

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25713055

研究課題名(和文) 種間新世代OMICSに基づく浸潤性膀胱癌新規動物モデルの開発

研究課題名(英文) Development of new animal model of invasive bladder cancer based on new generation OMICS analysis between species

研究代表者

小林 恭 (Kobayashi, Takashi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00642406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,700,000円

研究成果の概要(和文)：尿路上皮のKrt5またはUpk2発現細胞にlox-stop-loxシステムを用いて2種類のTP53点変異(R172H, R270H)を誘導し、さらに0.1%BBNを20週間投与したところ、それらの変異細胞を起源とする膀胱癌組織が得られた。各系統のマウス膀胱癌を病理組織評価および発現マイクロアレイで比較したところ、Krt5発現細胞にTP53点変異を誘導した場合に、扁平上皮分化を伴う筋層浸潤性膀胱癌を最も効率的に発生させることができ、それらがTCGA cluster 3に属するヒト膀胱癌に類似の腫瘍であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Upon administration of 0.1% BBN for 20 weeks after inducing two types of TP53 point mutations (R172H, R270H) in the urothelial cells expressing Krt5 or Upk2 by using the lox-stop-lox system, bladder cancer tissues originating from those mutant cells were obtained. Mouse bladder cancer tissues of each lineage were compared by pathological evaluation and expression microarray, and as a result, when TP 53 point mutation was induced in Krt5 expressing cells, muscle invasive bladder cancer with squamous differentiation, similar to human bladder cancer belonging to TCGA cluster 3, was generated most efficiently.

研究分野：泌尿器科

キーワード：膀胱癌 動物モデル 発癌

## 1. 研究開始当初の背景

膀胱癌による死亡者数は世界的にみて増加傾向にあり、本邦でも年間約 13,000 人が死亡しており、人口分布の高齢化に伴い、さらに罹患数・死亡数が増加することが予想される。膀胱に発生する悪性腫瘍の 95% は病理組織学的には尿路上皮癌に分類される。臨床的に問題となる筋層浸潤性膀胱癌 (病期分類 T2 以上) は経尿道的には完全切除が困難で、高率にリンパ節や他の臓器への転移を伴っており、予後不良である。筋層浸潤性あるいは転移性の膀胱癌は 5 年生存率がそれぞれ 50% および 20% と非常に予後が悪い (Stenzl, *Eur Urol.* 2011)。しかもこの治療成績は 20 年以上にわたって改善をみていない (Maase, *J Clin Oncol.* 2005)。この要因として、以下のようなことが挙げられる。浸潤性膀胱癌の発生には癌抑制遺伝子 TP53、RB1、PTEN、CDKN2A などの不活化が高率にみられる (Knowles, *Carcinogenesis.* 2006)。しかしこれらのがん抑制遺伝子単独の不活化ではマウスに膀胱癌を引き起こすことができないため、さらに他の発癌性イベントが必要であると考えられているが、詳細は未だによくわかっておらず発癌・進行の分子機構には未だ不明な点が多い。さらに、尿路上皮を形成する細胞には 3 つのサブタイプ、つまり最上層の umbrella cell、最下層の basal cell、そしてそれらの中間に位置する intermediate cell が存在するが、これらのうちの細胞が浸潤性膀胱癌の発生母地となるのかは不明である。近年、遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* 疾患モデルの重要性が飛躍的に高まっている。癌に限らず疾患を理解する上で、周囲組織との相互作用や生体内における drug delivery を考慮に入れることは必要不可欠であり、培養細胞を用いた実験系や腫瘍片皮下移植モデルを用いた薬剤の効果予測に限界があるのはこのためであるとも考えられている。しかしながら、ヒト浸潤性膀胱癌のマウスモデルは非常に限られており (Rosenberg, *Genes Dev.* 2009)、これが研究を進める上での大きな障壁となってきた。上述のごとく、浸潤性膀胱癌の発生にはいくつかの癌抑制遺伝子の不活化が深く関わっていると考えられている。遺伝子改変マウスを用いた膀胱癌マウスモデル作成に関しては、1) マウス膀胱上皮細胞で TP53、RB1、PTEN、CDKN2A などの癌抑制遺伝子を単独で不活化しても尿路上皮癌を誘導できない。2) 上記 4 種の癌抑制遺伝子のうち 2 種を同時に欠かさせた場合でも唯一 TP53 と PTEN の組み合わせが浸潤性膀胱癌を引き起こす (Puzio-Kuter *Genes Dev* 2009 23(6):675-80) 等の報告があげられる。しかし、ヒト浸潤性膀胱癌でみられる遺伝学的変化は両遺伝子の欠失ではなく TP53 は点突然変異、PTEN は発現の低下であるため、ヒト浸潤性膀胱癌にみられる遺伝学的イベン

ト、分子機構をより忠実に再現したマウスモデルの樹立が求められている。

## 2. 研究の目的

ヒト浸潤性膀胱癌の性質を忠実に反映した遺伝子改変マウスモデルの開発を行う。現在までの報告では単一遺伝子の改変モデルでは尿路上皮の過形成にとどまるのみである。TP53、PTEN の double knock out マウスでは浸潤性膀胱癌の作成に成功したが、ヒト浸潤性膀胱癌では TP53 の point mutation が主であり適切なマウスモデルとは言えない。以前より実験に用いられている BBN(N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine) 内服による化学発癌マウスモデルでは投与濃度、また投与期間の差により尿路上皮の過形成、異形成、上皮内癌、浸潤性膀胱癌と発癌タイプが変化し、ヒト膀胱癌の発生自然史を反映できていると考えられる。現在行われている治療成績改善への試みとして、マイクロアレイ遺伝子発現解析によるヒト浸潤性膀胱癌組織のクラスタ分析があり、これらは術前補助化学療法感受性などの臨床的性質の差異を反映している。BBN 投与により得られたマウス浸潤性膀胱癌組織に対してマイクロアレイ遺伝子発現解析によるクラスタ分析を用いてヒト膀胱癌のいかなるタイプを反映しているかを評価する。

## 3. 研究の方法

1) 前述の膀胱尿路上皮を構成する 3 種類の細胞のプロモーターである Upk2(umbrella cell)、または Krt5(intermediate ~ basal cell)によって Cre-ERT2 を発現する allele と lox-stop-lox RFP (LSL-RFP) を保持した allele を交配し、さらに Cre-loxP システムによりヒト浸潤性膀胱癌の 70% で認められる TP53 遺伝子点変異が発現する allele を交配させることにより得られるマウスに Tamoxifen を投与した後に BBN を内服させて化学発癌を誘導する。得られた膀胱癌組織で RFP が発現していれば TP53 遺伝子の点変異が誘導されていると考えられ、それらの浸潤性膀胱癌、また扁平上皮化の発生率の差を評価する。コントロールとして野生型マウス、TP53 遺伝子ヘテロ欠損をもつマウスへの BBN 投与も行う。

2) 1) で得られたマウス膀胱癌組織に対してマイクロアレイ遺伝子発現解析、また TCGA(The Cancer Genome Atlas) のヒト浸潤性膀胱癌に関するデータを基に作成された Gene set enrichment analysis (GSEA) によるクラスタ分析を行い、ヒト浸潤性膀胱癌のいかなるタイプを反映しているかを評価する。また、各クラスタ間で発現の差異を認める分子を同定し、今回の実験で得られたマウスが属するクラスタ内で今後の治療成績改

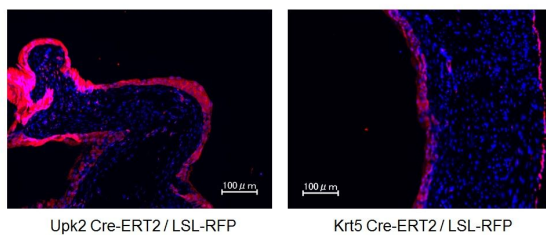
善を目的とした標的分子の候補を同定する。

最終的にはBBN発癌による浸潤性マウス膀胱癌への治療標的分子の同定を行い、同じクラスタに属する種類のヒト膀胱癌の治療成績改善につなげることを目的とする。

#### 4. 研究成果

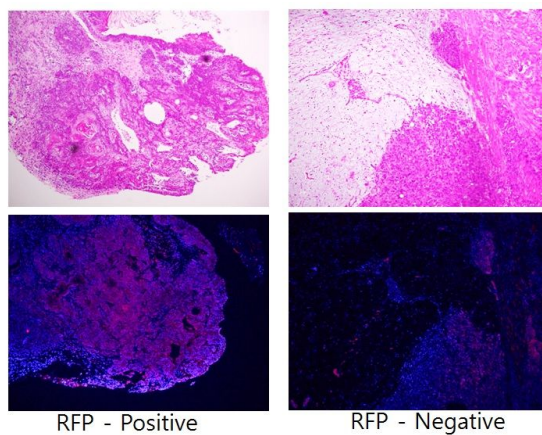
1) 方法に記した交配により得られたマウスの膀胱粘膜に対する蛍光抗体免疫染色で RFP が発現していることを確認した(Fig.1)。

Fig.1



これらのマウスに BBN 0.1% を 20 週間内服させることにより生じた膀胱癌組織に対して抗 RFP 抗体による蛍光免疫染色を行い、RFP の発現を確認するとともに、TP53 遺伝子点変異が生じていると推測される膀胱癌組織を同定した(Fig.2)。

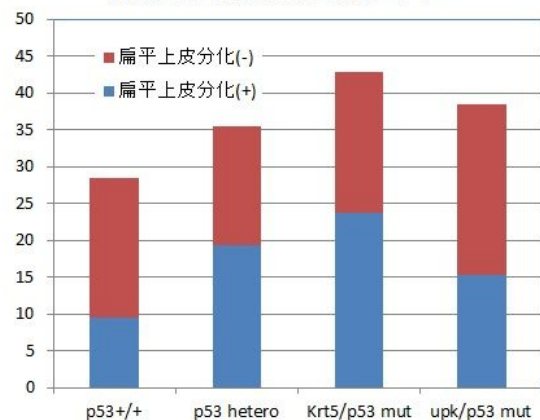
Fig.2



各系統のマウス膀胱癌を比較することにより、Krt5 陽性細胞に TP53 点変異を誘導することで、扁平上皮分化(ヒト筋層浸潤膀胱癌の約 7 割に見られる)を伴う筋層浸潤性尿路上皮癌を最も効率的に誘導できることを見出した(Fig.3)。

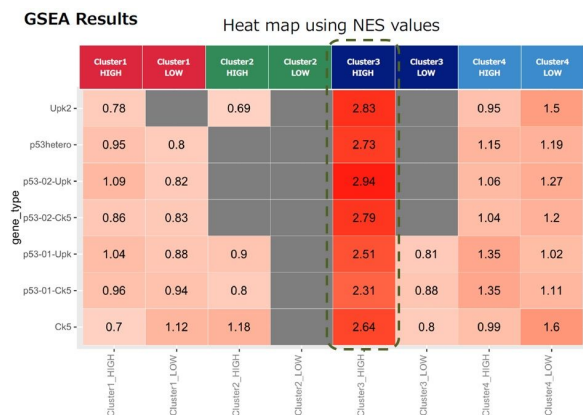
Fig.3

#### 浸潤性膀胱癌発生率



2) 上記で誘導されるマウス膀胱癌はヒト膀胱癌において最も浸潤性進行のリスクが高く治療抵抗性が強いとされる cluster 3 (これも扁平上皮分化を特徴とする) に最も近いことを見出した (Fig.4)。

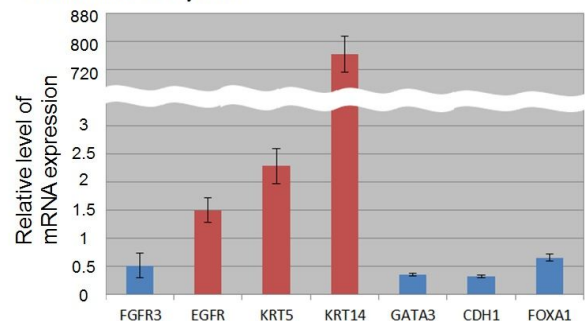
Fig.4



また、cluster3 のヒト浸潤性膀胱癌では EGFR、KRT5、KRT14 の mRNA 発現レベルが高いことが知られており、それに矛盾しない qPCR の結果を得ることができた(Fig.5)。

Fig.5

Muscle invasive bladder cancer of Krt5-CreERT2/TP53 LSL-R270H/+ / LSL-RFP induced by BBN



## 結語

尿路上皮のKrt5陽性細胞にp53変異を誘導することによってBBN膀胱発癌モデルにおいて効率よくTCGA cluster 3に属するヒト膀胱癌に類似の腫瘍を誘導することができることが明らかになった。

## 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 7 件)

1. Inoue T, Terada N, Kobayashi T, Ogawa O. Patient-derived xenografts as in vivo models for research in urological malignancies. Nat Rev Urol. 2017; Feb 21.
2. Kobayashi T. Understanding the biology of urothelial cancer metastasis. Asian J Urol. 2016;3(4):211-22.
3. Sano T, Kobayashi T, Negoro H, Sengiku A, Hiratsuka T, Kamioka Y, Liou LS, Ogawa O, Matsuda M. Intravital imaging of mouse urothelium reveals activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced intravesical release of ATP. Physiol Rep. 2016;4(21).
4. Kurobe M, Kojima T, Nishimura K, Kandori S, Kawahara T, Yoshino T, Ueno S, Iizumi Y, Mitsuzuka K, Arai Y, Tsuruta H, Habuchi T, Kobayashi T, Matsui Y, Ogawa O, Sugimoto M, Kakehi Y, Nagumo Y, Tsutsumi M, Oikawa T, Kikuchi K, Nishiyama H. Development of RNA-FISH assay for detection of oncogenic FGFR3-TACC3 fusion genes in FFPE samples. PLoS One. 2016;11(12):e0165109.
5. Goodison S, Ogawa O, Matsui Y, Kobayashi T, Miyake M, Ohnishi S, Fujimoto K, Dai Y, Shimizu Y, Tsukikawa K, Furuya H, Rosser CJ. A multiplex urinary immunoassay for bladder cancer detection: analysis of

a Japanese cohort. J Transl Med. 2016;14(1):287.

6. Sun D, Sawada A, Nakashima M, Kobayashi T, Ogawa O, Matsui Y. MK2206 potentiates cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis through an interaction of inactivated Akt signaling pathway. Urol Oncol. 2015;33(3):111 e17-26.
7. Nakashima M, Matsui Y, Kobayashi T, Saito R, Hatahira S, Kawakami K, Nakamura E, Nishiyama H, Ogawa O. Urine CXCL1 as a biomarker for tumor detection and outcome prediction in bladder cancer. Cancer Biomark. 2015;15(4):357-64.

[学会発表](計 1 件)

1. Norihiko Masuda, "The impact of p53 point mutation on the characteristics of BBN-induced mouse bladder cancer", 14th Urological Association of Asia Congress, 平成 28 年 6 月 21 日, Suntec Singapore Convention and Exhibition Centre (Singapore)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

京都大学医学研究科泌尿器科学教室 HP  
<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 恭 (KOBAYASHI, Takashi)

京都大学 医学研究科 助教

研究者番号: 00642406

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

