

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 4 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890096

研究課題名（和文）ILK-GSK3 β 経路を利用したハイリスク膀胱癌への新規分子標的治療の確立研究課題名（英文）ILK-GSK3 β pathway as a therapeutic target for high risk bladder cancer.

研究代表者

松井 喜之 (Yoshiyuki Matsui)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00582107

研究成果の概要（和文）：本研究は Integrin-linked kinase (ILK)の膀胱癌進展における役割を解明し、その治療標的としての可能性を探る目的で行われた。膀胱癌細胞株およびマウス化学発癌モデルにおいて ILK は浸潤・進展に伴い発現上昇する傾向を示し、in vitro では細胞遊走および浸潤に関連していた。その機序としては GSK3 β -Zeb1 経路を介した E-Cadherin の発現低下や、MMP9 の誘導が関与していると考えられた。また、膀胱癌の臨床検体の免疫染色では ILK は浸潤性膀胱癌において高発現していた。これらの結果から、ILK は上皮間葉移行を誘導し、浸潤性膀胱癌の進展に寄与すると考えられ、浸潤性膀胱癌の新規治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present study was to elucidate the role of Integrin-linked kinase (ILK) in bladder cancer progression, and to explore the possibility of ILK as a therapeutic target for invasive bladder cancer. ILK was up-regulated with tumor progression in chemically induced mouse BBN bladder cancer model, and also in invasive bladder cancer cell lines. ILK increased migration and invasion of bladder cancer cells in vitro, which was associated with down-regulation of E-Cadherin via GSK3 β -Zeb1 pathway or up-regulation of MMP9. ILK was up-regulated in invasive bladder cancers in clinical specimen. These data indicate that ILK is associated with bladder cancer progression by inducing epithelial-mesenchymal transition, and that ILK can be a novel therapeutic target in invasive bladder cancer treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1230000	369000	1599000
平成 23 年度	1130000	339000	1469000
年度			
年度			
年度			
総計	2360000	708000	3068000

研究分野：膀胱癌

科研費の分科・細目：泌尿器科学、腫瘍学

キーワード：転移・浸潤、インテグリン、膀胱癌

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は尿路性器がんのなかで前立腺癌について発症率が高く、近年徐々に増加傾向に

ある。初診時、70%の膀胱癌は非浸潤性であるが、経尿道的切除などの治療効果は限定的であり、BCG や抗癌剤などの膀胱内注入療

法を追加しても 80%の患者が再発に見舞われ、さらに 20-30%の患者では浸潤性膀胱癌への進行を認める。以上の点から、ハイリスク膀胱癌患者の治療効果を向上させるためには、膀胱癌発癌・進行過程における分子機構の解明とそれに根ざした新たな分子標的治療が重要であると考えられる。

2. 研究の目的

Integrin-linked kinase (ILK) は細胞接着受容体、インテグリン、成長因子群を細胞内のアクチン細胞骨格、細胞内シグナル伝達経路とリンクさせる細胞内アダプターキナーゼであり、細胞複製能の亢進、接着・成長因子非依存性、アポトーシス経路からの逸脱、血管新生、細胞浸潤・転移能の獲得など種々の膀胱癌の発癌、進行に必要な経路の制御に関与する。申請者はこれまでの研究で ILK 下流の GSK3 β が p53-p21 経路を介して尿路上皮癌の化学療法耐性機序に関与していることを報告しているが、本申請ではその上流にある ILK こそが膀胱癌の発癌と進行過程においてキーとなる分子ではないかという仮説を検証するとともに、ILK をターゲットとした膀胱癌に対する新規分子標的治療の確立を目指した。

3. 研究の方法

i) 膀胱癌細胞株およびマウス化学発癌モデルにおける ILK の発現解析

11 の膀胱癌細胞株における ILK および、上皮間葉移行に関わる分子 (E-Cadherin, N-Cadherin, Snail, Slug, Zeb1, Vimentin, MMP2, MMP9) の発現をウエスタンブロットで確認した。また、6-8 週齢の C57BL/6 マウスに N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl)Nitrosamine (BBN) を経口投与し、上皮内癌 (CIS) から浸潤性膀胱癌に至るまでの各段階における ILK の発現を免疫染色法にて評価した。

ii) ILK の過剰発現およびノックダウンにおける膀胱癌細胞の表現型の評価

上皮性の表現型を示し、ILK を低発現する 253J 膀胱癌細胞株に恒常的活性型の ILK を導入し、細胞増殖 (MTS assay)、細胞遊走 (Scratch assay)、細胞浸潤 (Matrigel invasion assay) に与える影響を評価した。同様に、間葉性の表現型を示し、ILK を高発現する二つの膀胱癌細胞株、TCCsup, UMUC3 において ILK を siRNA でノックアウトし、表現型の変化を評価した。

iii) ILK の下流分子の変化とメカニズムの解明

ILK を過剰発現またはノックダウンした際の E-cadherin, GSK3 β , Snail, Zeb1, MMP2, MMP9 の発現変化についてウエスタンブロットで確認した。

iv) ヒト膀胱癌臨床検体における ILK の発現

の評価

30 症例の膀胱癌臨床検体を含む Tissue Microarray を用いて ILK の免疫染色を行い、正常膀胱上皮、非浸潤性膀胱癌、浸潤性膀胱癌それぞれにおける発現量を評価した。

4. 研究成果

i) ILK は膀胱癌の進展とともに発現上昇し、浸潤性膀胱癌細胞株において高発現している。

BBN マウス化学発癌モデルにおいて、ILK の発現は CIS, 浸潤癌と進展するにつれ発現上昇していた (図 1)。また、膀胱癌細胞株においては、E-Cadherin の発現が低下している間葉性の表現型を示すもので ILK の発現が亢進している傾向が認められた (図 2)。

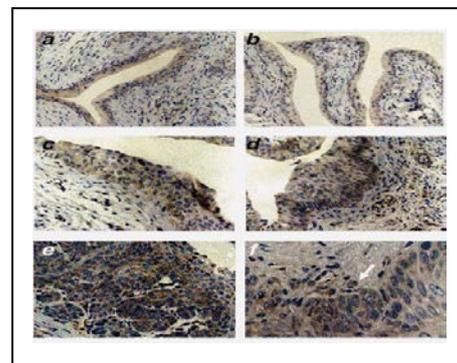


図 1

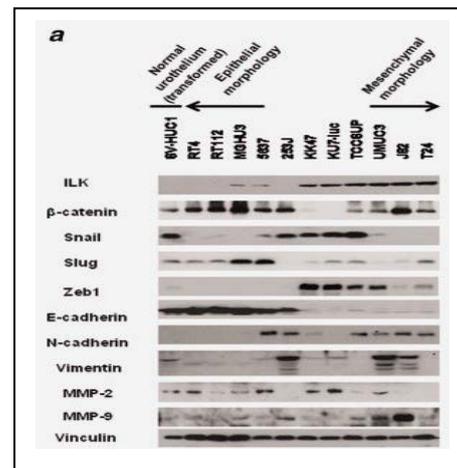


図 2

ii) ILK は膀胱癌細胞株の細胞遊走能および細胞浸潤能を亢進させる。

253J 細胞株への ILK の過剰発現により、細胞増殖は変化しなかったが、細胞浸潤走能 (図 3) および細胞浸潤能 (図 4) の亢進が認められた。また、TCCsup, UMUC3 いずれにおいても ILK をノックダウンすることで細胞遊走能 (図 5)、細胞浸潤能 (図 6) の低下が認められた。以上の結果より、ILK は膀胱癌細胞の細胞遊走、細胞浸潤に関わると考えられた。

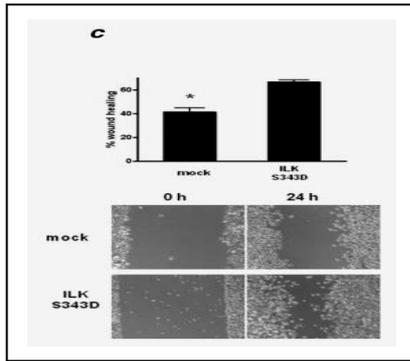


図 3

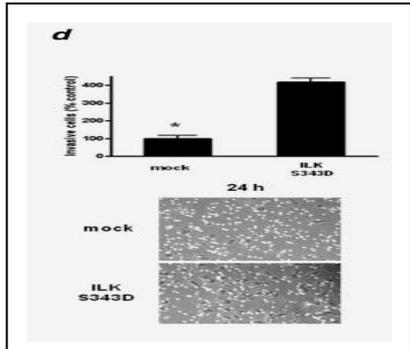


図 4

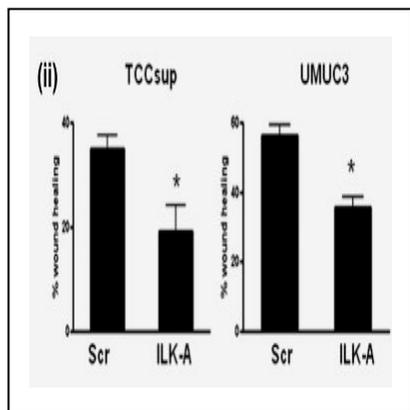


図 5

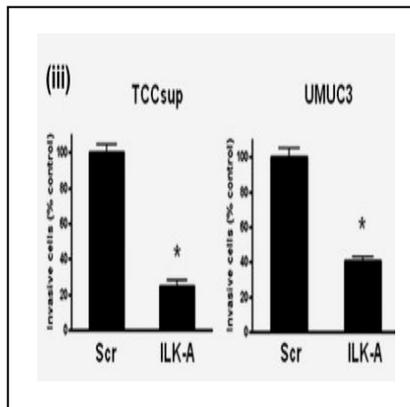


図 6

iii) ILK の膀胱癌における上皮間葉移行への影響は GSK3β-Zeb1 を介した E-Cadherin の発現抑制や、MMP9 の発現上昇を介している。
TCCsup 細胞において ILK をノックダウンすると GSK3β のリン酸化が抑制され、E-Cadherin の上流である Zeb1 および E-Cadherin の発現

が抑制された。UMUC3 細胞においては Zeb1 の発現抑制は見られなかったが、Snail の発現低下と MMP9 の発現低下が確認された。これらのデータから、ILK は GSK3β-Zeb1 を介した E-Cadherin の抑制や MMP9 の発現上昇により膀胱癌の上皮間葉移行に関わると考えられた。

iv) ILK はヒト膀胱癌で浸潤性癌において発現上昇している。

膀胱癌の Tissue Microarray において ILK および MMP9 の発現は膀胱癌の浸潤性と正の相関を示し、E-Cadherin は負の相関を示した (図 7)。

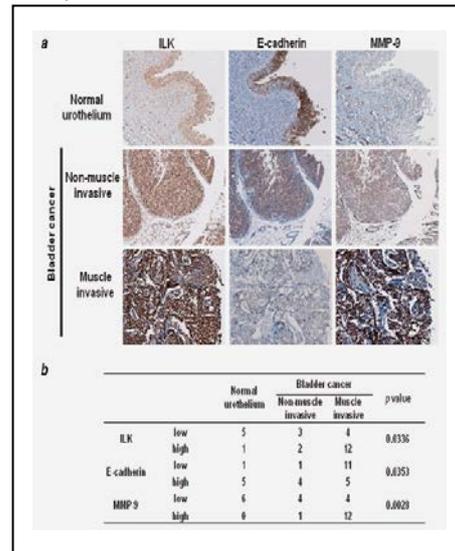


図 7

以上の結果より、ILK は膀胱癌において上皮間葉移行を誘導し、浸潤性に関わると考えられた。ILK は浸潤性膀胱癌の新規治療標的とな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 1 件)

1. Matsui Y, Assi K, Ogawa O, et al. (全 8 人) The importance of integrin-linked kinase in the regulation of bladder cancer invasion. International Journal of Cancer (130) 521-531, 2011 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

1. Matsui Y. Blockade of sonic hedgehog pathway as a novel intravesical treatment option for high-grade bladder cancer. 2010 The Genitourinary Cancers Symposium (ASCO), San Francisco, 2010/5, 査読あり
2. 松井喜之. MicroRNA-mediated targeting of oncolytic Herpes simplex virus -1 to high-risk bladder cancer. 第 9 回日本泌

尿器科学会総会，名古屋，2011/4，査読あり
3. 松井喜之. Preclinical study for a new
intravesical instillation therapy. 第7
0回日本癌学会総会，名古屋，2011/10，査
読なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 喜之 (Yoshiyuki Matsui)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00582107