

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18561

研究課題名(和文) S100制御性がん - 間質クロストークがもたらす膀胱がんの進展機構の解明

研究課題名(英文) S100A11 contributes to tumor progression with cross talking between muscle invasive bladder cancer cells and fibroblasts

研究代表者

光井 洋介 (Mitsui, Yosuke)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：60803781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は膀胱がん細胞と癌関連線維芽細胞におけるクロストークががんの進展に関するメカニズムの一部を解明した。膀胱がん細胞はS100たんぱく質やHMGB1などを分泌し、線維芽細胞にはそのレセプターであるRAGEが豊富であることは過去の研究により同定されている。今回の研究により、膀胱癌と癌関連線維芽細胞の共培養におけるがん遊走能、浸潤能の亢進と、その経路をRAGE-Fc(RAGE阻害薬)によって阻害されることを見出した。これらの研究成果より癌自体を抑制するだけでなく、癌周囲の間質組織をターゲットとした治療を組み合わせることで、より有効な治療戦略の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱がんは、その周囲に存在する豊富な線維性間質を特徴としており、がん細胞とその周囲に存在するがん関連線維芽細胞との相互作用は、がんの浸潤・転移に重要な役割を持っているとされているが、その詳細は明らかではない。今回の研究により、膀胱癌と癌関連線維芽細胞の共培養におけるがん遊走能、浸潤能の亢進と、その経路をRAGE-Fc(RAGE阻害薬)によって阻害されることを見出した。これらの研究成果より癌自体を抑制するだけでなく、癌周囲の間質組織をターゲットとした治療を組み合わせることで、より有効な治療戦略の開発が期待され、RAGE-Fcは治療薬の候補としても期待できる。

研究成果の概要(英文)：Muscle invasive bladder cancer (MIBC) shows a highly aggressive features leading to poor survival. It has been shown that extracellular S100A11 provides cancer cells with increased ability for survival or mobility through receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in an autocrine manner. However, the role of the extracellular S100A11 in MIBC progression remains unclear. In the present study, we investigated the extracellular role of S100A11 in cross-talking between MIBC cells and surrounding fibroblasts in MIBC progression. An abundant S100A11 secreted from bladder cancer cells stimulated neighboring fibroblasts through receptor for RAGE upon S100A11 binding, and was followed by an enhanced cancer cell motility in vitro. These findings of this study will contribute to the establishment of a novel therapeutic antidote to MIBCs that are difficult to treat by regulating cancer-associated fibroblasts (CAFs) through targeting the identified pathway.

研究分野：膀胱がん

キーワード：膀胱がん 癌関連線維芽細胞 S100たんぱく質 RAGE

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最近の知見では、がん細胞の増殖・浸潤・転移、化学療法抵抗性にはがん細胞そのものの動態だけでなく、がん細胞を取り巻く微小環境、中でも特にがん関連線維芽細胞 (CAF: cancer-associated fibroblast) が重要である。膀胱がんでは浸潤や転移によって治療方法や予後が大きく変わるため、それらメカニズムの解明の臨床的意義は大きい。S100 たんぱく質は、ヒトでは20種あるS100 たんぱく質ファミリーに属する。種々がん細胞から分泌されオートクラインにてがん細胞の増殖を促進することが知られている。細胞外S100 たんぱく質が、がん細胞に機能するためには細胞膜受容体が必要であり、それがRAGEである。しかし、膀胱がんではS100 たんぱく質の活発な産生分泌があるものの、RAGEの発現が低くS100 たんぱく質がオートクラインで働いている事象が得られていなかった。膀胱がんにおいてS100 たんぱく質の報告は多数あるが、がん細胞とS100 たんぱく質の関連を解析したものであり、一定の見解を得られていないのが現状である。ここで我々が着目したのは膀胱がんの特性である。膀胱がんの多くは、浸潤に伴い間質が増大する。他の間質が豊富ながん種において、がんの浸潤に先立ちCAFが増殖・遊走し、がんの進展を促すことが報告されている。さらにCAFは、薬物のがん到達を制限する厄介者と認識され、近年、がん間質を効果的に抑制する手法の開発が切望されている。しかし、これが何に起因するのか、そして増大した間質のがん進展への真の深い理解が頓挫しているため、革新となりうる医療への応用が成されていない。この理由の一端が分泌S100 たんぱく質で説明がつけば、S100 たんぱく質経路を標的とした新しい膀胱がん間質制御の医療創成につながる。我々はこれまでの成果を基盤とした現研究から、上記「問い」に答えうる重要な発見を得ている。それは、間質線維芽細胞側にRAGEが発現しており、がん細胞側のS100 たんぱく質をパラクラインとして受け取ることで線維芽細胞の増殖が活発となること、そしてさらにS100-RAGE経路が膀胱がんにおける遊走・浸潤・転移に重要である可能性を見出している。

2. 研究の目的

膀胱がん細胞からのS100 たんぱく質の分泌の確認をし、膀胱がんの浸潤・遊走・転移にCAFが重要であることをin vitroの系で明らかにする。さらにRAGE細胞質領域に結合するMAP3K種の発見を基盤に線維芽細胞の増殖促進メカニズムおよびRAGE下流伝達経路を解明する。次年度はin vitroの実験を続けながら、vivo実験をメインに行う予定である。膀胱がん間質浸潤動物モデルを作製し(線維芽細胞と膀胱癌細胞のマウス皮下移植) 上記分子群の連携のがん進展における機能的役割を解明する。さらにがん関連線維芽細胞が化学療法抵抗性の獲得への機序の解明を目標とする。

3. 研究の方法

膀胱がんにおけるS100 たんぱく質の発現の報告はS100 A2, A4, A6, A7, A8, A9, A11など多数あり確認が必要である。我々は様々な種類のヒト膀胱癌細胞株(T24, UMUC-1, UMUC-3, HUC, KK47, TCC-sup, J82, RT-4)を有しており、すべての細胞株においてそれぞれのS100 たんぱく質の発現・分泌を確認する。以前の研究でスクリーニングした際にヒト膀胱癌細胞株T24でのS100A11の分泌を確認しており、良い結果が期待される。さらに我々は、金沢大学血管分子生物学教室との共同研究によりRAGE KO(ノックアウト)マウス線維芽細胞とその下流であるMyd88 KO線維芽細胞を使用でき、今回のメインターゲットであるRAGE経路の実験を速やかに遂行可能である。また、ゲノム編集技術を用いてS100 たんぱく質の過剰発現型やノックダウン膀胱癌細胞を作成予定であり、これらの細胞株を用いてボイデンチャンバーを用いたin vitro走化・浸潤の研究を行う。すでに実験の一部であるRAGEが膀胱癌細胞株の走化・浸潤能に関与するといったデータを得ており、この検討をさらに深める。我々は以前の研究から、RAGE信号伝達のアダプタータンパク質としてTIRAP/MyD88, DOCK7を見出している。さらに最近の解析からRAGE細胞質領域に結合するシグナル上流リン酸化酵素(MAPKKK)を同定することに成功した(右図:未発表)。これらアダプター、MAPKKKを糸口に線維芽細胞の増殖促進のメカニズムについて分子生物学的手法を駆使して解析する。また、マウス皮下移植腫瘍モデルを構築し腫瘍の増大(腫瘍径)、浸潤性(組織染色)に関する解析を行う。さらに血中の末梢循環腫瘍細胞(Circulating Tumor Cells: CTC)をフローサイトメトリー法によりカウントし、転移との関連を解析する。またS100 たんぱく質吸着性のRAGE-Fc製剤や抗S100 たんぱく質抗体を用いた実験を行い治療薬への応用の可能性まで検討を行う。In vitroでは前年度に行った検討をさらに深める実験を行うとともに、化学療法抵抗性の実験を行う。CAFは抗がん剤ががん到達するのを妨害し、増悪する原因の一つと考えられており、その現象と機序の解明を行う。当科では以前作製したシスプラチン抵抗性の膀胱癌株(CL7/CDDP)を保持しており使用することができる。親株との比較、CAFとの共培養、さらにシスプラチン添加後のviabilityの確認によりCAFの化学療法抵抗性への関連を解明する。

4. 研究成果

今回の研究では主に HMGB1 におけるデータを述べる。

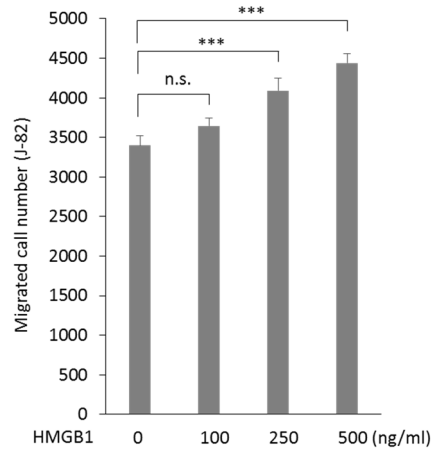
まず初めに膀胱がんの細胞株 (T24, UMUC-1, UMUC-3, TCC-sup, J82, RT-4) の上清に S100 たんぱく質や、HMGB1 が分泌されることを確認した。そして HMGB1 が膀胱がん細胞株の細胞遊走能を亢進するのを確認するために、Boyden Chamber を用いた Migration Assay にて確認した。図 1 のように、HMGB1 濃度依存性に細胞の遊走能が亢進していることが分かった。

次に、HMGB1 のレセプターである RAGE をターゲットとした実験を行った。まずは RAGE を Knock out させた線維芽細胞を 24well に接着・培養後に Migration assay を行った (図 2) このようにすることで、癌細胞と線維芽細胞の共培養における遊走能を確認することができる。線維芽細胞と共培養することで膀胱がん細胞株の遊走能は亢進し、RAGE を KO することで遊走能は抑制することが分かった。これより、膀胱がんと線維芽細胞の間には遊走能を亢進させる相互作用があり、その一端を線維芽細胞側

の RAGE が関与していると考えられた。さらに、RAGE

の重要性、HMGB1 の影響を調べるために、RAGE - Fc (HMGB1 と結合することで RAGE のインヒビターとして働く) を用いた実験を行った (図 3) 線維芽細胞と共培養することで亢進した遊走能は、RAGE-Fc によって抑制されることが分かった。これにより、遊走能の亢進には HMGB1-RAGE 経路が関与している可能性が考えられた。今後は HMGB1-RAGE 経路の下流の経路をさらに突き詰めるとともに、in Vivo による実験系での RAGE-Fc の治療薬としての可能性について考察を深める予定である。

図 1 : HMGB1 刺激による膀胱がん細胞株の遊走能の亢進 (Migration assay)



Migration assay

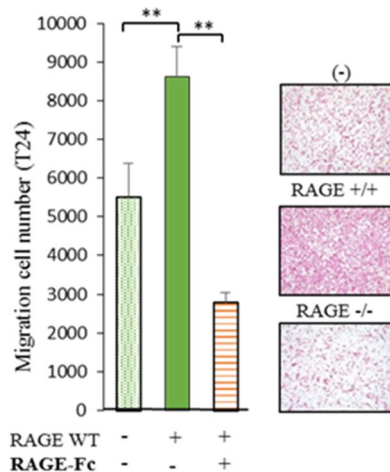
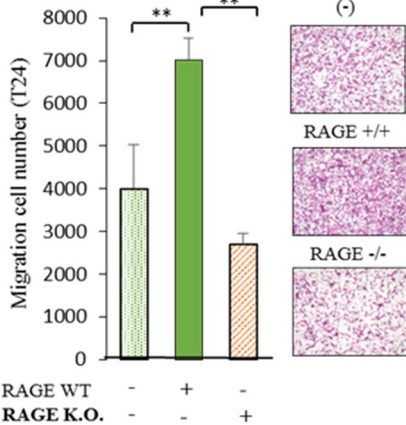
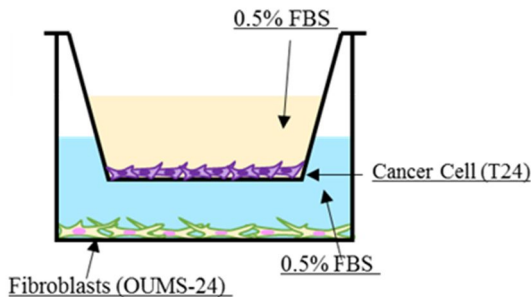


図 3 : RAGE-Fc を用いた細胞遊走 Assay

図 2 : 線維芽細胞 (RAGE WT, RAGE KO) と膀胱がん細胞株の共培養、細胞遊走 assay

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------