

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462476

研究課題名(和文) マウスモデルを用いた膀胱癌に対するperiostin膀胱内注入療法の開発

研究課題名(英文) Badder instillation treatment of periostin in a mouse orthotopic model of bladder cancer

研究代表者

金 哲将 (Kim, Tetsusyo)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10204968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Periostinは細胞外マトリックスタンパク質で、細胞間の接着機能に関与している。我々は、マウス膀胱癌同所性モデルを用いて、periostinの膀胱癌での機能解析を行った。経尿道的にヒト膀胱癌細胞UMUC-3をヌードマウス膀胱に注入し、形成された膀胱腫瘍を病理学組織学的に検討すると、コントロール細胞では筋層浸潤が確認できるが、periostin導入細胞では筋層浸潤は確認できず、粘膜下に浮腫状の組織が形成されていた。メカニズムについて検討したところ、Periostinは、PDK1/Akt/mTORシグナル伝達経路を介して膀胱癌の浸潤能を抑制することを確認できた。

研究成果の概要(英文)：Periostin is an extracellular matrix protein involved in the regulation of intercellular adhesion. We investigated the in vivo tumor suppressor function of periostin in a mouse orthotopic model of bladder cancer. Vector-control UMUC-3 bladder tumors had histological evidence of muscle invasion. However, the periostin-expressing UMUC-3 bladder tumors did not reveal muscle invasion with thick edematous lesions in the submucosa. Phosphorylation of PDK-1, Akt, and S6 ribosomal protein was decreased in periostin-expressing UMUC-3 cells compared with vector-control cells. Treatment with 100 ng/mL recombinant human periostin protein also suppressed cell invasiveness and phosphorylation of PDK-1, Akt, and S6 in UMUC-3 cells. Periostin suppresses in vivo and in vitro invasiveness of bladder cancers via the PDK1/Akt/mTOR signaling pathway. Periostin have utility as a potent chemotherapeutic agent by suppressing bladder cancer invasiveness.

研究分野：泌尿生殖器癌

キーワード：Periostin 膀胱癌 膀胱内注入療法 浸潤能

1. 研究開始当初の背景

我々は、癌化抑制に関与する遺伝子を網羅的にクローニングし、新規の癌抑制遺伝子を見出し、その中で periostin に注目した。Periostin は骨膜・歯根膜などの機械的圧ストレスの加わる部位に高発現し、骨や歯の発生・構造維持に重要な働きをする遺伝子として最初見出された。また、心臓の弁にも高発現し心不全との関連が注目されている。癌領域では、癌の浸潤・転移に重要な働きをすることが明らかになり、上皮間葉転換(EMT)との関連を含め種々の癌で解析が進められている。我々は、泌尿器臓器で機械的圧ストレスの加わる臓器に発生する膀胱癌と periostin の関連を検討し以下の結果を報告してきた。

膀胱癌の悪性化に伴い periostin mRNA の発現が著しく低下し、ヒト膀胱癌細胞株に periostin 遺伝子を導入すると、細胞増殖能・造腫瘍活性に影響を与えることなく浸潤・転移を抑制する。

免疫組織学的に periostin の発現を検討すると、正常膀胱では粘膜上皮直下に periostin はベルト状に高発現し、膀胱癌組織ではこの構造が消褪する。

この浸潤・転移抑制活性には、periostin C 末端領域が重要である。

periostin C 末端領域には alternative splicing が存在することより、splicing と癌化との関連を検討したところ、wild-type から spliced variant への変換が癌化に重要であることを見出した。また、実際の膀胱癌組織から spliced variant の分離を試みたところ、exon 16, 17, 20 が splicing した Variant I と exon 16, 20 が splicing した Variant II を同定し、膀胱癌組織での発現はほとんど Variant I であった。ヒト膀胱癌細胞に wild-type, Variant I, Variant II を導入し細胞浸潤能を検討したところ、wild-type で見られる抑制作用が、Variant I では消失し、Variant II では維持されていた。この結果は、膀胱癌組織から分離される Variant がほとんど Variant I であることに合致するとともに、わずかな、スプライシングパターンの違いが浸潤抑制機能に影響を与えることを示していた。

プロテオミックスの手法を用い periostin と結合する蛋白質として、ストレス応答 MAP キナーゼシグナル伝達に関与する TAK1 (transforming growth factor-activated kinase 1) の活性化因子である TAB1 (TAK1 binding protein 1) を同定し、periostin の浸潤・転移抑制機構に重要な働きを担っていた。

膀胱癌細胞に periostin を導入すると Akt

のリン酸化が抑制され、E-cadherin の発現が増強することより、浸潤抑制機能に EMT が関与していた。

本研究では、これまでに成果を踏まえて、periostin の膀胱癌治療への応用を検討する。

2. 研究の目的

本研究の学術的な特徴の第一は、マウス同所性膀胱癌モデルを用いて、periostin の膀胱癌に対する浸潤抑制機能・造腫瘍活性に解析を加えることである。

筋層非浸潤膀胱癌に対しては、手術治療として経尿道的膀胱腫瘍切除術(TURBt)が行われるが、約 50%の膀胱内再発が問題となっている。そのため術後抗癌剤や BCG 等の薬剤を膀胱内注入療法として用い再発予防が図られているが満足いく結果は得られていない。

マウス同所性膀胱癌モデルは、膀胱癌細胞をトリプシン処理したヌードマウス膀胱に経尿道的に注入し、膀胱腫瘍を作製し解析を加えるものである。この系は、筋層非浸潤膀胱癌に対して行われる TURBt 時の、癌細胞の術中膀胱内播種に伴い膀胱内に術後異所性に再発するメカニズムのモデルの一つになると考えている。Periostin が膀胱癌の浸潤能を抑制し、EMT のコントロールに関わっていることに加え、正常膀胱では粘膜下にベルト状に強発現している periostin 蛋白が、癌組織ではこの構造が消失することを踏まえ、TURBt 後の再発予防に利用できないか検討を加えることは、新たな治療法の可能性に対して重要なデータを提供すると期待できる。

Periostin は、Akt のリン酸化を抑制し E-cadherin の発現を増強することにより EMT を誘導し細胞浸潤能を抑制することを報告してきたが、その他のシグナル伝達経路との関係は明らかではない。Periostin とシグナル伝達経路との関係を明らかにすることは、種々の伝達経路の阻害剤が作製されている現在、新たな癌の治療法を開発するにあたり重要なデータが得られると考えられる。

3. 研究の方法

periostin 導入細胞の作製

ヒト膀胱癌細胞株である UMUC-3 細胞にレトロウイルスベクターのシステムを用いて、ベクターだけの UMUC-3-pCX 細胞と periostin を導入した UMUC-3-peri 細胞を樹立する。Periostin の発現は、RT-PCR 法と Western blotting (WB)法で確認する。

マウス同所性膀胱癌モデル

雌ヌードマウスを用い、経尿道的に膀胱内にカテーテルを挿入し、膀胱粘膜をトリプシン処理したのちに、ヒト膀胱癌細胞 UMUC-3 細胞を 5×10^6 個膀胱内に注入し 3 時間保持させる。4 週後に腫瘍形成を比較、病理組織学的にも検討を加える。腫瘍形成の大きさに

関しては、摘出膀胱の重量を測定し、比較検討する。腫瘍の浸潤能に関しては、病理組織学的に筋層浸潤の有無で判定する。

まず、注入細胞として、UMUC-3-pCX と UMUC-3-peri 細胞を用いて、造腫瘍活性・浸潤活性に対する periostin の働きを検討する。つぎに、腫瘍細胞を経尿道的に膀胱内に注入するさい、periostin 濃度を 0, 100ng/mL に設定し、periostin の抗腫瘍活性を検討する。

ヌードマウスでの造腫瘍活性

ヒト膀胱癌細胞を 3×10^6 個皮下に接種し 3 週間後に造腫瘍活性を判定する。その後腫瘍を摘出し、重量の測定、病理組織学的検討を加える。

細胞増殖活性

In vitro の実験系では、直径 35mm の培養用シャーレに 2×10^4 個の細胞を播き、培養をスタート。1-2 日間隔で細胞数をカウントし、増殖曲線で比較検討する。

病理組織標本を用いた検討では、HE 標本を 400 倍でランダムに 3 箇所顕微鏡で観察し、分裂像の数をカウント、mitotic activity index を算出し比較検討する。

細胞浸潤活性

In vitro の系で、Matrigel basement membrane matrix invasion chamber (BD Bioscience, Bedford, MA) を用いて検討した。

periostin とシグナル伝達経路との関係の解析

シグナル伝達経路との解析には、WB 法により解析を加えた。EMT との関連においては、E-cadherin, Snail, Twist に対する抗体を用いた。つぎに mTOR シグナル伝達系との関連においては、PI3K, PDK1, Akt, S6 に対する抗体と、これに対応するリン酸化抗体を使用した。

結果を検証するにあたっては、阻害剤 Akt inhibitor (0, 10, 25 μ M), UNC-01 (0, 0.1, 1.0 μ M), rapamycin (0, 5, 20nM) を用いて、in vitro で細胞を処理する系を用いた。

統計学的有意差の検証

Student's t-test, Fisher's exact probability test を用いた。p<0.05 をもって有意差ありと判定した。

4. 研究成果

periostin は、in vitro での細胞浸潤能を抑制する。

ヒト膀胱癌細胞 UMUC-3 細胞にレトロウイルスベクターのシステムを用いてベクターのみ細胞 (UMUC-3-pCX) と periostin を導入した細胞 (UMUC-3-peri) を樹立し、RT-PCR 法と WB 法により、periostin の発現を確認した。まず、細胞増殖活性には差は認めなかった。ヌードマウス皮下に細胞を接種したところ、

それぞれ接種した 3 匹のマウスにすべて皮下腫瘍が形成され、重量は UMUC-3-peri 0.56 ± 0.31 g、UMUC-3-pCX 0.46 ± 0.26 g で差を認めず (p=0.691)、造腫瘍活性に差を認めなかった。In vitro の細胞浸潤能ではコントロールに比べ UMUC-3-peri 細胞では、著明に浸潤能が抑制されていた。

Periostin は、細胞増殖活性、造腫瘍活性に影響することなく、in vitro での細胞浸潤能を抑制することが確認できた。

periostin はマウス同所性膀胱癌モデルで in vivo の細胞浸潤能を抑制する。

UMUC-3-pCX (7 匹, group A)、UMUC-3-peri (9 匹, group B) をヌードマウス膀胱に経尿道的に注入し造腫瘍活性、浸潤活性を検討した。4 週後の膀胱摘出時のマウス重量に差を認めなかった (p=0.335)。膀胱重量は、group A が 61.7 ± 20.0 mg、group B が 39.4 ± 11.0 mg で有意に periostin 導入細胞の方が軽く (p=0.013)、腫瘍重量が小さいと考えられた。腫瘍形成は、group A 85.7% (6/7)、group B 55.6% (5/9) で有意差を確認できなかった (p=0.455)。病理組織学的に形成腫瘍を検討したところ、group A では、83.3% (5/6) に筋層浸潤が確認できたが、group B では 5 腫瘍すべてで筋層浸潤は確認できず、腫瘍粘膜下に浮腫状組織が存在し、癌の浸潤が抑えられている所見が確認できた。腫瘍が形成された膀胱のみの検討でも、膀胱重量は group A 66.7 ± 16.3 mg、group B 46.6 ± 9.7 mg で有意に periostin 導入細胞で軽い結果であった (p=0.039)。病理組織標本をもとにした mitotic activity index は両群間に差はなく増殖活性に差はないと考えられた。

Periostin は、マウス同所性膀胱癌モデルにおいて、増殖活性に影響することなく、浸潤活性、造腫瘍活性を抑えることが確認できた。

periostin は Akt/mTOR シグナル経路を介して活性を発現する。

まず、periostin と EMT との関連に着目し、WB 法により UMUC-3-pCX と UMUC-3-peri 細胞の間で E-cadherin, Snail, Twist の発現について比較検討したが、E-cadherin の発現は確認できず、Snail と Twist の発現に差を認めず、EMT との関連は確認できなかった。

つぎに、Akt/mTOR シグナル伝達系との関連を検討したところ、PDK1, Akt, S6 のリン酸化が、コントロールと比べて periostin 導入細胞で抑制されることが確認でき、periostin の活性発現に PDK1/Akt/mTOR シグナル伝達系が関与していることが確認できた。

リコンビナント periostin 蛋白 (r-periostin) 処理による検討。

UMUC-3 細胞を 100ng/mL r-periostin で処理したところ、細胞増殖活性に關与すること

なく細胞浸潤能を抑制することが確認できた。つぎに、WB法により、PDK1/Akt/mTORシグナル伝達系との関連を検討したところ、PDK1, Akt, S6のリン酸化の抑制が確認できた。これらの結果は、レトロウイルスベクターの系で遺伝子導入した結果と合致するものであった。

PDK1/Akt/mTORシグナル伝達系に対する阻害剤を用いた検証。

PDK1, Akt, mTORに対する阻害剤を用いて、これまでの結果に検証を加えた。それぞれの阻害剤で処理したサンプルを用いて、WB法でPDK1, Akt, S6のリン酸化が抑えられ、細胞増殖能に影響することなく、濃度依存性に細胞浸潤能を抑制することを確認できた。

マウス同所性膀胱癌モデルでのr-periostinを用いた膀胱内注入療法の検討。

100ng/mL r-periostin処理で、細胞増殖活性に影響することなく、細胞浸潤能を抑制できることが確認できたことより、マウス同所性膀胱癌モデルを用いた、治療への応用に向けた検討を加えた。UMUC-3細胞を経尿道的に膀胱内に注入するさい、注入溶液のr-periostin濃度を0と100ng/mLに設定して実験を行った。0 ng/mLのコントロール群では7匹中5匹に腫瘍が形成され、膀胱重量は71.4±31.4mgであった。一方100ng/mLで注入した群では5匹中4匹に腫瘍が形成され、膀胱重量は54.1±24.9mgで両群間に差はなかった(p=0.332)。

腫瘍細胞膀胱内注入時にr-periostinを混ぜるだけの処理をおこなったが、有効な結果を得ることはできなかった。このことは、TURBt直後にアドリアマイシン系の抗癌剤を膀胱内に注入し、再発予防を図る直後単回膀胱内注入療法を想定したものであるが、結果として十分な効果を得ることはできなかった。

Periostinはin vitro, in vivoの系で、PDK1/Akt/mTORシグナル伝達経路を介して膀胱癌の浸潤能を抑制することを示すことができた。100ng/mL r-periostinでin vitroではあるが、著明な細胞浸潤の抑制効果が確認できたことより、治療への応用に向けた可能性があると考えている

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)

[雑誌論文](計 6件)

Kim CJ, Tambe Y, Mukaisho K, Sugihara H, Kawauchi A, Inoue H: Akt-dependent activation of Erk by cyclin D1b contributes to cell invasiveness and tumorigenicity. *Oncol Lett.* in press, 査読有り

<https://www.spandidos-publications.com/ol>

Kim CJ, Tambe Y, Mukaisho K, Sugihara H, Kageyama S, Kawauchi A, Inoue H: Periostin suppresses in vivo invasiveness via PDK1/Akt/mTOR signaling pathway in a mouse orthotopic model of bladder cancer. *Oncol Lett.* in press, 査読有り <https://www.spandidos-publications.com/ol>

Tambe Y, Hasebe M, Kim CJ, Inoue H: The drs tumor suppressor regulates glucose metabolism via lactate dehydrogenase-B. *Mol Carcinog.* 55: 52-63, 2016. 査読有り doi: 10.1002/mc.22258.

Kim CJ, Tambe Y, Mukaisho K, Sugihara H, Isono T, Sonoda H, Shimizu T, Kondih G, Inoue H: Female-specific rectal carcinogenesis in cyclin D1b transgenic mice. *Carcinogenesis* 35: 227-236, 2014. 査読有り doi: 10.1093/carcinog/bgt293.

Kim CJ, Kubota S, Murai R: Diagnostic criteria for stomal obstruction of tubeless cutaneous ureterostomy using 99mTc-mercaptoacetyl triglycine (MAG3) diuretic renography. *Korean J Urol.* 54: 322-326, 2013. 査読有り doi: 10.4111/kju.2013.54.5.322.

Kim CJ, Sano T, Murai R: Evaluations for hydronephrosis after the establishment of tubeless cutaneous ureterostomy. *Korean J Urol.* 54: 168-171, 2013. 査読有り doi: 10.4111/kju.2013.54.3.168.

[学会発表](計 8件)

Tambe Y, Kim CJ, Inoue H: Effects of inhibitors for LDH and PDK4 on malignant phenotypes of mouse and human cancer cell lines. 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct 10, 2015, Nagoya.

Kim CJ, Tambe Y, Mukaisho K, Sugihara H, Kawauchi A, Inoue H: Periostin suppresses invasiveness and tumorigenicity via Akt/mTOR pathway in a mouse orthotopic model of bladder cancer. 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct 9, 2015, Nagoya.

金哲将, 旦部幸博, 河内明宏, 井上寛二: マウス膀胱癌同所性モデルを用いたperiostinの抗腫瘍効果の検討. 第103回日本泌尿器科学会総会. 2015年4月18日、金沢.

Tambe Y, Inoue H, Kim CJ: Role of the drs tumor suppressor for regulation of

glucose metabolism via LDH-B and malignant transformation. 73th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sep 26, 2014, Yokohama.

Kim CJ, Tambe Y, Mukai-sho K, Sugihara H, Kawachi A, Inoue H: Activation of Akt contributes to the rectal tumorigenesis in cyclin D1b transgenic mice. 73th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sep 26, 2014, Yokohama.

金 哲將, 旦部幸博, 河内明宏, 井上寛二: 膀胱癌細胞に対して細胞浸潤促進活性を有する cyclin D1b variant の oncogenic potential の検討. 第102回日本泌尿器科学会総会. 2014年4月24日, 神戸.

旦部幸博, 金 哲將, 向所賢一, 杉原洋行, 井上寛二: cyclin D1b トランスジェニックマウスにおける雌特異的直腸腫瘍発生の分子機構. 第36回日本分子生物学会年会. 2013年11月30日, 神戸.

Kim CJ, Tambe Y, Mukai-sho K, Sugihara H, Inoue H: Molecular mechanism of female-specific rectal carcinogenesis in cyclin D1b transgenic mice. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct 4, 2013, Yokohama.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 哲將 (KIM Tetsusyo)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：10204968

(2) 研究分担者

井上 寛一 (INOUE Hirokazu)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30176440

(3) 連携研究者

()

研究者番号：