAC1 を発現するレンチウイルスベクターおよびそのコントロールベクターを膀胱癌細胞株 UMUC3 および KK-47 細胞に感染させ、プラストサイジン S による薬剤選択を行い、EPAC1 強制発現細胞株とそのコントロール細胞株を樹立した。それらの細胞の形態変化は、顕微鏡下で観察した。樹立した細胞株の生存率はアラマブルー法を用いて解析した。創傷治癒実験として、細胞間に一定の溝を作製するインサートを装着したプレートに細胞を播種後、インサートを除去し、細胞移動により埋められた面積を経時的に ImageJ 画像解析ソフトを用いて解析しグラフ化した。EPAC1 標的タンパク質 Rap1 の活性化状態 (Rap1-GTP 型) は、Rap1 activation Assay Kit を用いたプルダウン法により Rap1-GTP 型を抽出し、ウエスタンブロッティング法により検出した。発現させた EPAC1 の細胞内局在は蛍光免疫染色法により共焦点顕微鏡を用いて観察した。

4. 研究成果

定量的 RT-PCR の結果より、臨床検体における EPAC1 および EPAC2 の発現量は正常膀胱組織と比較して膀胱腫瘍組織において有意に低下していた。(図 1)

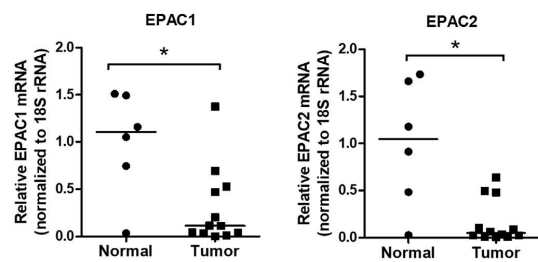
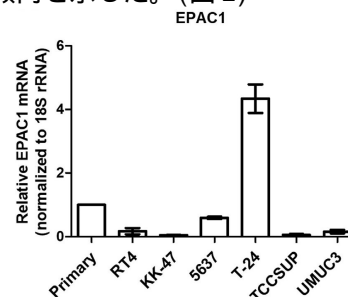


図 1 膀胱正常組織と癌部での Epac 発現

膀胱癌細胞株における EPAC1 の発現量は初代培養正常膀胱上皮細胞と比較して、T24 細胞を除き総じて低下していた。EPAC2 発現量もまた EPAC1 と比べわずかであるが、癌細胞株で低下傾向を示した。(図 2)



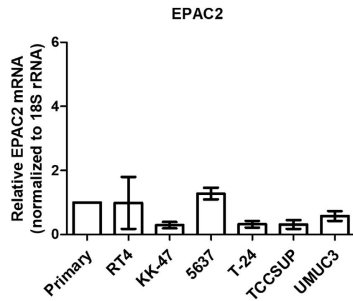


図2 膀胱初代培養細胞と膀胱癌細胞株のEPAC 発現

次に、膀胱癌における EPAC1 の役割を解析するために、膀胱癌細胞株 UMUC3 および KK-47 細胞に EPAC1 を強制発現させた EPAC1 強制発現膀胱癌細胞株 (UMUC3-EPAC1, KK47-EPAC1 細胞) を樹立した。UMUC3-EPAC1 および KK47-EPAC1 細胞の生存率は EPAC1 強制発現による影響は受けず、コントロール細胞と同様であった。一方、UMUC3-EPAC1 細胞は高い細胞間接着性を示し、敷石状に細胞が増殖しているのが観察された。(図 3)

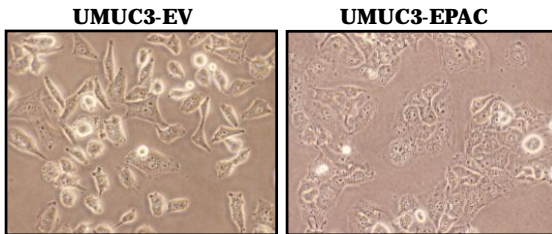


図3 EPAC1 強制発現細胞における細胞形態

そこで EPAC1 の過剰発現がもたらす下流の Rap1 への影響を調べたところ、UMUC3-EPAC1 細胞では Rap1-GTP 型の顕著な増加を認めた。(図 4) 同様に、KK47-EPAC1 細胞もまた Rap1-GTP 型の増加を示したが、形態変化は伴

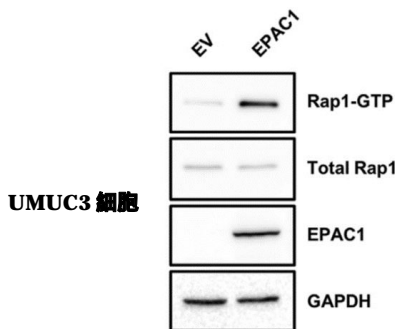


図4 EPAC1 強制発現細胞における Rap1 の活性化状態

UMUC3-EPAC1 細胞において細胞間接着の増強が見られたことから、EPAC1 発現が細胞の移動能に影響する可能性が示唆された。そこで、UMUC3-EPAC1 および KK47-EPAC1 細胞用いて創傷治癒実験を行った。非常に興味深いことに、UMUC3-EPAC1 細胞、KK47-EPAC1 細胞ともに、コントロール細胞と比べ移動能が有意に抑制されていた。(図 5)

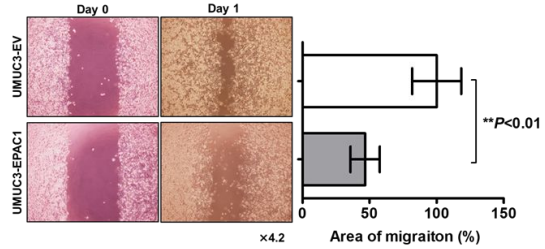


図5 EPAC1 強制発現細胞の遊走能

活性化された EPAC1 は細胞膜に局在することが報告されていることから、UMUC3-EPAC1 および KK47-EPAC1 細胞における EPAC1 の細胞内局在に注目した。細胞が単独で存在する場合、EPAC1 発現は細胞内全体に認められたが、細胞同士が接着している場合は、その接着面で EPAC1 の集積を示した。(図 6)

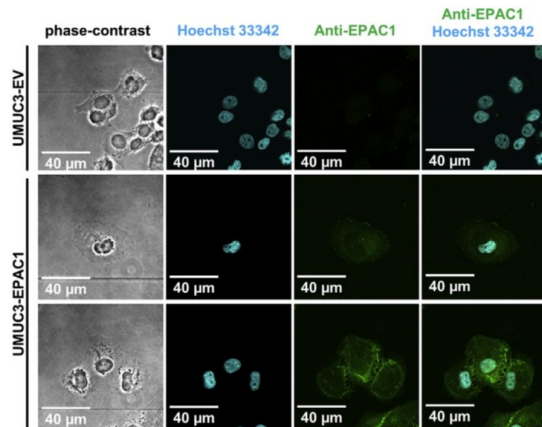


図6 EPAC1 強制発現の細胞内局在

これらのことから、EPAC が膀胱癌の浸潤や転移といった癌形質の中でも遊走能に特化して関与していることが示唆された。

現在、多くの癌において主に増殖抑制や細胞死誘導を狙った有効な治療法が開発されている。しかしながら、転移や浸潤に特化した治療法というものはほとんど見受けられない。転移や浸潤を抑えることができれば、様々な抗癌治療との併用により、より癌の撲滅につながる事が考えられる。本研究では、膀胱癌細胞の移動性を著しく抑制する遺伝子として Epac1 の同定を行ったことを報告する。

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 13 件)

Ichikawa H, Itsumi M, Kajioka S, Maki T, Lee K, Tomita M, Yamaoka S.

Overexpression of exchange protein directly activated by cAMP-1 (EPAC1) attenuates bladder cancer cell migration.

Biochem Biophys Res Commun. 査読有 2018
Jan 1;495(1):64-70.
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.142.

〔学会発表〕(計 6 件)

Hirona Ichikawa, Shoji Yamaoka,
Shunichi Kajioka, Momoe Itsumi
EPAC1 suppresses migration of bladder
cancer cells. 第 76 回日本癌学会学術総会
2017 年

逸見百江、山岡昇司. LUBAC 構成分子
HOIL-1L の発現低下による HTLV-1 感染細胞の
増殖抑制メカニズム. 第 4 回日本 HTLV - 1 学
会学術集会 2017 年

Momoe Itsumi, Kazuhiro Iwai, Shoji
Yamaoka. Role for linear ubiquitination in
the growth of HTLV-1-infected cells. 第
18 回国際ヒトレトロウイルス HTLV 会議
2017 年

Momoe Itsumi, Masaki Shiota, Akira
Yokomizo, Eiji Kashiwagi, Ario Takeuchi,
Kenjiro Imada, Katsunori Tatsugami,
Junichi Inokuchi, Takeshi Uchiumi,
Shunichi Kajioka, Seiji Naito, Masatoshi
Etoh. Serotonin receptor antagonist
inhibits prostate cancer progression. The
75th Annual Meeting of the Japanese Cancer
Association 2016 年

逸見百江、岩井一宏、山岡昇司. LUBAC 構
成分子 HOIL-1L の発現低下は HTLV-1 感染細
胞の増殖を抑制する. 第 3 回日本 HTLV-1 学
会学術集会 2016 年

Momoe Itsumi, Masaki Shiota, Akira
Yokomizo, Eiji Kashiwagi, Ario Takeuchi,
Kenjiro Imada, Katsunori Tatsugami,
Junichi Inokuchi, Takeshi Uchiumi,
Shunichi Kajioka, Seiji Naito. Equol
promotes protein degradation of androgen
receptor via Skp2 and suppresses cell
proliferation in prostate cancer. The 76th
Annual Meeting of the Japanese Cancer
Association 2016 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

逸見 百江 (ITSUMI, Momoe)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教

研究者番号 : 40585890