

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390442

研究課題名（和文） 泌尿器癌における癌・間質細胞相互作用—Stromal Therapy をめざして

研究課題名（英文） The interaction of cancer cell and stromal cell in urinary cancer

—The approach of stromal therapy—

研究代表者

金山 博臣 (KANAYAMA HIRO-OMI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：10214446

研究成果の概要（和文）：

膀胱がん細胞株 5637 に HGF を添加の有無で、マイクロアレイを行い、遺伝子の変化を検討し、2-fold 以上の変化を認めた 26 分子（3down-regulation、23up-regulation）のうち Toll like receptor 4 (TLR4) とその下流にあると考えられる Matrix metalloproteases (MMP-1、MMP-10) に着目し検討したところ、HGF による作用が TLR4-NF $\kappa$ B の経路を介して、MMP の活性を増強させ、浸潤能の増強を誘導している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In Micro array assay, we made a comparative study on bladder cancer cell line 5637 treated with or without hepatocyte growth factor (HGF), focusing attention on toll like receptor 4 (TLR4), Matrix metalloproteases-1 (MMP-1) and MMP-10 of 26 molecule, more than 2-fold change (3down-regulation, 23up-regulation). We also assessed the TLR4, MMP-1 and MMP-10 involvement in the invasion and proliferation of bladder cancer.

TLR4, MMP-1 and MMP-10 mRNA levels in invasive bladder cancer cells treated with HGF were dose-dependently elevated in real-time PCR. The escalation of MMP-1 and MMP-10 activity was inhibited by knockdown of TLR4 in 5637 cells treated with HGF.

In conclusion, we speculate that the effect of HGF lead to enhance the ability of invasiveness by escalating the activity of MMP through the signal of TLR4-NF $\kappa$ B.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍学・癌・間質細胞相互作用・HGF・Stromal Therapy

## 1. 研究開始当初の背景

HGF / MET シグナル経路は、臓器の再生や保護を担う生理活性物質である一方、癌細胞の増殖、遊走、浸潤、転移、血管新生などに関連するとされている。細胞-細胞外マトリックスとの相互作用の制御や上皮間質移行にも関わっている。

## 2. 研究の目的

膀胱がん細胞株 5637 に HGF の添加の有無で、マイクロアレイを行い、遺伝子の変化を検討し、2-fold 以上の変化を 26 分子で認めた。TLR4, MMP1, MMP10 に着目した。HGF は MMPs の転写レベルを増強させることにより MMPs の機能を調整する重要な役割を担っているとされているが、詳細は明らかでない。

HGF/MET シグナルが TLR4/NF- $\kappa$ B を介して MMP の機能活性を調節しているかを検討した。

## 3. 研究の方法

HGF による膀胱がん浸潤能、増殖能亢進に関わる分子を検討するためにマイクロアレイを行った。リアルタイム PCR にて mRNA レベル、ウエスタンブロットにてタンパクレベルにおいて、発現を確認した。MMP 活性測定キットを用い、MMP の活性の変化を確認した。si-RNA TLR4 を用い、TLR4 をノックダウンし、抑制効果があるかどうか確認した。

## 4. 研究成果

膀胱がん細胞株 5637 に HGF の添加の有無でマイクロアレイにて比較検討を行い、コントロール群と比べ、HGF 添加群で 2-fold 以上の変化を認めた 26 分子のうち、toll like receptor 4 (TLR4) とその下流にあると考えられる、Matrix metalloproteases

(MMP-1, MMP-10) に着目した。

(1)リアルタイム PCR を用いて、マイクロアレイの結果の再検証を行い、同様の結果が得られた。

(2)ウエスタンブロットにて、HGF の添加により、TLR4 と NF  $\kappa$  B の発現が増強すること、TLR4 のノックダウンで NF  $\kappa$  B の発現が抑制され、HGF での増強効果も抑制された。

(3)MMP に関しては、MMP 活性測定キットを用いて、HGF の添加により、MMP-1、MMP-10 の活性の増強が認められ、TLR4 のノックダウンで MMP-1、MMP-10 の活性は抑制され、MMP-1 では HGF での増強効果も有意に抑制された。

(4)Matrigel invasion assay にて、TLR4、MMP-1、MMP-10 のノックダウンにて、浸潤能は抑制され、また HGF での浸潤能増強効果も抑制された。

HGF による作用が、TLR4-NF  $\kappa$  B の経路を介して、MMP の活性を増強させ、浸潤能の増強を誘導している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① A Shiirevnyamba, T Takahashi, H Shan, H Ogawa, S Yano, H Kanayama, K Izumi, H Uehara Enhancement of osteoclastgenic activity in osteolytic prostate cancer cells by physical contact with osteoblasts British Journal of Cancer (査読有) 104, 2011, 505-513  
DOI:10.1038/sj.bjc.6606070

②Sakaki S, Fukumori T, Fukawa T, Essam Elsamman, A Shiirevnyamba, Nakatsuji H, Kanayama H Clinical significance of Galectin-3 in clear cell renal cell carcinoma

The Journal of Medical Investigation (査読有) 57・1,2、2010、152-157

[http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol57/pdf/v57\\_n1-2\\_p152.pdf](http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol57/pdf/v57_n1-2_p152.pdf)

③Koizumi T, Nakatsuji H, Fukawa T, Shiirevnyamba A, Fukumori T, Takahashi M, Kanayama H The Role of Actinin-4 in Bladder Cancer Invasion The Role of Actinin-4 in Bladder Cancer Invasion UROLOGY、(査読有) 75、2010、357-364

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969329>

④Nakanishi R, Oka N, Nakatsuji H, Koizumi T, Sakaki M, Takahashi M, Fukumori T, Kanayama H Effect of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor Inhibitor on Proliferation and Invasion in Bladder Cancer. Urologia Internationalis (査読有) 83、2009、98-106

DOI: 10.1159/000224877

[学会発表] (計 15 件)

①Nakatsuji H, The role of Actinin-4 in Bladder Cancer Metastasis、SIU、2011.10.17、ICC BERLIN (ドイツベルリン)

②中達 弘能、The involvement of TLR4 on the increase of invasion and proliferation ability in bladder cancer treated 日本癌学会学術総会、2011.10.4、名古屋コンgresセンター (名古屋市)

③ 布川 朋也、Identification and characterization of RCCDH as a novel molecular target for clear renal cell carcinoma. 日本癌学会学術総会、2011.10.3、名古屋コンgresセンター (名古屋市)

④ SAvilmed、Enhancement of osteoclastogenic activity in osteolytic prostate cancer cells by physical contact with osteoblasts、AUA、2011.5.17、Washington Convention center (アメリカワシントン)

⑤ アビルメド・シーレンヤンバ、Participation of N-caderin in bladder cancer 日本泌尿器科学会総会、2011.4.24、名古屋国際会議場(名古屋市)

⑥中達弘能、HGFによる膀胱がん浸潤亢進における Toll like receptor 4 (TLR4) の関与 日本泌尿器科学会総会、2011.4.23、名古屋国際会議場(名古屋市)

⑦布川朋也、ゲノム情報解析による腎細胞癌標的治療分子の同定およびその機能解析 日本泌尿器科学会総会、2011.4.22、名古屋国際会議場(名古屋市)

⑧S Avirmed、MicroRNAs are reproducibly deregulated in prostate carcinoma and are potential regulators of signal transduction pathways like PI3-kinase or MAP-kinase pathways、EAU、2011.3.20、Austria Centre Vienna (ACV)

⑨ アビルメド・シーレンヤンバ、Participation of N-cadherin in bladder Cancer 泌尿器科分子・細胞研究会、

2011. 3. 12、ホテルグリーンパーク津(津市)

⑩ 布川 朋也、Identification and characterization of RCCMP as a novel molecular target for clear cell-renal cell  
日本泌尿器科学会西日本総会、2010. 11. 6、  
鹿児島県民交流センター(鹿児島市)

⑪ 中達 弘能、The Involvement of Actinin-4 in Bladder cancer Metastasi 日本癌学会学術  
総会、2009. 10. 3、パシフィコ横浜(横浜市)

⑫ アビルメド・シーレンヤンバ、Change of gene expressions of prostate cancer cells by direct contact with osteoblasts 日本  
癌学会学術総会、2009. 10. 3、パシフィコ横浜  
(横浜市)

⑬ Yamaguchi K, Amelioration of Acute Tubular Necrosis in Ischemic Acute Renal Failure was Impaired in Mice Lacking Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  Gene, WCN, 2009. 5. 23、  
(Mirano)

⑭ 小泉 貴裕、膀胱癌の浸潤・増殖に対する Actinin-4の生物学的機能の検討 日本泌尿  
器科学会総会、2009. 4. 18、岡山コンベンシ  
ョンセンター(岡山市)

⑮ 山口 邦久、腎虚血一再灌流障害に対する Hif-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ) が  
与える影響に関する検討 日本泌尿器科学会  
総会、2009. 4. 16、岡山コンベンションセンタ  
ー(岡山市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金山 博臣 (KANAYAMA HIRO-OMI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号：10214446

### (2) 研究分担者

高橋 正幸 (TAKAHASHI MASAYUKI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・講師  
研究者番号：50325255

福森 知治 (FUKUMORI TOMOHARU)  
徳島大学・病院・講師  
研究者番号：10314874

中達 弘能 (NAKATSUJI HIROYOSHI)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号：50437638

### (3) 連携研究者

(無)