

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07601

研究課題名（和文）浸潤性膀胱癌における新規治療ターゲットとしての一次繊毛

研究課題名（英文）Primary cilia as a novel therapeutic target in invasive bladder cancer

研究代表者

吉田 崇（YOSHIDA, Takashi）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：00714966

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）：本研究では、浸潤性膀胱癌における新規治療ターゲットとして一次繊毛タンパク質、特にIFT88の役割を検討した。ヒトの検体を用いた免疫組織化学の結果、正常尿路上皮ではIFT88が高発現しているのに対し、異形成や尿路上皮癌では発現が低下または消失していることを確認した。また、Krt5陽性細胞特異的にIFT88を欠失させるコンディショナルノックアウトマウスを作成し、このマウスおよび野生型マウスにN-butyl-N-nitrosamineを投与して膀胱癌の増殖および浸潤速度を比較したところ、野生型マウスと比較して、IFT88欠失マウスでは膀胱癌の増殖および浸潤が促進されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで国内外の研究により乳癌、甲状腺癌、基底細胞癌、膵癌で一次繊毛と各癌進展の関連性、またそれにかかわるメカニズムの解明が試みられている(Gradilone et al. Curr DrugTargets 2018)。しかしながら、膀胱癌の進展と一次繊毛との関連を示した報告はない。本研究成果は、一次繊毛を構成するIFT88欠損が非筋層浸潤性膀胱癌が筋層浸潤性膀胱癌治療へ進行する際のトリガーになり得ることを示唆し、今後の新規治療ターゲット探索において重要な研究結果となった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the role of primary cilia protein, particularly IFT88, as a novel therapeutic target in invasive bladder cancer. Immunohistochemistry and RNA scope analyses using human samples revealed high expression of IFT88 in normal urothelium, whereas its expression was significantly reduced or lost in dysplasia and urothelial carcinoma. Attempts to establish IFT88 knockout bladder cancer cell lines using CRISPR-Cas9 were challenging. Consequently, we created conditional knockout mice with Krt5-positive cell-specific deletion of IFT88. These mice, along with wild-type counterparts, were subjected to N-butyl-N-nitrosamine administration to compare the growth and invasion rates of bladder cancer. We found that compared to wild-type mice, the loss of IFT88 accelerated the growth and invasion of bladder cancer.

研究分野：尿路上皮癌

キーワード：一次繊毛 IFT88

1. 研究開始当初の背景

筋層浸潤性膀胱癌は、根治的膀胱全摘除術後の再発および転移率が 50%以上と非常に高く、術前化学療法を追加しても予後改善率は約 5%に留まる。転移性・再発性膀胱癌では、白金製剤ベースの抗腫瘍薬を用いても 5 年生存率は 10%未満と極めて低く、新規薬剤である抗 PD-1 抗体薬の奏効率も約 30%に留まる。したがって、新規治療ターゲットの同定と早期臨床応用が重要である。

癌の増殖・進展のメカニズム解明は治療において重要である。ヘッジホッグ(Hedgehog, HH) シグナル経路は胚発生段階での分化や増殖に重要な役割を持ち、膵臓癌など多くの癌種で異常亢進が確認されている。膀胱癌でも、浸潤性膀胱癌組織でソニックヘッジホッグ(Sonic Hedgehog, SHH) およびそのエフェクター-GLI1 が増加し、これが癌の進展に関与していることが報告されている。SHH をノックダウンすると GLI1 発現が低下し、癌の増殖・進展が抑制される。

一次繊毛は細胞表面から伸びる特殊な細胞小器官で、HH シグナルを含む様々なシグナル伝達に関与する。一次繊毛は胚発生期の HH シグナル伝達の場合であり、発生・分化・極性に重要な役割を持つ。一次繊毛の有無が癌の進展や抑制に関与する可能性が示唆されており、近年多くの研究が行われている。HH シグナル経路の異常およびそれを介する一次繊毛の有無が腫瘍形成に影響を与えることが報告されている。膀胱癌における一次繊毛の役割は未解明であるが、新規ターゲットとなる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

申請者らは「浸潤性膀胱癌の進展の制御メディエーターとして一次繊毛を介した HH シグナル経路が関わっているか?」、さらにそれを踏まえ「一次繊毛の有無が浸潤性膀胱癌の新規治療ターゲットとなり得るか?」という仮説(問い)に対して探索した。

一次繊毛の構造は、主に鞭毛内輸送(intraflagellar transport: IFT) 構成タンパク群によって形成・維持されており、IFT は IFT-A 複合体(IFT-43, -121, -122, -139, -140, -144, Tulp3) と IFT-B 複合体(IFT-20, -22, -25, -27, -38, -46, -52, -54, -57, -70, -74, -80, -81, -88, -172) に分けられる。申請者らは、事前検討として、膀胱癌と IFT の関連性を調べるため、ヒト浸潤性膀胱癌細胞株である T24 細胞と 5637 細胞を用いて、IFT 構成タンパクの mRNA 発現を PCR にて網羅的に解析した。その結果、両膀胱癌細胞株において IFT88 の発現が確認できなかった。さらに、正常組織および膀胱癌の total RNA を用いて IFT88 について PCR を行ったところ、正常組織では IFT88 の発現が確認された一方で、癌組織では発現が確認できなかった。

このことから、IFT88 の欠損が一次繊毛の消失や形成不全を引き起こし、癌の進展に寄与する可能性が示唆された。

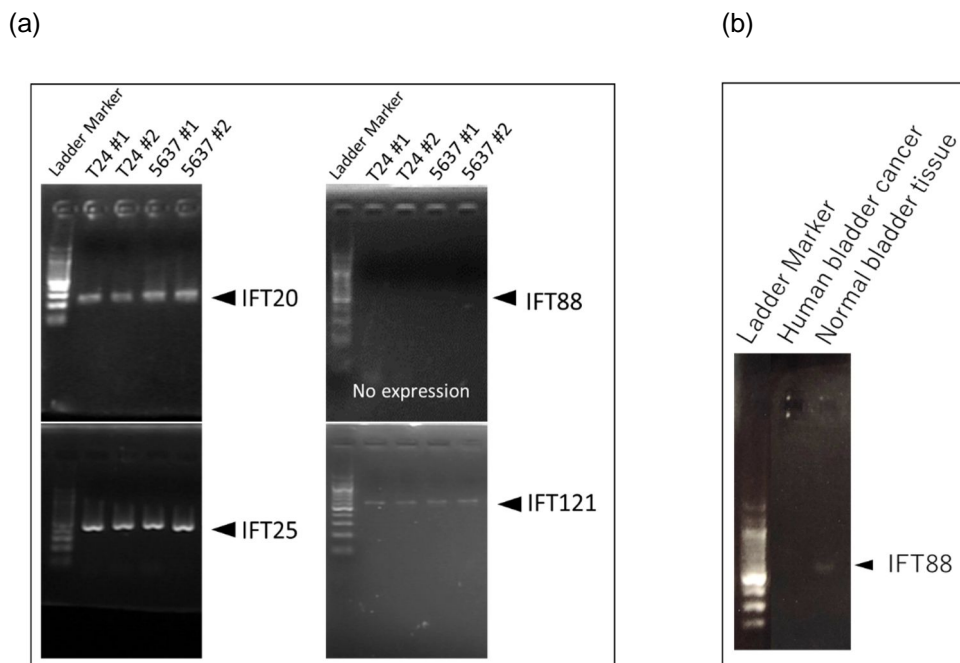


図 1. (a)ヒト膀胱癌細胞株および(b)ヒト膀胱正常/膀胱癌組織と IFT 発現

3. 研究の方法

(1) ヒト組織切片を用いた IFT88 発現の検討

全症例の手術標本から作成した組織マイクロアレイを用いて、IFT88 の免疫染色および RNAscope を行い、組織学的形態との関連性を検討する。

(2) Krt5 特異的 IFT88 遺伝子欠損マウスでの検討

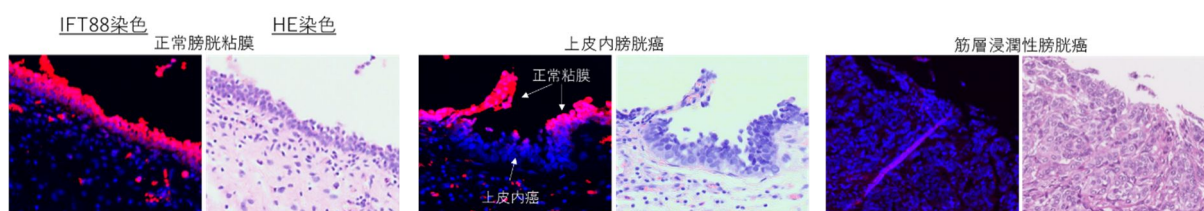
IFT88 fl/fl マウスと Krt5-iCre/ERT2 遺伝子改変マウス(The Jackson Laboratory)を交配させ、Krt5-iCre/ERT2/IFT88 マウスを作成する。タモキシフェンを腹腔内投与し、Cre recombinase を活性化させ、尿路上皮特異的に IFT88 を欠損させる。その後、以下の観察および解析を行う。

(i) 膀胱組織の肉眼的および組織学的変化の観察、(ii) 免疫染色法による関連する分子の局在の検討、(iii) ウェスタンブロット法と ELISA 法を用いた関連分子の定量。また、膀胱癌発癌物質である N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine 投与後の変化についても検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト組織切片を用いた IFT88 発現の検討

ヒトの検体を用いた免疫組織化学 (IHC) および RNA スコープを通じて、IFT88 の発現を確認したところ、正常尿路上皮では高発現しているのに対し、異形成や尿路上皮癌では明らかに低下または消失していることが確認された。この結果から、IFT88 が尿路上皮癌と正常との鑑別診断マーカーになりうることも示唆された。



(2) Krt5 特異的 IFT88 遺伝子欠損マウスでの検討

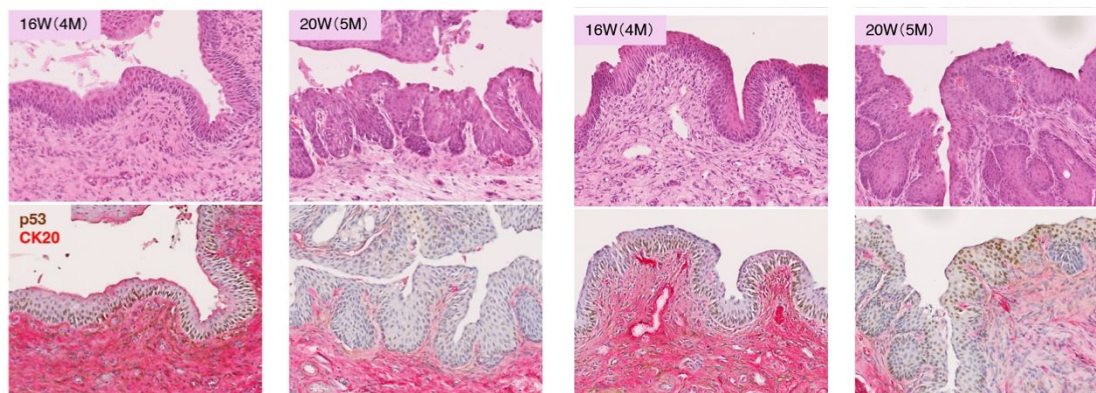
コロナ禍の影響で実験動物の施設への新規導入が制限されたため、令和 2 年度には動物実験が実施できなかった。そのため、ヒト膀胱癌細胞株 (T24, 5637, RT4, RT112) を用いて IFT88KO 膀胱癌細胞株の樹立を試みたが、CRISPR-Cas9 を用いた IFT88KO では細胞株の生存が保たず、樹立には至らなかった。IFT88 が有糸分裂に関与することが知られており、KO による機能喪失が原因と考えられた。

令和 3 年度より、IFT88 fl/fl マウスと Krt5-iCre/ERT2 遺伝子改変マウスを交配させ、Krt5-iCre/ERT2/IFT88 マウスを作成した。タモキシフェンを腹腔内投与して Cre recombinase を活性化し、尿路上皮特異的に IFT88 を欠失させた。しかし、Krt5 陽性細胞特異的に IFT88 を欠失させたマウスでは、特に癌化は認められなかった。

そこで、N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) を用いて膀胱癌を誘導したところ、BBN 投与 5 ヶ月以降、IFT88 欠損マウスの膀胱上皮では筋層浸潤性膀胱癌が顕著に認められた。また、免疫染色で p53 陽性細胞が IFT88 欠損マウスで増加していた。従って、IFT88 欠損が癌化を促進することが示された。

野生型マウス+ BBN

Krt5-iCre/ERT2 遺伝子改変マウス+BBN



5. 今後の展望

今後、マウス膀胱癌サンプルから RNA を抽出し、RT-qPCR 法を用いて IFT88 および癌化に関連する標的分子の発現解析をさらに行う予定である。将来的な、尿路上皮癌に対する新規治療ターゲットの解明に繋がると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Yoshida Takashi, Ohe Chisato, Ito Katsuhiko, Takada Hideaki, Saito Ryoichi, Kita Yuki, Sano Takeshi, Tsuta Koji, Kinoshita Hidefumi, Kitamura Hiroshi, Nishiyama Hiroyuki, Kobayashi Takashi, On behalf of the Japan Urological Oncology Group | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 Clinical and molecular correlates of response to immune checkpoint blockade in urothelial carcinoma with liver metastasis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy | 6. 最初と最後の頁 2815 ~ 2828 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-022-03204-6 | 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Takashi Yoshida , Chisato Ohe , Junichi Ikeda , Naho Atsumi , Ryoichi Saito , Hisanori Taniguchi , Haruyuki Ohsugi , Motohiko Sugi , Koji Tsuta , Tadashi Matsuda , Hidefumi Kinoshita | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Integration of NRP1, RGS5, and FOXM1 expression, and tumour necrosis, as a postoperative prognostic classifier based on molecular subtypes of clear cell renal cell carcinoma | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J Pathol Clin Res | 6. 最初と最後の頁 590-603 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cjp2.232 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Yoshida T, Ohe C, Ikeda J, Atsumi N, Ohsugi H, Sugi M, Higasa K, Saito R, Tsuta K, Matsuda T, Kinoshita H. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Eosinophilic features in clear cell renal cell carcinoma correlate with outcomes of immune checkpoint and angiogenesis blockade | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J Immunother Cancer . | 6. 最初と最後の頁 e002922 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2021-002922 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Ikeda J, Ohe C, Yoshida T, Kuroda N, Saito R, Kinoshita H, Tsuta K, Matsuda T. | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 Comprehensive pathological assessment of histological subtypes, molecular subtypes based on immunohistochemistry, and tumor-associated immune cell status in muscle-invasive bladder cancer | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Pathol Int . | 6. 最初と最後の頁 173-182 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13060 | 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 該当する |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Takashi Yoshida, Takashi Murota, Tomoaki Matsuzaki, Kazuyoshi Nakao, Chisato Ohe, Tadashi Matsuda, and Hidefumi Kinoshita | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Photodynamic Diagnosis-guided Dual Laser Ablation for Upper Urinary Tract Carcinoma: Preoperative Preparation, Surgical Technique, and Clinical Outcomes | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 European Urology Open Science | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|--|---------------------|--------------------|
| 産業財産権の名称 尿路系上皮腫瘍関連病変を検出するためのバイオマーカー | 発明者 吉田崇、田中進、大江知里 | 権利者 学校法人 関西医科大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-114309 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔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 | 田中 進 (TANAKA Susumu) (30399472) | 長崎県立大学・看護栄養学部・教授 (34417) | |
| 研究分担者 | 大江 知里 (OHE Chisato) (40469242) | 大阪公立大学・医学部・准教授 (34417) | |

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 |
|---------|---------|