

泌尿器科腫瘍学における分子研究の展望： 発癌・転移機構（膀胱腫瘍）

金沢大学医学部泌尿器科学教室（主任：並木幹夫教授）

越田 潔，今尾 哲也，伊藤 秀明，宮城 徹
小中 弘之，溝上 敦，江川 雅之，並木 幹夫

PROSPECTS FOR MOLECULAR RESEARCH IN UROLOGICAL ONCOLOGY: BLADDER CANCER

Kiyoshi KOSHIDA, Tetsuya IMAO, Hideaki ITO, Toru MIYAGI,
Hiroyuki KONAKA, Atsushi MIZOKAMI, Masayuki EGAWA and Mikio NAMIKI
From the Department of Urology, Kanazawa University School of Medicine

This report consists of a description of our research findings relating to the mechanism of cancer metastasis and target molecules for early diagnosis or cancer therapy. First, we investigated the significance of metastasis-related genes expressed to various extents in three human bladder cancer cell lines using two in vivo models. The relationship between the gene expression pattern and the behavior of cancer cells implicated a loss of E-cadherin expression as a critical factor in facilitating the progression of bladder cancer. Second, we examined the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in voided urine samples in patients with bladder cancer. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis showed a higher positive rate as compared with cytological examination, suggesting that the expression of hTERT in urine samples may be a useful diagnostic marker for bladder cancer. Finally, we searched for a molecule to which antisense can be applied as a treatment modality. The 150 kDa oxygen regulated protein (ORP 150), a kind of heat shock proteins, functions as a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. We demonstrated that the adenoviral-mediated antisense ORP150 cDNA transfer resulted in the suppression of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and tumor growth in vivo. In addition, the significant correlation between ORP150 and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) expression was observed in bladder cancer, suggesting that ORP150 functions as a molecular chaperone to MMP-2 secretion for tumor invasion. Anti-sense ORP150 may therefore have a potentially stronger antitumor effect because of its multitargeting capability as a molecular chaperone.

(Acta Urol. Jpn. 47: 815-818, 2001)

Key words: Bladder cancer, E-cadherin, Telomerase, Molecular chaperone

緒 言

膀胱癌における分子研究の目的として、1) 発癌機構の解析、2) 癌の浸潤・転移機構の解析、3) 癌の早期診断、癌治療に応用される標的分子の同定などがあげられる。ここでは2)、3) についてこれまでわれわれが行ってきた実験データを中心に今後の展望を述べる。

I. 膀胱癌の浸潤・転移機構の解析：

E-cadherin の優位性

膀胱腫瘍をみたときわれわれはまず第一にそれが表在性か浸潤性かを診断し治療にあたる。両者の予後がきわめて異なることは周知の事実であるが、これは単に癌細胞の浸潤の深さのみがすべてを規定している訳

ではない。両者は発癌から臨床癌の形成過程において異なるルートをたどっており、分子生物学的にはかなり違った性格を有することを認識しなければならない。移行上皮のがん化において9番染色体の欠失やcyclin D1, vascular endothelial growth factor (VEGF) の過剰発現により表在性乳頭状腫瘍が形成される。これらは50～75%以上の高い確率で再発をきたすが、そこには VEGF, matrix metalloproteinases (MMPs) の関与が示唆される。また10～20%の症例は浸潤癌に進展することが知られ、この際に p53 の変異が関与する。一方、浸潤癌では当初から p53 の変異がかかわり CIS が形成され、retinoblastoma (Rb) の不活化や platelet-derived endothelial cell growth factor (PDECGF) の過剰発現が加わり浸潤性の腫瘍塊を形成する。さらに腫瘍細胞の脈管へ

の侵襲, 移動, 遠隔臓器での接着, 増殖といった転移形成へのステップを踏むことになる. 表在性腫瘍の浸潤癌への進展にかかわる因子や浸潤癌における予後不良因子を解析することは治療に応用可能な標的分子の発見につながる. 癌の浸潤および転移には癌細胞あるいは腫瘍組織内間質細胞における細胞増殖因子, 細胞外マトリックス分解酵素や接着因子などの転移関連因子の発現が深くかかわりあっていることが知られ, これまでいくつかの転移関連因子の発現と癌の悪性度との関係が報告されてきた. 膀胱腫瘍における浸潤・転移関連因子として urokinase-type plasminogen activator (uPA)¹⁾, MMP-2, -9²⁾, tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2)³⁾, integrin $\alpha 5$ ⁴⁾ がそれらの発現と正の相関を, また E-cadherin⁵⁻⁸⁾ は負の相関を示すことが報告されている. これらの因子の発現の増強あるいは減弱が浸潤・転移のカスケードのなかでそれぞれの役割を発揮することで浸潤・転移の形成に寄与すると考えられるが, 各因子間での相互作用あるいは優位性について言及した報告は少ない. そこでわれわれは表在性および浸潤性膀胱癌由来培養細胞を用いて SCID マウスに同所移植モデルを作成し, 転移関連遺伝子の発現と浸潤・転移との関連を解析すると共に臨床材料において浸潤・転移にかかわる因子の解析を行った⁹⁾ 実験的研究として転移関連遺伝子の発現強度の異なる 3 種のヒト膀胱癌由来細胞株 T-24, RT-4 および KK-47 を使い, 2 種類の in vivo 転移実験モデルを用いて転移関連因子の発現と腫瘍細胞の浸潤転移能との関連について解析した (Table 1). 3 種類のヒト膀胱癌由来培養細胞株における培養条件下の転移関連因子の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて解析した結果, 浸潤性膀胱癌由来である T-24 においては c-ets-1, urokinase system, matrix metallo-proteinases, integrin- $\alpha 2$ および - $\alpha 3$ の強発現が認められたのに対して, 表在性膀胱癌由来である KK-47 と RT-4 ではそれらの発現は明らかに減弱し

ていた. 一方細胞間接着因子である E-cadherin の発現は RT-4 で最も強く, ウェスタンブロット法による解析では, RT-4 にのみに E-cadherin 蛋白の発現が確認された. 受精鶏卵を用いた腫瘍細胞の静脈内投与による肝転移能の検討では, T-24 と RT-4 では転移巣の形成が組織学的に確認されたのに対し, KK-47 においてはヒトベータグロビンを標的とした PCR 法により肝で一過性に捕捉されることが示されたが, 組織学的に明らかな転移巣は認められなかった. RT-4 においては肝転移巣で種々の転移関連因子の発現が誘導され T-24 と同程度の転移関連因子の発現が認められた. SCID マウスを用いた同所移植モデルにおける浸潤転移能の検討では, T-24 では膀胱壁への浸潤性増殖および肺転移が認められたが, KK-47 においては膀胱壁浸潤像を認めるものの肺転移は認められなかった. RT-4 では非浸潤性増殖像を呈し肺転移は認められなかったが, RT-4 移植腫瘍においては種々の転移関連因子の発現誘導が認められ, in vivo においては潜在的に高い転移能を獲得していることが示唆された. したがって受精鶏卵モデルにおいては, トリプシン処理によって E-cadherin の機能が喪失することで肝臓への転移が成立するが, 同所移植モデルにおいては E-cadherin の機能は維持され細胞間接着が強い非浸潤性増殖をきたし表在性腫瘍としての特性を保持しているものと考えられた. さらに KK-47 の受精鶏卵および同所移植モデルでの結果から, たとえ E-cadherin の機能が減弱しても uPA や MMPs など他の転移関連因子の発現の弱いものは転移能が低いことが示唆された. 次に臨床的検討としてヒト原発性膀胱癌の表在性および浸潤性腫瘍における転移関連因子の mRNA 発現を解析し膀胱癌の進展における転移関連因子の発現の意義を検討した. その結果, 浸潤性癌では E-cadherin の発現が明らかに減弱していたが, その他の転移関連因子については表在性および浸潤性癌, 双方ともに種々の転移関連因子を発現していることが示され, 表在性膀胱腫瘍においてもその潜在的浸潤転移能は高いと考えられた. さらにヒト原発性膀胱癌における E-cadherin に対する免疫組織化学染色により, 腫瘍の浸潤度, 異型度が上がるにつれて染色性は減弱することが確認された (Table 2). 以上より種々の転移関連因子の中で E-cadherin の発現の減弱

Table 1. Correlation between behavior of cancer cells and expression of metastasis-related factors

	T-24 浸潤性	RT-4 表在性	KK-47 表在性
培養条件下			
転移関連因子の mRNA 発現	⦿	+	+
E-カドヘリンの蛋白発現	—	+	—
受精鶏卵法			
肝転移	+	+	—
肝転移巣における 転移関連因子の mRNA 発現	⦿	⦿	—
SCID マウス同所移植腫瘍			
転移関連因子の mRNA 発現	⦿	⦿	+
筋層浸潤像	+	—	+
肺転移	+	—	—

Table 2. Results of hTERT mRNA expression and urine cytology

		Cancer	Normal
hTERT mRNA	Positive	25	1
	Negative	8	25
Cytology	Positive	22	0
	Negative	11	26

がヒト膀胱癌の進展に大きく寄与していることが示唆された。これまで膀胱腫瘍において E-cadherin の発現と腫瘍の悪性度あるいは患者の予後との相関についていくつか報告をみるが, われわれの結果はこれらを支持するのみならず, 膀胱癌の治療戦略を考える際にその標的として E-cadherin がいかに重要であるかを示唆するものと考えられた。

II. 膀胱癌におけるテロメラーゼの発現: 早期診断への応用の可能性

ヒト体細胞においては DNA 複製ごとに起きるテロメア DNA の短縮が分裂寿命の限界を決めているが, 癌細胞においてはテロメア DNA の長さは短縮せず無限増殖が可能である。テロメラーゼはテロメア長を維持し細胞の不死化に欠くことのできない酵素であり, 種々の癌組織でその高い酵素活性が報告されている。テロメラーゼは human telomerase RNA (hTERC), telomerase-associated protein (TEP1), human telomerase catalytic subunit (hTERT) の3つのサブユニットから成り, このうち hTERT がその酵素活性の発現に欠かせない因子である。われわれは膀胱組織において90%以上の頻度で hTERT mRNA の強発現を確認した¹⁰⁾。そこで尿中剝離細胞を用いて hTERT の発現を指標に癌の早期診断の可能性を検討した。尿細胞診との比較においては胆癌患者33人中, 陽性率は teromerase 25例 (76%), 尿細胞診22例 (67%) であった (Table 3)。Teromerase は G1 症例において尿細胞診より感度に優れ尿細胞診陰性例における癌検出の可能性が示され, 再発症例のスクリーニングの手段として有用であることが示唆された¹¹⁾。

III. 膀胱癌治療における標的分子: 分子シャペロンへの期待

癌の分子生物学的研究の目的として癌治療における

Table 3. Expression of E-cadherin in bladder cancer

	No. of cases	E-cadherin expression	
		Normal	Abnormal
Grade*			
1	18	17	1
2	21	13	8
3	35	4	31
Stage*			
pTa-1	33	30	3
pT2	15	3	12
pT3	24	1	23
pT4	2	0	2

* grade 1 vs grade 3: $p < 0.001$, * superficial (pTa-1) vs invasive (pT2-4): $p < 0.001$ by X^2 -test.

標的分子の同定があげられる。浸潤 転移関連因子が標的になることは疑いのないところであるが, 1つの因子だけを標的としても癌の heterogeneity 故の限界があることは論を待たない。細胞質内における分泌蛋白の成熟にかかわる分子シャペロンを標的にすれば複数の転移関連因子の制御が期待される。ORP150 (150 kDa oxygen-regulated protein) は脳 astrocyte において低酸素状態で誘導されるストレス蛋白の1種で小胞体に局在し分泌蛋白の輸送, 成熟にかかわっている。最近乳癌の腫瘍浸潤部において ORP150 が強発現していることが示され, 癌細胞の浸潤・増殖にかかわる蛋白の分泌に分子シャペロンとして機能している可能性が示唆された¹²⁾。また C6 glioma に antisense-ORP150 を導入すると VEGF の分泌を抑制しマウス皮下移植腫瘍の造腫瘍能を著しく低下させることが示された¹³⁾。われわれは正常酸素下にて ORP150, VEGF の双方を強発現している前立腺癌細胞: DU145 に対して antisense ORP150 アデノウイルスベクターを導入したところ, VEGF 蛋白の分泌抑制, 血管新生能の低下, in vivo における造腫瘍能の低下をきたすことを観察した¹⁴⁾。さらにヒト膀胱腫瘍では ORP150 の免疫組織化学染色において正常膀胱粘膜ではほとんど発現がみられないのに対し腫瘍ではその発現が明らかに増強し, 浸潤癌でより強い傾向が認められ, MMP-2 の染色性と一致する傾向が認められた (投稿中)。以上より分子シャペロン, ORP150 は複数の浸潤 転移関連因子の制御にかかわることが示唆され, 癌治療における標的分子に成り得ることが示唆された。

結 語

転移関連因子の解析はカスケードにおける種々の因子の役割を明らかにし治療における標的分子の同定につながる。膀胱癌の浸潤 転移における E-cadherin の重要性が確認され, これを腫瘍細胞に導入する治療実験が前立腺癌モデルで既に報告されている¹⁵⁾。しかし単一因子のみを標的分子とした場合, 動物実験レベルでの治療効果が得られたとしても臨床癌の heterogeneity を考慮すると, より効率の高い治療手段が求められ, これまでとは異なった視点から標的分子を選択する必要があると思われる。ここに示した分子シャペロン ORP150 はその1例といえよう。

文 献

- 1) Hasui Y, Marutsuka K, Nishi S, et al.: The content of urokinase-type plasminogen activator and tumor recurrence in superficial bladder cancer. *J Urol* **151**: 16-20, 1994
- 2) Davies B, Waxman J, Wasan H, et al.: Levels of

- matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res* **53**: 5365-5369, 1993
- 3) Grignon DJ, Sakr W, Toth M, et al.: High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res* **56**: 1654-1659, 1996
- 4) Saito T, Kimura M, Kawasaki T, et al.: Correlation between integrin $\alpha 5$ expression and the malignant phenotype of transitional cell carcinoma. *Br J Cancer* **73**: 327-331, 1996
- 5) Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma E, et al.: Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res* **53**: 3241-3245, 1993
- 6) Otto T, Birchmeier W, Schmidt U, et al.: Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer Res* **54**: 3120-3123, 1994
- 7) Syrigos KN, Krausz T, Waxman J, et al.: E-cadherin expression in bladder cancer using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: correlation with histopathological grade, tumor stage and survival. *Int J Cancer* **64**: 367-370, 1995
- 8) Shimazui T, Schalken JA, Girolodi LA, et al.: Prognostic value of cadherin-associated molecules (α -, β - and γ -Catenins and p120^{cas}) in bladder tumors. *Cancer Res* **56**: 4154-4158, 1996
- 9) Imao T, Koshida K, Endo Y, et al.: Dominant role of E-cadherin in the progression of bladder cancer. *J Urol* **161**: 692-698, 1999
- 10) Ito H, Kyo S, Kanaya T, et al.: Expression of human telomerase activity in urothelial cancer. *Clin Cancer Res* **4**: 1603-1608, 1998
- 11) Ito H, Kyo S, Kanaya T, et al.: Detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA in voided urine samples as a useful diagnosis tool for bladder cancer. *Clin Cancer Res* **4**: 2807-2810, 1998
- 12) Tsukamoto Y, Kuwabara K, Hirota S, et al.: Expression of the 150-kd oxygen-regulated protein in human breast cancer. *Lab Invest* **78**: 699-706, 1998
- 13) Ozawa K, Tsukamoto Y, Hori O, et al.: Regulation of tumor angiogenesis by oxygen-regulated protein 150, an inducible endoplasmic reticulum chaperone. *Cancer Res* **61**: 4206-4213, 2001
- 14) Miyagi T, Hori O, Koshida K, et al.: Antitumor effect of reduction of 150-kd oxygen-regulated protein expression in human prostate cancer cells. *Mol Urol* **5**: 79-80, 2001
- 15) Luo J, Lubaroff DM and Hendrix MJ: Suppression of prostate cancer invasive potential and matrix metalloproteinase activity by E-cadherin transfection. *Cancer Res* **59**: 3552-3556, 1999

(Received on September 18, 2001)

(Accepted on October 15, 2001)