

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592406

研究課題名(和文)膀胱癌に対するSteroid Sulfataseの作用機序の解明

研究課題名(英文)Investigation of Mechanism of Action of Steroid Sulfatase in Bladder Cancer

研究代表者

玉田 聡 (Tamada, Satoshi)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20382179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アンドロゲン代謝酵素の1つであるsteroid sulfatase (STS)は膀胱がんの浸潤過程および予後に関連する因子であることを発見した。第一に、免疫組織染色による評価では、ヒト浸潤性膀胱癌組織で筋層非浸潤性膀胱癌に比較して有意にSTSが高発現することを認め、STS陽性例は有意に予後不良であった。第二に、筋層浸潤性膀胱癌細胞株においてSTSをノックダウンすることで遊走能及び浸潤能が有意に低下することを発見した。最後に、STSはvimentinやZEB1などの上皮間葉系移行関連因子と相関することを発見した。以上のことからSTSは膀胱癌の新規治療標的因子となりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：we found out that steroid sulfatase (STS), an enzyme involved in androgen synthesis, is an important factor of invasion and prognosis of bladder cancer (BCa) patients. First, we demonstrated that the expression level of STS was significantly higher in muscle invasive BCa compared to non muscle-invasive BCa and the prognosis of STS positive Bca is significantly worse than that of STS negative BCa. Second, STS-knock down BCa cells showed less migration and invasion capability. Lastly, we showed that STS is relevant to epithelial to mesenchymal factors such as vimentin and ZEB1. In conclusion, we showed the possibility that STS is a novel target of BCa treatment.

研究分野：泌尿器がん

キーワード：膀胱癌 浸潤 アンドロゲン

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌の進展過程において、これまでに p53 や Ras/Raf /MAPK、MMP など多くの分子の関連が指摘されているが、androgen あるいは estrogen をはじめとする hormone の関与に関してはほとんど報告がない。しかし、男性における膀胱癌の罹患率は女性の約 4 倍となっているが、これは喫煙率や職業的曝露の差異のみで説明できない要因があると考えられる。具体的には、androgen 及びその前駆体あるいは代謝産物や androgen receptorなどを介した hormone signaling が膀胱癌の発生あるいは進展に関与していると考えられる。

Androgen と膀胱癌進展の関連については、相反する報告がされている。Androgen 依存性を示唆する考えとしては、2007 年に Miyamoto らによる報告が挙げられ、N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) を 40 週投与することにより wild type の mouse ではその 92 % に膀胱癌が発生するが、Androgen receptor knockout (ARKO) mouse では膀胱癌の発生が全く認められなかった。さらに、ARKO mouse に dihydrotestosterone (DHT) を投与することにより癌の発生率は 25 % に増加した。また Xenograft モデルでも small-interfering RNA により AR の signal をブロックすることにより、腫瘍の増殖を抑制した (Miyamoto, H. et al, 2007)。しかし、膀胱癌は以前から hormone-independent な悪性腫瘍と考えられており、androgen 非依存性を支持する考えとして AR の発現と膀胱癌の関連性を否定する報告が出ているが (Mir, C. et al, 2010)、それらは単に膀胱癌組織の免疫組織染色における AR の発現量と膀胱癌の予後に関する検討であり、AR signal と膀胱癌進展を否定するには至らないと考えられる。我々の予備的研究では進行性膀胱癌には androgen 依存性を示唆する症例が多く存在することから本研究を行う。

2. 研究の目的

我々は、これまでに化学発がんモデルを用いたがん研究を行ってきたが、それにプロトオミクスの技術を組み合わせることにより膀胱癌関連分子を検索しており、いくつかの新規癌関連蛋白を同定している。それらの中で、男性ホルモン代謝経路に関わる steroid sulfatase (STS) が膀胱癌の進行に関与することを示唆する実験結果を得たので、これまでに報告された知見を踏まえさらに研究を進めることとした。「Androgen 及びその代謝経路関連酵素は膀胱がんの進展を正に制御する」との仮説の下、本研究では、膀胱癌におけるホルモン感受性、特に STS の作用を *in vitro*, *in vivo* で明らかにし、さらに STS の inhibitor である 667 coumate の抗腫瘍効果を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 膀胱がんに対して手術を行った臨床検体を用い、STS の免疫組織染色における発現と臨床パラメーター (病理学的深達度、組織学的異型度、予後) との相関を検討する。

(2) 膀胱癌細胞株における STS の発現および機能解析を行う。

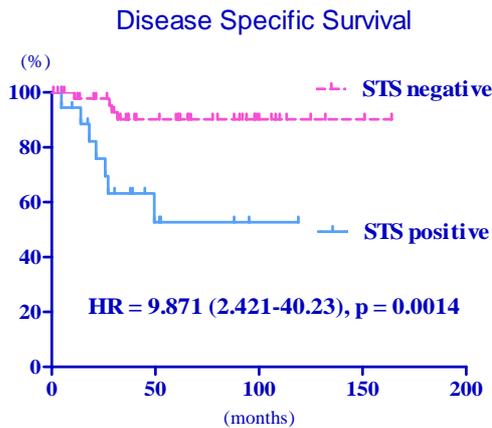
異なる膀胱がん細胞株における AR, STS の基礎発現を評価したのちに STS inhibitor 投与による表現型 (増殖能、遊走能および浸潤能) の変化を検討する。loss of function assay を行い毒性および遊走能、浸潤能の変化を検討する。

(3) 浸潤性膀胱がん細胞株において STS のノックダウンを行った後に mRNA を抽出し、real-time RT PCR により、上皮間葉系移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition、以下 EMT) 関連遺伝子の変化を検討する。さらに cDNA マイクロアレイによる網羅的解析を行い、STS が膀胱がんの進展、特に EMT に関与しているか検討する。

(4) *In vivo* xenograft model を用い、STS inhibitor (667 coumate) の治療効果を評価する。

4. 研究成果

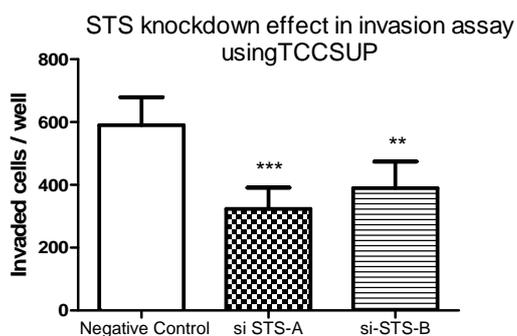
(1) 根治的膀胱全摘術を施行した 68 例の免疫組織染色を行った結果、膀胱癌の病理学的深達度および組織学的異型度と STS の発現に関して正の相関を得た。さらに、無再発生存率や癌特異生存率に関しても、STS の発現は有意な予後予測因子であることが明らかとなった。多変量解析では、癌特異生存率に関して STS は独立した予後予測因子であることが明らかとなった。



(2)

膀胱癌細胞株(TCCSUP, T24, UMUC3)の mRNA および蛋白レベルでの STS の発現量を測定し、各細胞株の浸潤能と STS の発現は正に相関する傾向が認められた。そこで、STS の inhibitor である 667 coumate による毒性、浸潤およびアポトーシスに対する効果を確認した。相対的に発現量の高かった TCCSUP、T24 に対して 667 coumate を投与して細胞増殖能を評価したところ、TCCSUP では濃度依存的に抑制効果が認められたが、T24 では有意な増殖抑制効果を認めなかった。

アンドロゲンレセプター(AR)の発現を定量評価したところ、TCCSUP では mRNA、蛋白レベルいずれにおいても AR の発現が認められたことに対し、T24 では AR は無～低発現であった。STS inhibitor である 667 coumate が TCCSUP では増殖抑制効果を認めたことに対して T24 ではその効果が認められなかったことと併せると、STS の機能は少なくとも部分的には AR を介して作用している可能性が示唆された。さらに、STS ノックダウンにより TCCSUP、T24 とともに遊走能・浸潤能が有意に低下することが認められた。加えて、細胞増殖能には有意な変化が認められなかった



ことから、STS は細胞増殖よりもむしろ上皮間葉系移行(EMT)に関連していることが示唆された。

(3)浸潤性膀胱がん細胞株である T24、TCCSUP いずれにおいても STS ノックダウンにより E-cadherin の発現が増加し、vimentin, ZEB1 の発現が低下する傾向が認められた。一方 cDNA マイクロアレイによる網羅的解析では、その他遊走・浸潤関連分子特異的な変化は認められなかった。

(4) TCCSUP xenograft model(2 million cells/tumor, 10 mg/kg BW, 5 days/week, 6 week treatment)において STS inhibitor である 667 coumate の抗腫瘍効果を検討したが、溶媒対照群に比較して治療群で有意な腫瘍縮小効果は得られなかった。

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 3 件)

山田貴宣、魏民他、スナネズミにおけるヘリコバクターピロリ誘発胃炎に対する raphanobrassica の抑制効果、Food Chem Toxicol, 査読有、vol.70, 2014, pp.107-113

DOI: 10.1016/j.fct.2014.04.037

加藤実、魏民他、マウス膀胱発がんにおけるタバコ主流煙曝露の修飾効果に対する検討、journal of toxicologic pathology、査読有、vol.26、No.4, 2013,pp.447-51.

DOI: 10.1293/tox.2013-0039

加藤実、魏民、山野壮太郎、梯アンナ、玉田聡他、DDX39 は膀胱癌の浸潤抑制因子である、cancer science、査読有、vol.103、No.7, 2012,pp.1363-1369.

DOI:10.1111/j.1349-7006.2012.02298.x.

[学会発表](計 3 件)

玉田聡、転移性腎癌に対する分子標的薬の治療成績-我々は薬剤を適正に使用できるようになったのか、第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014 年 4 月 26 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

加藤実、Steroid Sufatase は膀胱がんの予後予測因子である、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日、ロイトン札幌(北海道・札幌市)

魏民、BBN 誘発マウス膀胱発がん過程におけるがん幹細胞関連タンパク質の発現、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日、ロイトン札幌(北海道・札幌市)

〔図書〕(計1件)

加藤実、魏民、文光堂、腫瘍病理識別診断アトラス、2012年、pp.237-244

6. 研究組織

(1)研究代表者

玉田 聡 (Tamada, Satoshi)
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・
講師
研究者番号：20382179

(2)研究分担者

魏 民 (Wei, Min)
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・
准教授
研究者番号：70336783

加藤 実 (Kato, Minoru)
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・
登録医
研究者番号：30711684