

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592344

研究課題名(和文) 浸潤性膀胱がんの発生に関わる遺伝子UQCRBの同定とその機能解析

研究課題名(英文) UQCRB is involved in bladder carcinogenesis in mouse and human.

研究代表者

秋田 英俊 (Akita, Hidetoshi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：10381782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱がんモデルマウスを用いてarray CGHを行うことで膀胱発がんに関与する遺伝子UQCRBを同定した。UQCRBのCNAは浸潤がんでは減少する傾向が、モデルマウスのみならず、ヒトにおいても確認された。さらにUQCRBのCNAはタンパク発現と相関していた。UQCRBはミトコンドリア内に存在し、血管新生を促進することが報告されており、今回の検討では、同じく血管新生に関わるiNOSと同様の染色パターンを示したことから、ヒト膀胱発がんの過程にiNOSを介して関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, to investigate chromosomal instabilities (CIN), bladder cancer mouse model was used. As measure of CIN, DNA copy number aberrations (CNA) were investigated. According to array comparative genomic hybridization (CGH) analysis to detect CNA throughout the genome, five chromosomes with high CIN were identified, and among the candidate genes present in these regions, ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein (UQCRB) on chromosome13B3 was further characterized. In this study, both CNA and protein expression of UQCRB in mouse model were examined. Both CNA and protein expression of UQCRB of tumor at early stages were significantly increased than control tissue and invasive cancer. Quantitative PCR and immunohistochemical analyses indicated that the CNA and the protein expression of UQCRB at low T stage were higher than those at high T stages in human bladder cancer specimens. These findings suggest that UQCRB is an indicator of bladder cancer.

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：膀胱がん UQCRB

## 1. 研究開始当初の背景

膀胱がんの膀胱内再発率は約 80%と高い。再発後の 10~30%は浸潤性がんであり、浸潤性がんの 5 年生存率は T2、T3、T4 でそれぞれ 80%、40%、25%と予後不良である。表在性から浸潤性がんへの移行の分子機構はいまだ明確に解明されておらず、有用な分子マーカーもない。それ故、表在性膀胱がん治療後の再発時には浸潤性がんとなり根拠切除不可能な症例や、根治的膀胱全摘除術を行ったもののなかに overtreatment である症例が存在する可能性も否定できない。従って、浸潤性がんへの移行を示唆する有用なバイオマーカーが存在すれば、表在性膀胱がんの経過観察中に、より早い段階での浸潤性がんの診断、的確な治療に結びつけることができると考えられる。しかし現在、浸潤性膀胱がんにおいて、いくつか特定の染色体領域のコピー数の変化についての報告がされているのみで、特異的な指標としての十分な検討はいまだ報告されていないのが現状である。また転移を伴うような進行膀胱がんに対する効果的な治療もなく、複数の抗がん剤を用いての治療が一般的で、その効果は期待されるものに及ばず、新規治療法の開発が必要である。

これまでに、BHBN 誘発膀胱がんラット及びマウスの CNA における解析報告はない。それらの遺伝子発現プロファイルについての報告はあるが、我々の target 領域にある遺伝子はオーバーラップされていないため、本研究によりその関与を検討することで、新規のマーカー、治療薬となりうる可能性があると考えられている。UQCRB はヒト Chromosome8q22 領域に存在する遺伝子で、ミトコンドリア呼吸鎖のうち複合体を形成する 11 個のサブユニットの一つとして ATP 産生に寄与していることは上述した。またミトコンドリアは apoptosis の過程を制御する主要な器官であり、apoptosis におけるもっとも強力な活性化因子の一つが cytochrome c である。cytochrome c が細胞質へ放出されることで、caspase というカスケードを活性化させ apoptosis を引き起こす。その cytochrome c と結合する UQCRB は他のがん種においては CNA の報告があるが、

膀胱がん細胞株及び腫瘍組織とも特定の遺伝子領域における CNA の解析は報告されていない。

## 2. 研究の目的

膀胱の発がん進展過程は未だ不明な点が多い。近年、がんは遺伝子変化の集積に伴って多段階で生じ、染色体レベルでのゲノムの不安定性 (Chromosomal instability: CIN) がみられることが解明されてきた。しかし、膀胱がん患者は遺伝・環境背景が多様で CIN の解析は困難であった。このことから私は、膀胱がんモデルマウスを用いて CIN を検討することにより、ヒト膀胱発がんに関わる遺伝子の同定と解析を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

array comparative genomic hybridization (CGH) 解析: 6 週齢の C57BL/6N 雄マウスに 0.05% *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine を自由飲水投与し、膀胱がんモデルマウスを作成した。本モデルマウスは投与開始後 4 週で過形成、12 週で高度異形成、20 週から 26 週にかけて浸潤性膀胱がんを発生するため、各々の時期の膀胱組織より DNA を抽出した。Agilent Mouse Genome CGH Oligo Microarray kit (244K) (Agilent Technologies) を用いて array CGH を行った (投与 20 週後: n=2, 26 週後: n=3)。コントロールとして 6 週齢のマウスの肝臓を用いた。CIN の指標として Copy number aberrations (CNA) を観察した。CNA を認めた染色体領域にある遺伝子群について定量 PCR 法を用いてそれぞれの CNA を再検討した。その中よりヒトとの相同性のある ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein (UQCRB) に着目し、以下の検討を進めた。

モデルマウスを用いた解析: 膀胱組織の病変部から Pinpoint™ Slide DNA Isolation System (Zymo Research Corporation) を用いて DNA を抽出し、UQCRB の CNA 比を定量 PCR 法を用いて各群間で比較検討した (投与 4、12、26 週後: 各群 n=3)。コントロールとして 6 週齢のマウスの正常膀胱粘膜を用いた。また UQCRB と inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現を

免疫組織染色で経時的に検討した。

ヒト膀胱がん組織を用いた解析：同一検体のがん部と正常粘膜部から Pinpoint™ Slide DNA Isolation System を用いて DNA を抽出した。定量 PCR 法を用いて CNA 比を各群間で比較した (pTa:n=3、pT1:n=4、pT2:n=3、pT3:n=6)。また UQCRB の免疫組織染色を行い、その同在を検討した。

#### 4. 研究成果

表1:膀胱がんマウスでCNAを認めた遺伝子

chromosome	CGH	Gene(Copy number gain>1)
2D	gain	olfr1184
9F2	gain	-
11C-D	gain	-
13B3	gain	2410141K09Rik uqcrb
14C2	gain	A430107P09Rik

(1)array CGH 解析:array CGH の結果、2D、9F2、11C-D、13B3、14C2 の 5 領域にコピー数の増加を認めた。その領域にある 19 個の遺伝子の中で、1 コピー以上の増加を認め、ヒトとの相同性が明らかな遺伝子は UQCRB のみであった。

(2)モデルマウスを用いた解析:UQCRB の CNA 比は 4 週後より増加傾向を示し、12 週後でピークを認め、26 週後では減少する傾向にあった。また、免疫組織学的検討では UQCRB、iNOS とともに 4、12 週後と徐々に発現の上昇を認めたが、26 週後では、浸潤が

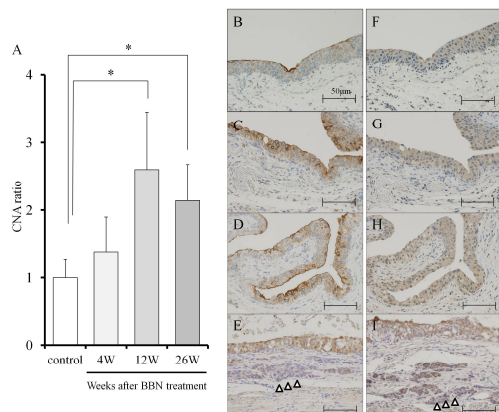


Figure 2

ん部で発現が低下する傾向にあった。

(3)ヒト膀胱がん組織を用いた解析:深達度の上昇に伴い CNA 比は減少する傾向にあった。免疫組織学的検討において、UQCRB は表在がんでは強く均一に発現していたが、浸潤が

ん部では不均一な発現傾向を認めた。

以上の検討より膀胱発がんに関与する遺伝子 UQCRB を同定した。UQCRB の CNA は浸潤がんで減少する傾向が、モデルマウスのみならず、ヒトにおいても確認された。さらに UQCRB の CNA はタンパク発現と相関していた。UQCRB はミトコンドリア内に存在し、血管新生を促進することが報告されて

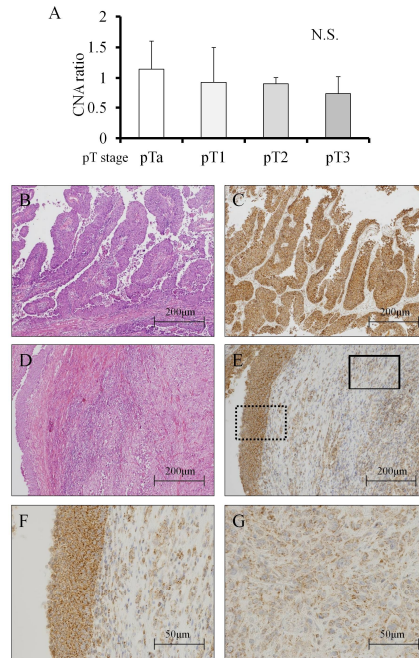


Figure 3

おり、今回の検討では、同じく血管新生に関わる iNOS と同様の染色パターンを示したことから、ヒト膀胱発がんの過程に iNOS を介して関与していることが示唆された。

#### 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)

Yamada Kenji: UQCRB is involved in bladder carcinogenesis in mouse and human. Nagoya Medical Journal. 2014.(in press) (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

山田 健司、福田 勝洋、小林 大地、内木 拓、池上 要介、安藤 亮介、金本 一洋、梅本 幸裕、河合 憲康、戸澤 啓一、佐々木 昌一、林 祐太郎、郡 健二郎：浸潤性膀胱がんにおける UQCRB の HIF1 を介した役割。第 101 回

日本泌尿器科学会総会、2013.4.25-28、  
札幌市

山田 健司、福田 勝洋、恵谷 俊紀、  
小林 大地、内木 拓、金本 一洋、河  
合 憲康、戸澤 啓一、郡 健二郎：  
UQCRB は浸潤性膀胱がんの発がん、進展  
に關与している。第 71 回日本癌学会学  
術総会、2012.9.19-21、札幌市

山田 健司、福田 勝洋、河合 憲康、  
内木 拓、池上 要介、戸澤 啓一、中  
釜 斉、郡 健二郎：浸潤性膀胱がんの  
關連遺伝子 UQCRB の同定とその機能解析。  
第 99 回日本泌尿器科学会総会、  
2011.4.21-24、名古屋市

山田 健司、福田 勝洋、小林 大地、  
内木 拓、池上 要介、安藤 亮介、河  
合 憲康、戸澤 啓一、郡 健二郎：浸  
潤性膀胱がんの關連遺伝子 UQCRB の同定  
とその機能解析。第 70 回日本癌学会学  
術総会、2011.10.3-5、名古屋市

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究  
員

研究者番号：80566232

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋田 英俊 (AKITA HIDETOSHI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究  
員  
研究者番号：10381782

### (2) 研究分担者

戸澤 啓一 (TOZAWA KEIICHI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教  
授  
研究者番号：40264733

橋本 良博 (HASHIMOTO YOSHIHIRO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究  
員  
研究者番号：40244561

郡 健二郎 (KOHRU KENJIRO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：30122047

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

山田 健司 (YAKADA KENJI)