

機関番号：24601

研究種目：若手研究B

研究期間：平成21～22年度

課題番号：21790392

研究課題名（和文）膀胱癌における新規AlkBホモログ蛋白hABH-8の解析

研究課題名（英文）The role of human ABH-8 in urothelial carcinoma

研究代表者

島田 啓司 (SHIMADA KEIJI)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90336850

研究成果の概要（和文）：新規DNA修復遺伝子であるhABH-8は、活性酸素種の産生促進を介してヒト膀胱尿路上皮癌細胞の生存を高め、癌の病理組織学的悪性度を決定することを見だし、特に進行膀胱癌に対する臨床治療上の新しい標的分子になる可能性を確認した。

研究成果の概要（英文）：We found for the first time that a novel DNA repair protein, hABH-8 promotes survival of human urothelial carcinoma cells through up-regulating generation of reactive oxygen species, moreover, the expression of hABH-8 is a useful marker to predict clinical development of urinary bladder cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：人体病理学・実験病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、尿路上皮癌、hABH-8

1. 研究開始当初の背景

著者らは differential display 法により前立腺癌ならびにその前癌病変で強く発現する新規遺伝子 prostate cancer antigen (PCA)-1 を cloning した (Konishi N., Shimada K., et al. Clin Cancer Res, 2005)。さらに、PCA-1 が discoidin receptor や Bcl-x1 を調節することにより、ホルモン非依存性前立腺癌細胞の細胞増殖や浸潤能を促進させること、そしてその発現強度を病理組織学的に評価することで生化学的再発 (PSA failure) を予測できることを見出した (Shimada K., et al. Cancer Sci, 2007)。

一方、PCA-1 はメチル化 DNA の修復にかかわる ABH 遺伝子と高い類似性を有し、発癌が

癌進展に深く関与する。

そこで、大阪大学薬学研究科（辻川和丈准教授）との共同研究ですべてのヒト ABH family の同定に着手した結果、新たにヒト ABH-8 (hABH-8) 遺伝子を cloning することに成功したが (TsujiKawa K., Konishi N., et al. J Mol Cell Med, 2007)、尿路系腫瘍における生物学的、臨床病理学的意義は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、hABH-8 の尿路上皮癌細胞における細胞生存や細胞死、癌の浸潤、増殖に及ぼす影響を解析し、膀胱癌の発生と進展に関連する分子メカニズムとその臨床病理学的意義を明確にする。

3. 研究の方法

1) hABH-8 の target genes の解析

膀胱尿路上皮癌細胞株 (KU-7 や UMUC2) に hABH-8 遺伝子 (pcDNA/EmGFP-DEST/hABH-8) を強発現させた stable clone や siRNA 導入によって hABH-8 をノックダウンさせた癌細胞を用いて、特に癌進展との関連性で注目される活性酸素種 (ROS) 関連分子群発現との関連性をリアルタイム PCR, RT-PCR 法等により網羅的に解析する。

2) hABH-8 による癌生存シグナルへの影響

hABH-8 遺伝子ノックダウンによる apoptosis 誘導や癌細胞の細胞周期に及ぼす影響を、MTS assay, apoptosis assay (propidium iodide や AnnexinV 染色による), Flowcytometry にて検討する。

3) ROS 産生の癌細胞に及ぼす影響について

ROS 中和剤を処理した場合、hABH-8 をノックダウンした場合と同様の効果が得られるのかを検討したり、癌細胞の生存に関わる ROS 非依存性シグナルを検討する。

4) hABH-8 の膀胱癌浸潤、血管新生に及ぼす影響の解析

①chorioallantoic membrane assay :

胎生 11 日目の卵膜上に腫瘍細胞を移植し、遺伝子導入や薬剤処理を行った後に組織を回収して浸潤、増殖や血管新生の程度を組織学的に評価する

②ヌードマウスを用いた同所性(膀胱内)移植実験 :

雌ヌードマウスの尿道からカテーテルを挿入して膀胱内にヒト膀胱癌細胞株 (KU-7) を移植する。同細胞株は、遺伝子組み換え技術によりあらかじめ GFP を発光できる様に処理されている。移植後約 1 週間して膀胱内に癌が生着していることを蛍光実体顕微鏡下に確認し、経尿道的にコントロール RNA あるいは hABH-8 siRNA を atelocollagen とともに投与し、15 分間反応させる。その後約 3 週間経過した時点で、腫瘍組織を摘出し、蛍光実体顕微鏡によって膀胱腫瘍の fluorescence intensity を求め、さらに組織標本を作製して H&E 染色を行い腫瘍の浸潤、増殖の程度を観察する。

①、②を行って膀胱癌の浸潤、血管新生や転移におよぼす hABH-8 ノックダウンの影響を解析する。

5) 膀胱癌組織を用いた hABH-8 ならびにその下流分子の病理組織学的検討

hABH-8 関連シグナル関連分子の膀胱癌における発現動態と grade、深達度、再発、多発や転移等との関連性を解析する。

4. 研究成果

1) 病理組織学的検討

抗 hABH-8 モノクローナル抗体を作製してヒト膀胱癌組織を用いて免疫組織学的解析を行なったところ、hABH-8 が正常細胞に比較

して尿路上皮癌細胞において強く発現し、その発現陽性率が膀胱癌の悪性度 (grade) や深達度と有意に相関することが判明したことから、hABH-8 が膀胱癌の進展を把握する上で重要な病理学的因子となると考えられた。

全 68 症例 (膀胱癌手術症例) より得られた免疫組織化学的検討の結果を以下に示す。(用語解説)

①grade について:

low と high に分けられ、high grade は生物学的に悪性度の高い腫瘍と解される。

②Stage について:

pTa は乳頭状に増殖する上皮内の腫瘍、pT1 は上皮下結合組織に浸潤する腫瘍、pT2 以上は、筋層から膀胱周囲脂肪組織に浸潤したり遠隔臓器に転移する腫瘍、pTis (CIS) は上皮内にとどまるが grade の高い腫瘍である。

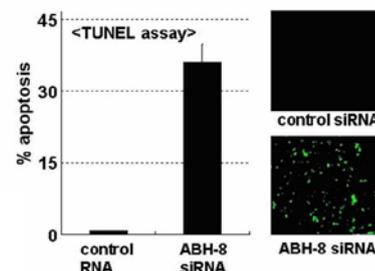
膀胱癌組織における hABH8 発現陽性率

	hABH-8 (%)
Grade	
low grade	12.7 ± 2.3
high grade	67.6 ± 3.8
Stage	
pTa	16.2 ± 3.2
pT1	69.0 ± 6.4
>= pT2	74.0 ± 5.8
pTis (Carcinoma in situ)	70.0 ± 6.5

2) *in vitro* 実験

膀胱尿路上皮癌細胞株を用いた siRNA 導入実験により、hABH-8 遺伝子ノックダウンが膀胱癌細胞の apoptosis を誘導することが分かった (下図参照)

hABH-8ノックダウンに伴う膀胱癌細胞のapoptosis誘導について



ヒト尿路上皮癌細胞株、KU-7に hABH-8 siRNA を導入し、72 時間培養した後、フルオレセイン-dUTP を用いた TUNEL 法にて apoptosis を定量化した。

この apoptosis 誘導には、ROS 産生にかかわる NADPH oxidase (NOX)-1 発現ならびに過酸化水素などの細胞内活性酸素種 (ROS) 産生の低下と、これに関連する c-jun NH2

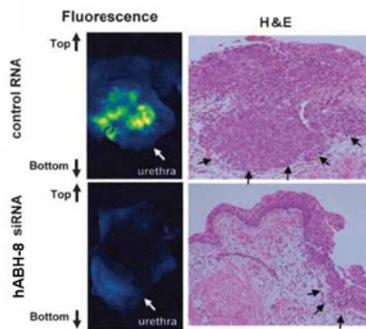
terminal kinase や p38 などの mitogen activated protein kinase 活性化が大きく関与する事実を確認した。

興味深いことに c-jun NH2 terminal kinase 活性化に伴って gamma-H2AX のリン酸化がみられたが、これが細胞死誘導上の促進因子として機能することが判明した。通常、gamma-H2AX のリン酸化は DNA 修復に関連して認められるもので、細胞に対して protective に作用するが、hABH-8 遺伝子ノックダウンにおいては、むしろ toxic に働くと考えられた。

3) *in vivo* 実験

chorioallantoic membrane assay や膀胱癌同所性移植実験結果から、atelocollagen を使用した hABH-8 *in vivo* ノックダウンにより膀胱癌細胞の血管新生や増殖、浸潤能が有意に抑制されることが分かった。膀胱癌同所性移植実験について下図に示す (urethra, 尿道)。

hABH-8 ノックダウンにより膀胱癌の増生が抑制される (*in vivo*)。



ヌードマウスに蛍光標識したヒト癌細胞株を移植して、コントロールとhABH-8 siRNAを膀胱内に導入した後組織を回収した。Fluorescenceは、蛍光実体顕微鏡下に摘出腫瘍を観察したもので、H&Eは、摘出腫瘍をH&E染色して組織像を観察したものである。hABH-8ノックダウンにより腫瘍体積やその浸潤、増殖が抑制されていることが分かる。

4) まとめ

hABH-8 を最上流とする (NOX-1)-(ROS)-(増殖・浸潤・血管新生) という分子シグナルが膀胱癌進展に重要な役割を担うと考えられる。また、hABH-8 分子やそのシグナル伝達を遮断することで強い膀胱癌抑制効果をもたらすことが判明した。

5) 今後の展望

①hABH-8 を標的とする新薬 (分子標的治療薬) の開発を行う。

今回の研究成果により、尿道から siRNA を投与しても十分な癌縮小効果が認められた。これを臨床応用できれば、従来の全身投与を原則とする抗癌剤の投与を根本的に見直すことができ、治療遂行上の問題である薬剤副作用を回避できるかもしれない。

②病理組織学的診断への応用

hABH-8 の癌細胞陽性率を病理組織学的に評価することで、腫瘍の悪性度やその後の進

展を推測できる可能性がある。

そして、膀胱癌における新規の予後予測因子となる可能性がある。

③ROS 産生の細胞診断的意義

活性酸素種を蛍光標識して尿中に剥離した陽性細胞を検出し形態的診断を加味することで尿細胞診における膀胱癌の診断精度が有意に向上することを確認している。

このシステムを実用化できれば、病理組織、細胞診断の精度向上が期待される。

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 2 件)

①Shimada K, Nakamura M, De Velasco MA, Tanaka M, Ouji Y, Miyake M, Fujimoto K, Hirao K, Konishi N. Role of syndecan-1 (CD138) in cell survival of human urothelial carcinoma. *Cancer Sci.* Vol. 101, No. 1, 2010, pp155-160.

②Shimada K, Nakamura M, Anai S, De Velasco M, Tanaka M, Tsujikawa K, Ouji Y, Konishi N. A novel human AlkB homologue, ALKBH8, contributes to human bladder cancer progression. *Cancer Res.* 査読有, Vol. 69, No. 7, 2009, pp3157-3164.

[学会発表] (計 3 件)

①Shimada, K., Nakamura, M., Marco A. De Velasco, Tanaka, M., Konishi, N., The role of syndecan-1 (CD138) in progression of human urinary bladder cancer, 第 68 回日本癌学会総会, 2009. 10. 2, 横浜

②大嶋正人, 島田啓司, 中村光利, 田崎正人, 辻川和丈, 小西 登, 膀胱癌における新規遺伝子ヒト ABH-8 の機能解析, 第 98 回日本病理学会総会, 2009. 5. 2, 京都

③島田啓司, 中村光利, 田崎正人, 小西 登, 膀胱癌における CD138 (Syndecan-1) 発現の分子病理学的意義について, 第 98 回日本病理学会総会, 2009. 5. 2, 京都

[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：

<http://www.naramed-u.ac.jp/~2path/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 啓司 (SHIMADA KEIJI)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：90336850

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小西 登 (KONISHI NOBORU)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20145832
辻川 和丈 (TSUJIKAWA KAZUTAKE)
大阪大学・薬学研究科・教授
研究者番号：10207376
王寺 幸輝 (OUJI YUKITERU)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：50343421
デベラスコ マルコ (DEVELASCO MARCO)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号：20449838
田中 基幹 (TANAKA MOTOYOSHI)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：30347562
藤本清秀 (FUJIMOTO KIYOHIDE)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50264867
平尾佳彦 (HIRAO YOSHIHIKO)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：00133207