

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791494

研究課題名（和文）

膀胱癌の発癌、再発、進展における芳香族炭化水素受容体発現の意義

研究課題名（英文）

Biological significance of expression of aryl hydrocarbon receptor in bladder cancer

研究代表者

石田 勝 (ISHIDA MASARU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80383876

研究成果の概要（和文）：膀胱癌臨床検体を用いて臨床病理学的に検討した結果、芳香族炭化水素受容体（AhR）の発現が尿路上皮癌の予後因子である脈管浸潤と相関することが明らかになった。膀胱癌細胞株を用いた検討では、細胞外マトリックスの分解にかかわるマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の発現と AhR の発現が相関することを明らかにした。また、AhR の発現を調節することで膀胱癌細胞株の浸潤能が変化することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In clinicopathological study, the expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR) significantly associated with lymphovascular invasion which is prognostic factor of urothelial cancer. The regulation of the expression of AhR correlated with the expression of matrix metalloproteinase (MMP) in *in vitro* study. Furthermore, the invasion activity of bladder cancer cell was affected by the expression status of AhR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 膀胱癌の男性例の約 50%、女性例の約 30%の発癌に喫煙が関与していると考えられている (Zeegers et al. Cancer 89: 630-609, 2000)。また、1938 年に Hueper らが犬に b-naphthylamine を投与することで膀胱癌を発生させた報告を始めとして (Hueper et al. Ind Hyg Toxicol 20:46-84, 1938)、benzidine、aminobiphenyl などの化合物への

暴露が膀胱癌の危険因子となることが明らかになってきた。

(2) タバコに含まれる多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH) やハロゲン化芳香族炭化水素 (halogenated aromatic hydrocarbon, HAH) などの外因性生理活性物質は発癌物質とされており、これらの物質は生体内では共通の受容体、aryl

hydrocarbon receptor, AhR に結合する。リガンドが結合した AhR は核内に移行し xenobiotic responsive element, XRE と結合し CYP 1A1, glutathione S-transferase などの外因性生理活性物質を代謝する酵素を誘導する。これらの酵素は膀胱癌のみではなく前癌病変でも発現がみられることから、AhR が発癌物質の暴露による発癌過程において重要な役割を果たしていることが示唆される。実際、喫煙が主要な危険因子である肺癌において AhR の過剰発現が報告されている (Lin et al. Toxicol Pathol. 31: 22-30, 2003)。

(3) AhR は他のシグナル伝達系と相互作用し、細胞周期やアポトーシスの制御など (Ma and Whitlick. Mol Cell Biol. 16: 2144-2150, 1996, Elizondo et al. Mol Pharmacol. 57: 1056-1063, 2000) 様々なカスケードに働きかけることが報告されている (Marlowe and Puga. J cell Biochem. 96: 1174-1184, 2005) さらには、AhR のシグナルは細胞外マトリックスの主要成分を分解し、癌の浸潤に関与する matrix metalloproteinase などの遺伝子の発現を調節する (Hillegass et al. Biol Chem. 387: 1159-1173, 2006) これらのことから、AhR が膀胱癌の発癌、増殖や浸潤・転移に関与する因子である可能性が高いと考えられる。

(4) 膀胱癌は経尿道的内視鏡治療や膀胱注入療法により臓器温存を果たせる症例も多く、臓器温存可能な症例の的確な選択は筋層非浸潤膀胱癌の再発・進展率をさらに改善することが示唆される。したがって膀胱癌の治療指針を決定する際に指標となる分子マーカーの同定およびその機能解析は臨床応用される可能性があり重要性が高い。

2. 研究の目的

腎臓で濾過された血液中の老廃物は尿中に排泄されるため、尿を貯留する臓器である膀胱は老廃物中に含まれる発癌物質に暴露される。実際、喫煙や発癌性化合物への暴露が膀胱癌の危険因子である。膀胱癌における発癌物質の代謝に関わる受容体型転写因子 aryl hydrocarbon receptor (AhR) の発現を調べ、膀胱癌の発癌・膀胱内再発・進展過程および予後との関連を明らかにすることが本研究の目的である。さらに AhR の機能と細胞増殖、アポトーシス、癌の浸潤・転移との関連を分子生物学的に明らかにする。本研究によって膀胱癌における AhR の機能が解明されるとともに膀胱癌の新規治療につながる有意義な知見が得られることも期待される。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学的に膀胱癌組織における AhR の発現を調べる。AhR は転写因子であるため、核に染色性がみられる細胞を陽性細胞と判断する。核染色陽性の癌細胞の割合が 50%以上を高発現群、50%以下を低発現群と定義する。臨床病理学的因子等との相関を統計学的に解析する。

(2) 膀胱癌由来細胞株に AhR のリガンドである 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン (TCDD) を投与し AhR 発現を増加させ、また RNA 干渉を用いて AhR 発現を特異的に抑制する。

(3) 膀胱癌由来細胞株において AhR の発現調節が、MMP をはじめとするプロテアーゼの発現に与える影響を定量 PCR 法により検討する。

(4) 同様に AhR の発現を調節し、フローサ

イトメトリーを用いて AhR の発現調節が細胞周期、アポトーシスに与える影響をそれぞれ Brdu の取り込み、TdT の取り込みにて検出する。

(5) AhR の発現を調節し、AhR が浸潤能に及ぼす影響を検討する。コントロールおよび TCDD を投与した細胞、siRNA 導入細胞をそれぞれ同数に調整した細胞浮遊液を、Matrigel™ を coating した membrane 上にて培養し、一定時間経過後に浸潤能の変化を *in vitro* で確認する。

4 . 研究成果

(1) 膀胱癌組織における AhR の発現の臨床的意義の解明

慶應義塾大学病院で膀胱癌に対して施行した膀胱全摘除術による膀胱癌臨床検体 56 例を用いて、芳香族炭化水素受容体 (Aryl hydrocarbon receptor: AhR) の免疫染色を施行し臨床病理学的に検討を行い、尿管浸潤を認める症例において AhR の発現が有意に高い事を明らかにした ($p < 0.05$)。当教室は、膀胱と同じ尿路上皮から発生する上部尿路上皮癌において、AhR の発現と尿管浸潤が相関しそれぞれが予後を予測する独立した因子であることを報告している。本研究により膀胱癌においても上部尿路上皮癌と同様に AhR が予後を予測する因子である可能性が示唆された。

(2) 膀胱癌細胞株を用いた AhR の機能解析
real time RT-PCR にて mRNA の発現量を定量した。AhR のリガンドである 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ p-ダイオキシン (TCDD) の膀胱癌細胞 T24 への投与により、AhR の発現は 50.0% 増加した ($p < 0.05$)。また、siRNA 導入により AhR の発現は 89.0% 低下した ($p <$

0.05)。

(3) AhR の発現量増加は、MMP -1、MMP -9 の発現量をそれぞれ増加させ (187.6%、98.3%、 $p < 0.05$)、また AhR の発現量低下は MMP -1、MMP -9 の発現量をそれぞれ低下させた (92.3%、94.8%、 $p < 0.05$)。

(4) AhR の発現量の調節が細胞周期・アポトーシスに与える影響は、T24 においては認められなかった。

(5) Matrigel invasion assay を用いた検討では、T24 の浸潤が TCDD の投与により 68.6% 亢進し ($p < 0.05$)、siRNA 導入により 52.8% 低下した ($p < 0.05$)。

(6) 本研究の成果

膀胱癌において AhR が浸潤と深く関わる可能性が示唆され、AhR を標的とした新規治療が期待される。

(7) 今後の展望

現在、表在性膀胱癌の浸潤癌への進展予測は、臨床病理学的因子を組み合わせる事で行っている。臓器・機能温存の観点から、浸潤癌への進展をより正確に予測するための分子マーカーの必要性が高く、AhR はその候補となりえる。癌の浸潤における AhR の機能機能解析を進め、AhR を標的とした治療の開発へと結び付けて行きたい。

問題点のひとつである膀胱全摘症例は、単施設で手術件数を増やす事は限界があるため、大学の関連医療機関と連携し膀胱癌手術検体を集積することを進めていく予定である。

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4件)

1. Kosaka T, Mikami S, Miyajima A, Shirotake S, Ishida M, Okada Y, Oya M. Expression of Snail in upper urinary tract urothelial carcinoma: Prognostic significance and implications for tumor invasion. *Clinical Cancer Research*. 16(23): 5814-5823, 2010 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

1. Ishida M, Mikami S, Kikuchi E, Kosaka T, Miyajima A, Mukai M, Okada Y, Oya M. Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway enhances cancer cell invasion by up-regulating the MMP expression in urothelial cancer. The 106th annual meeting of American Urological Association (2011.5.16 アメリカ ワシントン DC)

2. Takeda T, Kikuchi E, Suzuki E, Ito Y, Ishida M, Matsumoto K, Miyajima A, Mikami S, Oya M. Metastin, the final peptide of KISS-1 gene, prevents lung metastases of murine bladder cancer. The 106th annual meeting of American Urological Association (2011.5.16 アメリカ ワシントン DC)

3. Ishida M, Mikami S, Kikuchi E, Kosaka T, Miyajima A, Nakagawa K, Mukai M, Okada Y, Oya M. Activation of the AhR pathway enhances cancer cell invasion by up-regulating the MMP expression in urothelial cancer. 第69回日本癌学会学術総会 (2010.9.24 大阪)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.keio-uurology.jp/achievement/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田 勝 (ISHIDA MASARU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 80383876