

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 26 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460477

研究課題名(和文) 尿路上皮癌における新規癌進展メカニズムの解析

研究課題名(英文) A new mechanism of urothelial carcinoma progression

研究代表者

島田 啓司 (shimada, keiji)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：90336850

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)：我々は、ユビキチン・プロテアソーム関連分子に着目し、尿路上皮癌細胞(UC)と正常尿路上皮細胞とを網羅的に比較検討したところ、足場蛋白質、ubiquilin2がUCにて高発現することを発見した。UC細胞株を用いubiquilin2 gene silencingを行うと、GRP78の発現が低下し、MAP kinase上流分子であるASK-1発現上昇を介してMAP kinaseが活性化し、apoptosisを誘導することが分かった。ヌードマウスを用いたin vivo modelでも、ubiquilin2ノックダウンによって腫瘍細胞のvolume reductionをもたらした。

研究成果の概要(英文)：In the present research, we found for the first time that scaffold protein, ubiquilin2 is mainly involved in this reaction. In vitro experiments using UC lines clearly showed the gene silencing of ubiquilin2 destabilized GRP 78 protein expression, whereas increased upstream molecule of MAP kinase, ASK-1, which could strengthen MAP kinase activation by endogenous ROS and apoptosis induction in carcinoma cells. Such a role of ubiquilin2 in UC survival was proved by nude mice model with implantation of UC in the urinary bladder and in vivo treatment of ubiquilin2 siRNA technique. In addition, immunocytochemical labeling of ubiquilin2 improved both sensitivity and specificity of urine cytology.

研究分野：診断病理学

キーワード：尿路上皮癌 ユビキリン2 細胞診

## 1. 研究開始当初の背景

(1) UC は ROS を産生し細胞傷害ストレスの曝されているにもかかわらず生存し続けることができるのは、ubiquilin2 がタンパク質の re-folding、品質管理に欠かせない GRP78 発現の安定化と ROS によって惹起される細胞死誘導酵素、ASK-1 発現を抑制しているためである。Ubiquilin2 の機能を遮断することで効果的な膀胱癌治療を実現できる。

(2) ubiquilin2 を標識することで、尿中に遊離した尿路上皮癌細胞を発見し、泌尿器系腫瘍の診断をより正確に、効果的に行うことができる。新規診断システムやスクリーニングの開発が可能となる。

## 2. 研究の目的

近年、様々な癌においてその発生、進展にかかわる分子が特定され、これを標的とした分子医薬の開発と臨床応用が進み治療成績や予後の改善につながっている。他方、いまだに標的分子が特定されていない癌種、臓器癌もあり、その代表的なものに腎盂・尿管・膀胱癌（尿路上皮癌）があげられる。ubiquilin2 の尿路上皮癌における機能、役割を分子生物学的、臨床病理学的に解析し、新規標的分子の可能性を追求する。

## 3. 研究の方法

### (1) *in vitro*での実験系

Ubiquilin2 の機能を解析するため、ヒト尿路上皮癌細胞株を用い、遺伝子をノックダウンさせた場合の癌細胞への影響を解析する。具体的には siRNA を遺伝子導入して癌細胞における ALKBH3 発現を抑制させた場合に、細胞周期、細胞増殖を flowcytometry 法、MTS アッ

セイ法にて解析する。

### (2) *in vivo*での実験系

癌増殖能について、ヌードマウス同所性移植実験にて検討した。GFP 遺伝子を導入したヒト尿路上皮癌細胞を膀胱内に移植し、生着後に ubiquilin2 siRNA を遺伝子導入後、癌組織を摘出して病理組織学的に解析する。

### (3) ヒト手術検体を用いた病理組織学的研究

ヒト尿検体 245 症例ならびに膀胱癌組織検体 125 症例を用いて、ubiquilin2 の免疫組織/細胞化学的検討を行い、診断精度や癌悪性度との関連性を統計学的に解析した。

## 4. 研究成果

### (1) ubiquilin2 は膀胱尿路上皮癌にて高発現する

膀胱 UC 手術症例 125 例を用いて免疫組織化学的解析を行ったところ、正常尿路上皮に比して UC にて高い ubiquilin2 陽性率を認めた。さらに、浸潤癌を含む高悪性度 UC では核に染色される割合が高く、核陽性率によって組織学的悪性度を適確に予測できる可能性が示唆された。

### (2) 尿細胞診における ubiquilin2 免疫染色の意義

尿細胞診検体 (control:143 例および尿路上皮癌:102 例 [pTa 42 例、pT1 18 例、pT2 19 例、pT3/4 23 例]) を用いて、抗 ubiquilin2 抗体による免疫細胞染色を行ったところ、高悪性度 UC ほど核陽性率が有意に高いことが判明した。非腫瘍細胞は ubiquilin2 陰性であることとあわせて、ubiquilin2 免疫細胞染色を行

うことで、非侵襲的に高い精度で UC を診断できるだけでなく、悪性を予測することができるかと期待される。

( 3 ) ubiquilin2 は、高レベル ROS を産生する UC 生存に不可欠な分子である

ヒト UC 細胞株を用い、siRNA 導入によって ubiquilin2 遺伝子をノックダウンすると、細胞増殖が有意に抑制された。

N-Acetyl-L-cysteine を前投与して細胞内活性酸素種(ROS)産生を抑えると、本細胞毒性は抑制されたが、細胞内 ROS 産生量に変化はみられなかった。以上から、ubiquilin2 は癌細胞内 ROS 産生自体には影響しないが、ROS 誘導性細胞毒性から UC を保護する機能を有することが分かった。

( 4 ) ubiquilin2 ノックダウンは、apoptosis を誘導する

ヒト UC 細胞株を用い、ubiquilin2 遺伝子をノックダウンすると PARP cleavage など apoptosis を誘導することが分かった。図 3 で示した細胞毒性と障害の度合いはほぼ同値であり、細胞傷害の主たるメカニズムは apoptosis の誘導であることが分かる。なお、薬剤投与にて ROS 産生を抑制すると、apoptosis 誘導は有意に阻害された。

( 5 ) ubiquilin2 ノックダウンにより、GRP78 発現が低下する

ヒト UC 細胞株を用い、ubiquilin2 遺伝子をノックダウンすると、小胞体に常在する分子シャペロン、GRP78 の発現が低下する。これにより、酸化ストレスによって惹起される異常蛋白質の蓄積に対応できず、apoptosis などの細胞傷害を引き起こすと考えられる。

( 6 ) ubiquilin2 ノックダウンにより、MAP kinase が活性化する

ROS は MAP kinase の活性化を介して apoptosis を誘導することが知られている(図 5 左上)。

ヒト UC 細胞株を用い、ubiquilin2 遺伝子をノックダウンすると、MAP kinase 最上流分子である ASK-1 の発現が上昇し、JNK 活性化を誘導し、apoptosis をはじめ細胞傷害を誘導した。ASK-1 のノックダウンによりこの細胞毒性は阻害されたことから、ubiquilin2 は ASK-1 発現を抑制することで、細胞内 ROS 毒性から UC 細胞を保護していると考えた。

( 7 ) ubiquilin2 ノックダウンによる膀胱癌抑制効果の検討 ( in vivo model )

In vivo モデルにて ubiquilin2 をノックダウンすると、腫瘍の apoptosis 誘導により有意な縮小効果が得られた。

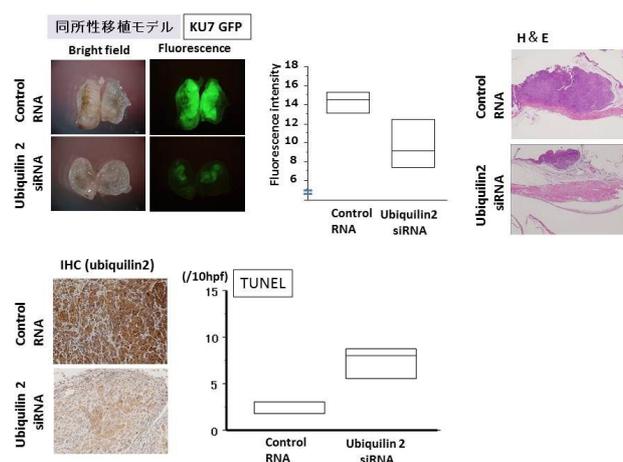


図 1 同所性移植モデルを用いた ubiquilin2 ノックダウンの影響。ヌードマウス膀胱内に GFP 遺伝子を導入した癌細胞株を移植した後、ubiquilin2 siRNA を atelocollagen とともに膀胱内に注入した。腫瘍細胞における

ubiquilin2 発現が抑制され、腫瘍体積は有意に縮小した。その後、腫瘍体積や腫瘍における apoptosis 誘導について、fluorescence intensity や TUNEL 法により解析した。

( 8 ) ubiquilin2 は膀胱癌細胞において強発現する

125 症例の膀胱癌手術検体を用い、ubiquilin2 発現の免疫組織化学的解析を行った結果、ubiquilin2 は非腫瘍細胞と異なり、UC 細胞において強く発現すること、浸潤癌や高悪性度癌では核に局在する割合が高いことが判明した。

( 9 ) ubiquilin2 細胞染色は、尿細胞診における補助診断法として有用である

非膀胱癌 143 例、膀胱癌 245 例の尿検体を用い、ubiquilin2 免疫細胞染色を行った結果、ubiquilin2 は尿中に剥離した癌細胞に陽性を示す一方、非腫瘍細胞には陰性であり、癌検出に有用であることが分かった( 感度: 87.6%; 特異度: 98.6% )。さらに、核陽性率から浸潤癌や癌悪性度を推測できる可能性が示唆された。

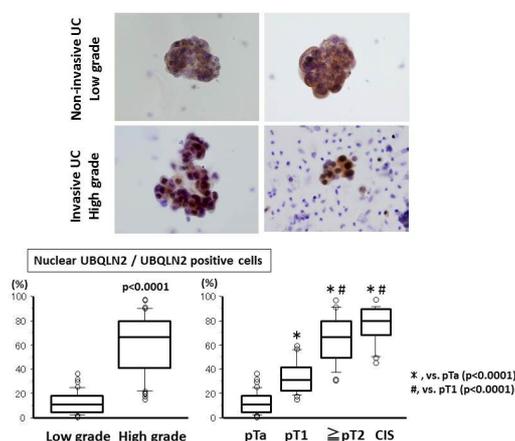


図 2 尿中に剥離した癌細胞における

ubiquilin2 発現について。尿中に剥離した細胞を用いて ubiquilin2 抗体により免疫細胞染色を行った。陽性細胞に占める核陽性細胞の割合を算出し、病期や悪性度と比較検討した。

Ubiquilin2 は、GRP78 発現安定化と ASK-1 発現を抑制することで、細胞内活性酸素種より尿路上皮癌細胞を保護していることが分かった。ubiquilin2 を target する分子治療薬によって効率的に膀胱癌を治療できる可能性がある。また、ubiquilin2 を標識することで、膀胱癌の診断精度を高め、悪性度を適確に予測できると期待される。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] ( 計 1 件 )

Shimada K, Fujii T, Tatsumi Y, Anai S, Fujimoto K, Konishi N. Ubiquilin2 as a novel marker for detection of urothelial carcinoma cells in urine. *Diagn Cytopathol.* 査読有、44 巻、2016、3-9.

[学会発表] ( 計 1 件 )

**島田啓司**、藤井智美、田中京子、西川 武、小西 登. ユビキリン 2 に着目した尿中癌細胞検出法: 有用性と課題について. 第 56 回日本臨床細胞学会 2015/6/13/14

## 6 . 研究組織

( 1 ) 研究代表者

島田啓司 (SHIMADA, Keiji)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 9 0 3 3 6 8 5 0