

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09146

研究課題名(和文)新規発がん超早期関連因子OCMを基軸とした尿路上皮癌発症機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of oncomodulin in the development of urothelial carcinoma

研究代表者

魏 民(Gi, Min)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：70336783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroおよびin vivo試験系を用いて新規膀胱発がん関連因子であるOncomodulin(以下、OCM)の機能解析を行った結果、OCMは尿路上皮発がんにおいて細胞増殖能、遊走能および浸潤能を制御する多彩な機能を有する分子であることが明らかになった。また、その作用機序にカルシウムシグナル伝達経路の活性化が関与することが示唆された。加えて、新規作製したOCMホモ欠損ラットを用いた膀胱発がん試験で、OCMは膀胱発がんに関与することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトにおける尿路上皮癌は再発率が高く、根治は極めて困難である。そのため、発がん分子機序を解明し、尿路上皮癌の発症を予防することは喫緊の課題である。OCMは尿路上皮癌の中で、最も発生頻度が高い膀胱癌において、発がん過程の超早期から腫瘍にかけて継続して発現が増加する分子であることから、本研究で得られたOCMを基軸とした尿路上皮癌発症機序に関する研究成果が、尿路上皮癌の超早期診断および発症予防に向けた基盤的な研究成果を提供できると確信している。

研究成果の概要(英文)：Oncomodulin, a calcium-binding protein, was identified as early biomarker for prediction of urinary bladder carcinogenesis in rats in our previous studies. However, little is known about its role and underlying mechanisms in development of urothelial carcinoma. In the present studies, we demonstrated that overexpression of OCM increased cell proliferative activity, migration and invasion during the bladder carcinogenesis, possibly via activation of calcium signaling pathway. The findings of decreased incidence of urinary bladder cancers OCM knockout rats compared with the wild-type rats also indicated that OCM is involved in the bladder carcinogenesis. These results suggested that OCM might be a useful therapeutic target for urothelial carcinoma.

研究分野：実験病理学、化学発がん、膀胱癌

キーワード：Oncomodulin Urothelial carcinoma

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

尿路上皮癌は腎盂・尿管・膀胱・尿道とつながる尿路に発生する癌である。中でも最も発症頻度の高い膀胱癌の約 75%は筋層非浸潤癌（表在性癌）である。すなわち尿路上皮癌の大部分は表在性癌である。表在性膀胱癌に対しては経尿道的膀胱腫瘍切除術による癌切除と、膀胱内注入療法を中心とした「膀胱温存療法」が施行されるが、治療後の高頻度な再発と、再発腫瘍が筋層浸潤性膀胱癌へ進行することが問題となっている。

我々は、表在性癌が発症する以前に尿路上皮内で起こる詳細な分子機序の解明に焦点を絞り、これまでに独自の大規模な *in vivo* 網羅的遺伝子発現スクリーニングを行い、尿路上皮発がん過程の超早期（組織学的変化が認められる以前）から腫瘍にかけて継続して発現が増加する発がん基盤分子として Oncomodulin（以下、OCM）を見出した。OCM は 2 つの EF-hand を有する 109 アミノ酸からなる低分子カルシウム結合タンパク質である。これまでに神経再生に關与するとの多数の論文報告がなされているが、尿路上皮発がん過程における機能は未知である。

2. 研究の目的

OCM を基軸とした尿路上皮癌発症機構を明らかにすることを目的とし、尿路上皮発がん過程における OCM の役割及びその機序を検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト正常尿路上皮不死化細胞を用いた OCM 機能解析(実験 1)

ヒト正常膀胱粘膜（尿路上皮）の初代細胞に変異 CDK4 および TERT を遺伝子導入することで、分化能に影響を与えず不死化したヒト正常尿路上皮細胞株(HBladEC-K4T)を樹立した。さらに、この不死化ヒト尿路上皮細胞に、野生型 OCM を Tet-one 発現誘導系レトロウイルスベクターを用いて導入し(pTetOne-HBladEC-K4T-OCM 細胞)、OCM の細胞増殖能や遊走能に及ぼす影響の検討及び OCM の下流遺伝子の同定を行った。

(2) OCM 変異型ヒト尿路上皮不死化細胞を用いた OCM 機能解析(実験 2)

pTetOne-HBladEC-K4T-OCM 細胞について、カルシウム結合ドメインをアミノ酸置換することでカルシウム結合能を低下させた変異体 (pTetOne-HBladEC-K4T-mutOCM 細胞)を作製し、OCM の細胞内分子機構はその既知機能であるカルシウム結合能に依存するか否かを検討した。

(3) ヒト膀胱癌細胞株を用いた OCM 機能解析(実験 3)

OCM が発現していないヒト膀胱癌株(TCCSUP)に対して Sleeping Beauty トランスポゾン法を用いて OCM 過剰発現亜株(OCM-TCCSUP)を樹立し、OCM の機能解析を行った。

(4) OCM ホモ欠損ラットを用いた個体レベルの機能解析(実験 4)

OCM ホモ欠損ラットを作製し、それを用いた膀胱発がん性試験を実施し、尿路上皮発がん過程における OCM の機能を個体レベルで評価した。詳細な方法として、雌雄の OCM ホモ欠損ラット及び野生型ラットに膀胱発がん物質である N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) を 0.05%の濃度で 8 週間飲水投与し、その後無処置で飼育した。実験開始 23 週後に解剖し、膀胱腫瘍の発生について病理学的解析を行った。

(5) ヒト膀胱尿路上皮癌における OCM の発現解析(実験 5)

大阪市立大学医学部付属病院において、外科的切除が行われた膀胱癌症例に対して OCM 染色を行い、OCM の臨床病理学的意義を検討した。

(6) OCM トランスジェニックマウスの作製(実験 6)

4. 研究成果

(1) ヒト正常尿路上皮不死化細胞を用いた OCM 機能解析(実験 1)

不死化させたヒト尿路上皮初代細胞に、OCM を Tet-On 発現誘導系を用いて導入した (pTetOne-HBladEC-K4T-OCM) 結果、OCM の発現亢進が細胞増殖能に影響を及ぼさないものの、遊走能を亢進することが明らかになった(図 1)。また、OCM 発現誘導 (Dox 添加) を行った 24 および 48 時間後にマイクロアレイ解析を実施し、OCM の発現亢進により 2 倍以上の発現変動を示した遺伝子をそれぞれ 251 および 274 種類を同定した。その中で、MMP13 や CEMIP などの遊走能関連遺伝子が共通して高発現したことから、これら遺伝子が OCM による遊走能の亢進に寄与することが考えられた(表 1)。さらに、MMP13 および CEMIP が OCM 発現誘導を行った 6 時間後においても、

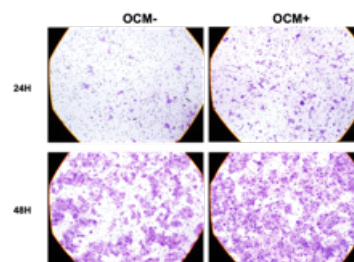


図1. OCMによる遊走能の亢進

その発現亢進が認められたことから、これらの遺伝子が OCM の直接的標的遺伝子である可能性が示唆された (図 2)。

表 1. OCM発現誘導を行った24および48時間後に発現が増加した上位20遺伝子

Symbol	Entrez Gene Name	Log Ratio	
		24H	48H
OCM	oncomodulin	12.124	11.806
OCM2	oncomodulin 2	10.75	10.999
MMP13	matrix metalloproteinase 13	4.998	4.071
IL23R	interleukin 23 receptor	4.352	2.103
CEMIP	cell migration inducing hyaluronan binding protein	3.218	3.166
TMPPRS11E	transmembrane protease, serine 11E	3.101	3.803
SLC16A2	solute carrier family 16 member 2	2.524	2.316
MYL9	myosin light chain 9	2.161	2.352
LGALS1	galectin 1	2.103	1.053
IL32	interleukin 32	2.072	1.899
HSPG2	heparan sulfate proteoglycan 2	2.009	1.225
RAET1L	retinoic acid early transcript 1L	2.004	
FADS3	fatty acid desaturase 3	1.964	
KLK7	kallikrein related peptidase 7	1.833	1.261
HSD17B11	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 11	1.74	2.352
PLEKHASP1	pleckstrin homology domain containing A8 pseudogene 1	1.683	
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	1.676	
GSDMA	gasdermin A	1.655	
BCL2A1	BCL2 related protein A1	1.648	1.687

(2) OCM 変異型ヒト尿路上皮不死化細胞を用いた OCM 機能解析(実験 2)

OCM 変異体株 (pTetOne-HBladEC-K4T-mutOCM) では、野生型 OCM で誘導された遊走及び浸潤関連遺伝子の発現変化 (MMP13 および CEMIP) が低下し、OCM はカルシウムシグナル伝達経路の活性化を介して下流遺伝子の発現を制御することが強く示唆された (図 3)。

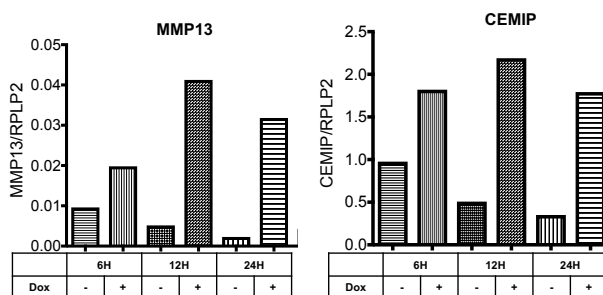


図2. pTetOne-HBladEC-K4T-OCM におけるMMP13及びCEMIP発現

(3) ヒト膀胱癌細胞株を用いた OCM 機能解析(実験 3)

OCM 過剰発現亜株 (OCM-TCCSUP#1 および#2) を用いて解析した結果、OCM 発現増加により細胞増殖能及び浸潤能が亢進することが明らかとなった (図 4)。さらに、マイクロアレイ解析を実施した結果、OCM の発現亢進により発現変動した遺伝子群を同定した。その遺伝子群には、増殖および浸潤に関連する遺伝子が多数含まれていたが、ヒト尿路上皮初代細胞を不死化した細胞で同定した OCM 標的遺伝子のプロファイルと異なることから、OCM は発がん過程の段階によってその作用機序が異なることが強く示唆された。一方、共通して発現が誘導された因子としてアポトーシス阻害因子である BCL2 related protein A1 (BCL2A1) を同定した。このことから、OCM はアポトーシスを阻害する機能を有する可能性が示唆された。

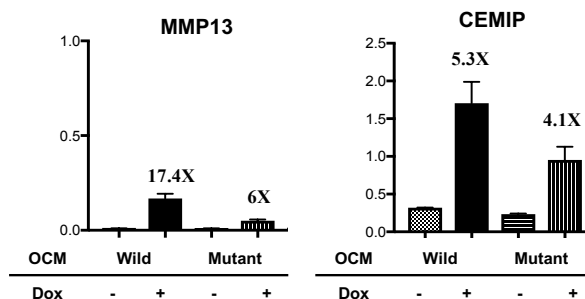


図3. pTetOne-HBladEC-K4T-mutOCM におけるMMP13及びCEMIP発現

(4) OCM ホモ欠損ラットを用いた個体レベルの機能解析(実験 4)

OCM ホモ欠損ラットの作製に成功した。その作製過程において、OCM のホモ欠損は産仔数および仔動物の発生などに明らかな影響を及ぼさないことが判明した。雌雄の OCM ホモ欠損ラットおよび野生型ラットを用いた膀胱発がん試験の結果、雌雄共に、野生型ラットと比較して、OCM ホモ欠損ラットでは、膀胱腫瘍の発生頻度および発生数が、統計学的有意差はないものの、減少傾向にあった。以上より、OCM はラット膀胱発がんに関与することを示した。

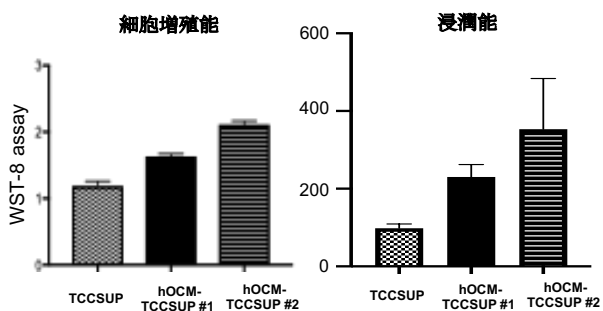


図4. OCM-TCCSUPにおける増殖能及び浸潤能

(5) ヒト膀胱尿路上皮癌における OCM の発現解析(実験 5)

筋層浸潤性膀胱癌 52 例について OCM 免疫染色を実施し、そのうち 30 例 (57.7%) で OCM 発現が認められ、筋層浸潤性膀胱がんにおいても OCM の過剰発現を確認した。

(6) OCM トランスジェニックマウスの作製(実験 6)

OCM トランスジェニックマウスの作製において、膀胱尿路上皮での OCM 過剰発現を認める系統は得られなかったが、肝臓や腎臓などの別臓器に OCM 過剰発現を認める系統が得られた。今後、肝臓や腎臓における OCM の発がん研究に有用なツールになり得ると考えられた。

以上より、OCM は尿路上皮発がんにおいて細胞増殖能、遊走能および浸潤能を制御する多彩な機能を有する分子であることが明らかになった。また、その作用機序にカルシウムシグナル伝達経路の活性化が関与することが示唆された。OCM は膀胱発がん過程の超早期から腫瘍にかけて継続して発現が増加する分子であることから、膀胱癌の超早期診断および発症予防に有用な標的分子になりうる可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yukimatsu Nao, Gi Min, Okuno Takahiro, Fujioka Masaki, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Yanagiba Yukie, Suda Megumi, Koda Shigeki, Nakatani Tatsuya, Wanibuchi Hideki	4. 巻 93
2. 論文標題 Promotion effects of acetoaceto-o-toluidide on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arch Toxicol	6. 最初と最後の頁 3617-3631
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00204-019-02605-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鰐淵英機、魏民
2. 発表標題 職業曝露による発生の要因解明と予防研究への展開
3. 学会等名 第27回がん予防学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 実 (Kato Minoru) (30711684)	大阪市立大学・大学院医学研究科・講師 (24402)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------