

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791633

研究課題名(和文)膀胱癌前癌病変におけるTXNIP-ARRB2経路を介した細胞膜情報伝達制御の解明

研究課題名(英文)The role of TXNIP-ARRB2 pathway in bladder carcinogenesis

研究代表者

高岡 栄一郎(Takaoka, Ei-ichiro)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50625340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：レドックス関連因子であるthioredoxin interacting protein(TXNIP)の膀胱発癌における役割を解明することを目的に、BBNマウス膀胱発癌モデルによる検討やTXNIPノックアウトマウスの膀胱における免疫組織学的検討ならびにタンパク発現解析、さらに表在性、浸潤性膀胱癌細胞株を用いたタンパク、遺伝子発現解析を行った。その結果からTXNIP-ARRB2経路はE-cadherinの発現調整を通じて膀胱発癌、浸潤に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Results from the phenotype of BBN induced bladder carcinogenesis model, protein and gene expression analysis of bladder cancer cell lines, and results from protein expression analysis and immunohistochemical study in TXNIP knock out mice. We suggest that TXNIP-ARRB2 pathway related to bladder carcinogenesis, invasion through the expression adjustment of E-cadherin.

研究分野：泌尿器科学

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：TXNIP EMT E-cadherin Bladder cancer

1. 研究開始当初の背景

一般に細胞は外界からの刺激を細胞膜を通じて細胞内に伝達し、特有の機能を発揮すると考えられている。細胞膜構成成分であるイノシトールリン脂質やその集合体である脂質ラフトは近年の研究からシグナル伝達の重要な中継点であり、それらの部位での構造変化やタンパクの結合が細菌感染や発癌にかかわるとされているが、細胞質内とのシグナル伝達調整機構は明らかでなく、その機序を解明することは疾患の発症機序の解明につながり、新規治療法、診断、予防法の開発につながると考えられる。これまでの我々の研究から、レドックス関連因子である thioredoxin interacting protein (以下 TXNIP) が膀胱発癌抑制に深くかかわっており、TXNIP-KO マウスでは膀胱発癌が促進する事を見出した。この過程で、膀胱発癌早期から間質にて分泌される増殖因子 SDF1 が増加し、SDF1 が G タンパク共役 7 回膜貫通型受容体である CXCR4 と結合し、ERK を活性化することで膀胱発癌を調節していることも明らかにした。一方、我々は TXNIP が scaffold タンパクである β arrestin2 (以下 ARRB2) の蛋白レベルでの発現制御をすることを見出している。また、最近の研究から、CXCR4 の活性化により G タンパク質の α サブユニットが脂質ラフト領域に移行することで細胞増殖調整が行われているということが明らかになっており、我々の研究も合わせると、TXNIP-ARRB2 経路とのクロストークの可能性が示唆される。また、細胞膜構成成分であるイノシトールリン脂質代謝酵素の活性異常は癌などの様々な病変を引き起こすが発癌早期における役割については未だ不明な部分が多い。そこで、膀胱発癌をモデルとして、TXNIP-ARRB2 経路と脂質ラフトやイノシ

トールリン脂質代謝といった細胞膜情報制御機構のクロストークの解明が膀胱発癌機構の解明につながり、その知見をもとに新規の治療、診断法ならびに発癌予防法を確立できるのではないかという着想にいたったのが本研究の背景である。

2. 研究の目的

- (1) 膀胱癌細胞株を用いて TXNIP-ARRB2 経路と脂質ラフトおよびイノシトールリン脂質代謝系の関係について解析する。
- (2) TXNIP-KO マウスを用いた BBN 発癌実験によって in vivo で証明する。
- (3) 尿路上皮癌臨床検体において上記シグナル変化の相関について明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 膀胱癌細胞株を用いた TXNIP-ARRB2 経路と脂質ラフトおよびイノシトールリン脂質代謝系のクロストーク

① 脂質ラフトの質的解析

まず、各種膀胱癌細胞株ならびに TXNIP を強制発現させた膀胱癌細胞株を用いて細胞膜表面の脂質ラフトの分布を免疫細胞染色によって調べる。次に、ラフト構成タンパク (Cavelonin1, Cavelonin2, Flotillin1) をそれぞれの検体で RNAi によって発現抑制し、その結果を解析することで脂質ラフトの質的变化について解析する。

② 脂質ラフトの機能的解析

脂質ラフト阻害剤を膀胱癌細胞株、TXNIP 強制発現の膀胱癌細胞株に処理した後、増殖因子である SDF1 をそれぞれに加え、細胞増殖を評価することで脂質ラフトの機能的解析を行う。

③ イノシトールリン脂質代謝系の質的解析

イノシトールリン脂質代謝系を構成する

タンパクの発現および下流分子の評価を行う。

(2) TXNIP-KO マウス用いた BBN 発癌実験

① 脂質ラフトの解析

TXNIP-KO マウスを用いた BBN 発癌モデルにおいてそれぞれの検体の脂質ラフトの発現、ならびにラフト構成タンパクの発現を解析し、膀胱発癌における脂質ラフトの関与、ならびに TXNIP-ABBR2 系の脂質ラフトに与える影響について *in vivo* で解析する。

② イノシトールリン脂質代謝系の解析

TXNIP-KO マウスを用いた BBN 発癌モデルにおいてそれぞれの検体の PIP, PIP2, PIP3 発現、ならびに Kinase の発現を解析し、膀胱発癌におけるイノシトールリン脂質代謝系の関与、ならびに TXNIP-ABBR2 系の同系に与える影響について *in vivo* で解析する。

(3) 尿路上皮癌臨床検体において上記シグナル変化の相関について明らかにする。

特に、肉眼的には明らかな腫瘍ではないが蛍光色素 5ALA にて陽性となる組織や上皮内がんといった発癌早期の腫瘍における発現解析を行う。

4. 研究成果

(1) 膀胱癌細胞株における TXNIP 発現解析

ヒト正常膀胱上皮細胞株である HUC、表在性膀胱癌細胞株である RT112、RT4 ならびに浸潤性膀胱癌細胞株である 253J、T24 における TXNIP 発現について、RT-PCR 法による mRNA ならびに Western blot 法によるタンパク発現解析を行ったところ mRNA、タンパクともに表在性膀胱癌細胞株において 発現亢進を認めた (図 1, 2)。これらの結果から TXNIP は膀胱癌の発癌早期にかかわる分子である可能性が示された。



図 1 正常尿路上皮細胞株、各膀胱癌細胞株における TXNIP のタンパク発現

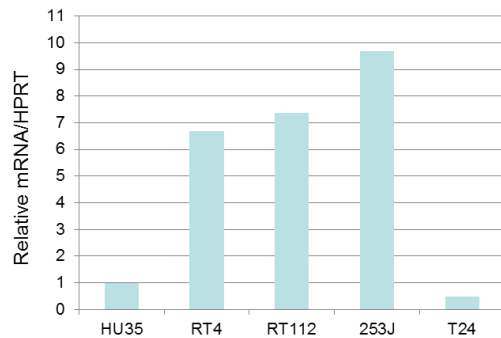


図 2 正常尿路上皮細胞株、各膀胱癌細胞株における TXNIP の mRNA 発現

次に、これらの細胞株に lipofectamine を用いた transfection による TXNIP 強制発現株の樹立を試みたが発現効率が悪く、樹立できなかった。

(2) TXNIP-KO マウス用いた BBN 発癌実験ならびに *in vivo* 発現解析

TXNIP-KO マウスを用いた BBN 発癌実験において当初予想された BBN 摂取 4 週後の早期発癌の差が phenotype として見いだされなかったが BBN 摂取 0 週時点での尿路上皮形態が異なることが見いだされた (図 3)。

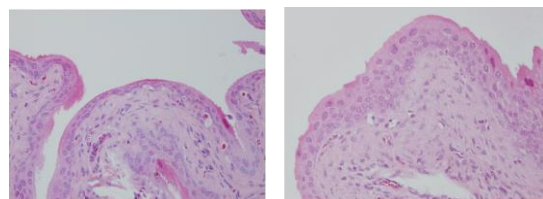


図3 尿路上皮形態の差(左 TXNIP w/t, 右 TXNIP k/o) TXNIP k/oにおいて尿路上皮の肥厚を認める。

この結果から、TXNIPはin vivoにおいても膀胱発癌早期にかかわる分子である可能性が考えられた。さらなる発癌機序の検索のためこれらの組織を網羅的に免疫染色したところTXNIP k/oマウスの尿路上皮において上皮間葉転換(EMT)マーカーであるE cadherinの発現低下が示された(図4)。さらにWestern blot法によるタンパク発現解析でもTXNIP k/oマウスの膣、直腸上皮においてE cadherinの発現低下が示された(図5)。

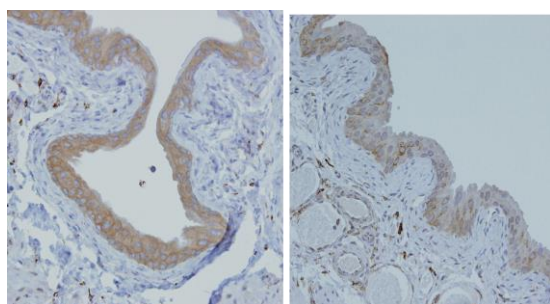


図4 マウス尿路上皮におけるE cadherinの発現(左 TXNIP w/t, 右 TXNIP k/o)



図5 マウス直腸、膣におけるE cadherinタンパク発現(左から TXNIP w/t 直腸、TXNIP k/o 直腸、TXNIP w/t 膣、TXNIP k/o 膣)

以上よりTXNIPはE cadherinの発現調整を行うことで膀胱発癌に関与している可能性が示唆された。同時に尿路上皮癌においてもTXNIPの上皮間葉転換(EMT)への関与が示唆され、これらは新規の知見である。今後、

TXNIP k/oマウス組織検体や膀胱癌細胞株におけるARRB2発現を解析することで、TXNIP-ARRB2経路とEMTのクロストークについての検討をすすめていきたい。さらにはレンチウイルスベクターを用いたTXNIP強制発現細胞株を樹立することで、EMTの上流、下流分子の発現変化についても検討していきたい。

(3) 5ALA 蛍光内視鏡による膀胱粘膜生検

倫理委員会での承認を得たうえで5ALA 蛍光内視鏡による膀胱粘膜生検を行い、上皮内癌(CIS)の検出感度、特異度を従来法である白色光膀胱粘膜生検と比較した。その結果は表1, 2に示すように白色光では上皮内癌検出感度28%、特異度93%に対し、5ALA 蛍光内視鏡では感度64%、特異度86%と感度において有意差(p=0.011)を認めた。

	白色陽性	白色陰性	合計
CIS陽性	7	18	25
CIS陰性	12	151	163
合計	19	169	188

表1 白色光膀胱粘膜生検結果

	蛍光陽性	蛍光陰性	合計
CIS陽性	16	9	25
CIS陰性	22	141	163
合計	38	150	188

表2 5ALA 蛍光内視鏡膀胱粘膜生検結果

これらの結果から、5ALA 蛍光内視鏡の臨床的有用性が示された。今後は、今回の検討で得られた臨床検体を用いて膀胱癌発癌早期における5ALA代謝に関連したヘム代謝系シグナル変化の解析ならびにこれら5ALA代謝

系と今回我々が見出した TXNIP による E cadherin 発現調整の関係を分子生物学的に証明していきたいと考えている。

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)

[学会発表] (計 1 件)

① 高岡 栄一郎、筑波大学における膀胱癌に対する光力学的診断の初期成績、第 98 回日本泌尿器科学会茨城地方会、2014 年 2 月 2 日、つくば国際会議場、茨城県つくば市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高岡 栄一郎 (TAKAOKA, Ei-ichiro)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50625340