

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18137

研究課題名（和文）生体二光子励起イメージングによる膀胱癌および腫瘍微小環境の時空間的解析

研究課題名（英文）Spatio-temporal analysis of bladder cancer and tumor microenvironment by two-photon excitation imaging in vivo

研究代表者

佐野 剛視（SANO, Takeshi）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60866309

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）：二光子顕微鏡を用いた生体イメージングにより、マウス膀胱癌細胞株(MB49)を膀胱注入することで、尿路上皮集団運動(uCCM)が生じることを発見した。uCCMは、src阻害剤dasatinibの経静脈・経口投与、FAK阻害剤PF-573228の経静脈投与によりほぼ停止し、src/FAKシグナル経路に依存していると考えられた。Dasatinibの連日経口投与によりMB49の膀胱注入モデルでは腫瘍の増大が有意に促進された一方、皮下移植モデルでは腫瘍増大がやや抑制された。このことから、uCCMの抑制が腫瘍の増大を来す、つまりuCCMが癌細胞の尿路上皮生着を抑制する防御機構であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞から分泌される物質、あるいは癌細胞に反応して尿路上皮から分泌される物質により尿路上皮が集団運動し、癌細胞から膀胱を守るための防御機構として働くと考えられた。膀胱癌は経尿道的切除術の後にしばしば膀胱内に播種再発する。MB49による同所性膀胱癌マウスモデルは、膀胱内播種再発を模したモデルとされており、本研究の結果は、集団運動を誘導する物質を同定し、防御機構を強化することができれば、経尿道的切除術後の播種再発を予防できる可能性を示唆すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Intravital imaging of the mouse bladder with two-photon excitation microscopy found that intravesical instillation of mouse bladder cancer cell line (MB49) induced urothelial collective cell migration (uCCM). The src inhibitor dasatinib (i.v. and p.o.) and the FAK inhibitor PF-573228 (i.v.) almost stopped the uCCM, which fact suggested that the uCCM was dependent on the src/FAK signaling pathway. Surprisingly, the inhibition of uCCM by daily oral administration of dasatinib significantly enhanced orthotopic MB49 bladder tumor development, despite dasatinib inhibiting cell growth in certain types of malignancies. Subcutaneous injection of MB49 resulted in a slight decrease in tumor growth with daily oral administration of dasatinib, suggesting that the uCCM functions as a defense mechanism against bladder tumor development.

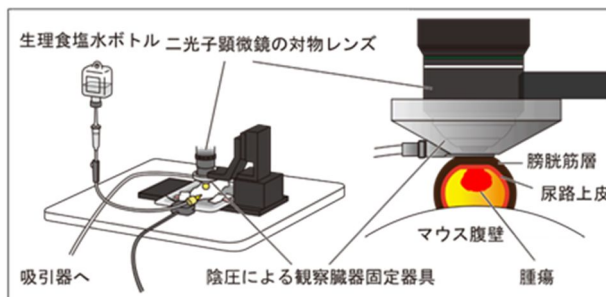
研究分野：膀胱癌

キーワード：膀胱癌 生体イメージング 二光子顕微鏡

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

二光子顕微鏡は組織深部の観察に適しており、「生きた動物を顕微鏡レベルの解像度でリアルタイムに観察する生体イメージング」に汎用されるが、膀胱などの管腔臓器の場合、臓器の外側から、平滑筋層の深部にある上皮や癌組織を観察する必要があり、また観察臓器を長時間対物レンズに対して固定しなければならず、技術的に困難であった。本研究責任者は点滴ボトルを接続した尿道カテーテルを膀胱内に留置し、点滴ボトルの高さによって膀胱壁を適度に伸展させることで壁厚を調節することと、膀胱を軽度の陰圧で吸い付ける固定器具を用いることでこれらの問題を克服し、生体イメージングを膀胱癌研究に応用する実験系を確立していた(右図)。



### 2. 研究の目的

本研究の目的は、従前の実験法では成し得なかった、『膀胱癌の発生・生着や進展の過程、膀胱癌組織と腫瘍微小環境との相互作用、および抗腫瘍薬に対する「膀胱癌組織と周囲環境を含めた空間」の反応の時空間的な可視化』により、新たな知見や治療戦略をメカニズム的に解明可能な実験系を構築することである。この実験系を土台に、適切な膀胱癌モデルマウスを用い、癌の発生・生着や進展のタイムラインに合わせて適切なタイミングで適切な部位を、長時間安定して生体イメージングする方法を確立することで、膀胱癌に応用し、膀胱癌と腫瘍微小環境を含めた時空間的な解析を行うことを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 同所性膀胱癌マウスモデルの構築

ERK 活性をモニターする FRET バイオセンサーを発現させた遺伝子改変マウスに、レンチウイルスを用いた遺伝子導入法で蛍光タンパク mScarlet を発現させたマウス膀胱癌株化細胞(MB49)を膀胱注入し、二光子顕微鏡でイメージング可能な同所性膀胱癌マウスモデルを構築する。

上述の膀胱癌モデルマウスで膀胱癌の生着・進展を生体イメージングし、膀胱癌の生体イメージング法を確立する。観察のタイミングを最適化し、6時間以上の長時間タイムラプスで、癌組織(mScarlet 陽性)や周囲組織における ERK 活性を細胞ごとに測定し、それを定量解析する。腫瘍の生着・進展において癌組織および周囲組織の ERK が変化する法則を記述できることをエンドポイントとする。MetaMorph や Imaris といったイメージングソフトウェアを用いて、癌組織と周囲環境の区別、FRET による分子メカニズムの定量・解析、細胞形態や細胞運動の評価・解析などを行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 同所性膀胱癌マウスモデルの作成

上述の方法で同所性膀胱癌マウスモデルを構築し、二光子顕微鏡で膀胱を安定的に長時間生体イメージングすることが可能となった。

#### (2) 二光子顕微鏡による生体イメージング

##### 尿路上皮の集団運動の発見

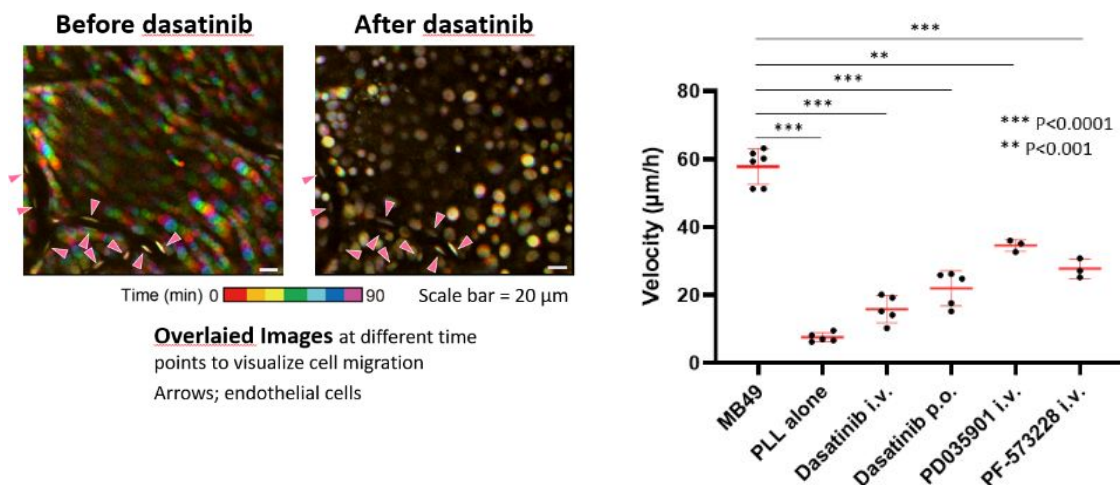
poly-L-lysine を膀胱内に注入する前処理をしてから MB49 を膀胱注入した同所性膀胱癌マウスモデルを観察したところ、全例で膀胱中の尿路上皮が集団運動することを発見した。Poly-L-lysine による前処理のみを行ったマウスの膀胱では、集団運動は観察されなかった。

##### 尿路上皮の集団運動を惹起する物質の探索

MB49 を膀胱注入し集団運動が誘導されているマウス尿を、細胞成分をフィルターで除去したうえで、他のマウスの膀胱に注入すると集団運動が誘導されるが、コントロールマウスの尿を注入しても集団運動は誘導されなかった。よって、尿中に集団運動を惹起する物質が含まれることが示唆された。

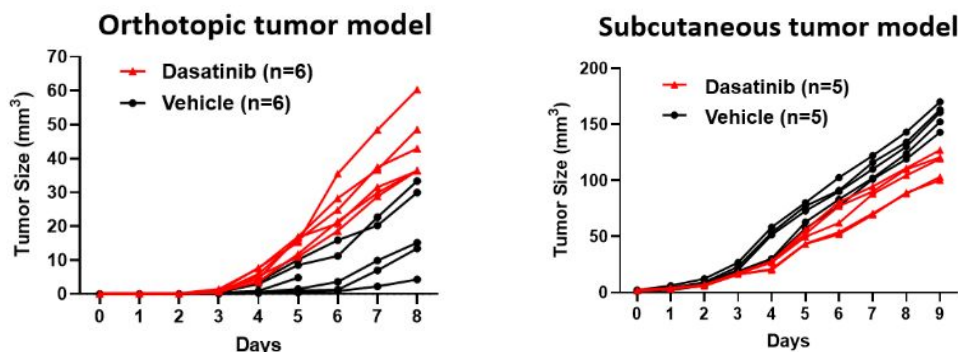
### 尿路上皮の集団運動のメカニズムの解明

Src 阻害剤である dasatinib の経静脈投与や経口投与、focal adhesion kinase (FAK) 阻害剤である PF-573228 の経静脈投与により集団運動がほぼ停止することが判明し、MB49 により惹起される尿路上皮の集団運動は src/FAK シグナル経路に依存していることが示唆された。



### 尿路上皮の集団運動の意義

Poly-L-lysine による前処理後、MB49 をマウス膀胱に注入し、同時に dasatinib の内服を連日行うと、コントロール群と比較して腫瘍の増大速度が著明に上昇した。一方で、MB49 を皮下接種する異所性膀胱癌モデルでは、dasatinib を投与するとコントロール群より腫瘍の増大速度がわずかに減少した。これらのことから、尿路上皮の集団運動を止めることが腫瘍増大に関連している可能性が高いと考えられた。以上のことから、癌細胞から分泌される物質、もしくは癌細胞に応答して尿路上皮から分泌される物質により尿路上皮が集団運動し、それが癌細胞から膀胱を守るための防御機構として働いていると考えられた。



### 今後の展望

筋層非浸潤膀胱尿路上皮癌は、経尿道的膀胱腫瘍切除術のあとにしばしば膀胱内に播種再発する。MB49 による同所性膀胱癌マウスモデルは、膀胱内播種再発を模したモデルとされており、本研究の結果は、集団運動を誘導する物質を同定し、防御機構を強化することができれば、経尿道的膀胱腫瘍切除術後の播種再発を予防できる可能性を示唆すると考えられる。上述のとおり MB49 を投与した膀胱の尿中に集団運動を誘導する物質が含まれていることが分かっており、現在同定を目指して研究を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 張 寧
2. 発表標題 A newly discovered collective migration of urothelial cells: A potential defense mechanism against bladder cancer development
3. 学会等名 2023 AUA annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐野 剛視
2. 発表標題 新規に同定された尿路上皮集団運動の防御機構としての意義
3. 学会等名 第110回泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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