

173. ユビキチンシステムを標的としたがん微小環境の制御

田中 伸之

慶應義塾大学 医学部 泌尿器科学教室

Key words : 尿路上皮癌, 上皮間葉転換, CDDP, FBXO32

緒言

難治性である転移・再発性尿路上皮癌の治療標準はシスプラチン (CDDP) を中心とする多剤併用化学療法である。しかし奏功は一時的であり、既存のセカンドライン療法にも限界がある。本研究で我々は、抗がん剤耐性獲得後の再燃性尿路上皮癌における新規治療軸として、CDDP 治療が誘導するがん微小環境変化の制御に着目した。がん微小環境は、全ての泌尿器科癌(腎・前立腺・尿路上皮癌)で重要な標的分子と成り得る。これまで我々は、血管新生・上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) を中心に泌尿器科癌とがん微小環境の検討を重ねてきた。尿路上皮癌に関して、特に抗がん剤治療の誘導するがん微小環境に焦点を当て、CDDP 治療後の VEGF 発現上昇及びその抑制による著明な抗腫瘍効果の増強¹⁾、独自に樹立した2種の CDDP 耐性尿路上皮癌細胞株を用いて CDDP 耐性獲得後の血管新生亢進を報告した²⁾。今回我々は、前述の CDDP 耐性尿路上皮癌細胞株において確認された EMT 誘導の探索を目的として、CDDP 耐性獲得前後の時間軸に沿ったマイクロアレイ網羅的解析より同定された、新規 EMT 制御因子 FBXO32 (F-box protein 32) の機能・臨床的意義を検討した。

方法および結果

光学顕微鏡下の観察において、2種の CDDP 耐性尿路上皮癌細胞株 T24PR・5637PR (Platinum Resistance) では細胞形態の紡錘型変化が確認され、CDDP 耐性獲得後の EMT 誘導が示唆された。遺伝子・タンパク発現解析から、T24PR・5637PR 細胞における EMT 関連因子 (SNAIL、Vimentin) の発現上昇及び E-cadherin の発現低下が確認され、これら CDDP 耐性細胞では細胞浸潤能も有意に亢進していた (図 1)。

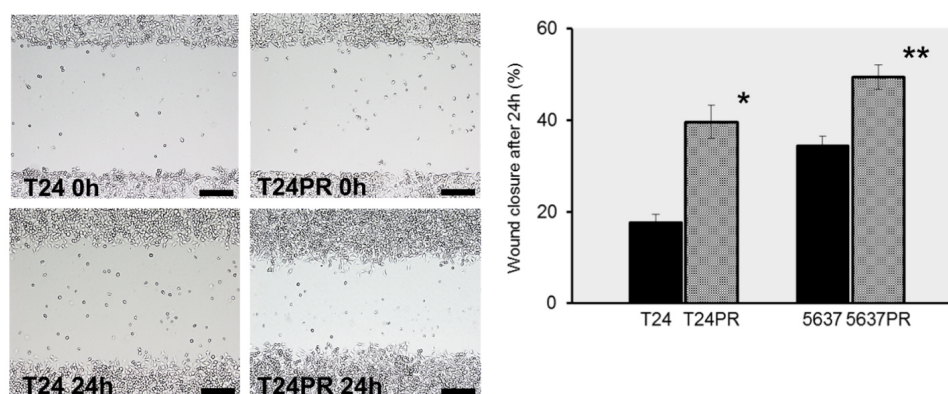


図 1. スクラッチアッセイによる CDDP 耐性尿路上皮癌細胞株 T24PR・5637PR の遊走能評価

CDDP 耐性獲得前後でスクラッチアッセイによる細胞遊走能の比較検討を行った。Scale bar: 0.2 mm. Error bar: SE. *P < 0.05, compared with T24 cells. **P < 0.05, compared with 5637 cells. P values were examined by Mann-Whitney U test.

次に、このような CDDP 耐性獲得後の EMT 誘導機構の網羅的探索を目的として、CDDP 耐性獲得前後の時間軸に沿ったマイクロアレイ解析を行い、CDDP 耐性獲得後に共通して変化する標的遺伝子 49 遺伝子を抽出した (図 2)。この内、本研究ではユビキチン E3 リガーゼ FBXO32 の新規 EMT 制御因子の可能性に着目した。

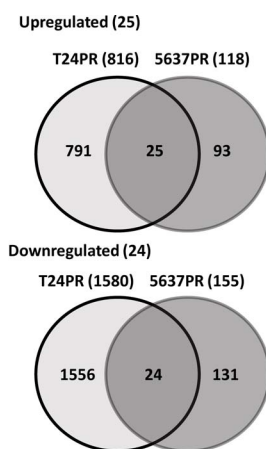


図 2. マイクロアレイ法を利用した、CDDP 耐性尿路上皮癌細胞株 T24PR・5637PR において共通して発現変化を来す遺伝子群の抽出
2 種の CDDP 耐性尿路上皮癌細胞株を用い、CDDP 耐性獲得前後に共通して発現変化を来す遺伝子の抽出を行った。

遺伝子・タンパク発現解析では T24PR・5637PR 細胞における FBXO32 の発現低下が確認され、更には FBXO32 ノックダウンに伴う EMT 誘導並びに細胞浸潤能亢進が確認された (図 3A-B)。FBXO32 過剰発現においては EMT 関連因子 (SNAIL、Vimentin) の発現低下及び E-cadherin の発現上昇が確認され、FBXO32 の EMT 制御因子としての可能性が示唆された (図 3C-D)。

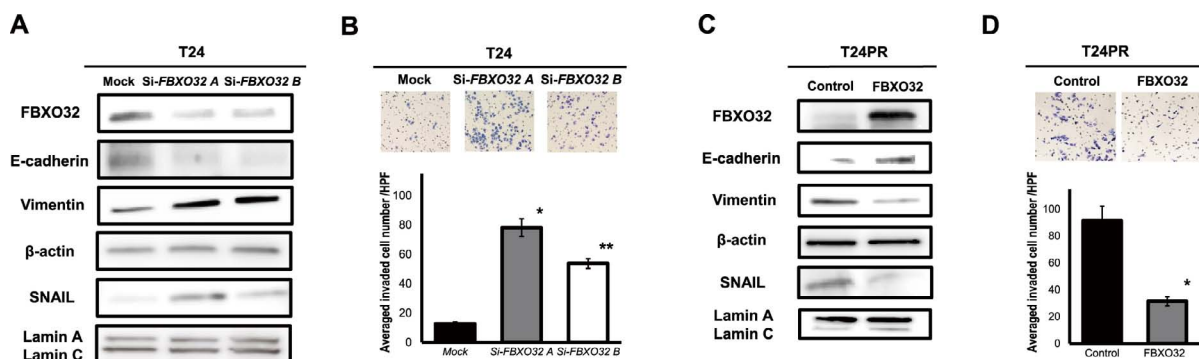


図 3. FBXO32 ノックダウンおよび過剰発現に伴う EMT 関連因子、細胞浸潤能の変化
CDDP-sensitive T24 細胞における FBXO32 ノックダウン後の EMT 関連因子 (A、ウェスタンブロット法)、細胞浸潤能 (B、マトリゲルインベーションチャンバー) の変化。Error bar: SE. *P < 0.05, compared with Mock. **P < 0.05, compared with Mock. CDDP-resistant T24PR 細胞における FBXO32 過剰発現後の EMT 関連因子 (C、ウェスタンブロット法)、細胞浸潤能 (D、マトリゲルインベーションチャンバー) の変化。Error bar: SE. *P < 0.05, compared with control. P values were examined by Mann-Whitney U test.

尿路上皮癌臨床検体 (腎盂尿管癌 201 例、膀胱癌 94 例) を用いた免疫組織学的検討では FBXO32 低発現群における SNAIL 高発現と E-cadherin 低発現が確認され、FBXO32 低発現群での EMT 誘導が示唆された (図 4)。

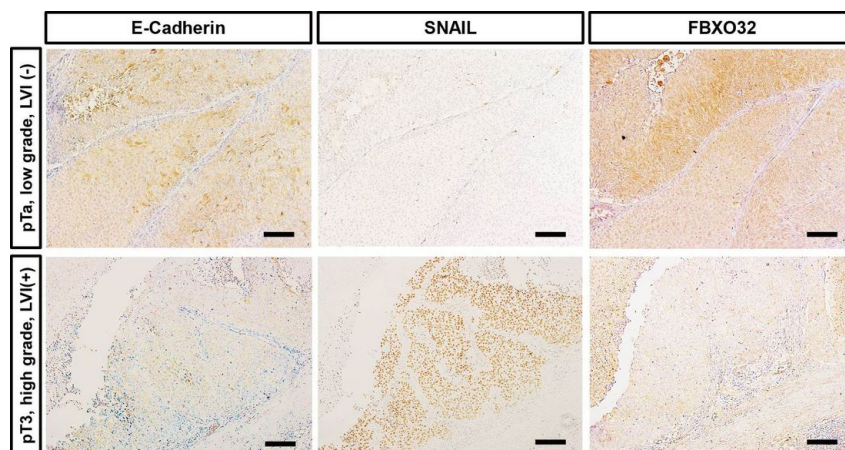
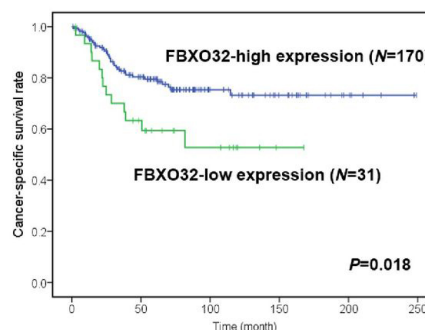
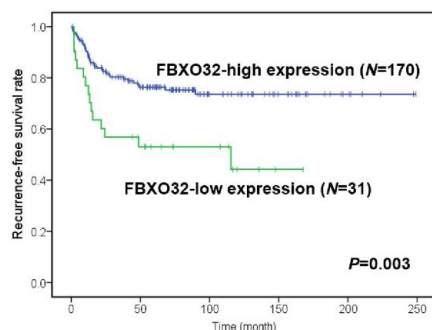


図4. 尿路上皮癌(腎盂尿管癌)臨床検体を用いた免疫組織学的検討

pTa, low grade, lymphovascular invasion [LVI] 陰性症例および pT3, high grade, LVI 陽性症例。Scale bar: 0.1 mm.

更に免疫組織学的染色の結果を用いた予後解析では、腎盂尿管癌・膀胱癌共に FBXO32 低発現が術後再発・癌死に関連する危険因子であり、尿路上皮癌における予後予測マーカー FBXO32 の有用性が示唆された (図5)。化学療法治療前後の組織検体を利用した免疫組織学的検討では、化学療法後に摘出された癌組織で FBXO32 発現低下・SNAIL 発現上昇傾向が確認された (図6)。

腎盂尿管癌



膀胱癌

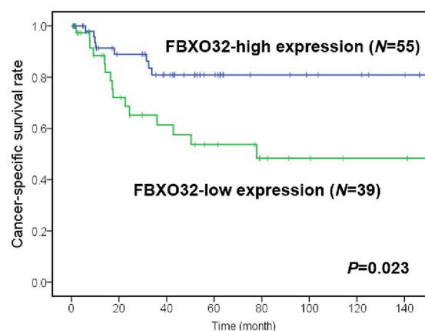
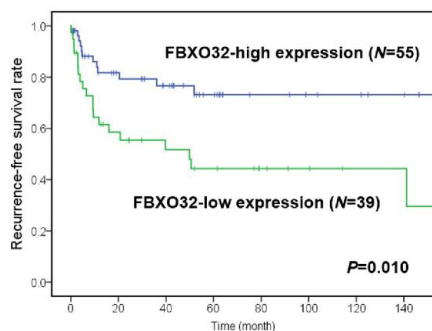


図5. 尿路上皮癌患者における FBXO32 発現の予後予測マーカーとしての有用性

カプランマイヤー法による、手術治療が行われた尿路上皮癌患者 (腎盂尿管癌 201 例、膀胱癌 94 例) における摘出組織内の FBXO32 発現と予後 (術後再発、癌死) の関係。

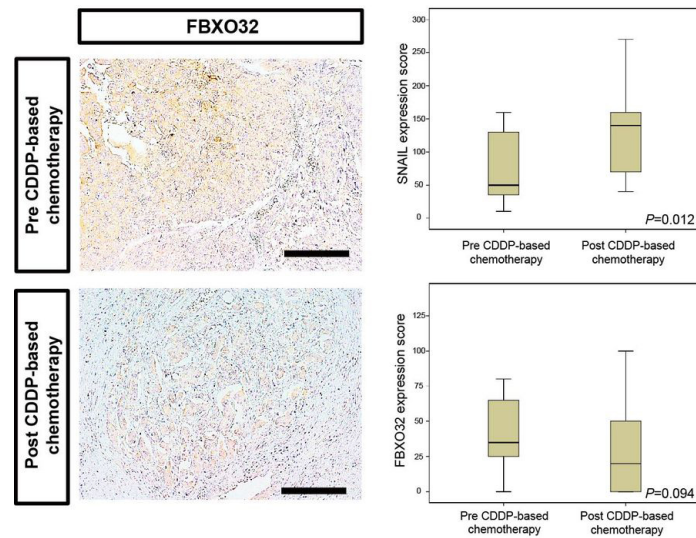


図6. 尿路上皮癌臨床検体を用いた化学療法前後の EMT 関連因子・FBXO32 発現の変化
CDDP を含む術前全身化学療法が行われた膀胱癌臨床検体を用いた、化学療法前後の SNAIL・FBXO32 発現変化の免疫組織学的検討 (N = 16)。Scale bar: 0.1 mm. Error bar: SE. P values were examined by Mann-Whitney U test.

CDDP 耐性下における FBXO32 発現抑制のメカニズムとして、CDDP 耐性細胞株を用いた CGH アレイ解析では T24PR 細胞における 8 番染色体長腕領域 (*FBXO32* 遺伝子のコード領域) の Loss of heterozygosity が確認され、T24PR 細胞における染色体レベルでの FBXO32 発現抑制が示唆された。5637PR 細胞では同様な染色体変化は認めなかったが、FBXO32 発現調節を担う FOXO (forkhead box O) 転写因子である FOXO1・FOXO3a の核内発現が、5637PR 細胞では AKT リン酸化上昇に併せて低下しており、FBXO32 発現抑制の一因と考えられた。

考 察

FBXO32 はラット筋萎縮モデルの網羅解析により同定された筋萎縮原因遺伝子であり、その遺伝子産物は SCF 複合体型ユビキチンリガーゼに属する。今回我々はマイクロアレイ法を用いた網羅的解析から、CDDP 耐性獲得後の尿路上皮癌細胞における FBXO32 発現低下に着目した。更には FBXO32 ノックダウンや強制発現系を利用し、CDDP 耐性獲得後の EMT 誘導機構として FBXO32 発現低下の関与を示した。

癌研究における FBXO32 発現は、癌性悪液質に関連した筋萎縮誘導等、宿主正常組織に着目した FBXO32 発現上昇を主に検討がなされている^{3,4)}。一方、癌組織自体においては FBXO32 発現低下に伴う癌細胞の CDDP 感受性低下⁵⁾、予後不良因子としての癌組織内 FBXO32 低発現等^{5,6)}、相反する組織依存性の発現制御が報告されている。また先行の乳癌研究ではヒストンメチル化修飾を標的とした DZNep 治療により誘導される遺伝子群の一つとして、FBXO32 のアポトーシス誘導作用への関与が指摘されている⁷⁾。今回我々は、CDDP 耐性尿路上皮癌における FBXO32 発現制御・EMT 誘導機構の解明に焦点を当て、FBXO32 発現低下を介したユビキチンシステム依存性がん微小環境変化を検討した。今後は抗がん剤耐性誘導やがん幹細胞性への関与等、FBXO32 発現の更なる分子基盤の解明が期待される。また組織検体を用いた追加検討により、尿路上皮癌患者における FBXO32 発現の臨床的意義がより鮮明化されれば、新規バイオマーカーとして尿路上皮癌治療の最適化に貢献する可能性が示唆される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室の大家基嗣および小坂威雄である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Tanaka N, Miyajima A, Kosaka T, Shirotake S, Hasegawa M, Kikuchi E, Oya M. Cis-dichlorodiammineplatinum upregulates angiotensin II type 1 receptors through reactive oxygen species generation and enhances VEGF production in bladder cancer. *Mol Cancer Ther.* 2010 Nov;9(11):2982-92. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0535. PMID: 20978160.
- 2) Tanaka N, Miyajima A, Kosaka T, Miyazaki Y, Shirotake S, Shirakawa H, Kikuchi E, Oya M. Acquired platinum resistance enhances tumour angiogenesis through angiotensin II type 1 receptor in bladder cancer. *Br J Cancer.* 2011 Oct 25;105(9):1331-7. doi: 10.1038/bjc.2011.399. PMID: 21970881.
- 3) Tseng YC, Kulp SK, Lai IL, Hsu EC, He WA, Frankhouser DE, Yan PS, Mo X, Bloomston M, Lesinski GB, Marcucci G, Guttridge DC, Bekaii-Saab T, Chen CS. Preclinical Investigation of the Novel Histone Deacetylase Inhibitor AR-42 in the Treatment of Cancer-Induced Cachexia. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Oct 12;107(12):djv274. doi: 10.1093/jnci/djv274. PMID: 26464423.
- 4) Matsuyama T, Ishikawa T, Okayama T, Oka K, Adachi S, Mizushima K, Kimura R, Okajima M, Sakai H, Sakamoto N, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Kokura S, Naito Y, Itoh Y. Tumor inoculation site affects the development of cancer cachexia and muscle wasting. *Int J Cancer.* 2015 Dec 1;137(11):2558-65. doi: 10.1002/ijc.29620. PMID: 26016447.
- 5) Chou JL, Su HY, Chen LY, Liao YP, Hartman-Frey C, Lai YH, Yang HW, Deatherage DE, Kuo CT, Huang YW, Yan PS, Hsiao SH, Tai CK, Lin HJ, Davuluri RV, Chao TK, Nephew KP, Huang TH, Lai HC, Chan MW. Promoter hypermethylation of FBXO32, a novel TGF-beta/SMAD4 target gene and tumor suppressor, is associated with poor prognosis in human ovarian cancer. *Lab Invest.* 2010 Mar;90(3):414-25. doi: 10.1038/labinvest.2009.138. PMID: 20065949.
- 6) Guo W, Zhang M, Shen S, Guo Y, Kuang G, Yang Z, Dong Z. Aberrant methylation and decreased expression of the TGF- β /Smad target gene FBXO32 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2014 Aug 15;120(16):2412-23. doi: 10.1002/cncr.28764. PMID: 24798237.
- 7) Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee PL, Karuturi RK, Tan PB, Liu ET, Yu Q. Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev.* 2007 May 1;21(9):1050-63. PMID: 17437993.