

筑波大学

博士（医学）学位论文

PLD1 promotes tumor invasion by regulation
of MMP-13 expression via NF- κ B signaling
in bladder cancer

(ホスホリパーゼ D1 は NF- κ B シグナル経路を介した
MMP-13 の発現制御を介して膀胱癌の浸潤を促進する)

2021

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

南雲 義之

目次

1	序論.....	1
1.1	膀胱癌における浸潤の重要性	1
1.2	ホスホリパーゼ D の生理機能	3
1.3	がんにおけるホスホリパーゼ D の役割.....	4
2	目的.....	7
3	対象と方法	8
3.1	遺伝子発現レベルで層別化した膀胱癌患者の生存分析および RNA シークエン ス解析におけるデータ取得	8
3.2	細胞と細胞培養	8
3.3	マウス	9
3.4	RNA の抽出と quantitative real-time PCR (qPCR)	10
3.5	ウエスタンブロット解析.....	12
3.6	siRNA を用いた細胞株における遺伝子発現抑制.....	13
3.7	レンチウイルスベクターを用いた PLD1 遺伝子発現抑制.....	13
3.8	細胞浸潤アッセイ	14

3.9	MMP-13 タンパクの検出.....	15
3.10	PA の調整.....	15
3.11	マウス膀胱発癌モデル.....	16
3.12	パスウェイ遺伝子解析.....	16
3.13	RNA シークエンス.....	17
3.14	RNA シークエンス解析.....	17
3.15	統計解析.....	18
4	結果.....	20
4.1	膀胱癌患者におけるホスホリパーゼ D の発現と予後の関連.....	20
4.2	ヒト膀胱癌細胞の浸潤におけるホスホリパーゼ D1 の役割.....	22
4.3	ホスホリパーゼ D1 を介した膀胱癌の細胞浸潤における機序.....	24
4.4	ホスホリパーゼ D1 を介したマウス膀胱発癌モデルにおける腫瘍浸潤の機序	
	25	
4.5	ホスホリパーゼ D1-ホスファチジン酸-MMP-13 経路と NF- κ B シグナル経路	
	の関連.....	29
5	考察.....	32

6	統括.....	39
7	謝辞.....	40
8	出典.....	42
9	参考文献.....	43
10	略語.....	49
11	図表.....	52

1 序論

1.1 膀胱癌における浸潤の重要性

膀胱癌は、尿路に発生する悪性腫瘍の中で最も多く占め、世界で 9 番目に多い悪性腫瘍である。[1]欧米諸国では、毎年約 8-12 万人が新たに膀胱癌と診断され、約 2-5 万人が死亡している。[2,3]欧米諸国と同様に、本邦でも近年増加傾向にあり、2017 年には 23,039 人が新たに膀胱癌と診断され、2019 年には 8,911 人が死亡している。[4]このように、膀胱癌は生命を脅かす可能性が高いため、国内外を問わず、近年でも重要な悪性腫瘍として認識されている。

膀胱癌は、がん細胞が膀胱粘膜、粘膜下組織、膀胱筋層で構成される膀胱壁に、どの程度まで深く浸潤しているかによって、大きく筋層非浸潤性膀胱癌と筋層浸潤性膀胱癌の 2 つに分類される。新たに膀胱癌と診断される症例のうち、約 70%の症例は筋層非浸潤性膀胱癌で、残りの約 30%が転移症例を含む筋層浸潤性膀胱癌が占める。[5]

転移のない筋層浸潤性膀胱癌の標準治療は膀胱全摘除術であり、診断時からの転移症例や術後の転移再発症例では、抗がん剤や免疫チェックポイント阻害剤などの薬物療法が主体となる。これらの切除不能な筋層浸潤性膀胱癌の 5 年全生存率は約 15%と極めて予後不良である。

[6]さらに、切除可能な筋層浸潤性膀胱癌の場合でも、膀胱摘出に伴い尿路変向術を行う必要があるため、術後の quality of life (QOL) の低下が臨床上大きな問題となっている。一般的に、尿路変向術のうち回腸の一部を利用した回腸導管造設術と、回腸新膀胱造設術の2つがよく用いられる。[7]前者は尿を持続的に対外に排出するために腹部にストーマを作成し、尿を貯めるパウチを貼り付ける必要がある。後者は回腸を利用してパウチ状の代用膀胱を作成するため、体内に尿を貯めることができる利点がある一方で、尿意は感じないため定期的に腹圧ないし用手圧迫による尿の排出を行う必要があり、慢性的な残尿による尿路感染症のリスクや腎機能低下のリスクといった欠点がある。このように、筋層浸潤性膀胱癌は切除可能な場合であっても、患者にとっては再発リスクのみならず、術後 QOL 低下も大きな問題となる。

一方、筋層非浸潤性膀胱癌の標準治療は経尿道的膀胱腫瘍切除術であり、術後の予後は一般的に良好である。しかしながら、膀胱上皮内癌や高悪性度膀胱癌、粘膜下浸潤を伴う T1 症例では、術後の再発率が高く、また一部の症例で筋層浸潤性膀胱癌への進展が臨床上大きな問題となっている。[8]このように、筋層非浸潤性膀胱癌から筋層浸潤性膀胱癌への変化、即ち膀胱粘膜から筋層へのがん細胞の浸潤が、膀胱癌

の進行において極めて重要な過程と考えられている。

1.2 ホスホリパーゼ D の生理機能

ホスホリパーゼ D (phospholipase D: PLD) には、哺乳類における古典的なアイソフォームとして PLD1 と PLD2 の 2 つが広く知られており [9, 10]、細胞膜に豊富に存在するリン脂質であるホスファチジルコリン (phosphatidyl choline: PC) をホスファチジン酸 (phosphatidic acid: PA) とコリンに加水分解するための代謝酵素である。この PLD が産生する PA が、脂質性シグナル伝達物質として小胞輸送や開口分泌、オートファジー、細胞内代謝制御などの様々な細胞機能において重要な役割を果たしている。[11] このように、PLD の生理機能はこの PA を介した細胞内シグナル伝達機構によりもたらされる。PA が産生される経路として、先述したような PLD による PC の加水分解以外に、G3P (glycerol 3-phosphate) から LPAAT (lysophosphatidic acid acyltransferase) により産生されるケネディー経路や、DGK (diacylglycerol kinase) による DG (diacylglycerol) のリン酸化がある。(図 1) また、PA はひとつの産生経路が抑制されるようなストレス条件下では、補完的な産生が行われることが知られている。[12, 13]

PLD1 は分泌小胞やエンドソーム、リソソーム、ゴルジ体などの哺乳類細胞内膜において主に存在する。[14-16]PLD1 の基礎活性レベルは低く、PKC や Rac、Rho、Arf などのタンパク質によって活性化されることで細胞外シグナル伝達が起こり、様々な細胞機能の制御が行われる。[17]一方、PLD2 は主に細胞膜に存在し、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: PI(4,5)P₂) の存在によって十分に高い活性レベルを示す。[18]このように、PLD1 と PLD2 の機能は、一般的にそれらの細胞内における局在の差によって生じる PA 産生区画の違いが影響することが知られている。

1.3 がんにおけるホスホリパーゼ D の役割

PLD はこのような正常細胞機能だけでなく、乳癌、大腸癌、前立腺癌を始めとする多くの癌においてその活性が亢進していることが知られている。[19-22]これら癌における PLD 活性の亢進は、がん細胞の遊走や増殖、生存、浸潤、転移能と深く関連している。[12, 22-25] さらに、PLD はがん細胞やがん組織だけでなく、がん微小環境においても腫瘍増殖や転移において重要な役割を果たすことが報告されている。[26]

これらの研究のうち、Zeng ら[12]と Utter ら[22]は、PLD 阻害剤や PLD

遺伝子発現抑制による PLD 活性の低下に伴う細胞の遊走や浸潤抑制に加え、PLD 遺伝子強制発現による PLD 活性の増加に伴う遊走・浸潤の亢進も併せて示している。その他の研究では、PLD 遺伝子発現抑制や PLD 阻害剤、PLD により産生される PA の添加による実験が行われている。[23-25]このように、種々の手法を用いた PLD の発現や活性の調整による実験から、PLD の働きを調べる研究がこれまで行われてきた。

一方で、様々な種類のがんにおける PLD の役割は広く研究されているが、未だ PLD の役割が不明ながん種も多く、また PLD1 と PLD2 の各アイソフォームにおける正確な役割も十分に解明されていない。各 PLD アイソフォームにおける役割に関しては、例えば PLD1 については、大腸癌や乳癌細胞においてその発現が亢進し、MMP-9 の発現制御を介して細胞浸潤を促進することが知られている。[27,28]一方、PLD2 については、大腸癌患者における PLD2 発現亢進が予後や腫瘍の臨床病理学的特徴と関連することが報告されている。[20]さらに、乳癌やグリオーマにおいて、PLD2 は細胞増殖や生存に関与することも知られている。[23,24]このように、がんの種類やアイソフォームによって、PLD は様々な役割を持つことが分かっている。

我々のグループでは、先行研究においてヒト腎細胞癌における PLD

の役割について報告した。[29]この研究では、PLD1 と PLD2 のうち、主に PLD2 の発現亢進がヒト腎細胞癌における腫瘍増殖や浸潤を促進し、予後不良と関連することを示した。一方で、ヒト腎癌細胞を用いた *in vitro* 解析では、PLD2 と同様に PLD1 も有意に細胞浸潤を促進する結果が認められた。

先述のように、膀胱癌ではがん細胞の浸潤が、がん進行における最も重要な過程として考えられている。しかしながら、膀胱癌の浸潤における PLD の意義はこれまで研究されておらず、未だ不明である。我々の腎細胞癌における先行研究で得られた知見より、PLD を介した膀胱癌の浸潤メカニズムを研究することにより、膀胱癌における PLD の意義が明らかになることが期待されると考えた。

2 目的

本研究では、膀胱癌の浸潤メカニズムにおける PLD の役割を明らかにすることを目的とする。

3 対象と方法

3.1 遺伝子発現レベルで層別化した膀胱癌患者の生存分析および RNA シークエンス解析におけるデータ取得

The Cancer Genome Atlas (TCGA)データベースより、膀胱癌患者 408 例における生存情報を含めた臨床病理学的データおよび RNA シークエンスデータを、Genomic Data Commons (GDC) Data Portal を用いてダウンロードした。[30]生存解析では、408 例のうち経過観察時間が不明の 2 例と、-64 日と登録されている 1 例の 3 例を除外し、合計 405 例の生存解析を行った。各遺伝子の発現レベルを高発現群、低発現群に層別化し、2 群間比較を行った。遺伝子発現レベルのカットオフは、2 群間比較の log-rank test における P 値が最小となるような、生存において最大の差をもたらす値を用いた。

3.2 細胞と細胞培養

293T 細胞株は、理化学研究所バイオリソースセンターより提供いただいた。T24 細胞株と 5637 細胞株は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター・細胞バンクより提供いただいた。RT112 細胞株は DS ファーマバイオメディカル株式会社より購入し、RT4 細胞株は American

Type Culture Collection より購入した。TCC-sup 細胞株と 253J 細胞株は、それぞれ京都大学とノースウェスタン大学より提供いただいた。

293T 細胞株は 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) を添加した DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培地を使用し、それ以外の細胞株は 10% FBS を添加した RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 培地を使用し、37°C、CO₂ 濃度 5% の条件下で培養した。PLD1 遺伝子発現抑制株の培養は、1.0 μg/mL の濃度になるようにピューロマイシンを添加した RPMI 培地で行った。

3.3 マウス

6-8 週齢の雌 C57/BL/6 マウスは、日本チャールズ・リバー株式会社より購入した。PLD1 ノックアウト (knockout: KO) マウスは筑波大学医学医療系生理化学研究室 金保安則先生に提供いただき、10 世代以上交配を行った 6-8 週齢の雌 *PLD1*^{-/-} を使用した。[26] 各マウスは筑波大学動物実験委員会によって承認された動物実験取扱規定に基づき、SPF (specific pathogen free) 条件下の専用施設において、餌と水は自由に与えられ管理された。

3.4 RNA の抽出と quantitative real-time PCR (qPCR)

各細胞株からの Total RNA は、TRIzol reagent (Invitrogen 社) を用いて抽出し、マウス全膀胱サンプルからの Total RNA は NucleoSpin RNA kit (TaKaRa 社) を用いて抽出した。cDNA 合成のための逆転写反応は、High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems 社) を用いて行った。PCR 反応のセットアップ試薬は SYBER Green I qPCR Master Mix (Applied Biosystems 社) を使用し、qPCR は ABI7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems 社) または QuantStudio 5 Real-Time PCR system (Applied Biosystems 社) を使用して行った。内在性コントロールは HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) 遺伝子を使用した。qPCR で使用したオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列は下記の通りである。

遺伝子シンボル		塩基配列
Human PLD1	Sense	5'-CAGTGGTTGAGGGAAATCGT-3'
	Antisense	5'-AACGCCAGACAAATGTGACC-3'
Human PLD2	Sense	5'-CCGTCTCGGAGCTCATCTAC-3'
	Antisense	5'-TGCTCCAAGAATCACACTGC-3'
Human DGKA	Sense	5'-AAGGCATCGCAGTGCTAAAC-3'
	Antisense	5'-AGGGTCGGTGATGACTTTAGC-3'
Human MMP-13	Sense	5'-AACGCCAGACAAATGTGACC-3'
	Antisense	5'-AAAACAGCTCCGCATCAACC-3'
Human MMP-9	Sense	5'-CCATTTTCGACGATGACGAGTTG-3'
	Antisense	5'-TGCGTTTCCAAACCGAGTTG-3'
Human CXCL1	Sense	5'-CCCCAAGAACATCCAAAGTGTG-3'
	Antisense	5'-TTTCCGCCATTCTTGAGTG-3'
Human COL5A1	Sense	5'-AGCAGGGTATCCAGCAGATTG-3'
	Antisense	5'-AGCAATTCTGTGCCACTTGC-3'
Human ANOS1	Sense	5'-AGAAAGCCAGTGGATTTGCG-3'
	Antisense	5'-TCCACACCCATTTCGAACAAC-3'
Human ICAM1	Sense	5'-TGGACGTGGCCAGAAAATTC-3'
	Antisense	5'-ACAGTCACTGATTCCCCGATG-3'
Human RELA	Sense	5'-TTTCGCAAGCTGATGTGCAC-3'
	Antisense	5'-TACTGGAATTCCATGGGCTCAC-3'
Human HPRT	Sense	5'-GACTTTGCTTTCCTTGGTC-3'
	Antisense	5'-AGTCAAGGGCATATCCTAC-3'
Mouse Mmp-13	Sense	5'-TCTTCTGGCACACGCTTTTC-3'
	Antisense	5'-AGCCTTTGGAAGTCTTGTC-3'
Mouse Hprt	Sense	5'-CTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG-3'
	Antisense	5'-CCAGTTTCACTAATGACACAAACG-3'

3.5 ウェスタンブロット解析

各細胞株におけるタンパク発現レベルは、過去に報告されている方法に従って、ウェスタンブロット解析を用いて検討した。[31]使用した一次抗体と、抗体の希釈濃度は下記の通りである。二次抗体は HRP (Horseradish peroxidase) 酵素で標識された抗マウスおよび抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare 社) を、それぞれ 1 万倍の希釈濃度で使用した。ウェスタンブロットシグナルは、化学発光試薬である ImmunoStar Zeta (Wako 社) を使用し、Fujifilm LAS-4000 imager (Fujifilm 社) を用いて検出した。内在性コントロールは β -アクチンを使用した。

抗体名	製造会社	カタログ番号	希釈濃度
anti-PLD1	Santa Cruz Biotechnology	sc-28314	1:200
anti-NF- κ B p65	Cell Signaling Technology	#8242	1:200
anti-P-NF- κ B p65 Ser536	Cell Signaling Technology	#3031	1:200
anti-I κ Ba	Cell Signaling Technology	#4814	1:200

3.6 siRNA を用いた細胞株における遺伝子発現抑制

siRNA は ONTARGETplus human MMP-13 SMART pool siRNA (L-005955-00-0005, horizon 社)、ON-TARGETplus human RELA SMART pool siRNA (L-003533-00-0005)、ON-TARGETplus non-targeting pool siRNA (D-001810-10-05) を用いた。Lipofectamine RNAiMax Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて、上記 siRNA を 25 nmol/L にて各細胞株にトランスフェクションした。

3.7 レンチウイルスベクターを用いた PLD1 遺伝子発現抑制

PLD1 の shRNA は、過去の報告に従って、pLKO.1 レンチウイルスベクターを用いて作成した。[32, 33]使用した shRNA の塩基配列は下記の通りである。レンチウイルスベクタープラスミドのトランスフェクションおよびレンチウイルスのトランスダクションは、我々の先行研究に従って行った。[29]まず、Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen 社) を用いて、293T 細胞株にレンチウイルスベクタープラスミドである pLKO-shControl または pLKO-shPLD1、pMDLg/pRRE、pRSV-Rev、pMD2.G をトランスフェクションした。次に、48 時間経過後、ウイルス粒子を含む培養上清を回収し、5637 細胞株、253J 細胞株に添加し、

37°C、CO₂濃度 5%の条件下で培養した。24 時間後に、1.0 μg/mL 濃度のピューロマイシン添加 RPMI 培地へ交換し、shControl 株と shPLD1 株を選択した。

オリゴヌクレオチド配列	
shPLD1 #1	5'-CCGGGCGTCTACATCCCAACATAAACTC GAGTTTATGTTGGGATGTAGACGCTTTTT-3' 5'-AATTAAAAAGCGTCTACATCCCAACATA AACTCGAGTTTATGTTGGGATGTAGACGC-3'
shPLD1 #2	5'-CCGGCCACTAGAAGACACACGTTTACTC GAGTAAACGTGTGTCTTCTAGTGGTTTT-3' 5'-AATTAAAAACCACTAGAAGACACACGTT TACTCGAGTAAACGTGTGTCTTCTAGTGG-3'
control scramble	5'-CCGGGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCTC GAGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTTTTT-3' 5'-AATTAAAAAGCACGACTTCTTCAAGTCC GCCTCGAGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGC-3'

3.8 細胞浸潤アッセイ

細胞浸潤は BioCoat Matrigel invasion chamber (Corning 社) を使用し、同社のマニュアルに従って評価した。まず、 5×10^5 個に調整した細胞懸濁液 (培地は FBS 非含有 RPMI 培地) を各インサートチャンバーに播種した。各ウェルには 10%FBS 含有 RPMI 培地を注入した。37°C、CO₂濃度 5%の条件下で培養を開始し、22 時間後にインサート

チャンバーの内側（メンブレン上面）を綿棒で丁寧に拭き非浸潤細胞を除去した。メンブレン下面の浸潤細胞をメタノールで固定、ディフ・クイック液（シスメックス社）で染色した。浸潤細胞を光学顕微鏡（200倍）で観察し、5視野についてカウントし、その平均値を浸潤細胞数とした。各細胞における細胞浸潤アッセイは2回以上行い、再現性を確認した。

3.9 MMP-13 タンパクの検出

細胞を取り除いた培養上清におけるヒト MMP-13 タンパク発現レベルは、Human MMP-13 enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）kit（Proteintech 社）を用いて検討した。タンパク発現レベルは細胞数で補正を行った。

3.10 PA の調整

Phospholipid 1,2,-dioleoyl phosphatidic acid（DOPA）は Avanti Polar Lipids 社よりパウダーで購入した。PA の調整は過去の報告に従った。[34]まず 0.5%濃度になるように BSA（bovine serum albumin）を PBS（phosphate-buffered saline）で溶解し、この溶液を用いて DOPA が

1 nmol/L の濃度になるように調整した。次に、この DOPA 溶解液をソニケーション後、Mini Extruder (Avanti Polar Lipids 社) を用いて粒子径を揃えた。最後に、最終濃度 300 nmol/L になるように調整し、細胞株へ添加した。4 時間後に細胞から Total RNA、タンパクを抽出し、それぞれ qPCR、ウエスタンブロット解析を行った。

3.11 マウス膀胱発癌モデル

6-8 週齢の雌 C57/BL/6 マウスと PLD1-KO マウスに、0.025% に調整した *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) (東京化成工業) を自由飲水させた。飲水開始後前、開始後 8 週、12 週、16 週、20 週時点において、それぞれ膀胱を摘出して半割した。半分は HE 染色による組織学的評価のため、10%ホルマリン溶液で固定した。残りの半分は qPCR および RNA シークエンスによる検討のため凍結保存した。

3.12 パスウェイ遺伝子解析

RT2 Profiler PCR array (SA Biosciences 社) のうち、細胞浸潤に関連する 84 パスウェイ遺伝子を含む Human Angiogenesis および Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules パネルを使用した。同社の

マニュアルに従って、5637-shControl 株と 5637-shPLD1 株における発現変動遺伝子解析を行った。

3.13 RNA シークエンス

マウス膀胱発癌モデルにおける膀胱サンプルより抽出した Total RNA を用いて、RNA シークエンスを行った。ライブラリー調整および RNA シークエンスはつくば i-Laboratory LLP へ受託解析を依頼した。まず、500 ng の Total RNA に対して、NEBNext rRNA Depletion Kit (New England Biolabs 社) を用いてリボソーム RNA 除去を行った。次に、NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit (New England Biolabs 社) を用いてライブラリー調整を行い、Bioanalyzer (Agilent Technologies 社) を用いてライブラリーの品質評価および選別を行った。最後に、ライブラリーを NextSeq500 (Illumina 社) を用いて 2 × 36 base pair (bp) ペアエンドシークエンスを行った。

3.14 RNA シークエンス解析

シークエンスリードのマッピング (mm10 マウスリファレンスゲノムを使用) および発現量の定量は、CLC Genomics Workbench version

10.1.1 (Qiagen) を使用し行った。

次に、比較したいサンプルを用いて2群を作成し、上記ソフトウェア内の Empirical Analysis of DGE tool を用いて、この2群間における発現変動遺伝子解析を行った。発現変動遺伝子は false discovery rate (FDR) < 0.05 かつ $|\text{fold-change}| > 2.0$ を満たす遺伝子と定義した。ヒートマップおよびボルケーノプロットを R package (version 4.0.2; R Foundation)を用いて作成し、解析データの可視化を行った。パスウェイ解析は Ingenuity pathway analysis (IPA, Qiagen 社)を用いて行った。本研究で得られた RNA シークエンスデータは、公共データベースである Gene Expression Omnibus (GEO)へアップロードし、登録した。(登録番号: GSE166004)

3.15 統計解析

実験により得られたデータは、平均値+標準偏差で表示した。2群間比較は GraphPad Prism8 (GraphPad Software 社)を用いて、Student *t*-test で行った。生存解析では、R package を用いて、Kaplan-Meier 法にて全生存率を算出し、log-rank test で2群間比較を行った。2説明変数における相関は、R package を用いて Pearson の相関分析で検討

した。P 値 < 0.05 を統計学的有意と判断した。

4 結果

4.1 膀胱癌患者におけるホスホリパーゼ D の発現と予後の関連

まず、膀胱癌患者のがん進行における PLD1 と PLD2 それぞれの意義を検討した。公共データベースである TCGA データを用いた *in silico* 解析では、PLD1 の発現レベルが高い患者群では発現レベルが低い患者群と比較して、予後が有意に不良であった。(P < 0.001) (図 2) 一方、PLD2 でも同様に、発現レベルの高い患者群において予後が有意に不良であった。(P = 0.037) (図 2)

次に、PLD1 と PLD2 の相互作用による予後への影響を検討するため、両者の発現レベルの相関を調べたところ、相関係数は $r=0.28$ と小さいものの、PLD1 の発現レベルは PLD2 の発現レベルと正の相関の傾向を認めた。(図 3) また、PLD1 高発現かつ PLD2 高発現の患者群では、PLD1 低発現かつ PLD2 低発現の患者群と比較して、予後が有意に不良であった。(P < 0.0001) (図 4) さらに、PLD1 高発現かつ PLD2 低発現の患者群では、PLD1 低発現かつ PLD2 高発現の患者群と比較して、予後不良の傾向を認めた。(図 4) これらの結果より、PLD1 高発現は、PLD2 高発現と比較して、より膀胱癌患者の予後不良と関連することが示唆された。

一方、PA を産生する PLD 以外の酵素のひとつである DGKA (diacylglycerol kinase A) は、様々ながんにおいて PLD の発現や活性の喪失を補完する役割をもつことが報告されている。[12, 13, 35, 36]この DGKA が PLD1 の発現低下を補完することで PA 産生を調整し、膀胱癌患者の予後に影響を与える可能性が示唆された。まず、DGKA 発現レベルと膀胱癌患者の予後との関連を検討した結果、両者に有意な関連は認めなかった。(図 5) 次に、PLD1 発現レベルと DGKA 発現レベルとの間に負の相関があれば、膀胱癌患者全体において、PLD1 の発現低下を DGKA の発現上昇が補完する可能性が考えられたが、両者に有意な相関は認めなかった。(図 6) さらに、PLD1 低発現の患者群に絞って DGKA 発現レベルと予後との関連を検討した結果、DGKA 低発現群と比較して、DGKA 高発現群において有意に予後良好の結果を認めた。

($P=0.038$) (図 7) これらの結果より、膀胱癌患者においては、DGKA は PLD1 発現低下を補完する役割は認めず、またそれに伴う予後への影響も認めなかった。

以上の TCGA データを用いた *in silico* 解析結果より、PLD1 と PLD2 のうち、PLD1 高発現が膀胱癌患者の予後不良と主に関連することが明らかとなった。

4.2 ヒト膀胱癌細胞の浸潤におけるホスホリパーゼ D1 の役割

次に、ヒト膀胱癌細胞の浸潤における PLD1 の役割について検討を行った。ヒト膀胱癌細胞株のうち、RT112 細胞株と RT4 細胞株は筋層非浸潤性膀胱癌のモデルとして、T24 細胞株、5637 細胞株、TCC-sup 細胞株、253J 細胞株はそれぞれ筋層浸潤性膀胱癌のモデルとして広く研究に利用されている。これらのヒト膀胱癌細胞株における PLD1 発現レベルを検討するためにウエスタンブロット解析を行ったところ、筋層浸潤性膀胱癌の細胞株のうち、特に 5637 細胞株と 253J 細胞株において PLD1 の高い発現レベルを認めた。(図 8) そこで、この 2 つの細胞株に対して、shRNA を用いた PLD1 遺伝子発現抑制を行い、ウエスタンブロット解析にて PLD1 発現レベルが低下していることを確認した。(図 9) 次に、PLD1 遺伝子発現抑制による細胞浸潤への影響を検討するために、細胞浸潤アッセイを行ったところ、5637 細胞株と 253J 細胞株ともに、PLD1 遺伝子発現抑制株において有意な細胞浸潤の抑制を認めた。(図 10)

しかしながら、どちらの細胞株においても細胞浸潤能と PLD1 タンパク発現レベルとの相関が認められなかったため (図 9、図 10)、次に

先述のように PLD1 による PA 産生の抑制を補完する可能性がある PLD2 と DGKA の発現レベルを調べることにした。qPCR にて各 mRNA 発現レベルを検討した結果、PLD2 は PLD1 遺伝子発現抑制の有無で有意な変化は認めず (図 11)、DGKA は PLD1 遺伝子発現抑制により発現低下の傾向を認めた。(図 12) これらの結果より、PLD1 遺伝子発現抑制による PLD2 や DGKA の発現上昇、即ち、PLD1 による PA 産生抑制の補完的な影響は認めなかった。続いて、各細胞株における PLD1 タンパク発現レベルではなく、PLD 活性が細胞浸潤能に影響を与える可能性を考え、PLD 活性アッセイキット (ab183306, アブカム社) を用いて、プロトコールに従い細胞ライセートにおける PLD 活性を比色分析 (吸光光度法) で間接的に測定した。データは割愛するが、検出感度以下で PLD 活性を検出することができなかったため、評価ができなかった。今回の検討では細胞浸潤能と PLD1 タンパク発現レベルとの乖離に関する明確な理由を示すことができなかったが、今後の課題として LPAAT を介した PA 産生 (図 1) の補完や、オフターゲット効果も併せて検討が必要と考えられた。以上の検討により、PLD1 が主に膀胱癌細胞の浸潤を促進することが明らかとなった。

4.3 ホスホリパーゼ D1 を介した膀胱癌の細胞浸潤における機序

次に、PLD1 を介した膀胱癌の細胞浸潤における機序を明らかにするために、細胞浸潤に関連するパスウェイ遺伝子に焦点をあてた PCR アレイを用いて、5637-shControl 細胞株と 5637-shPLD1 細胞株における発現変動遺伝子解析を行った。168 遺伝子のうち 23 遺伝子において、shControl 細胞株と比較して shPLD1 細胞株における有意な遺伝子発現レベルの低下を認めた。(表 1) これら 23 遺伝子について、TCGA データを用いた *in silico* 解析により膀胱癌患者の予後 (図 13) および PLD1 発現レベルとの相関 (図 14) により選別した結果、ANOS1、ICAM1、MMP-9、MMP-13 の 4 遺伝子が候補として挙げられた。最後に、5637 細胞株と 253J 細胞株においてこれら 4 遺伝子の mRNA 発現レベルを qPCR で調べた結果、PLD1 遺伝子発現抑制により、唯一、MMP-13 が両細胞株において有意な発現低下を認めた。(図 15) 以上より、MMP-13 は膀胱癌の細胞浸潤において重要な役割をもつことが示唆された。

TCGA データを用いた *in silico* 解析結果より、MMP-13 発現レベルは膀胱癌患者の予後不良と有意に関連し ($P=0.044$, 図 16)、相関係数は $r=0.19$ と小さかったものの、PLD1 発現レベルと正の相関の傾向を持つことが明らかとなった。(図 17) PLD1 遺伝子発現抑制により、5637 細

胞株と 253J 細胞株ともに、MMP-13 発現レベルの有意な低下を認めた。

(図 15) さらに、MMP-13 は分泌タンパクのため、培養上清における MMP-13 タンパクレベルを ELISA で検討した結果、PLD1 遺伝子発現抑制により有意な低下を認めた。(図 18)

次に、MMP-13 が膀胱癌の細胞浸潤に直接関連するか検討するために、両細胞株において siRNA を用いて MMP-13 遺伝子発現抑制を行ったところ、MMP-13 mRNA 発現レベルの有意な低下を認めた。(図 19) さらに細胞浸潤アッセイにより、MMP-13 遺伝子発現抑制株において有意な細胞浸潤の抑制を認めた。(図 20) これらの結果より、PLD1 は MMP-13 の発現制御を介して、細胞浸潤を促進することが示唆された。

4.4 ホスホリパーゼ D1 を介したマウス膀胱発癌モデルにおける腫瘍浸潤の機序

上記 *in vitro* 解析に引き続き、*in vivo* において PLD1 を介した膀胱癌の腫瘍浸潤における機序の検討を行った。PLD1 が膀胱癌の腫瘍浸潤を促進するかどうか検討するために、BBN の自由飲水によるマウス膀胱発癌モデルにより、WT (wild-type) マウスと PLD1-KO マウスにおける浸潤性膀胱癌の発生割合を比較した。BBN の飲水開始後、12–16 週

にかけて上皮内癌が形成され、16–20 週で浸潤癌の形成が安定して認められた。(図 21) 16 週時点における浸潤癌の割合を両群で比較した結果、WT 群 26.7% (4/15 匹)、PLD1-KO 群 13.3% (2/15 匹) と PLD1-KO 群において浸潤癌の割合が低い結果であった。(図 22) さらに、20 週時点においても、それぞれ 42.9% (6/14 匹)、20.0% (3/15 匹) と PLD1-KO 群において浸潤癌の割合が低い結果であった。(図 22) これらの結果より、PLD1 は膀胱発癌過程において、腫瘍浸潤を促進することが示唆された。

次に、*in vitro* での結果と同様に、MMP-13 が PLD1 を介した腫瘍浸潤に関連するかどうか検討することとした。飲水開始後 8 週、12 週、16 週時点で摘出した膀胱サンプルにおける MMP-13 mRNA 発現レベルを qPCR で経時的に検討した結果、WT 群では 16 週にかけて発現レベルの上昇を認めた一方で、PLD1-KO 群では著明な発現レベルの抑制を認めた。(図 23) また、16 週時点における MMP-13 mRNA 発現レベルを 2 群間比較したところ、PLD1-KO 群で有意な発現レベルの抑制を認めた。(図 24) これらの結果より、*in vitro* と同様に、*in vivo* でも PLD1 は MMP-13 の発現制御を介して腫瘍浸潤を促進することが示唆された。

続いて、MMP-13 以外に腫瘍浸潤を促進する潜在的な候補遺伝子が

存在するか、RNA シークエンスによる網羅的トランスクリプトーム解析を用いて検討した。遺伝子発現が顕著であった 2,028 遺伝子を用いてヒートマップを作成し遺伝子発現プロファイルを可視化、さらに階層型クラスタリングを行ったところ、BBN の飲水開始前と、飲水開始後 8 週のサンプル間における遺伝子発現プロファイルが明確に異なることが明らかとなった。(図 25) また、飲水開始後 12-16 週のサンプルにおける遺伝子発現プロファイルとも異なる結果を認めた。WT 群と PLD1-KO 群における遺伝子発現プロファイルの違いを明らかにするために、飲水開始前、8 週、12 週、16 週それぞれにおいて、2 群間における発現変動遺伝子解析を行い、ボルケーノプロットを作成して可視化した。(図 26) 飲水開始後 16 週時点において、最も多い 538 個の発現変動遺伝子を認め、この 16 週における遺伝子発現プロファイルの大きな変化は、このマウス膀胱発癌モデルにおける、16 週時点での浸潤癌の形成との関連が示唆された。IPA を用いて、この 538 発現変動遺伝子におけるパスウェイ解析を行ったところ、WT 群と比較して、PLD1-KO 群における結合組織の分解や細胞浸潤に関連する生物学的機能の低下を認めた。(図 27) さらに、PLD1-KO 群において活性化しているパスウェイの一つとして、MMP-13 を含む MMP の阻害が認められた。

(図 28) これらの RNA シーケンスによる網羅的トランスクリプトーム解析により、*in vitro* 解析の結果と同様に、*in vivo* 解析でも PLD1-MMP-13 経路が腫瘍浸潤を促進する可能性が強く示唆された。

次に、MMP-13 発現制御に関わる転写制御因子を明らかにするために、IPA を用いて上流制御因子解析を行った。先述のように、飲水開始後 16 週時点における WT および PLD1-KO 群間の発現変動遺伝子が最多であったため、まず 16 週時点における発現変動遺伝子を用いて解析を行ったところ、潜在的な転写制御因子として Nfkb1-RelA が候補に挙げられ、PLD1-KO 群と比較して、WT 群でより活性化を認めた。(表 2) さらに、この Nfkb1-RelA が制御する下流シグナル分子として MMP-13 の存在を確認した。発現変動遺伝子数は少ないものの、膀胱癌が形成され始める 12 週時点においても同様に上流制御因子解析を行ったところ、16 週時点と同様に Nfkb1-RelA が候補に挙げられた。(表 3) この結果に基づき、次に文献検索にて MMP-13 の転写制御因子を検討したところ、ヒト軟骨肉腫細胞における MMP-13 発現制御において、NF- κ B p65 (RELA) の活性化、特に NF- κ B p65 Ser536 のリン酸化が関与することを示した研究報告を見つけた。[37]これらの結果より、膀胱癌の浸潤において、NF- κ B p65 (RELA) が MMP-13 の発現制御に関わる潜在

的な転写調節因子である可能性が示唆された。

4.5 ホスホリパーゼ D1-ホスファチジン酸-MMP-13 経路と NF- κ B シグナル経路の関連

次に、PLD1 遺伝子発現抑制により NF- κ B p65 Ser536 のリン酸化レベルが変化するかどうかウエスタンブロット解析を用いて検討した結果、5637 細胞株と 253J 細胞株ともに PLD1 遺伝子発現抑制株においてリン酸化レベルの低下を認めた。(図 29) しかしながら、NF- κ B p65 Ser536 のリン酸化レベルの変化は小さかったため、NF- κ B の活性制御に関わる他の NF- κ B 経路の検討を行った。I κ B 複合体のうち特に I κ B α が NF- κ B 活性を抑制することが知られているため、PLD1 遺伝子発現抑制株における I κ B α タンパク発現レベルおよびリン酸化レベルをウエスタンブロット解析にて検討した。I κ B α のリン酸化レベルは検出できなかったが、タンパク発現レベルは両細胞株ともに PLD1 遺伝子発現抑制株において亢進を認めた。(図 29) これらの結果より、PLD1 遺伝子発現抑制は NF- κ B p65 Ser536 のリン酸化だけではなく、I κ B α を含む、NF- κ B 活性化に関わる抑制因子の発現にも影響する可能性が示唆された。

NF- κ B p65 Ser536 のリン酸化が MMP-13 発現レベルを促進するか検討するために、次に NF- κ B p65 タンパクをコードする遺伝子である RELA に対して siRNA を用いて遺伝子発現抑制を行ったところ、両細胞株ともに RELA mRNA 発現レベルは有意に低下した。(図 30) また、RELA 遺伝子発現抑制に伴い、NF- κ B p65 タンパク発現レベルとともに、NF- κ B p65 Ser536 のリン酸化レベルも顕著な低下を認め(図 31)、さらに MMP-13 mRNA 発現レベルの有意な低下も認めた。(図 32) これらの結果より、PLD1 は NF- κ B シグナル経路、特に NF- κ B p65 Ser536 のリン酸化を介して、MMP-13 の発現制御を行っていることが示唆された。

最後に、PLD1 により産生される PA が MMP-13 の発現を促進するか検討を行った。PLD1 遺伝子発現抑制に伴い MMP-13 mRNA 発現レベルは有意に低下したが、PA の添加によりその発現レベルの有意な回復を認めた。(図 33) さらに、PLD1 発現抑制株における NF- κ B p65 Ser536 のリン酸化レベルは、PA の添加に伴い増加傾向を認めた。(図 34) 一方、PLD1 遺伝子発現抑制に伴いタンパク発現レベルの低下を認めた I κ B α に関しては、5637 細胞株と 253J 細胞株に共通する発現レベルの増加傾向は認めなかった。(図 35) 以上の結果より、PLD1 により産生

された PA が、NF- κ B シグナル経路のうち特に NF- κ B p65 Ser536 のリン酸化レベルの調整による MMP-13 の発現制御を介して、膀胱癌の細胞浸潤を促進することが示唆された。(図 36)

5 考察

膀胱癌は進行性疾患の特徴をもち、筋層非浸潤性膀胱癌から筋層浸潤性膀胱癌へのシフト、すなわち膀胱粘膜から筋層への膀胱癌細胞の浸潤が、疾患の進行における本質的な過程と考えられている。これまで多くの研究により、様々な種類のがんにおいて、PLD が細胞浸潤を促進することが報告されてきたが[12, 19, 22, 24, 29]、膀胱癌の細胞浸潤における PLD の意義はこれまで研究されていなかった。本研究は、PLD1 と PLD2 のうち、主に PLD1 の高い発現レベルが膀胱癌患者の予後不良と関連し、PLD1 遺伝子発現抑制によりヒト膀胱癌細胞株における浸潤が有意に抑制されることを明らかにした。また、マウス BBN 膀胱癌モデルにおいて、PLD1 遺伝子発現抑制が膀胱癌と浸潤癌の発生を抑制することを示した。さらに、PLD1 が NF- κ B シグナル経路のうち、特に NF- κ B p65 Ser536 のリン酸化を介した MMP-13 の発現制御により膀胱癌の浸潤を促進することを明らかにした。

これまでの研究により PLD の発現や活性が様々ながんに関与することが報告されており[19-22]、*in vitro* における RNA 干渉を用いた PLD1 遺伝子発現抑制により、乳癌[12]、腎癌[29]、前立腺癌[22] において細

胞浸潤が抑制されることが明らかにされてきた。本研究はこれまでの研究と同様に、PLD1 遺伝子発現抑制により *in vitro* におけるヒト膀胱癌の細胞浸潤が有意に抑制されることを明らかにしたとともに、マウス膀胱発癌モデルを用いた *in vivo* における解析において、膀胱癌の腫瘍浸潤が抑制されることを初めて示した。

さらに、本研究では PLD1 遺伝子発現抑制に伴う分子メカニズムを、*in silico*、*in vitro*、*in vivo* からの総合的なアプローチにより、詳細に検討を行った。*in silico* 解析により、膀胱癌患者において PLD1 発現レベルと正の相関関係を示し、さらに予後不良と関連する遺伝子として ANOS1、ICAM1、MMP-9、MMP-13 の 4 遺伝子を明らかにした。

ANOS1 は、別名 KAL1 と呼ばれ、先天性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症と嗅覚異常を中核症状とする Kallmann 症候群のうち、X 連鎖性遺伝における責任遺伝子であり、[38]神経細胞の接着や増殖、遊走に関わることが知られている。[39-41]がんにおける役割としては、Kanda らが胃癌における ANOS1 mRNA 発現レベルが、腫瘍の臨床病理学的特徴と患者の予後不良と関連していたことを報告している。[42]また、公共データベースの GEO を用いた *in silico* 解析により、大腸癌患者における予後不良と関連することも示されている。[43]一方で、膀胱

癌における ANOS1 の意義や、PLD1 との関連については知られていない。

ICAM1 は CD54 としても知られ、白血球などの免疫細胞や内皮細胞を含む細胞表面に発現する細胞接着糖タンパク質をコードする遺伝子で、内皮細胞へのがん細胞の接着を介して転移に関わることが知られており[44]、さらに、膜結合型の ICAM1 は切断されて可溶性になることも報告されている。[45]ICAM1 は様々な種類のがんにおける発現亢進が示されているが、膠芽腫ではがん微小環境における単球やマクロファージなどの免疫細胞との相互作用を形成する上で、ICAM1 は重要な役割を持つことが報告されている。[46]膀胱癌においては、内皮細胞における ICAM1 発現が、膀胱癌細胞との接着に関わることが報告されているが[47]、膀胱癌の進行や予後との関連、そのメカニズムに関する報告は少ない。

MMP-9 に関しては、MMP-2 と同様に、数多くの MMP ファミリーのなかでも主要な細胞外マトリックス分解酵素のためこれまで広く研究されており、様々ながんにおける浸潤能と関連することが明らかにされてきた。[27, 48, 49]膀胱癌においては、Jin らがヒト膀胱癌細胞株における MMP-2 発現レベルの亢進を報告し、さらにその遺伝子発現抑制

により細胞浸潤の抑制を示した。[50]さらに、Kaderらは膀胱癌患者において MMP-9 が腫瘍浸潤に関連することを報告した。[51, 52]一方、MMP-13 に関しては多くの研究が様々なタイプのがん進行を促進する役割を持つことを報告しているが[37, 53, 54]、膀胱癌における役割はこれまで十分に研究されていなかった。数少ない報告のなかで、Boströmらはヒト膀胱癌細胞株および膀胱腫瘍において、いずれも MMP-13 の発現がみられたことを報告した。[55]さらに、彼らは MMP-13 の発現が、膀胱腫瘍における腫瘍先進部に限局しており、正常部ではその発現がみられなかったことも報告した。これらの結果は、MMP-13 が持つ組織における細胞外マトリックスを分解する能力を考慮すると、極めて合理的なものと考えられた。

膀胱癌患者における予後不良と PLD1 発現レベルと正の相関の傾向を示す 4 遺伝子 (ANOS1、ICAM1、MMP-9、MMP-13) のうち、*in vitro* 解析において 5637 細胞株と 253J 細胞株ともに PLD1 遺伝子発現抑制によりそれらの mRNA 発現レベルの低下を認めた遺伝子は、唯一 MMP-13 であった。(図 15) そのため、本研究では MMP-13 に着目して詳細なメカニズムの検討を継続した。*in vivo* における RNA シークエンスを用いた網羅的なトランスクリプトーム解析により、これまでの研

究報告と同様に、MMP-13 が浸潤に関連する潜在的な遺伝子であることを示した。これらの結果より、MMP-13 は膀胱癌の腫瘍浸潤を促進する下流標的であり、PLD1 遺伝子発現抑制によりその発現が制御されることが強く示唆された。

本研究で示した PLD1 遺伝子発現抑制による MMP-13 の発現低下は、PLD1 が産生する PA の添加により、NF- κ B p65 Ser536 のリン酸化レベルの増加傾向とともに回復を認めた。(図 33, 34) これらの結果より、PLD1 が産生する PA が、NF- κ B シグナル経路、特に NF- κ B p65 Ser536 のリン酸化による MMP-13 の発現制御を介して、膀胱癌の細胞浸潤を促進することが示唆された。Kang らは、PLD1 の発現抑制が PKC/Ras/ERK/NF- κ B シグナル経路による MMP-9 の発現制御を介して、大腸癌の細胞浸潤を抑制することを報告した。[27]この PLD1-NF- κ B シグナル経路に関しては、PA を介したシグナル伝達による NF- κ B の制御が関与していることが、これまでに複数報告されている。[56-58] MMP-13 の発現制御に関わるシグナル経路として、Tang らがヒト軟骨肉腫細胞において NF- κ B p65 のリン酸化が関与することを示した。[37]この NF- κ B p65 のリン酸化については、Madrid らにより、特に Ser536 のリン酸化が NF- κ B の活性化につながることを報告されてい

る。[59]さらに、Tang らは NF- κ B p65 が MMP-13 の発現制御に関わる転写活性領域に結合することも示している。[37]これまで、PLD1 と MMP-13 の直接的な関連を報告した研究はない。本研究は、PLD1 が NF- κ B p65 Ser536 のリン酸化による MMP-13 の発現制御により膀胱癌の浸潤を促進することを示した、初めての報告である。しかしながら、PLD1 遺伝子発現抑制による NF- κ B p65 Ser536 のリン酸化レベルの変化は小さく、I κ B を含む NF- κ B 活性の抑制因子にも影響を与える可能性も示唆された。(図 29)

本研究結果の全体像を図 37 に示す。今回、PLD1 の遺伝子発現抑制によって MMP-13 の発現が抑制され、がん細胞浸潤および腫瘍浸潤が抑制されることを示した。これらの結果より、PLD1 の働きによって MMP-13 の発現が亢進し、がん細胞浸潤および腫瘍浸潤が促進したと解釈した。しかしながら、遺伝子発現抑制により PLD1 の働きの逆効果を示したに過ぎず、本来の PLD1 の働きによる効果は示せていない。先述のように、過去の研究では PLD 阻害剤や PLD 遺伝子発現抑制実験による細胞浸潤の抑制に加え、PLD 遺伝子強制発現による細胞浸潤の亢進も示されている。[12, 22]本研究では PLD1 遺伝子強制発現は行わず、PLD1 により産生される PA の添加実験により、MMP-13 の発現亢

進を示したが、細胞浸潤が促進するかどうかは評価していない。しかし、MMP-13 は細胞浸潤に直接影響するため（図 20）、PLD の生理機能が PA を介した細胞内シグナル伝達機構によりもたらされる点を考慮すると、おそらく MMP-13 の発現亢進に伴い細胞浸潤は促進すると予想される。

6 統括

本研究では、膀胱癌における PLD1 発現レベルの亢進が腫瘍浸潤を促進し、膀胱癌患者における予後不良と関連することを示した。さらに、膀胱癌の浸潤メカニズムとして、新たに PLD1 による NF- κ B シグナル経路を介した MMP-13 の発現制御を明らかにした。本研究で得られた知見により、PLD1 およびその下流標的は、筋層非浸潤性膀胱癌から筋層浸潤性膀胱癌への臨床における疾患進行を抑制する新たな治療標的となることが示唆された。

7 謝辞

本研究の初期計画から実験の遂行、さらには結果の解釈とさらなる実験計画の立案に至るまで、いつも丁寧にご指導いただいた西山博之先生（筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 腎泌尿器外科学 教授）に深く感謝いたします。また、同じく多くのご指導やご助言をいただいた神鳥周也先生（筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 腎泌尿器外科学 講師）、小島崇宏先生（愛知県がんセンター病院 泌尿器科部 部長）、根来宏光先生（筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 腎泌尿器外科学 准教授）、PLD1 ノックアウトマウスのご提供や本研究のご助言をいただいた金保安則先生（筑波大学 副学長・理事）および船越裕司先生（筑波大学人間総合科学研究科 生命システム医学専攻 生理化学研究室 助教）、RNA シークエンス解析でサポートをいただいた村谷匡史先生（筑波大学大学院人間総合科学研究科 生命医学専攻 ゲノム生物学研究室 教授）およびつくば i-Laboratory LLP のスタッフの皆さまに深く感謝いたします。

最後に、本研究に際しこれまで多くのサポートをいただいた筑波大

学腎泌尿器外科研究室の技官および大学院生の皆さま、筑波大学腎泌尿器外科スタッフの先生方に深く感謝いたします。

8 出典

本学位論文では Cancer Lett. 2021 Jul 28;511:15-25. doi:
10.1016/j.canlet.2021.04.014.に掲載された論文の内容を Elsevier 社の規
定にしたがって再利用している。

9 参考文献

- [1] L.A. Torre, F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, A. Jemal, Global cancer statistics, 2012, *CA: a cancer journal for clinicians*, 65 (2015) 87-108.
- [2] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2020, *CA: a cancer journal for clinicians*, 70 (2020) 7-30.
- [3] R. Marcos-Gragera, S. Mallone, L.A. Kiemeny, L. Vilardell, N. Malats, Y. Allory, M. Sant, Urinary tract cancer survival in Europe 1999-2007: Results of the population-based study EURO CARE-5, *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 51 (2015) 2217-2230.
- [4] 国立がん研究センターがん情報サービス, 「がん統計」(全国がん登録および厚生労働省人口動態統計) .
- [5] Z. Kirkali, T. Chan, M. Manoharan, F. Algaba, C. Busch, L. Cheng, L. Kiemeny, M. Kriegmair, R. Montironi, W.M. Murphy, I.A. Sesterhenn, M. Tachibana, J. Weider, Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis, *Urology*, 66 (2005) 4-34.
- [6] H. von der Maase, L. Sengelov, J.T. Roberts, S. Ricci, L. Dogliotti, T. Oliver, M.J. Moore, A. Zimmermann, M. Arning, Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23 (2005) 4602-4608.
- [7] M.F. Campbell, P.C. Walsh, A.J. Wein, A.W. Partin, R.R. Dmochowski, L.R. Kavoussi, C. Peters, *Campbell-Walsh-Wein urology*, 12th ed. / editor-in-chief, Alan W. Partin ; editors, Roger R. Dmochowski, Louis R. Kavoussi, Craig A. Peters ed., Elsevier, Philadelphia, Pa., United States, 2021.
- [8] M. Babjuk, A. Böhle, M. Burger, O. Capoun, D. Cohen, E.M. Compérat, V. Hernández, E. Kaasinen, J. Palou, M. Rouprêt, B.W.G. van Rhijn, S.F. Shariat, V. Soukup, R.J. Sylvester, R. Zigeuner, EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016, *Eur Urol*, 71 (2017) 447-461.
- [9] S.M. Hammond, Y.M. Altshuler, T.C. Sung, S.A. Rudge, K. Rose, J. Engebrecht, A.J. Morris, M.A. Frohman, Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family, *The Journal of biological chemistry*, 270 (1995) 29640-29643.
- [10] I. Lopez, R.S. Arnold, J.D. Lambeth, Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2). ADP-ribosylation factor regulates hPLD2, *The Journal of biological chemistry*, 273 (1998) 12846-12852.
- [11] R.C. Bruntz, C.W. Lindsley, H.A. Brown, Phospholipase D signaling pathways and

- phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer, *Pharmacological reviews*, 66 (2014) 1033-1079.
- [12] Y. Zheng, V. Rodrik, A. Toschi, M. Shi, L. Hui, Y. Shen, D.A. Foster, Phospholipase D couples survival and migration signals in stress response of human cancer cells, *The Journal of biological chemistry*, 281 (2006) 15862-15868.
- [13] C.N. Antonescu, G. Danuser, S.L. Schmid, Phosphatidic acid plays a regulatory role in clathrin-mediated endocytosis, *Molecular biology of the cell*, 21 (2010) 2944-2952.
- [14] W.C. Colley, T.C. Sung, R. Roll, J. Jenco, S.M. Hammond, Y. Altshuler, D. Bar-Sagi, A.J. Morris, M.A. Frohman, Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization, *Current biology : CB*, 7 (1997) 191-201.
- [15] M. Corrotte, S. Chasserot-Golaz, P. Huang, G. Du, N.T. Ktistakis, M.A. Frohman, N. Vitale, M.F. Bader, N.J. Grant, Dynamics and function of phospholipase D and phosphatidic acid during phagocytosis, *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 7 (2006) 365-377.
- [16] M. Nanjundan, F. Possmayer, Pulmonary phosphatidic acid phosphatase and lipid phosphate phosphohydrolase, *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 284 (2003) L1-23.
- [17] J.H. Cho, J.S. Han, Phospholipase D and Its Essential Role in Cancer, *Molecules and cells*, 40 (2017) 805-813.
- [18] T.C. Walther, R.V. Farese, Jr., The life of lipid droplets, *Biochimica et biophysica acta*, 1791 (2009) 459-466.
- [19] K.M. Henkels, G.P. Boivin, E.S. Dudley, S.J. Berberich, J. Gomez-Cambronero, Phospholipase D (PLD) drives cell invasion, tumor growth and metastasis in a human breast cancer xenograph model, *Oncogene*, 32 (2013) 5551-5562.
- [20] M. Saito, M. Iwadate, M. Higashimoto, K. Ono, Y. Takebayashi, S. Takenoshita, Expression of phospholipase D2 in human colorectal carcinoma, *Oncology reports*, 18 (2007) 1329-1334.
- [21] Y. Zhao, H. Ehara, Y. Akao, M. Shamoto, Y. Nakagawa, Y. Banno, T. Deguchi, N. Ohishi, K. Yagi, Y. Nozawa, Increased activity and intranuclear expression of phospholipase D2 in human renal cancer, *Biochemical and biophysical research communications*, 278 (2000) 140-143.
- [22] M. Utter, S. Chakraborty, L. Goren, L. Feuser, Y.S. Zhu, D.A. Foster, Elevated phospholipase D activity in androgen-insensitive prostate cancer cells promotes both survival and metastatic phenotypes, *Cancer letters*, 423 (2018) 28-35.
- [23] F. Zhang, Z. Wang, M. Lu, Y. Yonekubo, X. Liang, Y. Zhang, P. Wu, Y. Zhou, S. Grinstein, J.F. Hancock, G. Du, Temporal production of the signaling lipid phosphatidic acid by phospholipase D2 determines the output of extracellular signal-regulated kinase signaling in cancer cells, *Molecular and cellular biology*, 34 (2014) 84-95.
- [24] R.C. Bruntz, H.E. Taylor, C.W. Lindsley, H.A. Brown, Phospholipase D2 mediates survival

signaling through direct regulation of Akt in glioblastoma cells, *The Journal of biological chemistry*, 289 (2014) 600-616.

[25] M.C. O'Reilly, S.A. Scott, K.A. Brown, T.H. Oguin, 3rd, P.G. Thomas, J.S. Daniels, R. Morrison, H.A. Brown, C.W. Lindsley, Development of dual PLD1/2 and PLD2 selective inhibitors from a common 1,3,8-Triazaspiro[4.5]decane Core: discovery of MI298 and MI299 that decrease invasive migration in U87-MG glioblastoma cells, *Journal of medicinal chemistry*, 56 (2013) 2695-2699.

[26] Q. Chen, T. Hongu, T. Sato, Y. Zhang, W. Ali, J.A. Cavallo, A. van der Velden, H. Tian, G. Di Paolo, B. Nieswandt, Y. Kanaho, M.A. Frohman, Key roles for the lipid signaling enzyme phospholipase d1 in the tumor microenvironment during tumor angiogenesis and metastasis, *Science signaling*, 5 (2012) ra79.

[27] D.W. Kang, M.H. Park, Y.J. Lee, H.S. Kim, T.K. Kwon, W.S. Park, S. Min do, Phorbol ester up-regulates phospholipase D1 but not phospholipase D2 expression through a PKC/Ras/ERK/NFkappaB-dependent pathway and enhances matrix metalloproteinase-9 secretion in colon cancer cells, *The Journal of biological chemistry*, 283 (2008) 4094-4104.

[28] D.W. Kang, M.H. Park, Y.J. Lee, H.S. Kim, C.W. Lindsley, H. Alex Brown, S. Min do, Autoregulation of phospholipase D activity is coupled to selective induction of phospholipase D1 expression to promote invasion of breast cancer cells, *International journal of cancer*, 128 (2011) 805-816.

[29] S. Kandori, T. Kojima, T. Matsuoka, T. Yoshino, A. Sugiyama, E. Nakamura, T. Shimazui, Y. Funakoshi, Y. Kanaho, H. Nishiyama, Phospholipase D2 promotes disease progression of renal cell carcinoma through the induction of angiogenin, *Cancer science*, 109 (2018) 1865-1875.

[30] R.L. Grossman, A.P. Heath, V. Ferretti, H.E. Varmus, D.R. Lowy, W.A. Kibbe, L.M. Staudt, Toward a Shared Vision for Cancer Genomic Data, *New England Journal of Medicine*, 375 (2016) 1109-1112.

[31] H. Watanabe, T. Hongu, M. Yamazaki, Y. Kanaho, Phospholipase D2 activation by p38 MAP kinase is involved in neurite outgrowth, *Biochemical and biophysical research communications*, 413 (2011) 288-293.

[32] Y. Sun, Y. Fang, M.S. Yoon, C. Zhang, M. Roccio, F.J. Zwartkruis, M. Armstrong, H.A. Brown, J. Chen, Phospholipase D1 is an effector of Rheb in the mTOR pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (2008) 8286-8291.

[33] F. Tabatabaian, K. Dougherty, M. Di Fulvio, J. Gomez-Cambronero, Mammalian target of rapamycin (mTOR) and S6 kinase down-regulate phospholipase D2 basal expression and function, *The Journal of biological chemistry*, 285 (2010) 18991-19001.

[34] N. Hatton, E. Lintz, M. Mahankali, K.M. Henkels, J. Gomez-Cambronero, Phosphatidic Acid Increases Epidermal Growth Factor Receptor Expression by Stabilizing mRNA Decay and by

Inhibiting Lysosomal and Proteasomal Degradation of the Internalized Receptor, *Molecular and cellular biology*, 35 (2015) 3131-3144.

[35] B. Purow, *Molecular Pathways: Targeting Diacylglycerol Kinase Alpha in Cancer*, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21 (2015) 5008-5012.

[36] J. Li, C. Pan, A.C. Boese, J. Kang, A.D. Umamo, K.R. Magliocca, W. Yang, Y. Zhang, S. Lonial, L. Jin, S. Kang, DGKA Provides Platinum Resistance in Ovarian Cancer Through Activation of c-JUN-WEE1 Signaling, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 26 (2020) 3843-3855.

[37] C.H. Tang, C.F. Chen, W.M. Chen, Y.C. Fong, IL-6 increases MMP-13 expression and motility in human chondrosarcoma cells, *The Journal of biological chemistry*, 286 (2011) 11056-11066.

[38] B. Franco, S. Guioli, A. Pragliola, B. Incerti, B. Bardoni, R. Tonlorenzi, R. Carrozzo, E. Maestrini, M. Pieretti, P. Taillon-Miller, C.J. Brown, H.F. Willard, C. Lawrence, M. Graziella Persico, G. Camerino, A. Ballabio, A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules, *Nature*, 353 (1991) 529-536.

[39] N. Soussi-Yanicostas, C. Faivre-Sarrailh, J.P. Hardelin, J. Levilliers, G. Rougon, C. Petit, Anosmin-1 underlying the X chromosome-linked Kallmann syndrome is an adhesion molecule that can modulate neurite growth in a cell-type specific manner, *Journal of cell science*, 111 (Pt 19) (1998) 2953-2965.

[40] D. González-Martínez, S.H. Kim, Y. Hu, S. Guimond, J. Schofield, P. Winyard, G.B. Vannelli, J. Turnbull, P.M. Bouloux, Anosmin-1 modulates fibroblast growth factor receptor 1 signaling in human gonadotropin-releasing hormone olfactory neuroblasts through a heparan sulfate-dependent mechanism, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24 (2004) 10384-10392.

[41] V. Murcia-Belmonte, P.F. Esteban, J. Martínez-Hernández, A. Gruart, R. Luján, J.M. Delgado-García, F. de Castro, Anosmin-1 over-expression regulates oligodendrocyte precursor cell proliferation, migration and myelin sheath thickness, *Brain structure & function*, 221 (2016) 1365-1385.

[42] M. Kanda, D. Shimizu, T. Fujii, S. Sueoka, Y. Tanaka, K. Ezaka, H. Takami, H. Tanaka, R. Hashimoto, N. Iwata, D. Kobayashi, C. Tanaka, S. Yamada, G. Nakayama, H. Sugimoto, M. Koike, M. Fujiwara, Y. Kodera, Function and diagnostic value of Anosmin-1 in gastric cancer progression, *International journal of cancer*, 138 (2016) 721-730.

[43] L. Qi, W. Zhang, Z. Cheng, N. Tang, Y. Ding, Study on molecular mechanism of ANOS1 promoting development of colorectal cancer, *PloS one*, 12 (2017) e0182964.

[44] J.W. Franses, N.C. Drosu, W.J. Gibson, V.C. Chitalia, E.R. Edelman, Dysfunctional

endothelial cells directly stimulate cancer inflammation and metastasis, *International journal of cancer*, 133 (2013) 1334-1344.

[45] A.M. Witkowska, M.H. Borawska, Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview, *European cytokine network*, 15 (2004) 91-98.

[46] C.K. Shen, B.R. Huang, W.L. Yeh, C.W. Chen, Y.S. Liu, S.W. Lai, W.P. Tseng, D.Y. Lu, C.F. Tsai, Regulatory effects of IL-1 β in the interaction of GBM and tumor-associated monocyte through VCAM-1 and ICAM-1, *European journal of pharmacology*, 905 (2021) 174216.

[47] V. Sundar Rajan, V.M. Laurent, C. Verdier, A. Duperray, Unraveling the Receptor-Ligand Interactions between Bladder Cancer Cells and the Endothelium Using AFM, *Biophysical journal*, 112 (2017) 1246-1257.

[48] L. Yan, B. Lin, L. Gao, S. Gao, C. Liu, C. Wang, Y. Wang, S. Zhang, M. Iwamori, Lewis (y) antigen overexpression increases the expression of MMP-2 and MMP-9 and invasion of human ovarian cancer cells, *International journal of molecular sciences*, 11 (2010) 4441-4452.

[49] J.S. Chen, X.H. Huang, Q. Wang, J.Q. Huang, L.J. Zhang, X.L. Chen, J. Lei, Z.X. Cheng, Sonic hedgehog signaling pathway induces cell migration and invasion through focal adhesion kinase/AKT signaling-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in liver cancer, *Carcinogenesis*, 34 (2013) 10-19.

[50] H. Jin, Y. Yu, Y. Hu, C. Lu, J. Li, J. Gu, L. Zhang, H. Huang, D. Zhang, X.R. Wu, J. Gao, C. Huang, Divergent behaviors and underlying mechanisms of cell migration and invasion in non-metastatic T24 and its metastatic derivative T24T bladder cancer cell lines, *Oncotarget*, 6 (2015) 522-536.

[51] A.K. Kader, L. Shao, C.P. Dinney, M.B. Schabath, Y. Wang, J. Liu, J. Gu, H.B. Grossman, X. Wu, Matrix metalloproteinase polymorphisms and bladder cancer risk, *Cancer research*, 66 (2006) 11644-11648.

[52] A.K. Kader, J. Liu, L. Shao, C.P. Dinney, J. Lin, Y. Wang, J. Gu, H.B. Grossman, X. Wu, Matrix metalloproteinase polymorphisms are associated with bladder cancer invasiveness, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13 (2007) 2614-2620.

[53] J.F. Liu, C.W. Lee, M.H. Tsai, C.H. Tang, P.C. Chen, L.W. Lin, C.Y. Lin, C.H. Lu, Y.F. Lin, S.H. Yang, C.C. Chao, Thrombospondin 2 promotes tumor metastasis by inducing matrix metalloproteinase-13 production in lung cancer cells, *Biochemical pharmacology*, 155 (2018) 537-546.

[54] J. Xue, Z. Chen, X. Gu, Y. Zhang, W. Zhang, MicroRNA-148a inhibits migration of breast cancer cells by targeting MMP-13, *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37 (2016) 1581-1590.

[55] P.J. Boström, L. Ravanti, N. Reunanen, V. Aaltonen, K.O. Söderström, V.M. Kähäri, M. Laato,

Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in transitional-cell carcinoma of the urinary bladder, *International journal of cancer*, 88 (2000) 417-423.

[56] M.H. Park, B.-H. Ahn, Y.-K. Hong, D.S. Min, Overexpression of phospholipase D enhances matrix metalloproteinase-2 expression and glioma cell invasion via protein kinase C and protein kinase A/NF- κ B/Sp1-mediated signaling pathways, *Carcinogenesis*, 30 (2009) 356-365.

[57] D.W. Kang, M.K. Park, H.J. Oh, D.G. Lee, S.H. Park, K.Y. Choi, M.L. Cho, S. Min do, Phospholipase D1 has a pivotal role in interleukin-1 β -driven chronic autoimmune arthritis through regulation of NF- κ B, hypoxia-inducible factor 1 α , and FoxO3a, *Molecular and cellular biology*, 33 (2013) 2760-2772.

[58] M.H. Park, D.W. Kang, Y. Jung, K.-Y. Choi, D.S. Min, Caffeic acid phenethyl ester downregulates phospholipase D1 via direct binding and inhibition of NF κ B transactivation, *Biochemical and biophysical research communications*, 442 (2013) 1-7.

[59] L.V. Madrid, M.W. Mayo, J.Y. Reuther, A.S. Baldwin, Jr., Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38, *The Journal of biological chemistry*, 276 (2001) 18934-18940.

10 略語

ANG	angiogenin
ANOS1	anosmin 1
BBN	N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary DNA
DGKA	diacylglycerol kinase
DNA	deoxyribonucleic acid
DOPA	1,2,-dioleoyl phosphatidic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
FDR	false discovery rate
GEO	Gene Expression Omnibus
HE	hematoxylin eosin
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HRP	horseradish peroxidase
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1

I κ B	inhibitor of NF- κ B
KO	knockout
MMP-13	matrix metalloproteinase-13
MMP-2	matrix metalloproteinase-2
MMP-9	matrix metalloproteinase-9
mRNA	messenger RNA
NF- κ B	nuclear factor- κ B
PA	phosphatidic acid
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PLD1	phospholipase D1
PLD2	phospholipase D2
qPCR	quantitative real-time PCR
RELA	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A
RNA	ribonucleic acid
Ser	serine
shRNA	short hairpin RNA

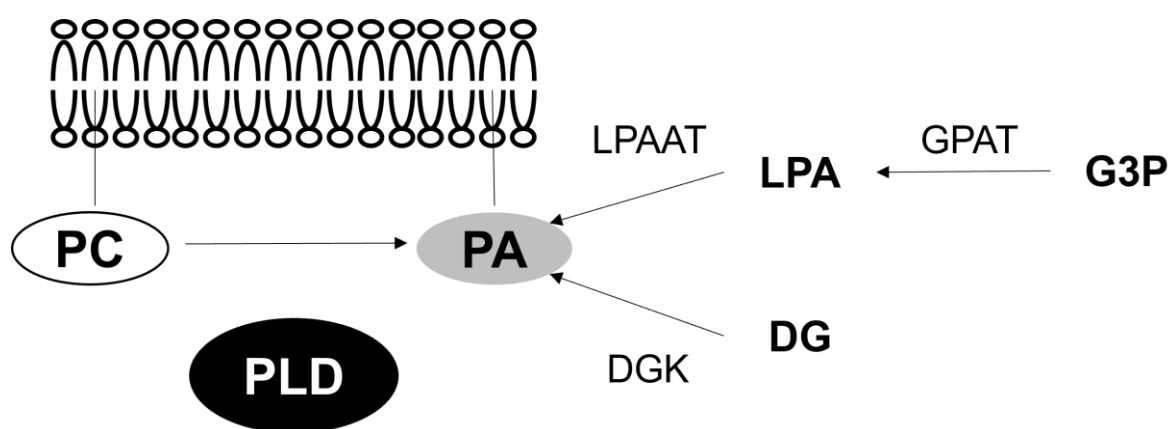
siRNA small interfering RNA

SPF specific pathogen free

TCGA The Cancer Genome Atlas

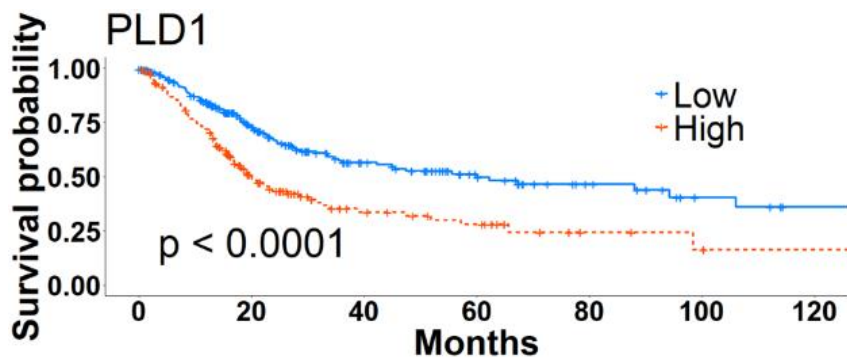
WT wild-type

11 図表



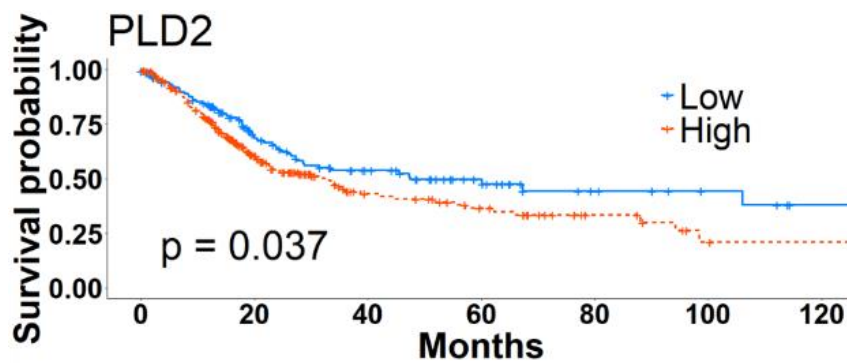
DG, diacylglycerol, DGK, diacylglycerol kinase, G3P, glycerol 3-phosphate, GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase, LPA, lysophosphatidic acid, LPAAT, lysophosphatidic acid acyltransferase, PA, phosphatidic acid, PC, phosphatidyl choline, PLD, phospholipase D.

図1 PAの主な産生経路



Number at risk

Low	249	116	58	35	18	9	5
High	156	54	21	14	4	2	1



Number at risk

Low	143	70	43	25	11	7	3
High	262	100	36	24	11	4	3

図2 膀胱癌患者における PLD1 および PLD2 発現と予後の関連

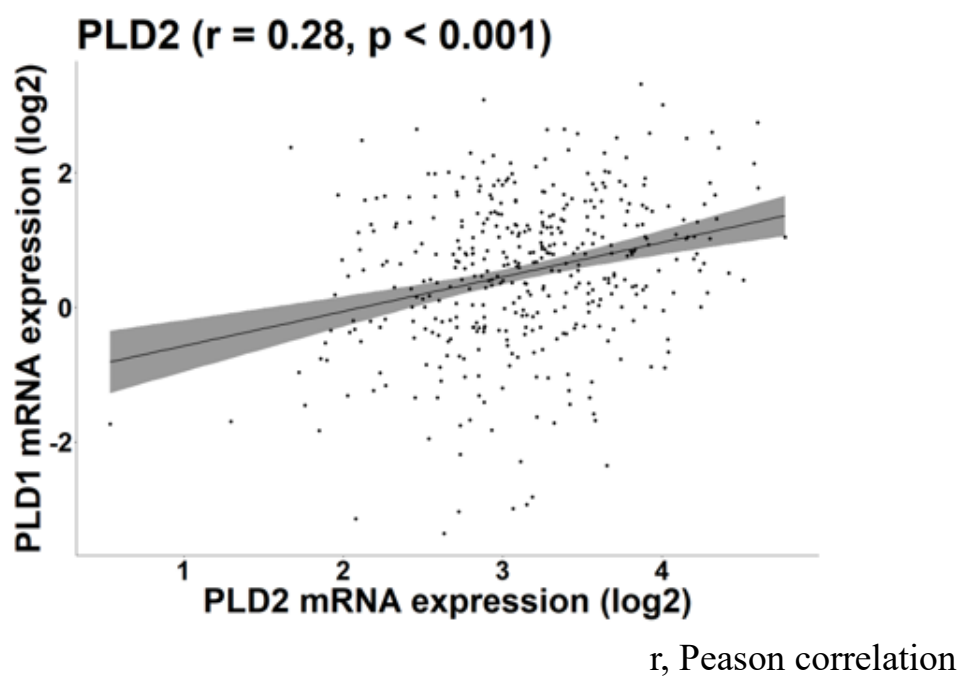


図3 膀胱癌患者における PLD1 と PLD2 発現レベルの相関

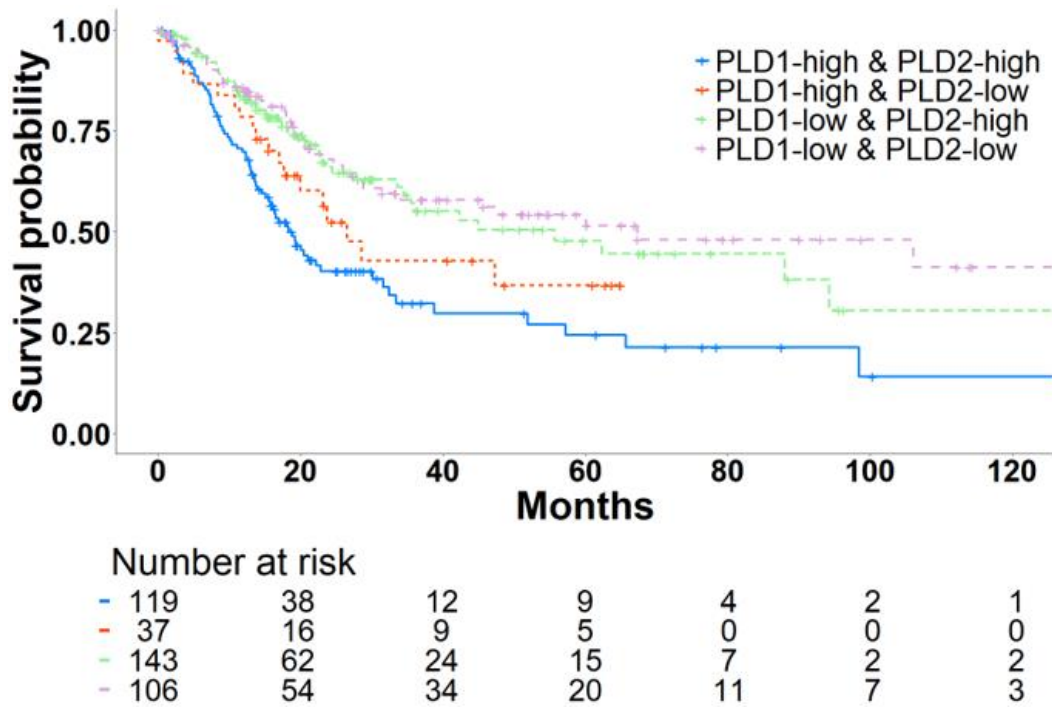


図4 膀胱癌患者における PLD1 と PLD2 両者の発現と予後の関連

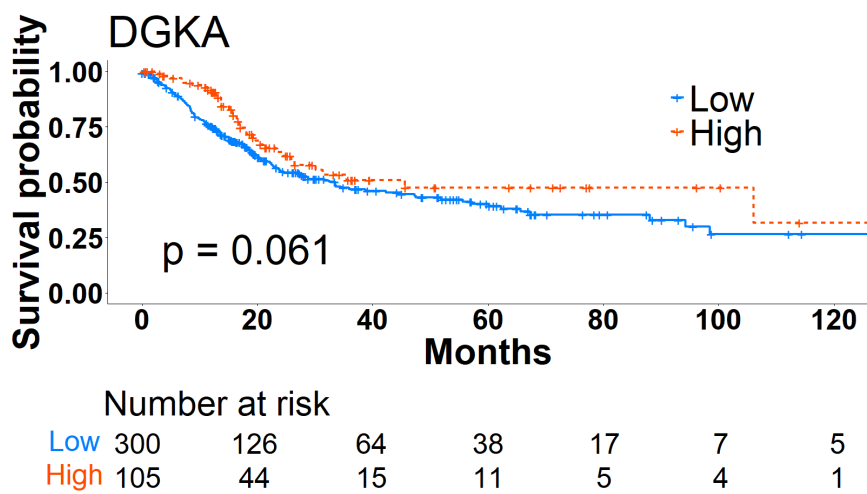


図5 膀胱癌患者における DGKA 発現と予後の関連

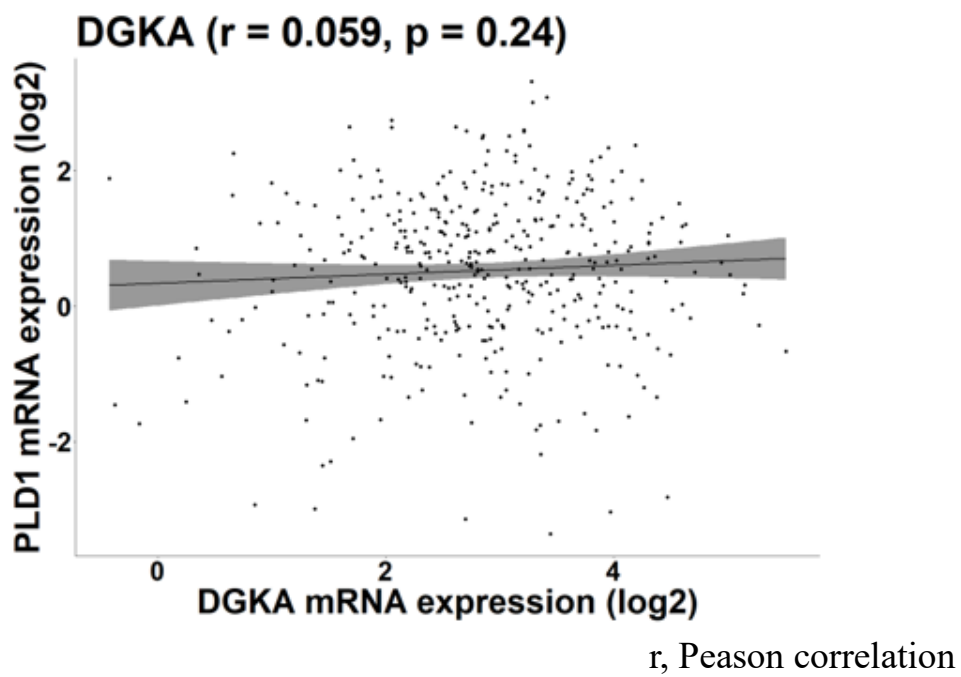
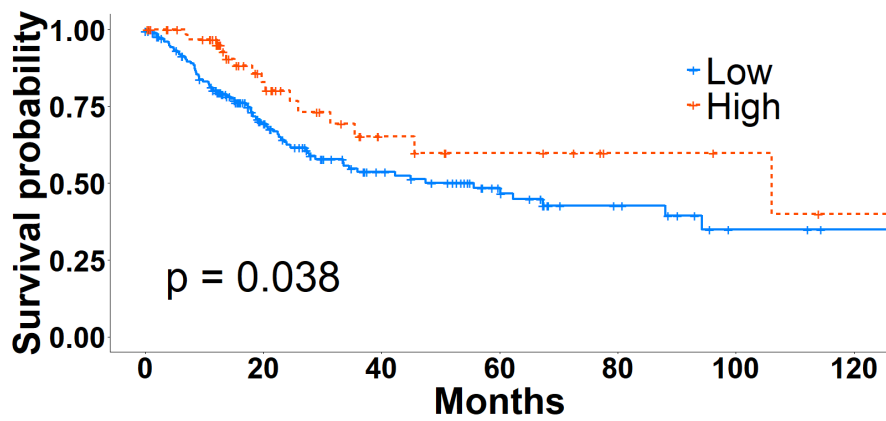


図6 膀胱癌患者における PLD1 と DGKA 発現レベルの相関



Number at risk		0	20	40	60	80	100	120
Low	182	86	46	27	14	6	4	
High	67	30	12	8	4	3	1	

図7 PLD1 低発現の膀胱癌患者における DGKA 発現と予後の関連

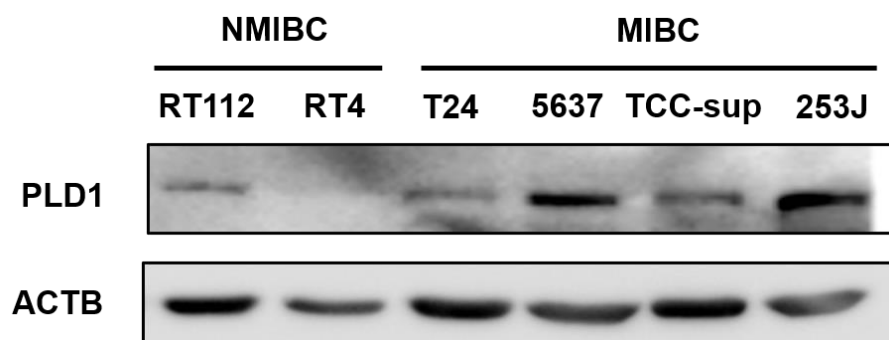


図8 ヒト膀胱癌細胞株における PLD1 タンパク発現レベル

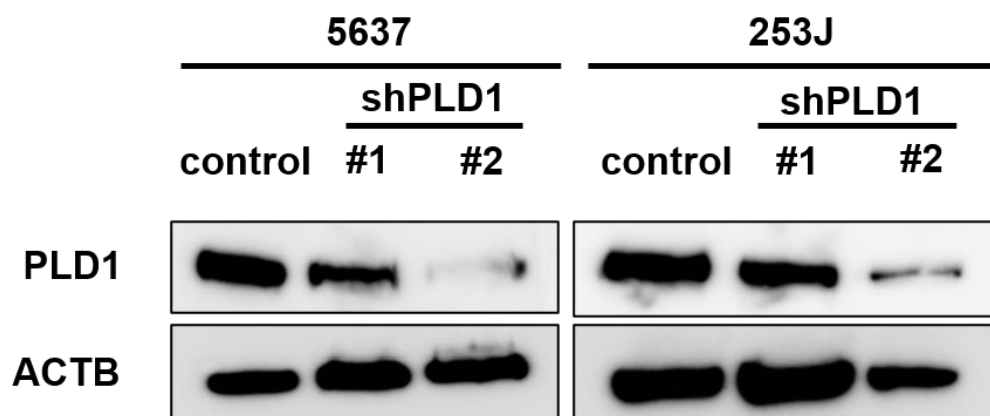
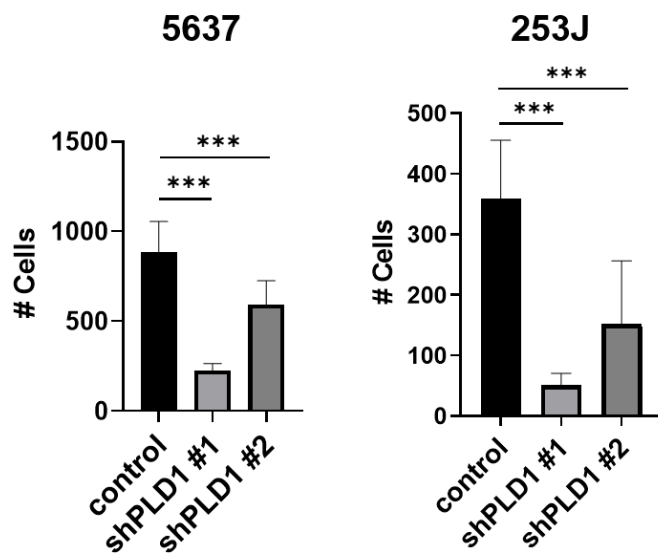
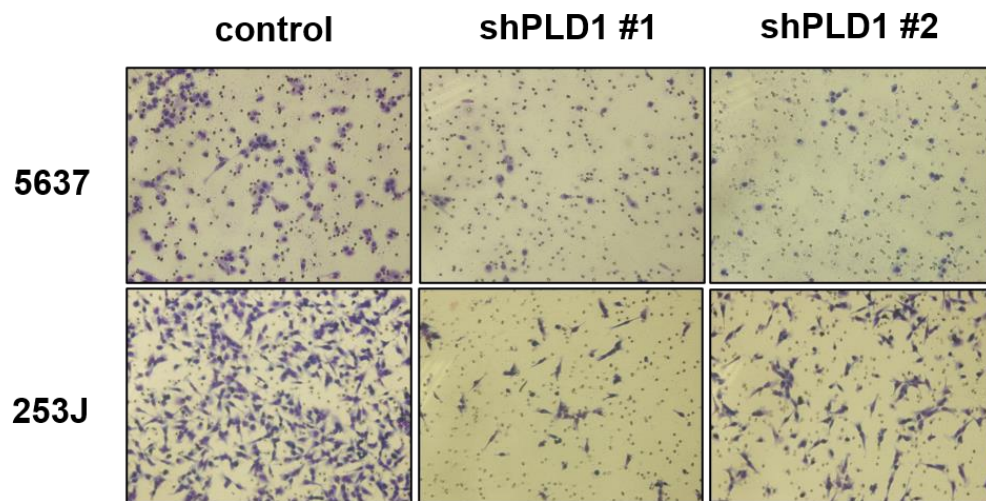


図9 ヒト膀胱癌細胞株における PLD1 遺伝子発現抑制による
PLD1 タンパク発現レベル



***, $P < 0.001$.

図 10 ヒト膀胱癌細胞株における PLD1 遺伝子発現抑制による細胞浸潤への影響

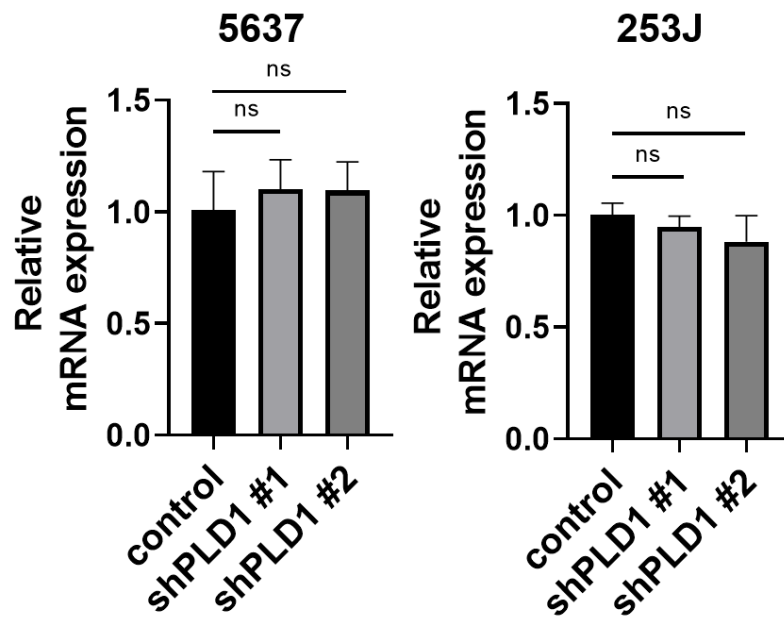
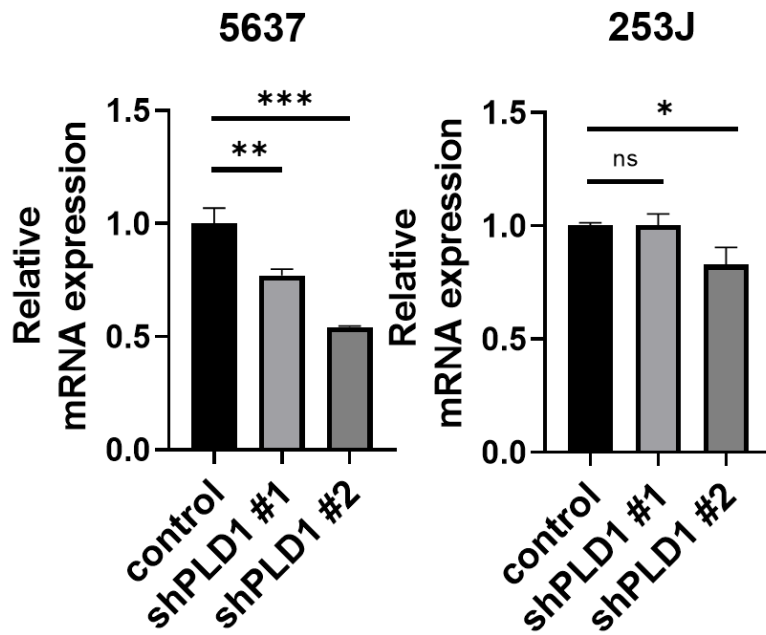


図 11 ヒト膀胱癌細胞株における PLD1 遺伝子発現抑制による PLD2 発現レベル



*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.

図 12 ヒト膀胱癌細胞株における PLD1 遺伝子発現抑制による DGKA 発現レベル

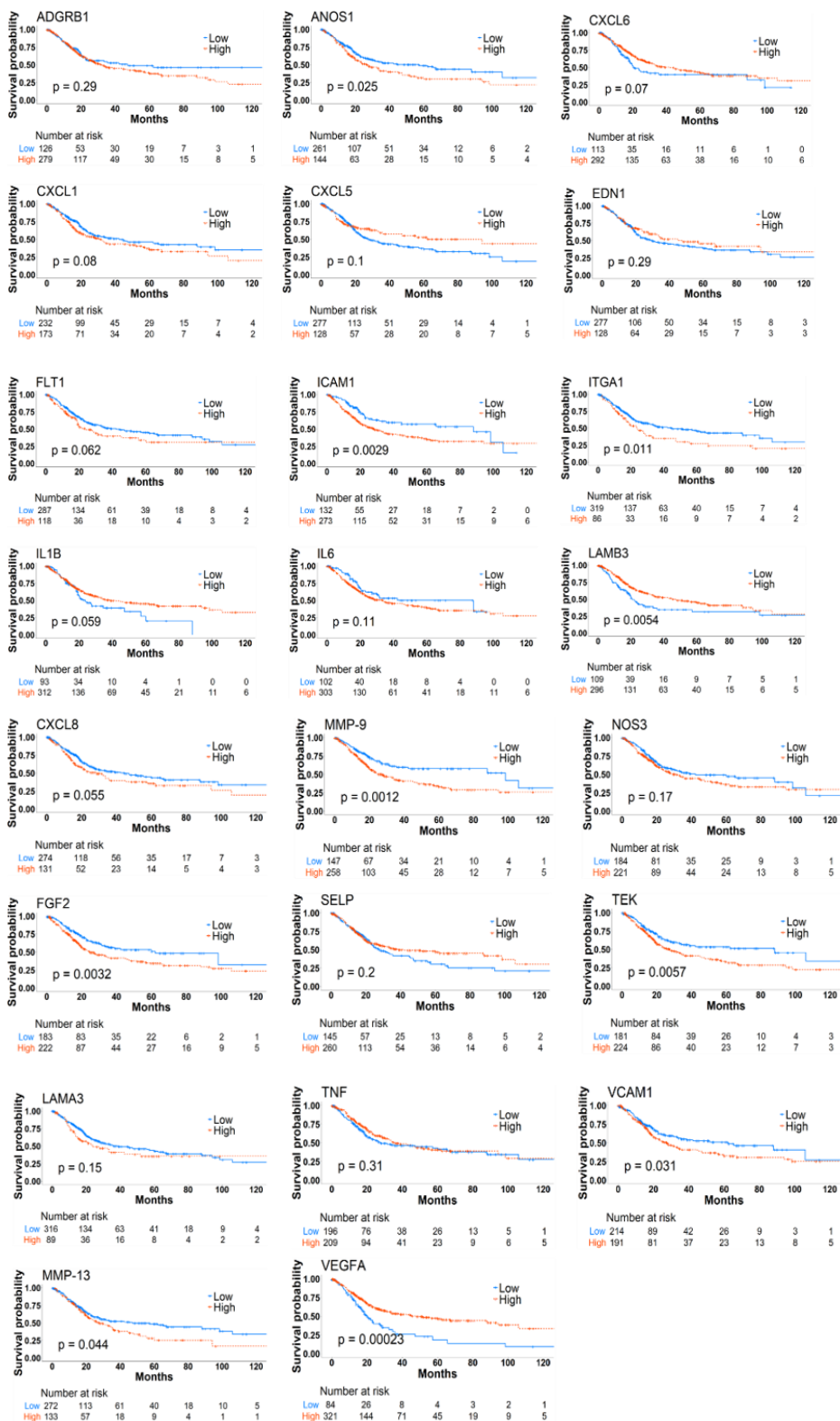
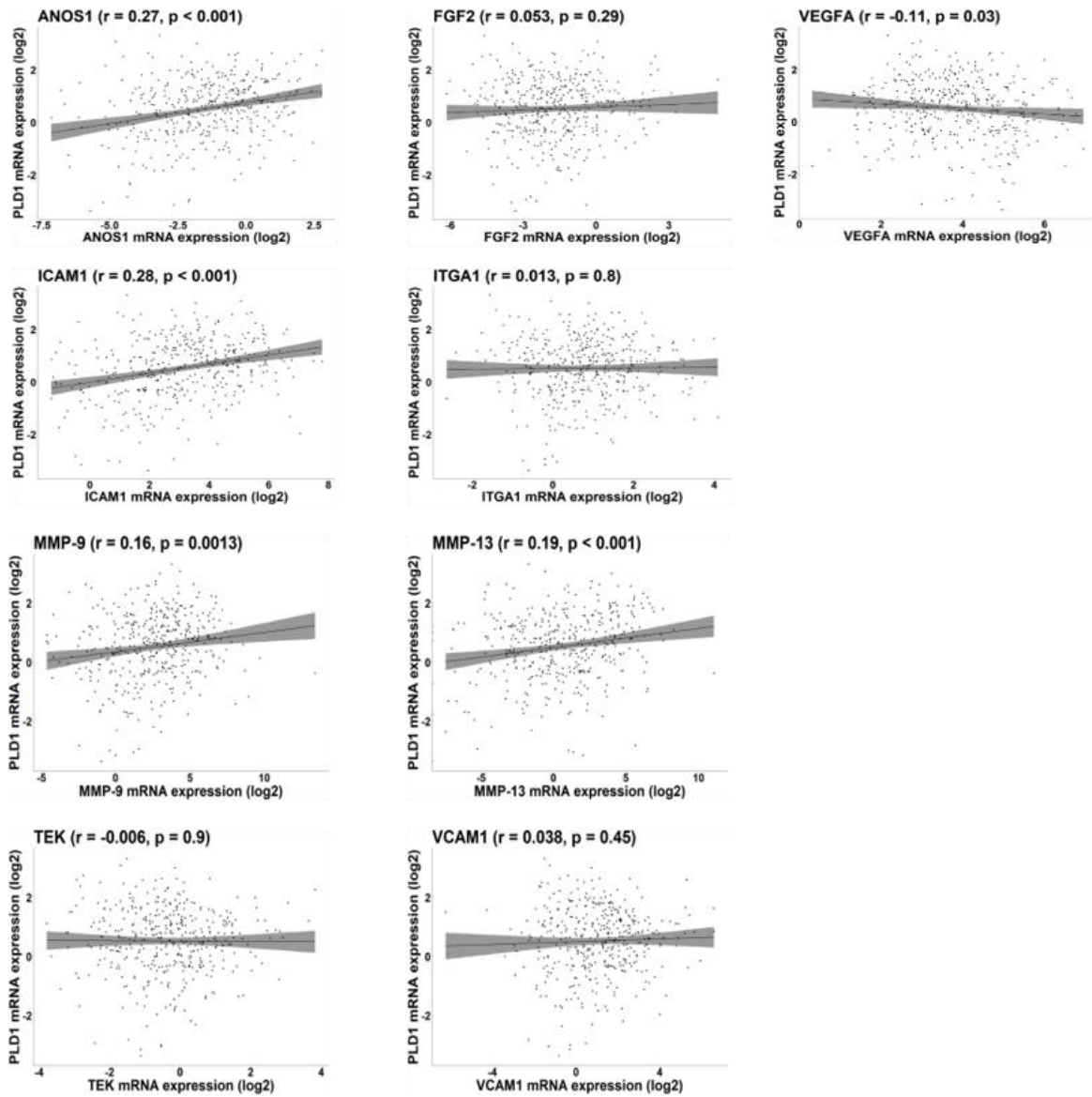
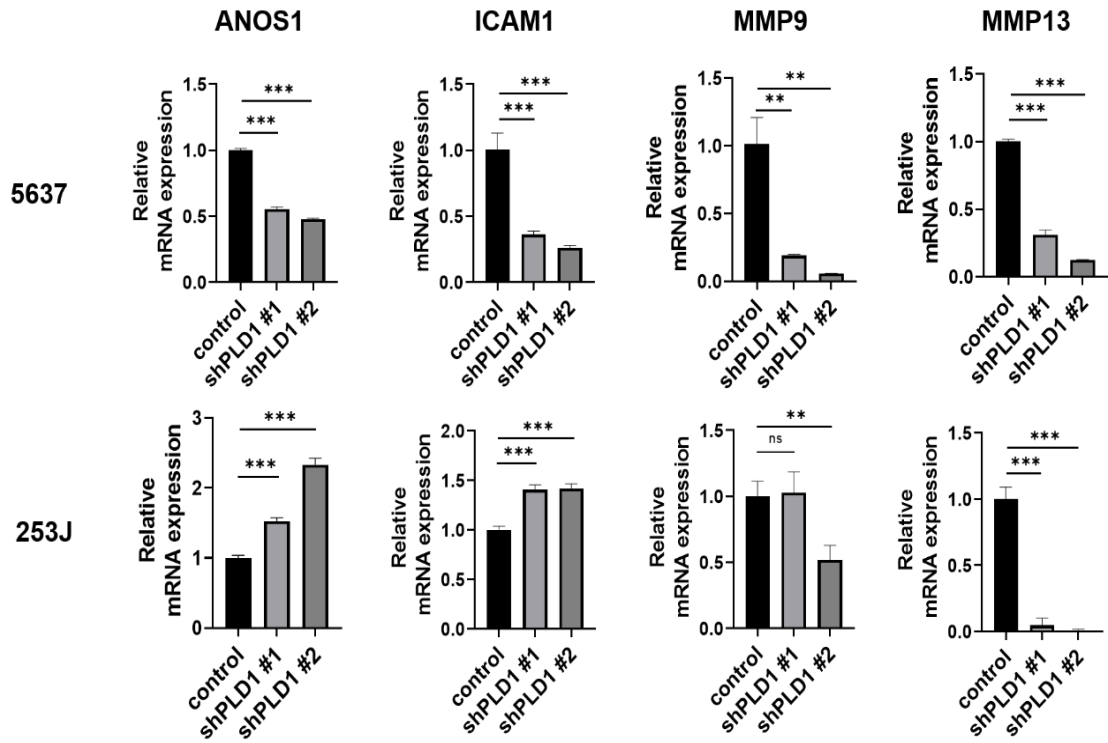


図 13 各遺伝子の発現レベルと膀胱癌患者の予後の関連



r , Pearson correlation

図 14 膀胱癌患者における PLD1 と各遺伝子発現レベルの相関



** , P < 0.01, *** , P < 0.001.

図 15 ヒト膀胱癌細胞株における PLD1 遺伝子発現抑制による 4 遺伝子発現レベル

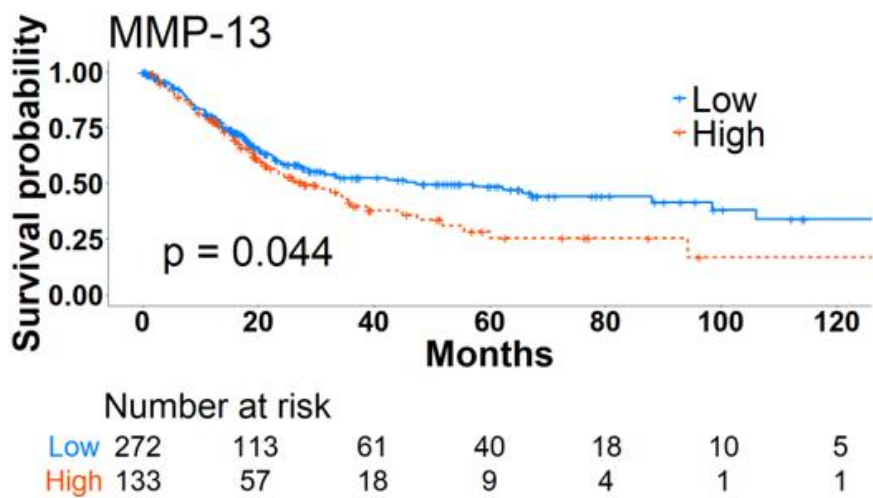


図 16 膀胱癌患者における MMP-13 発現と予後の関連

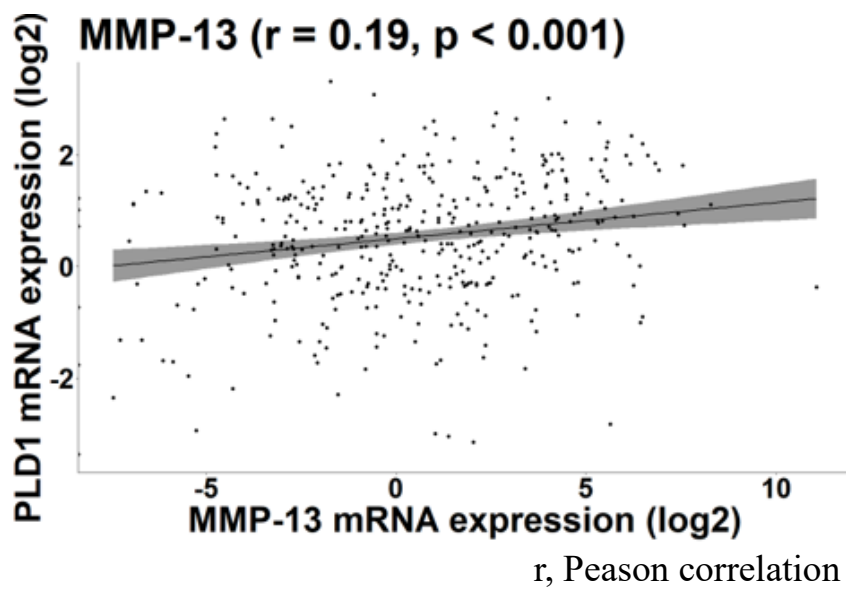
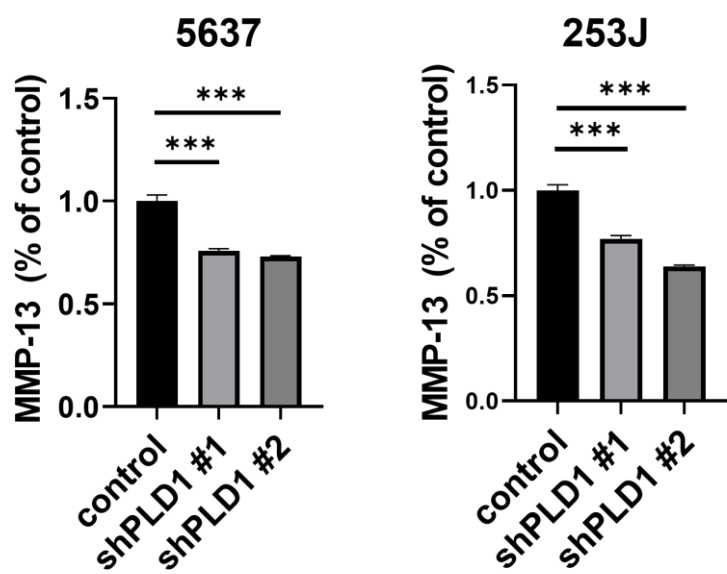


図 17 膀胱癌患者における PLD1 と MMP-13 発現レベルの相関



***, $P < 0.001$.

図 18 ヒト膀胱癌細胞株の培養上清における PLD1 遺伝子発現抑制による MMP-13 タンパク発現レベル

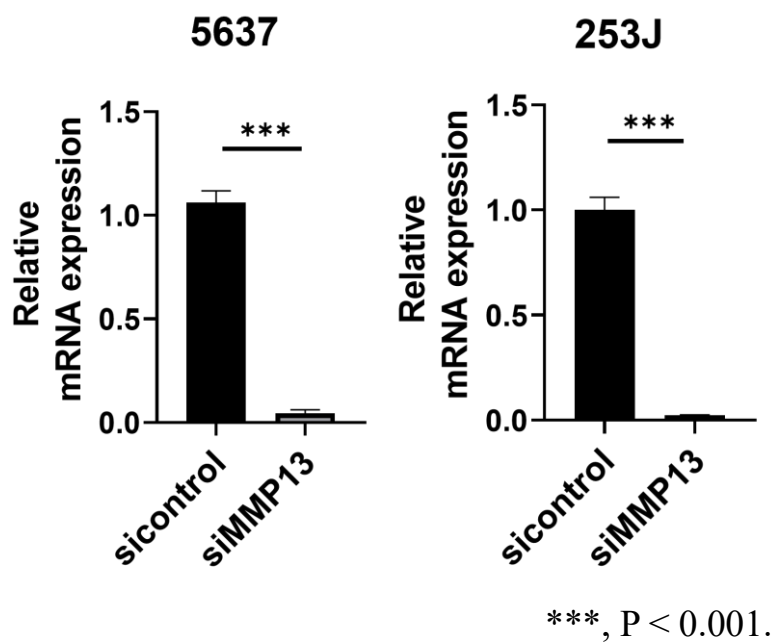
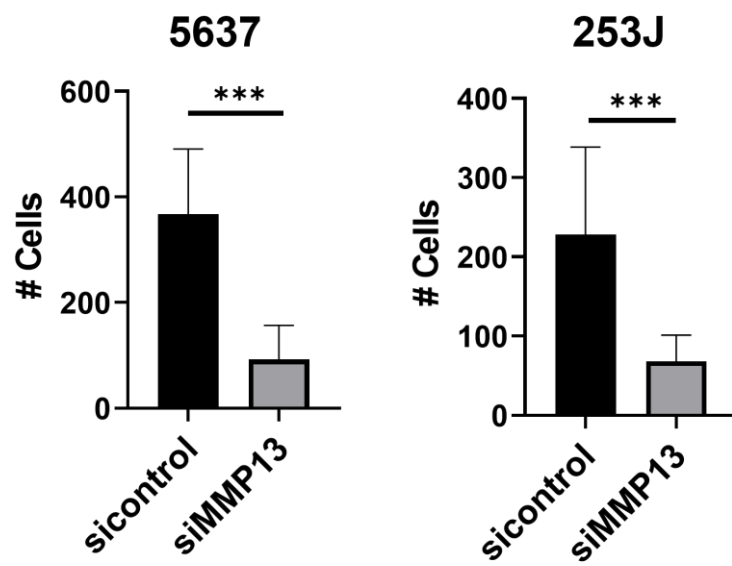
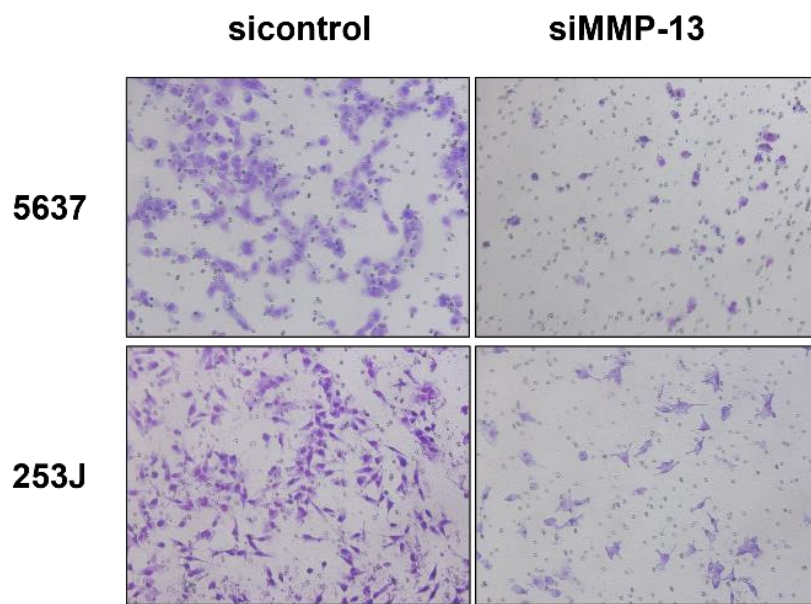


図 19 ヒト膀胱癌細胞株における MMP-13 遺伝子発現抑制による
MMP-13 発現レベル



***, $P < 0.001$.

図 20 ヒト膀胱癌細胞株における MMP-13 遺伝子発現抑制による細胞浸潤への影響

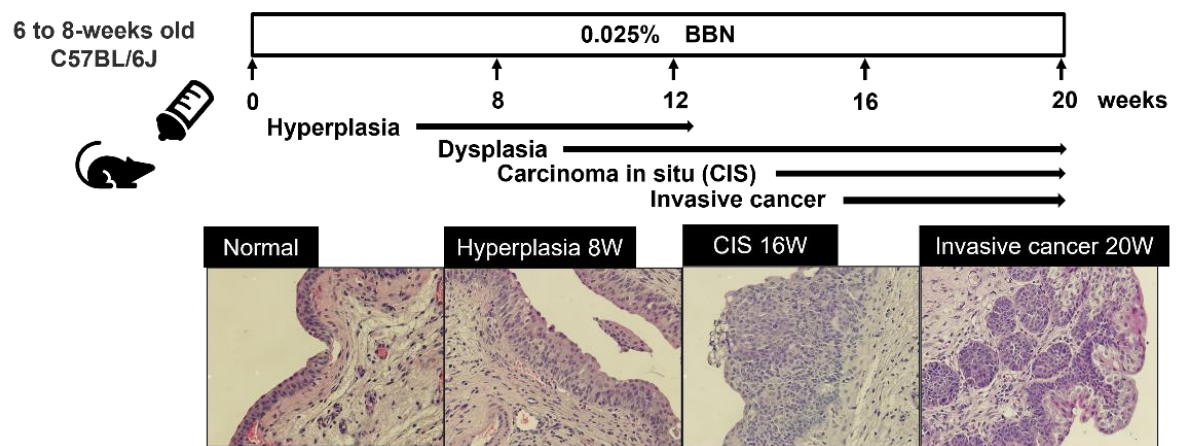


図 21 マウス膀胱発癌モデルにおける浸潤性膀胱癌の発癌過程

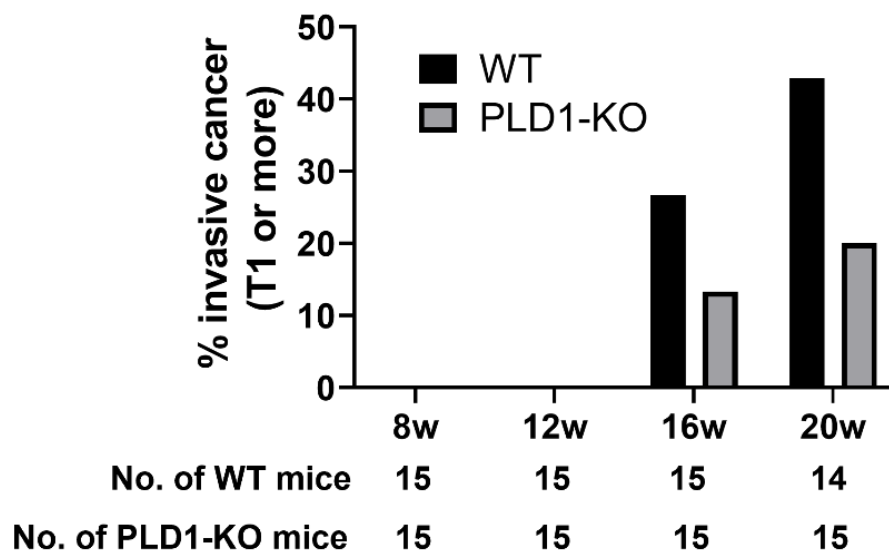


図 22 WT と PLD1-KO マウスにおける浸潤性膀胱癌の発生割合の比較

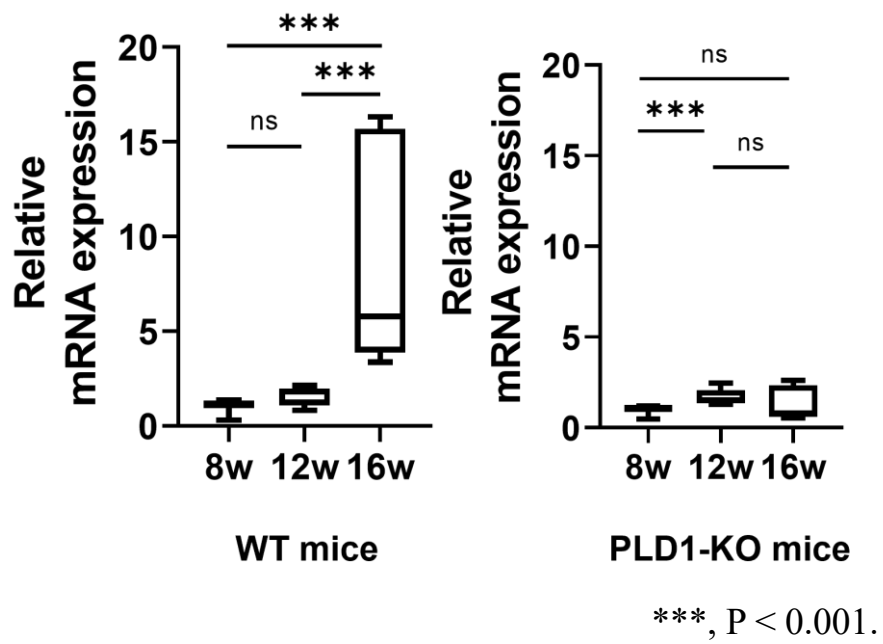
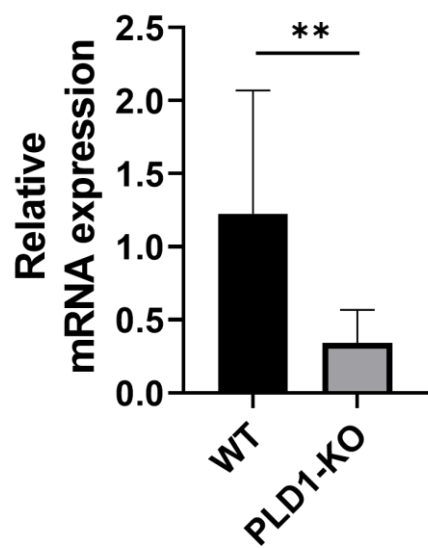


図 23 マウス膀胱発癌過程における経時的な MMP-13 発現レベル



** , P < 0.01.

図 24 飲水開始後 16 週時点における MMP-13 発現レベル

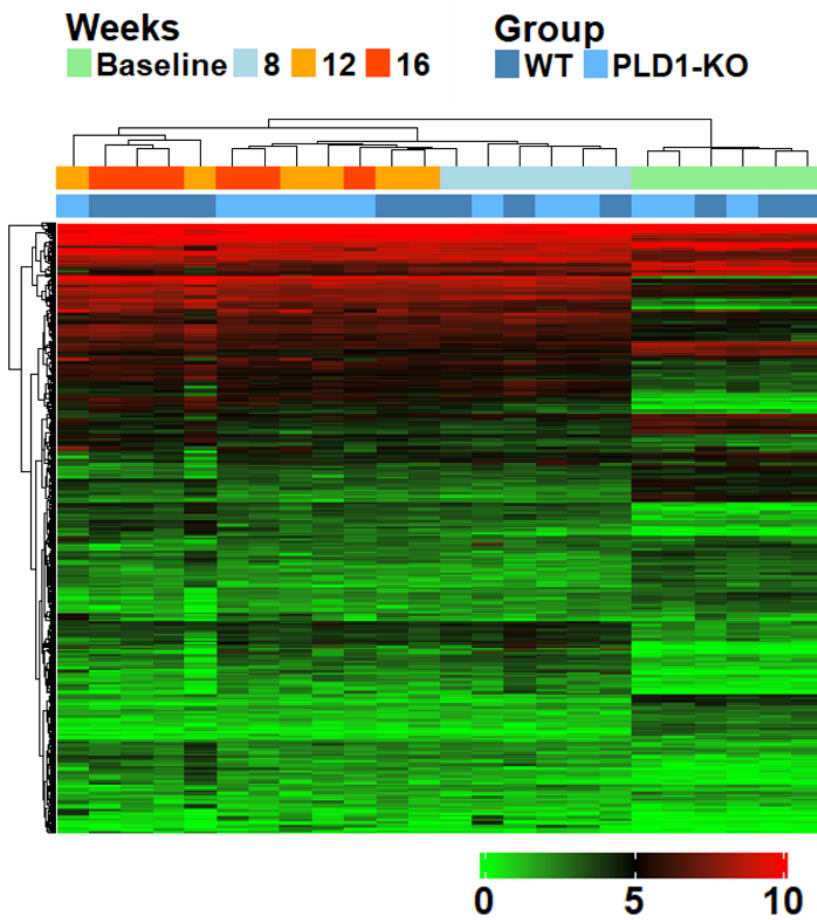


図 25 飲水開始前から 16 週時点の膀胱サンプルにおける遺伝子発現プロファイルを示すヒートマップと階層型クラスタリングの結果

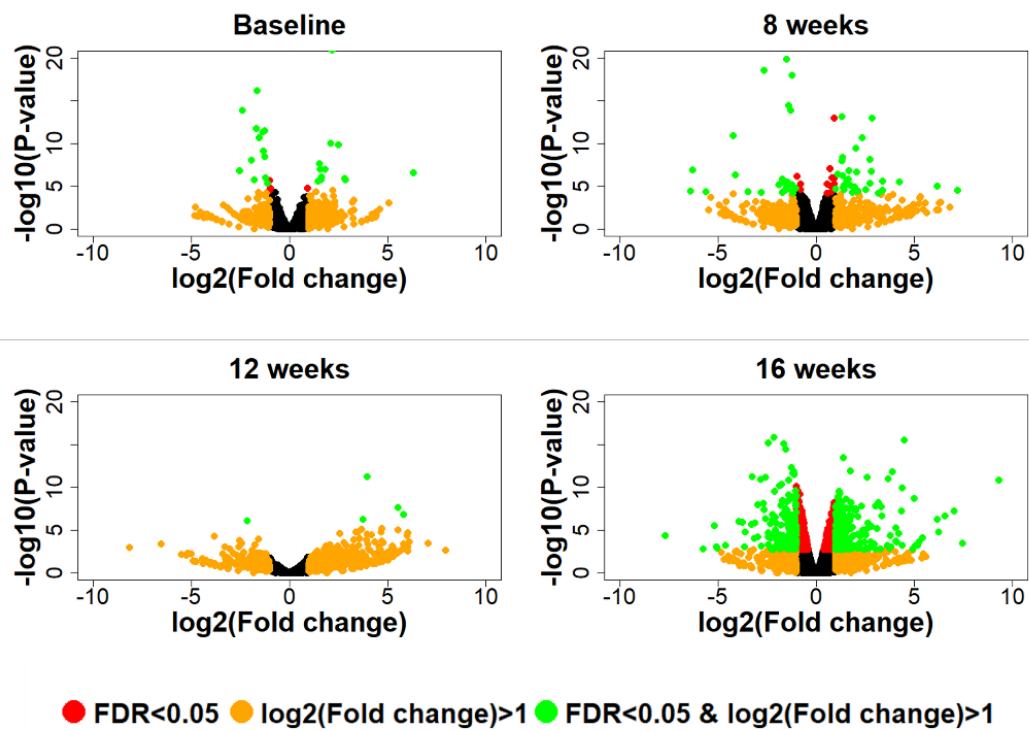


図 26 WT マウスと PLD1-KO マウス間における経時的な発現変動遺伝子の様子

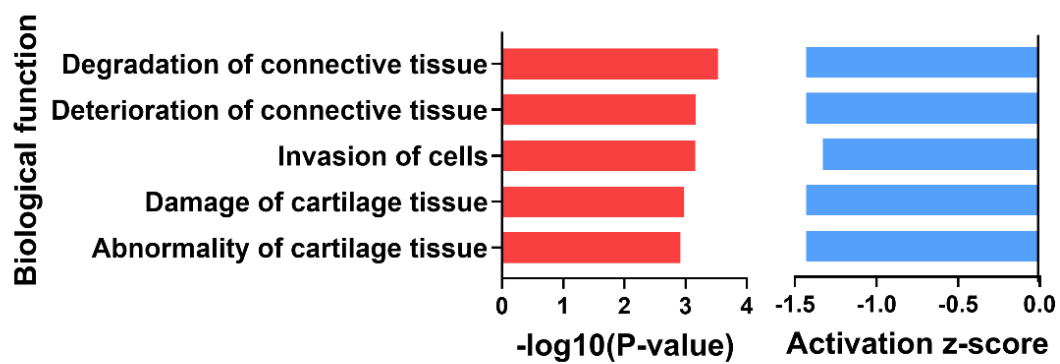


図 27 WT マウスと比較して PLD1-KO マウスで低下がみられた生物学的機能トップ 5

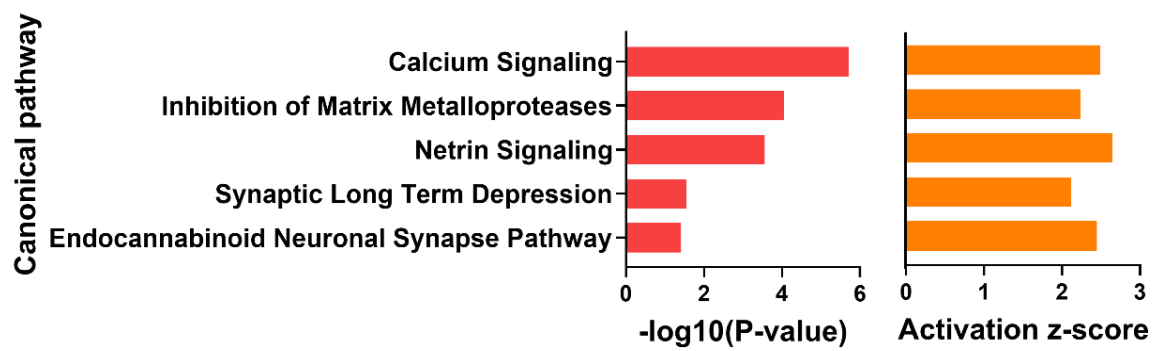


図 28 WT マウスと比較して PLD1-KO マウスで亢進がみられたパ
スウェイトップ 5

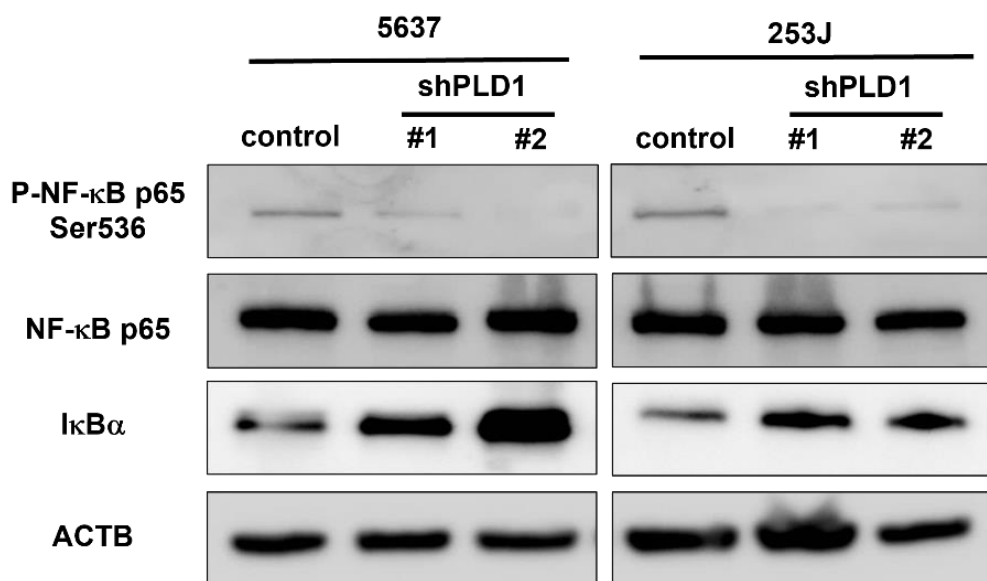


図 29 ヒト膀胱癌細胞株における PLD1 遺伝子発現抑制による NF- κ B p65 Ser536 リン酸化レベルと I κ B α タンパク発現レベル

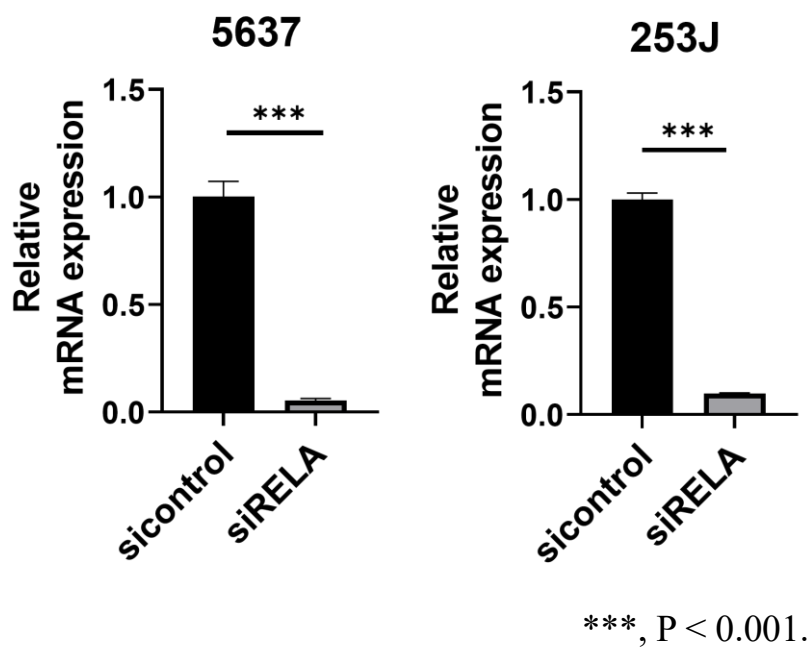


図 30 ヒト膀胱癌細胞株における RELA 遺伝子発現抑制による
RELA 発現レベル

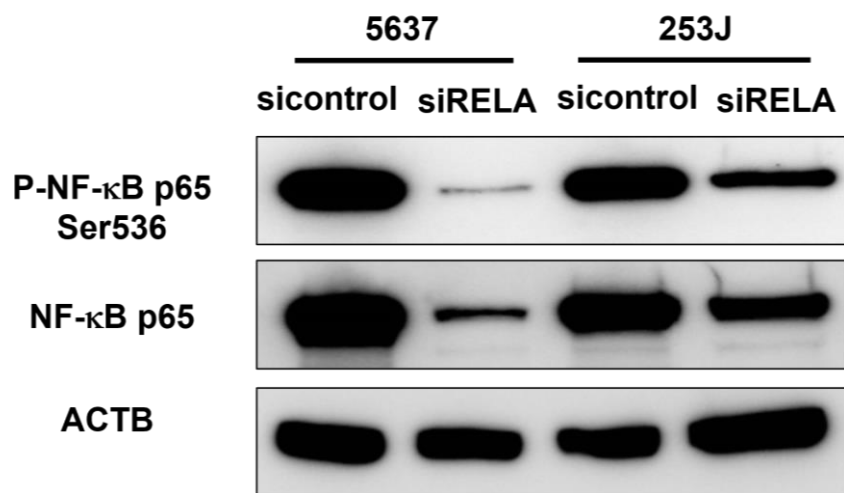


図 31 ヒト膀胱癌細胞株における RELA 遺伝子発現抑制による NF- κ B p65 Ser536 リン酸化レベル

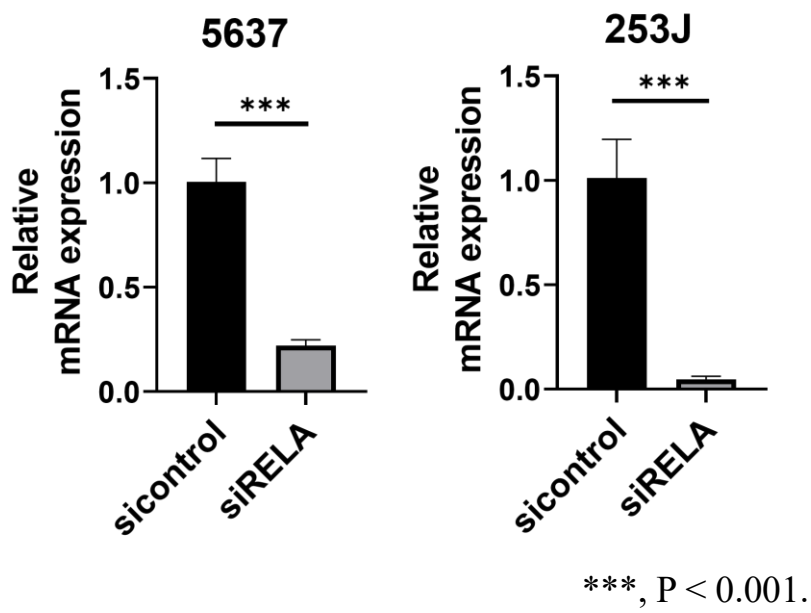
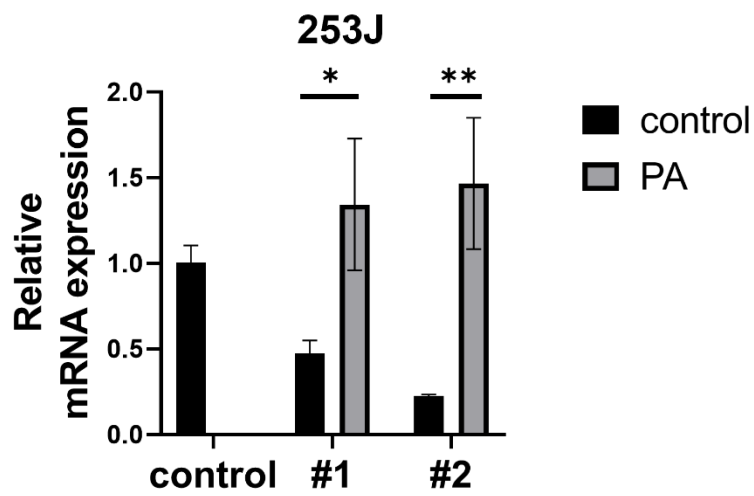
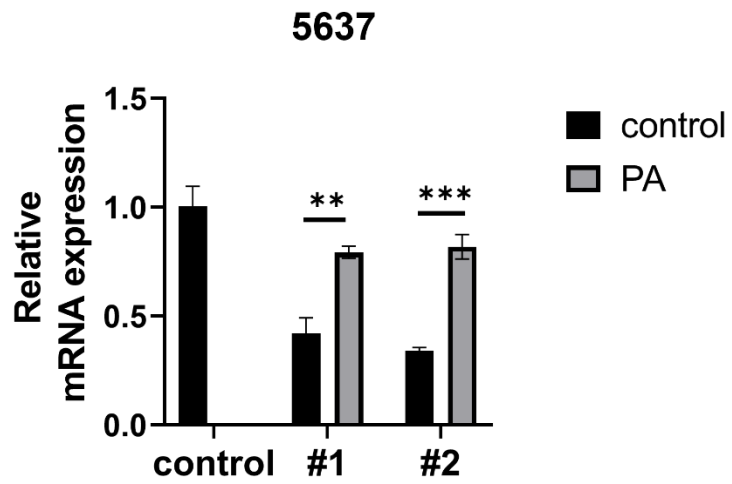
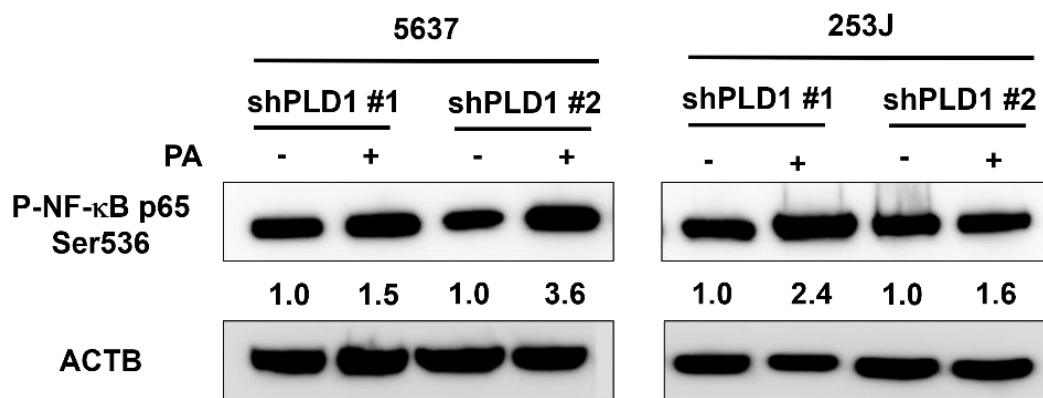


図 32 ヒト膀胱癌細胞株における RELA 遺伝子発現抑制による
MMP-13 発現レベル



*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.

図 33 PA 添加による PLD1 遺伝子発現抑制株における MMP-13 発現レベル



*数字は PA 添加前と比較した治療後の Normalized 値

図 34 PA 添加による NF- κ B p65 Ser536 リン酸化レベル

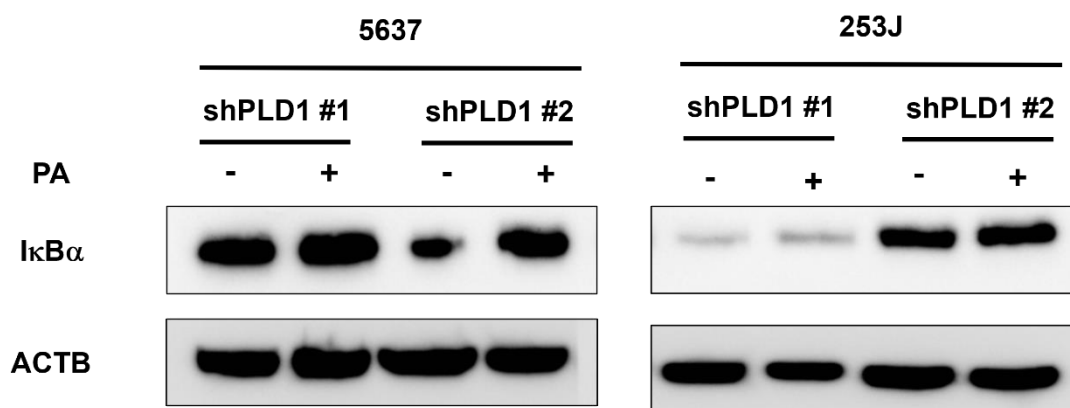


図 35 PA 添加による I κ B α タンパク発現レベル

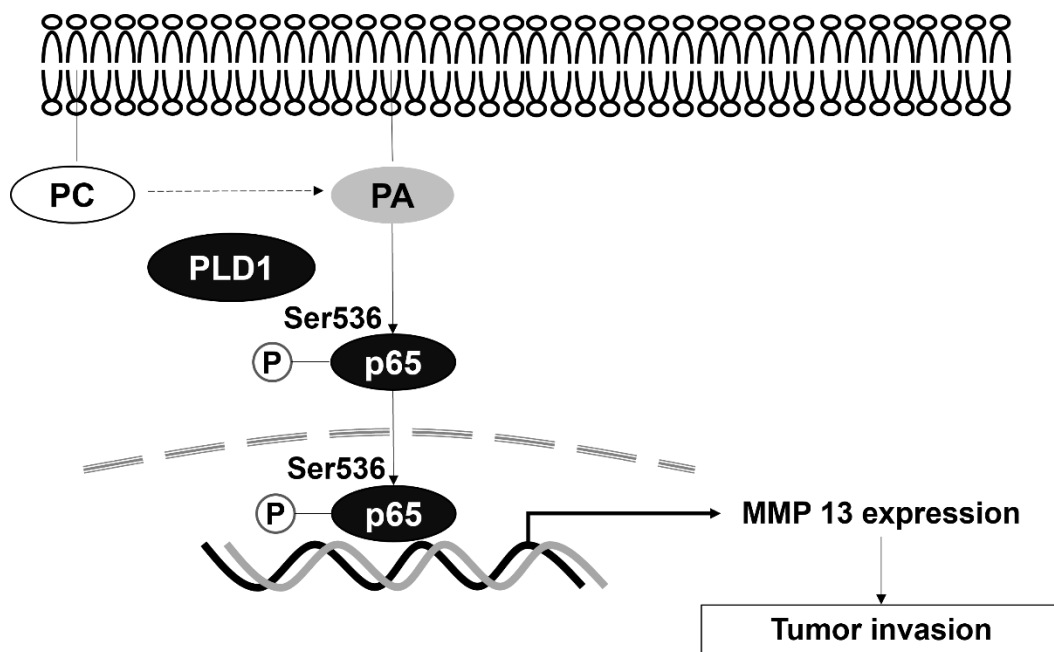
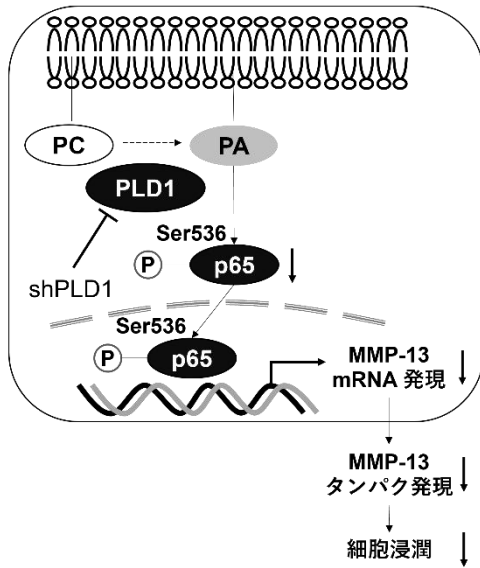


図 36 膀胱癌における PLD1 を介した推定浸潤メカニズム

5637細胞株, 253J細胞株



マウス膀胱発癌モデル

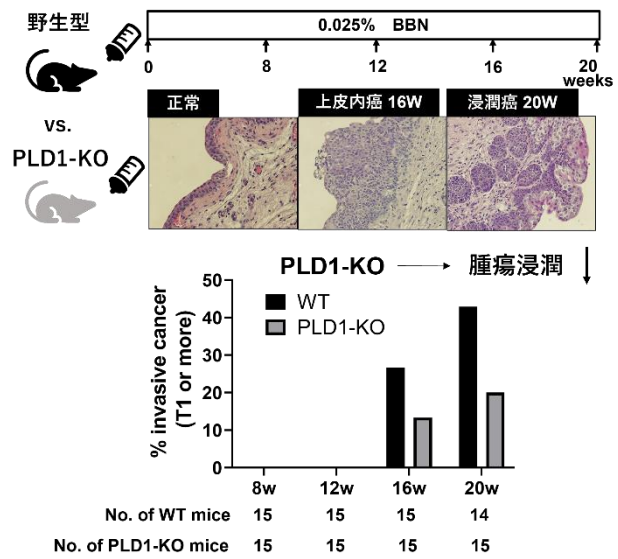


図 37 本研究結果の全体像

表 1 5637-PLD1 遺伝子発現抑制株で発現低下を認めた 23 遺伝子

遺伝子シンボル	Fold change	
	shPLD1 #1	shPLD1 #2
ADGRB1	0.05	0.06
ANOS1	0.34	0.37
CXCL1	0.29	0.14
CXCL5	0.31	0.14
CXCL6	0.34	0.08
CXCL8	0.21	0.12
EDN1	0.38	0.36
FGF2	0.3	0.46
FLT1	0.04	0.07
ICAM1	0.29	0.3
IL1B	0.15	0.21
IL6	0.05	0.1
ITGA1	0.31	0.19
LAMA3	0.19	0.39
LAMB3	0.21	0.27
MMP13	0.32	0.24
MMP9	0.16	0.06
NOS3	0.07	0.1
SELP	0.06	0.23
TEK	0.18	0.1
TNF	0.28	0.16
VCAM1	0.27	0.16
VEGFA	0.26	0.34

表 2 飲水開始後 16 週時点における発現変動遺伝子を用いた上流制御因子解析の結果

	Upstream Regulator	Predicted Activation State	Activation z-score	p-value of overlap	Target Molecules in Dataset
WT	NFkB (complex)	Activated	5.17	<0.001	BCL2A1,BCL3,BIRC5,CCL17,CCL22,CCL4,CCNB1,CCNB2,CCR7,CD80,CLU,COL1A2,CSF2,CXCL10,CXCL3,CXCL6,DMBT1,F2RL1,FOX P3,GCH1,IGFBP2,IL12B,IL18,IL1A,IL1B,IL1RN,IL6,IRF7,KRT17,KRT6B,KYNU, MMP13 ,MUC2,NOS1,OLR1,PLK1,PTGS2,SERPINA3,SE RPINB2,SPIB,SPP1,STAT4,TNF,TNFRSF4,TNFRSF9,TNFSF4,UBD, WNT10A,WNT10B
	NfκB1-RelA	Activated	2.594	<0.001	ADAMTS4,CSF2,IL12B,IL6, MMP13 ,PTGS2,TNF
PLD1-KO	NFkB (complex)	Activated	4.096	<0.001	BCL2A1,CCL22,CCR7,CD80,CLU,CXCL10,CXCL2,CXCL6,DMBT1,FCGR1A,FOXP3,GDF15,IGFBP2,IL12B,IL1A,IL1B,IL1RN,IL2RA,IL6,IR F7,KRT17,KRT6B,LTA, MMP13 ,NOS1,OLR1,SELE,SERPINA3,SERPIN B2,SLC2A5,SOCS3,SPP1,STAT4,TNFRSF4,TNFRSF9,TNFSF4,UB D,WNT10A,WNT10B
	NfκB1-RelA	NA	1.231	0.0023	IL12B,IL6, MMP13 ,SELE

表 3 飲水開始後 12 週時点における発現変動遺伝子を用いた上流制御因子解析の結果

	Upstream Regulator	Predicted Activation State	Activation z-score	p-value of overlap	Target Molecules in Dataset
WT	NFkB (complex)	Activated	4.304	<0.001	BCL2A1,BIRC5,CCL17,CCL22,CCNB1,CCNB2,CCR7,CD80,CLU,CXCL10,CXCL6,DMBT1,F2RL1,FOXP3,GCH1,IGFBP2,IL12B,IL18,IL1A,IL1B,IL1RN,IRF7,KRT17,KRT6B, MMP13 ,MUC2,NOS1,OLR1,PLK1,SELE,SERPINA3,SERPINB2,SPP1,STAT4,TNF,TNFRSF4,TNFRSF9,TNFSF4,UBD,WNT10A
	NfκB1-RelA	NA	1.503	<0.001	ADAMTS4,IL12B, MMP13 ,SELE,TNF
PLD1-KO	NFkB (complex)	Activated	4.281	<0.001	AGT,BCL2A1,BDNF,CCL22,CCR7,CD80,CLU,CXCL10,CXCL2,CXCL3,CXCL6,DMBT1,FOXP3,GDF15,HLA-A,IGFBP2,IL12B,IL18,IL1A,IL1B,IL1RN,IL2RA,IL6,IRF7,KRT17,KRT6B, MMP13 ,NOS1,OLR1,SERPINA3,SLC2A5,SPP1,STAT4,TNFRSF9,TNFSF4,UBD,WNT10A
	NfκB1-RelA	NA	NA	0.0174	IL12B,IL6, MMP13