

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462485

研究課題名(和文)膀胱尿路上皮癌細胞の生存・増殖・遊走・浸潤における脂肪組織の役割とその制御機構

研究課題名(英文) Interaction between urothelial carcinoma and adipose tissue in survival, proliferation, migration, invasion

研究代表者

魚住 二郎 (Jiro, Uozumi)

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30223514

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)：脂肪組織由来線維芽細胞(ATSCs)は、表在性膀胱癌細胞のアポトーシス促進、増殖抑制に働き、浸潤性膀胱癌細胞では増殖促進、アポトーシス抑制に働いた。MAPK pathwayやMMP-2,-7,-9が蛋白レベルでの発現亢進しており、上記の細胞動態中間因子の役割を示唆された。また癌-間質相互作用の関連因子は表在性膀胱癌では、ATSCsとの混合培養で、HER-2, COX-2, E-cadherin の発現が亢進した。浸潤性膀胱癌では、COX-2のみ混合培養で発現低下していた。表在性膀胱癌では、ATSCsが、HER-2をターゲットとする分子標的治療に効果的なことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The adipose tissue stromal cells (ATSCs) suppress the progression of superficial urothelial carcinoma through their growth inhibition and apoptosis promotion, whereas ATSCs promote that of the invasive urothelial carcinoma through the enhancement of the growth and invasion, and the apoptosis prohibition. ATSCs had no effect on the invasion of superficial types, whereas they promoted the invasion of invasive types. ATSCs promoted the expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in all cancer cell types. Superficial type could not invade into gel with ATSC, which promoted invasion and MAPK molecules. ATSC-induced MAPK pathway activation plays differential roles in biological behavior of superficial and invasive types. MMP-2, MMP-7 and MMP-9 are critical for the invasion of invasive type under cancer-stromal interaction.

研究分野：泌尿器科

キーワード：表在性膀胱癌 浸潤性膀胱癌 脂肪組織 癌-間質相互作用 MAPK MMP COX-2 HER-2

1. 研究開始当初の背景

膀胱はその周囲に豊富な脂肪組織を有するが(膀胱特異的脂肪組織)、その生理的な役割や意義の詳細は不明である。近年、膀胱癌(尿路上皮癌)の発症リスクと皮下、内臓脂肪組織の増加を基盤とする肥満との関連が疫学的に示唆されているが(Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 17:1214-21, 2008)、脂肪組織が膀胱癌にどのような影響を与えているか、その詳細は不明である。一般に、膀胱癌は尿路上皮内で発生し、上皮結合組織筋層 膀胱周囲脂肪組織へと浸潤する(図 1)。それ故に、脂肪組織が膀胱癌細胞の生存、増殖、遊走、浸潤、転移に活発に影響していると予想される。しかし、膀胱周囲、皮下、内臓脂肪組織が膀胱癌細胞に与える直接的な影響を解析した研究は国内外にはなく、その詳細は不明である。これまで、脂肪組織を培養することは困難であった。我々は初めて脂肪組織のコラーゲン・ゲル器官培養系を確立し、脂肪組織の長期維持、脂肪酸、アディポカイン産生を見出した(Sonoda, Toda et al. Endocrinology 149:4794-98, 2008)。さらに、尿細管上皮や心筋細胞-脂肪組織解析モデルを考案し、脂肪組織が尿細管上皮の極性化、機能分化、グリコーゲン産生を促進し、細胞死を抑制すること(Udo, Uozumi et al. Kidney Int 78:60-8, 2010) や、心筋細胞に脂肪毒性(脂肪滴蓄積・細胞死促進、機能分化抑制)を誘導することを見出した(Anan, Toda et al. Endocrinology 152:1599-605, 2011)。以上により、脂肪組織が膀胱癌細胞に与える直接的な影響を解析することが初めて可能となった。

我々が考案した膀胱癌細胞-脂肪組織解析モデル(図 3)を用いた本研究により、膀胱癌における脂肪組織の役割とその制御機構の解明や新規分子標的治療薬の開発が期待できる。以上の背景に基づいて、膀胱尿路上皮癌細胞の生存、増殖、遊走、浸潤における脂肪組織の役割とその制御機構を解明する本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、膀胱尿路上皮癌細胞-脂肪組織(膀胱周囲、皮下、内臓)解析モデルを用いて、以下の点を明らかにする。

- 1)上記 3 種類の脂肪組織が、膀胱癌細胞のアポトーシス、増殖、遊走、浸潤に与える影響とその相違を解明する。
- 2)上記 1)の現象を仲介する分子基盤を解明する。標的分子として、アディポカイン、脂肪酸、脂肪酸輸送分子、アディポソーム(Adiposome)、酸化ストレス・小胞体ストレス分子、細胞内情報伝達分子を解析し、脂肪

組織誘導性の膀胱癌の細胞動態制御因子を明らかにする。

3. 研究の方法

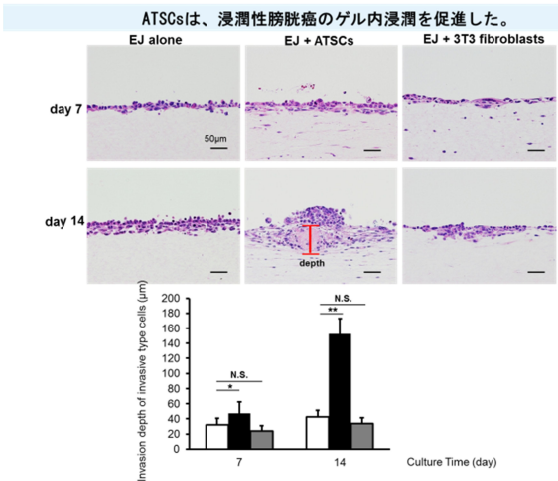
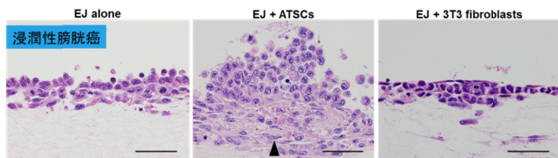
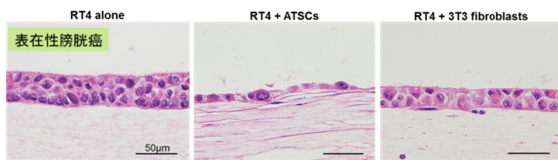
1 尿路上皮癌細胞:RT4(非浸潤型)、EJ(浸潤型)及び手術材料の膀胱癌より単離した尿路上皮癌細胞(学内倫理委員会の認可症例)を用いる。2 脂肪組織:6, 12 週齢マウス、ラット及び剖検例や膀胱全摘例のヒト膀胱周囲、皮下、内臓脂肪組織(学内倫理委員会の認可症例)を細切した脂肪組織片を用いる(文献 25, 26, 27, 35, 47)。

2)培養システム(魚住、徳田、戸田担当):膀胱癌細胞-脂肪組織解析モデルを用いる(図 3、文献 25-27, 35, 36, 47 を基盤に考案した)。外皿 [1] に、0.5-1 mm 径に細切した脂肪組織片(0.5 ml)を 5 ml の I 型コラーゲン・ゲル内に包埋し、1 日間培養する。同時に、底面がニトロセルロース膜から成る内皿 [2] に 1 ml のコラーゲン・ゲル層を作製し、そのゲル層上に癌細胞(10 万個)を播種し 1 日間培養する。その後、内皿 [2] を、外皿 [1] に入れて、培養する。対照は、癌細胞の単独培養である。脂肪組織が癌細胞に与える影響の特異性を検証するために、膀胱の間葉系細胞である線維芽細胞や平滑筋細胞の癌細胞に与える影響と比較検討する。即ち、外皿 [1] に線維芽細胞(3T3 細胞株、膀胱から単離した細胞)や平滑筋細胞(A-10 細胞株、膀胱から単離した細胞)を培養した系で、内皿 [2] に癌細胞を培養する。培養 1, 2, 3 週で、癌細胞-脂肪組織解析モデルで再現された現象を、ホルマリン及びグルタルアルデヒド固定切片、細胞から抽出した蛋白、遺伝子と細胞培養液を用いて、以下のように解析する。

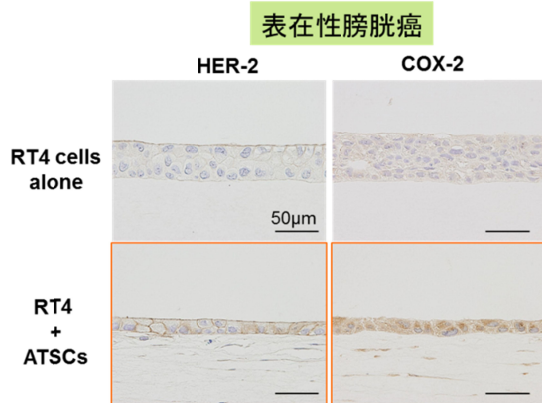
3)癌細胞の形態、生存、増殖の解析(魚住、徳田担当):癌細胞の形態をヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色、電顕で、アポトーシスを ssDNA の免疫染色で、増殖を 24 時間ウリジン(BrdU) 摂取率で、比較検討する。以上により、膀胱周囲、内臓、皮下脂肪組織が膀胱尿路上皮癌細胞の形態、生存、増殖に与える影響とその相違を解明する。

4. 研究成果

脂肪組織由来線維芽細胞(ATSCs)は、表在性膀胱癌細胞のアポトーシス促進、増殖抑制に働き、浸潤性膀胱癌細胞では増殖促進、アポトーシス抑制に働いた。



MAPK や MMP-2,-7,-9 が蛋白レベルで発現亢進しており、上記の細胞動態中間因子の役割を示唆さ



れた。癌 間質相互作用の関連因子は表在性膀胱癌では、ATSCs との混合培養で、HER-2, COX-2, E-cadherin の発現が亢進した。浸潤性膀胱癌では、COX-2 のみ混合培養で発現低下していた。表在性膀胱癌では、ATSCs が、HER-2 をターゲットとする分子標的治療に効果的なことが示唆された。

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)

1. Kawasaki-Nanri Maki, Aoki Shigehisa, Uchihashi Kazuyoshi, Yamamoto Mihoko, Udo Kazuma, Nishijima-Matsunobu Aki, Kakiyama Nahoko, Noguchi Mitsuru, Uozumi Jiro, Toda Shuji, Differential effects of adipose tissue stromal cells on the apoptosis, growth and invasion of bladder urothelial carcinoma between the superficial and invasive types, International Journal of Urology, 査読有, Volume23, Issue 6, 2016, 449-535
DOI:10.1111/iju.13086

[学会発表](計 7 件)

1. Nanri M, Udo K, Nishijima A, Uchihashi K, Aoki S, Noguchi M, Toda S, Uozumi J : Effects of adipose tissue stromal cells on apoptosis, growth and invasion of superficial and invasive type urothelial carcinomas of the bladder. AUA . 82.2014.5.18.Moderated Poster Session21. ORLANDO
2. Tobu S, Noguchi M, Mori K, Uozumi J : Changes of the suburothelial myofibroblasts in streptozotocininduced diabetes mellitus model rats. ICS-第44回国際コネクト学会 . 2014.10.20 - 24. Rio de Janeiro.
3. Nakao I, Tokuda Y, Kusumoto M, Tobu S, Udo K, Noguchi M, Enaida H, Hatano T, Uozumi J, : Intra Ocular Pressure Evaluation during Robot Assisted Laparoscopic Prostatectomy. 34th Congress of the Societe internationale D'Urologie, 2014.10.12-16.

4. Tokuda Y, Udo K, Tobu S, Kakinoki H, Nanri M, Kurata S, Ichibagase Y, Takahara K, Noguchi M, Uozumi J: Impact of initial PSA level on biochemical failure free survival(BFFS) following radical prostatectomy for the prostate cancer detected in community-based PSA mass screening program in Saga, Japan. . 34th Congress of the Societe internationale D'Urologie、2014.10.12-16.
5. 南里麻己：脂肪組織間質細胞と膀胱癌細胞の相互作用についての検討．第23回泌尿器科分子・細胞研究会．プログラム・抄録集 P 89．ホテルメトロポリタン山形．2014.3.14～15.
6. 南里麻己：脂肪組織間質細胞と膀胱癌との相互作用について．2014.4.24.総会賞応募ポスター .APP-164 第102回日本泌尿器科学会総会．
7. 南里 麻己、有働和馬 徳田雄二 西島亜紀 内橋和芳 青木茂久 野口満 戸田修二 魚住二郎. Adipose tissue stromal cells exert differential effects on the apoptosis, growth and invasion of bladder urothelial carcinoma between the superficial and invasive types. 第65回西日本泌尿器科学会総会．佐賀.2013.11.2

〔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

魚住 二郎 (JIRO UOZUMI)

「佐賀大学・医学部・客員研究員」

研究者番号：30223514

(2)研究分担者

戸田 修二 (SHUJI TODA)

「佐賀大学・医学部・教授」

研究者番号：80188755

徳田 雄治 (YUJI TOKUDA)

「佐賀大学・医学部・客員研究員」

研究者番号：90315200

野口 満 (MITSURU NOGUCHI)

「佐賀大学・医学部・教授」

研究者番号：00325648

(3)連携研究者

()

研究者番号：