

令和 6 年 9 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18134

研究課題名(和文)膀胱癌における癌遺伝子TRIM44の臨床的意義および作用機序の解明

研究課題名(英文)Clinical significance and related-mechanisms of TRIM44 in bladder cancer

研究代表者

山田 雄太 (Yamada, Yuta)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10376452

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)：膀胱癌において、TRIM44の免疫学的染色実験をおこなったところ、悪性度の高い癌で強発現しており予後不良とも関連を認めた。また、膀胱癌細胞株を用いた細胞実験においては、gain of function実験とloss-of-function実験を行った。gain-of-function実験では、TRIM44は、膀胱癌細胞株において癌細胞の増殖を促進する方向に作用し、loss of functionでは細胞増殖を抑制する方向に作用することがわかった。また、遊走能を調べたmigration assayでもTRIM44は細胞遊走能を促進していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TRIM44はもともと頭頸部癌、胃癌、大腸癌、乳癌、膵癌、子宮頸がん、肺がん、前立腺癌、腎癌など10種類以上の癌種で癌細胞の増殖を促進する方向に働き癌遺伝子と考えられている。今回、膀胱癌においても免疫学的染色や膀胱癌細胞株を用いた機能実験の結果からTRIM44は癌を促進する作用があることがわかった。TRIM44を治療標的とした化合物が同的できれば治療ターゲットとなり得ることが分かり膀胱癌に対する新規治療薬となる可能性が考えられた。また、TRIM44蛋白は今回血中で同定することができなかった、今後、血清から同定できる手法が確立されれば膀胱癌の病勢を反映するバイオマーカーとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Tripartite motif 44 is a previously known oncogenic signal that is associated in head/neck cancer, gastric cancer, pancreatic cancer, breast cancer, colon cancer, cervical cancer, prostate cancer, kidney cancer, and more. We identified Tripartite motif protein (TRIM) 44 as a prognostic factor of bladder cancer based on the immunohistochemical studies. We used bladder cancer cell lines and performed gain-of-function and loss-of-function studies to investigate the function of TRIM44. We performed MTS assay to investigate the relationship of TRIM44 and cell proliferation and found that TRIM44 facilitated tumor growth of bladder cancer cells both in gain-of-function and loss-of-function studies. Migration assay was also performed and TRIM44 promoted migration in bladder cancer cells.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：膀胱癌 trim44

1. 研究開始当初の背景

近年、膀胱癌において免疫チェックポイント阻害剤や新規レジメンによる化学療法が開発されたことにより少しずつ生存率はあがってきてはいるものの、転移性膀胱癌や進行膀胱癌の予後はわるく5年生存率は一般的に筋層浸潤癌で40-50%、リンパ節転移症例で30-40%以下である。

Tripartite motif protein (TRIM)は、ring finger ドメイン、B-box ドメイン、coiled-coil ドメインの3つの構造が特徴的なタンパクである。TRIM 蛋白は、ユビキチン経路に関与し、ring finger ドメインが E3 ligase の役割を果たすため、タンパクの degradation に関わる。

TRIM 蛋白は約80種類ほど同定されており、神経疾患、免疫疾患、感染症、悪性腫瘍などの領域でユビキチン経路を介した作用機序が多数報告されている。その中でも TRIM44 は、悪性腫瘍において癌を促進する方法に働く遺伝子として胃癌、食道癌、頭頸部癌、膵癌、大腸癌、乳癌、腎癌、子宮頸癌、など複数の癌種で関与していることが分かっている。我々は、既に腎癌において TRIM44 が FRK という癌抑制遺伝子を抑制することで腎癌の癌細胞増殖や遊走能を促進することを見出し英文論文として報告している (Yamada Y, Cancer Sci 2020;111(3):881-890)。TRIM44 が膀胱癌においても癌を促進する方向に働くことが予想されるため本研究で調べることを着想した。

2. 研究の目的

膀胱癌における TRIM44 の発現と臨床的意義、そしてその機能に関して調査することを目的とした。

3. 研究の方法

膀胱癌における TRIM44 の免疫学的染色実験を行い予後との関連を調べる。年齢、術前臨床病期(cTNM 分類)、病理学的病期(pTNM 分類)、病理学的所見(腫瘍のサイズ、癌細胞の grade)などの臨床病理学的パラメータを調査する。

機能実験

膀胱癌細胞株である T24, 5637, UMUC3 を用いる。膀胱癌の細胞株における gain of function と loss of function を実験する。

Gain of function 実験では、flag と neo 遺伝子を挿入した TRIM44 プラスミドベクターを用いて stable T24 を作製する。この TRIM44 プラスミドベクターを膀胱癌細胞株に transfection し G418 にてセレクションを行うことで TRIM44 安定細胞株を作製する。TRIM44 安定細胞株を樹立できない場合には、transfection 試薬を用いて T24 細胞に transient な TRIM44 の overexpression を行う。細胞増殖実験としては、MTS assay を行い、細胞遊走能実験としては、migration assay を施行する。

Loss-of-function 実験では、膀胱癌細胞株に siTRIM44 をトランスフェクシ

ンさせることで TRIM44 knockdown を行う。同様に細胞増殖能の判定に MTS assay, 細胞遊走能の解析に migration assay を用いる。

血中の TRIM44 の蛋白の測定 (ELISA と質量分析計)

ELISA(サンドイッチ法)による血中 TRIM44 蛋白の測定も行う。捕捉抗体としては、マウスモノクローナル抗体である市販の抗 TRIM44 抗体を使用する予定である。アブカム社[OTI1E10](ab236422)あるいはコスモ・バイオ社#66249-1-Ig1)を使用する。検出用抗体としては、ラビットのポリクローナル抗体である抗 TRIM44 抗体をすでに作製済みである。同抗体は、精巣癌や腎癌における免疫学的染色や Western blotting などの実験手法で用いており同抗体を使用することに関して申請者は扱い慣れている(図 4; Yamada Y et al., *Cancer Sci* 2017, *Cancer Sci* 2020)。ELISA は、キャプチャー抗体の希釈液を 96 ウェルプレートの各ウェルに加えて、シーリング後にキャプチャー抗体の固相化を行う。ブロッキング 検出用抗体希釈液の添加 酵素標識二次抗体希釈液の添加 基質溶液の添加 発色程度の評価の順に実験をすすめる。ELISA プレートリーダーにて吸光度(波長 450nm)を測定する。

ELISA で TRIM44 を同定できない場合は、質量分析計を用いて測定を試みる。Orbitrap Fusion Lumos 質量分析計を用いて血清中の TRIM44 の高感度測定を行う。患者血清から抽出したタンパク質に対して、In gel digest 法によるトリプシン消化を行う。TRIM44 の消化断片を標的としたパラレル反応モニタリング(PRM)を行い、atto mol レベルでの TRIM44 の検出を行い定量化する。

4 . 研究成果

膀胱癌において、TRIM44 の免疫学的染色実験をおこなったところ、悪性度の高い癌で強発現しており予後不良とも関連を認めた。

また、細胞実験においては、Gain of function 実験では、neo を挿入した TRIM44 ベクターを用いて stable T24 を作成しようとしたが、複数の条件下においても癌細胞株は成長せず、作成が困難であったため、T24 細胞に transient な TRIM44 の overexpression を行った。TRIM44 の overexpression は qRT-PCR にて mRNA 発現量から確認した。

MTS assay において、膀胱癌細胞株において TRIM44 overexpression は、細胞増殖を促進する方向に作用した。また、Migration assay においても、TRIM44 は、膀胱癌の細胞遊走能を促進する作用を認めた。

loss of function では、siTRIM44 により knockdown されていることを qRT-PCR にて mRNA 発現量を確認した。TRIM44 knockdown は、膀胱癌細胞株において細胞増殖を抑制する方向に作用することがわかった。また、遊走能を調べた migration assay でも TRIM44 は細胞遊走能を促進していた。

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