

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590471

研究課題名(和文)膀胱尿路上皮癌におけるDNA修復酵素hABHファミリーの分子病理学的解析

研究課題名(英文)The role of ALKBH family in bladder cancer development

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト尿路上皮癌細胞におけるALKBH3の機能を解析した。尿路上皮癌細胞株を用い、ALKBH3遺伝子をノックダウンするとNOX2発現および細胞内活性酸素種(ROS)が低下し、癌細胞の増殖が強く阻害された。また、ALKBH3ノックダウンにより、癌細胞におけるTweak発現ならびに血管増殖因子VEGF発現が強く阻害された。同様の結果は動物モデルでも得られた。ヒト膀胱癌組織を用いた免疫組織化学的解析により、癌細胞や血管内皮細胞におけるALKBH3、Tweak、Fn14の発現が病理組織学的悪性度と相関することが分かった。

研究成果の概要(英文)：The role and function of ALKBH3 in human urothelial carcinoma development were examined. ALKBH3 knockdown induced cell cycle arrest at the G1 phase through downregulation of NOX-2-mediated generation of ROS. ALKBH3 knockdown reduced VEGF expression by reducing expression of Tweak and its receptor, Fn14. Silencing of ALKBH3 or Tweak significantly suppressed invasion and angiogenesis of urothelial carcinoma in vivo. Interestingly, not only urothelial carcinoma cells but also vascular endothelial cells within cancer foci expressed Fn14, which was strongly reduced by ALKBH3 and Tweak knockdown in vivo, suggesting that ALKBH3-dependent expression of Tweak stabilizes Fn14. Immunohistochemical examination showed high expression of ALKBH3, Tweak, and Fn14 in urothelial carcinoma, especially in high-grade, invasive carcinomas; moreover, Fn14-positive vessel counts within cancer foci were increased in invasive phenotypes. ALKBH3 contributes to development of urothelial carcinomas.

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：基盤研究(C)

キーワード：urothelial carcinoma ALKBH3 ROS Tweak Fn14 VEGF

1. 研究開始当初の背景

(1) ALKBH は、DNA 修復酵素である AlkB のヒトホモログで癌発生や進展に影響すると考えられるが、その機能や臨床病理学的意義ははまだ十分解明されていない。我々は ALKBH3 が前立腺癌ならびにその前癌病変で強く発現することを見出し(Clin Cancer Res. Konishi N and Shimada K et al. 2005)、前立腺癌の浸潤能を促進してホルモン不応性獲得に影響することを明らかにした(Cancer Sci. Shimada K et al. 2008)。

(2) ALKBH3 は膵臓原発腺癌や肺原発腺癌・扁平上皮癌においても強発現し、細胞周期の促進、apoptosis 抵抗性獲得や血管新生の促進によって癌細胞の増殖を促し臨床予後に影響することも分かった(Br J Cancer. Tasaki M and Shimada K et al. 2011; Cancer Res. Yamato I and Shimada K et al. 2012)。ALKBH3 は、根治が難しく予後不良な癌種に対する新しい予後予測因子、治療標的分子となる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 近年、様々な悪性腫瘍において分子医薬の開発と臨床応用が進み、治療成績や予後改善につながっている。他方、腎盂・尿管・膀胱癌(尿路上皮癌)はいまだに標的分子が特定されていない。我々は、ALKBH3 の尿路上皮癌における機能、役割を分子生物学的、臨床病理学的に解析し、新規標的分子となるか否か追求する。

(2) 尿路上皮癌細胞の生存に ROS が重要な役割を担うことを明らかにした。ALKBH3 が癌細胞内 ROS を至適レベルに調整する上流の分子であるか否かを検討する。

3. 研究の方法

(1) *in vitro*での実験系

ALKBH3 を強発現するヒト尿路上皮癌細胞株、UMUC2 及び 3 を用い、ALKBH3 遺伝子をノックダウンさせた場合の癌細胞への影響を解析した。具体的には siRNA を遺伝子導入して癌細胞における ALKBH3 発現を抑制させた場合に、細胞周期、細胞増殖がどのような影響をうけるか、flowcytometry (FACS)法、MTS アッセイ法にて解析した。また、ROS 産生に及ぼす影響を検出用蛍光試薬を用いて定量的に検討した。

(2) *in vivo*での実験系

癌増殖能、浸潤能や血管新生能については、膀胱同所性癌細胞移植(ヌードマウス)実験及び chorioallantoic membrane への移植実験を用いて行い検討した。いずれも GFP 遺伝子を導入したヒト尿路上皮癌細胞を移植し、生着後に ALKBH3 siRNA を遺伝子導入(atelocollagen を用いる)して、癌組織を摘出し、病理組織学的に解析した。同所性移植実験については、蛍光実体顕微鏡を用いた定性、定量的解析も行った。

(3) 手術検体を用いた病理組織学的研究 ヒト膀胱癌切除手術検体(93 症例)を用いて、ALKBH3 やその下流分子群の免疫組織化学的検討を行い、癌悪性度や血管新生との相関性を統計学的に解析した。

4. 研究成果

(1) ALKBH3 は尿路上皮癌細胞の増殖を促進する

ヒト尿路上皮癌細胞株 UMUC2,3 に対し、siRNA を導入して ALKBH3 をノックダウンすると、ALKBH3 発現が有意に低下し(図 1A)、G1 cell cycle arrest により癌細胞の増殖活性が阻害された(図 1B および図 1C)。

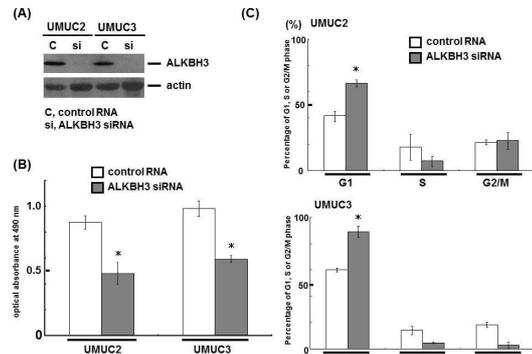


図 1 (A) siRNA 導入により ALKBH3 蛋白発現量が強く低下した(western blot)。(B)および(C)細胞増殖、細胞周期に及ぼす影響を MTS アッセイ、FACS 法にてそれぞれ解析した。

(2) ALKBH3 は尿路上皮癌細胞における NOX2 を介して ROS 産生を維持し、細胞増殖を促進する

UMUC2,3 はいずれも高い細胞内 ROS (H2O2, 過酸化水素; O2-, 酸素ラジカル) 産生量を示すが、ALKBH3 をノックダウンすると細胞内 ROS 産生量が有意に抑制された(図 2A)。また、ALKBH3 発現抑制により、ROS 産生責任酵素である NADPH oxidase (NOX)2 発現が低下した(図 2B)。一方、NOX2 をノックダウンすると ALKBH3 の場合と同様に、癌細胞は G1 cell cycle arrest を来し、細胞増殖が抑制された。

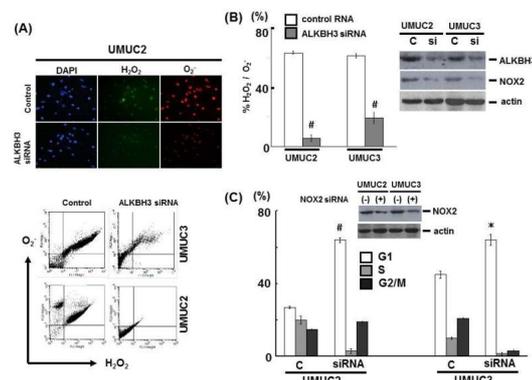


図 2 (A)および(B)ROS を蛍光標識し、UMUC2,3 における細胞内 ROS 産生を蛍光顕微鏡ならびに FACS 法にて定性的、定量的に解析した。

また、ALKBH3 ノックダウンに伴う ROS 産生量と NOX2 発現に及ぼす影響を検討した。(C)NOX2 ノックダウンの細胞周期に及ぼす影響を解析した。

(3) ALKBH3 は Tweak/Fn14 および VEGF シグナルを介して尿路上皮癌の血管新生および浸潤を促進する

1) 鶏卵膜にヒト尿路上皮癌細胞株 KU7 を移植し、ALKBH3 siRNA を導入すると癌細胞の浸潤深達度および血管(腫瘍血管)新生が強く阻害されるとともに、腫瘍細胞における Tweak とその受容体 Fn14 ならびに VEGF の発現が抑制された(図 3 A および B)。siRNA 導入実験にて、KU7 における Tweak および Fn14 発現を抑制すると、前者では Tweak, Fn14, VEGF 発現が、後者では Fn14, VEGF 発現がそれぞれ抑制されたことから、ALKBH3 は Tweak/Fn14 シグナルを介して VEGF を誘導し腫瘍血管の増生と浸潤を促進すること、Tweak は、受容体 Fn14 発現を安定化させることが判明した(図 3 C)。NOX2 をノックダウンした場合には、VEGF 発現は軽度低下にとどまり、Tweak/Fn14 発現に有意な変化は認められなかった(図 3 C)。癌浸潤、血管新生能は有意に抑制されたものの、Fn14 をノックダウンした場合に比して脆弱であった(図 3 D)ことから、本抑制効果は、主に癌細胞増殖抑制効果に起因すると思われる。以上から、ALKBH3 は NOX2/ROS シグナルを介した癌細胞増殖および Tweak/Fn14/VEGF シグナルを介した血管新生・浸潤によって尿路上皮癌の進展に関与すると考えられた。

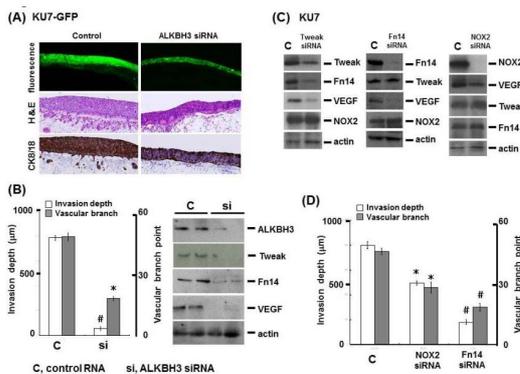


図 3 (A) および (B) 胎生 11 日目の鶏卵膜に KU7(GFP 遺伝子を導入している)を移植し、ALKBH3 siRNA を導入して 5 日後に組織を回収してその断面を蛍光顕微鏡、H&E 染色ならびに抗 GFP 抗体を用いた免疫組織染色を施行の上、癌の浸潤の深さや新生血管数を算出した(Chorioallantoic membrane アッセイ)。また、western blot 法によって、ALKBH3, Tweak, Fn14 および VEGF 発現を定量した。(C) KU7 に Tweak, Fn14, NOX2 siRNA を導入してノックダウンし、Tweak, Fn14 や VEGF 蛋白発現を

討した。(D)(A)と同様の手法にて NOX2, Fn14 をノックダウンし、浸潤度、血管新生の程度を定量し、比較検討した。

2) ノードマウスの膀胱内に KU7 を移植した後に ALKBH3 siRNA を導入すると、癌細胞における ALKBH3 発現の低下とともに、NOX2, Tweak/Fn14 および VEGF 発現が低下し、腫瘍体積の有意な減少を認めた(図 4 A)。腫瘍組織を免疫組織化学的に解析したところ、腫瘍深達度に加えて腫瘍胞巣内毛細血管数の減少、内皮細胞における Fn14 発現の減弱が観察された(図 4 B)。同モデルを用い、Tweak を *in vivo* でノックダウンしても同様の抗腫瘍効果が認められ、腫瘍胞巣における毛細血管内皮細胞 Fn14 発現が抑制された。ALKBH3 はその下流分子である Tweak を介して、癌細胞だけでなく、腫瘍血管内皮細胞における Fn14 の発現をも安定化させ、効率的な血管新生および腫瘍進展をもたらすと考えられた。

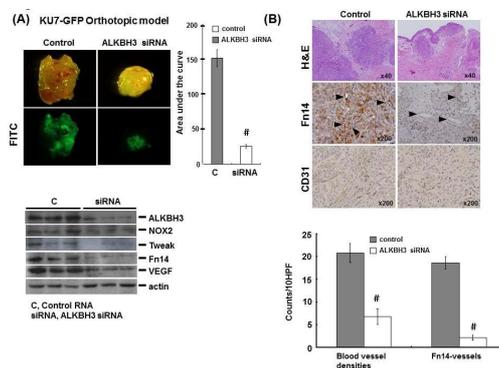


図 4 (A) ノードマウス膀胱内に KU7(GFP)を移植し、ALKBH3 siRNA を導入して 14 日後に組織を回収して腫瘍の大きさを蛍光実体顕微鏡下に蛍光強度で測定した。また、western blot 法によって、ALKBH3, NOX2, Tweak, Fn14 および VEGF 発現を定量した。(B) 回収した膀胱腫瘍組織に対し、H&E 染色、(抗 Fn14, CD31(内皮細胞マーカー)抗体を用いた)免疫染色を行い、腫瘍内血管数、Fn14 陽性血管数を算出した。

(4) ALKBH3/Tweak/Fn14 発現は膀胱尿路上皮癌の進展に深く関与する

ヒト膀胱癌手術検体を用いた免疫組織化学的検討の結果、膀胱尿路上皮癌細胞における ALKBH3 発現はその悪性度(組織学的 grade)や深達度(癌浸潤の深さ)と有意に相関した。また、癌細胞に加え、腫瘍内・周囲における毛細血管内皮細胞にも Tweak, Fn14 発現が認められ、発現陽性血管の割合は癌深達度に相関して増加することが分かった。悪性度の高い膀胱上皮癌においては、その血管新生に、ALKBH3 を最上流とする Tweak/Fn14 シグナルが重要な役割を担うと考えられる。

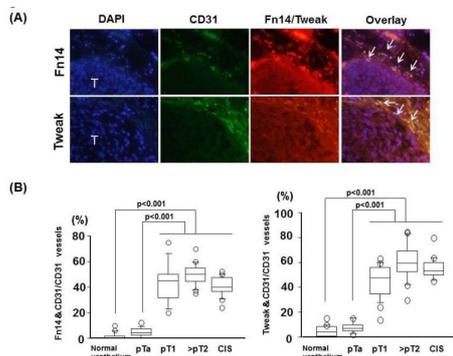


図5 (A)膀胱癌組織検体を用い、抗 CD31(緑：内皮細胞マーカー)と抗 Tweak あるいは抗 Fn14 抗体(赤)による免疫2重染色を行った。腫瘍巣内あるいはその周囲には CD31/Tweak あるいは CD31/Fn14 陽性を示す腫瘍血管内皮細胞が観察される。(B)血管内皮細胞における Tweak や Fn14 発現陽性細胞の割合を算出し、正常膀胱組織や悪性度の異なる癌組織間で比較検討した。

#### まとめ：

ALKBH3 は、尿路上皮癌細胞において細胞内 ROS 産生を維持して細胞増殖を高める一方、Tweak/Fn14/VEGF シグナル活性化によって腫瘍血管を増生し、さらに癌細胞由来の Tweak によって腫瘍血管内皮細胞における Fn14 発現を安定化させることで、さらに一層効率的な「血管新生」をもたらす、これが膀胱癌の進展に重要な役割をになうことが判明した。ALKBH3 ならびに Tweak/Fn14 は、膀胱癌治療上の有効な標的分子となる可能性があり、すでに開発されている抗 VEGF 抗体と組み合わせると実用的で効果的な尿路上皮癌治療を確立できると期待される。

#### 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4件)

Fujii T, Shimada K, Anai S, Fujimoto K, Konishi N. ALKBH2, a novel AlkB homologue, contributes to human bladder cancer progression by regulating MUC1 expression. *Cancer Sci*. 査読有、104 巻、2013、321-327.

Shimada K, Fujii T, Tsujikawa K, Anai S, Fujimoto K, Konishi N. ALKBH3 contributes to survival and angiogenesis of human urothelial carcinoma cells through NADPH oxidase and tweak/Fn14/VEGF signals. *Clin Cancer Res*. 査読有、18 巻、2012、5247-5255.

Yamato I, Sho M, Shimada K, Hotta K, Ueda Y, Yasuda S, Shigi N, Konishi N, Tsujikawa K, Nakajima Y. PCA-1/ALKBH3 contributes to pancreatic cancer by supporting apoptotic resistance and angiogenesis. *Cancer Res*. 査読有、72 巻、2012、4829-4839.

Tasaki M1, Shimada K, Kimura H, Tsujikawa K, Konishi N. ALKBH3, a human AlkB homologue, contributes to cell survival in human non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 査読有、104 巻、2011、700-706.

##### [学会発表](計7件)

藤井智美、島田啓司、穴井 智、藤本清秀、小西 登. ヒト膀胱癌の進展における MUC1 発現を介した AlkB homologue 2 の役割. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013/10/04

藤井智美、島田啓司、穴井 智、藤本清秀、小西 登. ヒト膀胱癌における MUC1 発現制御を介した ALKBH2 の役割. 第 102 回日本病理学会総会. 2013/06/07

島田啓司. 尿路上皮癌進展にかかわる分子病理学的因子について. 第 71 回日本癌学会学術総会・シンポジウム. 2012/09/21

島田啓司、藤井智美、穴井 智、藤本清秀、小西 登. 膀胱尿路上皮癌における新規血管新生メカニズムの解析. 第 71 回日本癌学会学術集. 2012/09/19

島田啓司、藤井智美、榊田礼子、田中京子、平山真央、西川 武、穴井 智、藤本清秀、小西 登. 尿細胞診における活性酸素種標識の有用性. 第 53 回日本臨床細胞学会総会(春期大会)シンポジウム. 2012/06/01

島田啓司、藤井智美、穴井 智、藤本清秀、小西 登. 膀胱癌における血管新生因子 Tweak/Fn14 発現の病理学的意義について. 第 101 回病理学会総会. 2012/04/26

島田啓司、藤井智美、穴井 智、藤本清秀、小西 登. 膀胱尿路上皮癌における細胞内活性酸素種の病理学的、臨床細胞学的意義. 第 100 回病理学会総会. 2011/04/30

##### [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]

特記事項なし

#### 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医学科・准教授  
研究者番号：9 0 3 3 6 8 5 0

##### (2) 研究分担者 なし

##### (3) 連携研究者

辻川 和文(TSUJIKAWA, Kazutake)  
大阪大学薬学研究科・教授  
研究者番号：1 0 2 0 7 3 7 6