

## 2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

|           |                                |       |           |     |
|-----------|--------------------------------|-------|-----------|-----|
| 学 校 名     | 関 西 医 科 大 学                    | 研究所名等 | 附属生命医学研究所 |     |
| 研 究 課 題   | 尿路上皮がん間質細胞による新規がん悪性化機構の<br>解明  |       | 研 究 分 野   | 医 学 |
| キ ー ワ ー ド | ①尿路上皮がん ②間質細胞 ③発癌モデルマウス ④一細胞解析 |       |           |     |

### ○研究代表者

| 氏 名     | 所 属               | 職 名    | 役 割 分 担    |
|---------|-------------------|--------|------------|
| 坂 本 毅 治 | 附 属 生 命 医 学 研 究 所 | 学長特命教授 | 研究の統括、動物実験 |

### ○研究分担者

[illegible]

# 尿路上皮がん間質細胞による新規がん悪性化機構の解明

## 1. 研究の目的

膀胱がんは泌尿器系で最もよく見られるがんであり、2020年には世界で57万3千人が新規に膀胱がんと診断され、21万人が膀胱がんで亡くなっている。膀胱がんの90%以上が尿路上皮がんの組織型を示し、治療にはシスプラチン・ゲムシタビンなどの細胞傷害性抗がん剤が長らく使用されてきたが、治療成績は芳しくなかった。近年、免疫制御薬や分子標的治療薬が尿路上皮がんに対して適用され、一部には治療成績の改善がみられたが、特定の変異を持つ一部の患者にしか使用出来ないこと、がんの分子サブタイプによっては効果が限られること、一部の薬剤では細胞傷害性抗がん剤と同頻度で有害事象が報告されるなど、未だに多くの制限があるため、既存治療薬とは作用機序の異なる新たな治療標的が切望されている。

Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)は細胞の低酸素応答に関わる主要な転写因子であり、尿路上皮がんの悪性化にも関わるが、HIF-1自身を標的としたがん治療薬は正常細胞にも影響を及ぼすため開発が困難と考えられている。研究代表者の坂本は、浸潤性のがん細胞、腫瘍関連線維芽細胞、活性化マクロファージなど限られた細胞でのみでHIF-1を活性化させる分子としてMint3を同定した(Sakamoto T et al., JBC, 2009)。Mint3の尿路上皮がんでの役割を明らかにするため、研究代表者の坂本および研究分担者の木下、蔦、田中らは、先行研究において膀胱がん117例、上部尿路上皮がん207例の2つの尿路上皮がんコホートの組織マイクロアレイを用いて、Mint3の発現と臨床病理スコアとの解析を行った。その結果、尿路上皮がんのがん細胞におけるMint3は予後不良因子であることが明らかとなり、さらに細胞株を用いた機能解析から、Mint3が尿路上皮がんの分子サブタイプによらず治療標的となり得ることを明らかとした(Ikeda J et al., Clin Trans Discov, 2023)。この先行研究では、尿路上皮がんの組織マイクロアレイでMint3のがん細胞における発現と予後の相関解析を行ったが、一部のがんではがん細胞だけでなく、間質細胞においてもMint3の高発現が認められた。そこで、がん間質細胞でのMint3の発現と予後の相関解析を行ったところ、間質細胞でのMint3発現も膀胱がん、尿路上皮がんの予後不良と相関することを見出した。組織切片での細胞の形態から、少なくともがん間質の線維芽細胞の一部でMint3が発現していると推察されるが、他の間質細胞でMint3が発現するかなど詳細は不明であり、また尿路上皮がんのがん間質での役割や治療標的としての有用性は不明である。

そこで本研究では、間質細胞の複雑な細胞間相互作用を理解するため新たに情報解析の専門家の日笠を研究分担者に加え、新たな尿路上皮がん治療薬開発のため、3年間の研究期間で、尿路上皮がんのがん間質細胞におけるMint3の役割と治療標的としてのMint3の有用性の解明を目指す。

## 2. 研究の計画

(1) Mint3発現間質細胞の同定と、Mint3により発現制御される遺伝子の解明

①尿路上皮がん臨床検体における間質Mint3の発現と病理スコア、マーカー分子の発現、臨床情報との相関解析

尿路上皮がん組織マイクロアレイを用いてMint3およびがん関連分子の免疫染色を行い、各マーカーの発現と臨床情報について統計解析を行う。

②間質細胞マーカーを用いた、尿路上皮がん臨床検体での間質Mint3発現細胞の同定  
尿路上皮がん組織切片でMint3および間質細胞マーカー分子の免疫染色を行い、間質におけるMint3発現細胞を同定する。

③尿路上皮がん手術検体からのMint3発現間質細胞の単離・培養法の確立

上述の実験で同定した間質細胞について、尿路上皮がんの腫瘍検体から細胞を単離し、培養する実験系を確立する。

④手術検体から単離したMint3発現間質細胞に対するMint3ノックダウン後のトランスクリプトーム解析

手術検体から単離したMint3発現間質細胞を培養し、siRNAを用いてMint3の発現をノックダウンさせ、RNAを抽出し、RNA-seqを行い、トランスクリプトームデータを取得する。

(2) 膀胱癌発癌マウスモデルで、全身での Mint3 欠損が膀胱癌進展に及ぼす影響の解明と、間質細胞特異的 Mint3 欠損マウスの作製

① ヒト尿路上皮がん病理検体で同定したMint3を発現する間質細胞 (e. g. 線維芽細胞) に特異的にMint3を欠損させたマウスの作製

同定したMint3発現間質細胞特異的にCreを発現するマウスを購入し、Mint3 floxマウスと交配を行い、間質細胞特異的Mint3欠損マウスを作製する。

② conventional Mint3欠損マウスに対するN-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) 誘導膀胱がん発癌モデル解析

野生型およびMint3欠損マウスに対し自由飲水で0.05% BBNを12週間投与し、BBN投与後8週間後に膀胱がんを回収し、組織学解析を行う。

### 3. 研究の成果

(1) Mint3 発現間質細胞の同定と、Mint3 により発現制御される遺伝子の解明

① 尿路上皮がん臨床検体における間質Mint3の発現と病理スコア、マーカー分子の発現、臨床情報との相関解析

組織マイクロアレイを用いて膀胱がん207例の間質におけるMint3発現と病理スコアとの相関を解析した結果、Mint3発現は悪性度ならびにpTステージと有意に正の相関を示した。また、間質Mint3発現は、上皮のCk14, FGFR, GATA3, Mint3と正に相関する一方、PD-L1発現とは相関を示さなかった。

② 間質細胞マーカーを用いた、尿路上皮がん臨床検体での間質Mint3発現細胞の同定

尿路上皮がん臨床検体を用いてMint3と細胞マーカーに対する免疫染色を行った結果、ほとんどの間質Mint3陽性細胞は平滑筋マーカーsmooth muscle actin (SMA)陽性であり、ごく一部に白血球マーカーCD45陽性細胞が存在した。これらの結果から、主なMint3発現間質細胞は腫瘍関連線維芽細胞(CAF)であることが明らかになった。

③ 尿路上皮がん手術検体からのMint3発現間質細胞の単離・培養法の確立

腫瘍組織分散のための酵素の反応条件、単離した細胞の細胞培養条件を検討し、尿路上皮がん手術検体から主なMint3発現間質細胞であるCAFの単離・培養法を確立した。

④ 手術検体から単離したMint3発現間質細胞に対するMint3ノックダウン後のトランスクリプトーム解析

手術検体からCAFの単離培養・バイオバンクへのストックを4例完了した。ストックしたCAFを用いてMint3に対するsiRNAを用いたノックダウンを行い、RNA-seqでトランスクリプトーム解析を行った結果、Mint3ノックダウンにより多数の遺伝子に有意な発現変動が観察された。変動遺伝子についてオンロジー解析を行ったが、直接病態と関わるようなパスウェイは抽出されなかった。

(2) 膀胱癌発癌マウスモデルで、全身での Mint3 欠損が膀胱癌進展に及ぼす影響の解明と、間質細胞特異的 Mint3 欠損マウスの作製

① ヒト尿路上皮がん病理検体で同定したMint3を発現する間質細胞 (e. g. 線維芽細胞) に特異的にMint3を欠損させたマウスの作製

CAFのマーカーであるSMAプロモーター下でCreを発現するマウスを入手し、Mint3 floxマウスと交配し、SMA-Cre+;Mint3 fl/flマウスを作製し、発がん実験のために繁殖を進めた。

② conventional Mint3欠損マウスに対するN-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) 誘導膀胱がん発癌モデル解析

Mint3 KOマウスを用いたBBN誘導膀胱がん発癌モデル実験を行い、野生型マウスに比べてMint3 KOマウスでは膀胱がんの浸潤度が有意に低下していた。

### 4. 研究の反省・考察

(1) Mint3 発現間質細胞の同定と、Mint3 により発現制御される遺伝子の解明

尿路上皮がん臨床検体を用いた解析から、間質のMint3がCAFに発現しており、その発現が

悪性度ならびに pT ステージと有意に正の相関を示したことから、間質 Mint3 は尿路上皮がんの悪性化を促進する可能性が示唆された。臨床検体では間質 Mint3 の発現が上皮の Ck14, FGFR, GATA3 と相関したが、臨床検体から単離した CAF の Mint3 ノックダウン実験では特定のパスウェイの異常は検出出来なかったことから、CAF における Mint3 の役割は現時点では不明のままである。RNA レベルでの絞り込みが出来なかったことから、機能との関連が解析しやすいシグナルパスウェイやサイトカインのタンパクアレイを用いて、Mint3 の発現がタンパクレベルで CAF にどのような影響を与えているかについて解析を進める予定である。

(2) 膀胱癌発癌マウスモデルで、全身での Mint3 欠損が膀胱癌進展に及ぼす影響の解明と、間質細胞特異的 Mint3 欠損マウスの作製

全身性 Mint3 KO マウスでは BBN 誘導膀胱がんの進展が野生型マウスに比べて抑制されていたことから、Mint3 が膀胱がん進展を促進していることが示された。全身性 Mint3 KO マウスの結果は、がん細胞および全ての間質細胞での Mint3 の機能喪失の結果であるため、CAF での Mint3 が本当に膀胱がん進展に関わるかについては、作製した CAF 特異的 Mint3 KO マウスを用いた発がん実験によって明らかになることが期待される。

## 5. 研究発表

(1) 学会誌等  
なし

(2) 口頭発表  
なし

(3) 出版物  
なし