

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19598

研究課題名（和文）ASIC/ENaCを介した膀胱癌の発癌と浸潤機序の解明

研究課題名（英文）To elucidate the mechanisms of carcinogenesis and invasion of bladder cancer via ASIC/ENaC signal pathway

研究代表者

西山 博之（NISHIYAMA, HIROYUKI）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20324642

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：閉経に伴い、膀胱粘膜上皮におけるASICやENaCなどの感覚受容体の発現変化が生じることを閉経モデルマウスを用いて明らかにした。さらにこれら感覚受容体の発現変化が無髄C線維を介した膀胱機能障害と関連することを明らかにした。一方、マウスBBN発癌モデルを確立し経時的な膀胱発癌、浸潤、悪性化の過程を明らかにした。同時に、BBN投与によって膀胱におけるASIC1の発現変化が生じることを示した。また臨床検体を用いた検討からASIC1は膀胱癌の浸潤、予後に寄与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、閉経に伴い膀胱粘膜上皮における感覚受容体の発現変化が起こること、それら感覚受容体の発現変化が過活動膀胱などの膀胱機能障害に関連することが明らかになった。この成果は高齢者における膀胱機能障害の発症機序の解明や新規治療標的の開発に寄与するものと考えられる。さらに、本研究から膀胱発癌や悪性化と膀胱における感覚受容体の発現変化の関連性が見出された。膀胱における感覚受容体と膀胱発癌、悪性化を関連付けた報告はこれまでになく、本研究成果は膀胱癌の悪性化機序の解明、新規治療標的の開発に寄与するものと考えている。

研究成果の概要（英文）：Using post menopausal mice model, we clarified the changes in expression of sensory receptors such as ASIC and ENaC in the bladder mucosa in the post menopause. We also clarified that changes in the expression of these sensory receptors are associated with bladder dysfunction mediated by unmyelinated C fibers. On the other hand, we established BBN carcinogenesis mice model and clarified the process of bladder carcinogenesis, infiltration, and malignancy over time. We also indicated that BBN administration causes changes in the expression of ASIC1 in the bladder. Furthermore, we found that ASIC1 may contribute to bladder cancer infiltration and prognosis from studies using clinical specimens.

研究分野：泌尿器科腫瘍学 泌尿器科学

キーワード：感覚受容体 閉経モデル BBN発癌モデル 膀胱癌 膀胱機能障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) これまでの疫学調査から女性の膀胱癌は閉経後に好発し、男性に比べ頻度は少ないものの悪性度が高く、治療後の再発率も男性よりも高いため予後不良とされる。また、閉経後の高齢女性に好発する排尿障害や蓄尿障害などの膀胱機能障害と、膀胱発癌リスクや膀胱癌悪性度との関係を示唆する報告も散見される。しかし、閉経後の高齢女性に生じる膀胱機能障害の発生機序や膀胱発癌、悪性化の機序は不明である。

(2) 我々は閉経モデルマウスを用いた予備実験から、閉経後の高齢女性における膀胱機能障害の背景に膀胱粘膜上皮における感覚受容体の発現変化が関与する可能性を見出した。

## 2. 研究の目的

以上の背景から本研究では、

(1) 閉経状態における膀胱粘膜上皮の感覚受容体変化と膀胱機能障害発症機序の解明

(2) 感覚受容体を含めた膀胱発癌、悪性化に関連する分子の同定

を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 閉経状態における膀胱粘膜上皮の感覚受容体変化と膀胱機能障害発症機序の解明

閉経モデルマウスの作成と膀胱機能評価：8週齢メス C57BL/6N マウスに、イソフルレン全身麻酔下に背面切開にて両側卵巢摘除を行い、6週後に検体採取、覚醒下膀胱内圧測定による膀胱機能評価を行った(OVX群, n=8)。シャム手術群(Sham群, n=8)をコントロール群とした。

閉経モデルマウスの膀胱粘膜上皮における分子発現変化：OVX群(n=8)とSham群(n=8)の膀胱粘膜上皮、筋層におけるASIC1,2,3, CDH1, Cx43, ENaC, TRPV1, TRPV4の発現をRT-PCRにて解析した。

閉経モデルマウスの膀胱機能変化機序に関する検討：で発現変化を認めた分子についてアゴニストまたはアンタゴニスト膀胱内注入による膀胱機能変化を覚醒下膀胱内圧測定にて評価した(n=8)。さらにカプサイシン(合計 87.5 mg/kg)前処置によるC線維除神経の影響を解析した(n=8)。

(2) 感覚受容体を含めた膀胱発癌、悪性化に関連する分子の同定

マウス BBN 発癌モデルの確立

マウス膀胱発癌モデルとして BBN(N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine)を用いた。C57BL/6Jで0.025%BBN飲水を開始し、8週後(n=15)、12週後(n=15)、16週後(n=15)、20週後(n=15)でそれぞれsacrificeし、病理組織標本の作成ならびにTotal RNA抽出を行った。

マウス BBN 発癌モデルのフェノタイプと分子発現変化の解析

BBN発癌モデルにおける病理組織学的フェノタイプをHE染色にて評価した。また、分子発現変化をRNAシーケンスを用いて評価した。

ヒト膀胱癌における感覚受容体関連分子と浸潤・予後との相関に関する解析

GDC Data PortalよりTCGA-BLCAコホート(n=408)のRNAシーケンスデータ、臨床情報データをダウンロードしin silico解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 閉経状態における膀胱粘膜上皮の感覚受容体変化と膀胱機能障害発症機序の解明

閉経モデルマウスの作成と膀胱機能評価：覚醒下膀胱内圧測定において生理食塩水注入ではOVX群とSham群にパラメータの有意な差を認めなかったが、0.1%酢酸注入ではOVX群において排尿間隔、排尿量、膀胱容量の有意な減少を認めた。Sham群では0.1%酢酸注入による膀胱機能変化は認めなかった(図1)。よって、閉経モデルマウスの膀胱では酸感受性が亢進し膀胱機能障害が生じることが示された。

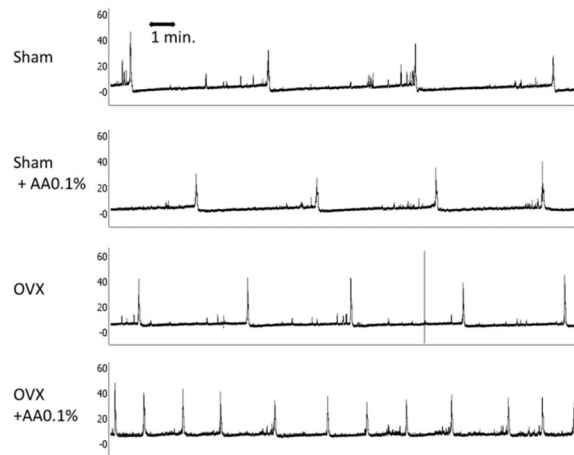


図1: OVX群とSham群の覚醒下膀胱内圧測定

閉経モデルマウスの膀胱粘膜上皮における分子発現変化: RT-PCRではOVX群の膀胱粘膜上皮において酸感受性遺伝子であるASIC1の発現亢進を認めた(図2)。その他分子の発現に有意差は認めなかった。

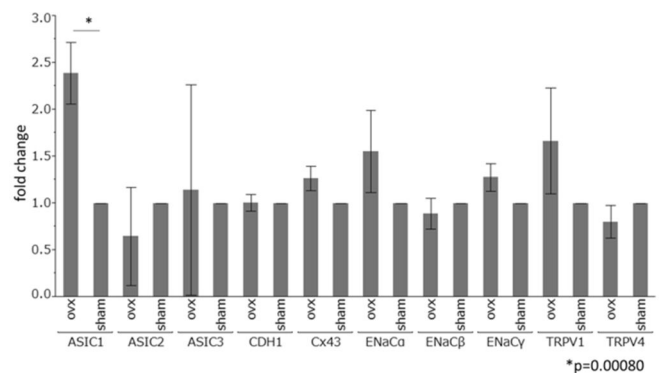


図2: OVX群とSham群の膀胱粘膜上皮における分子発現

閉経モデルマウスの膀胱機能変化機序に関する検討: OVX群にて覚醒下膀胱内圧測定においてASIC1のアンタゴニストであるamilorideを膀胱内注入ののち、0.1%酢酸を注入したところ膀胱機能変化を認めなかった(図3)。さらに、カプサイシン前処置にてC線維除神経をおこなったOVX群に対し0.1%酢酸注入を行ったところ膀胱機能の変化を認めなかった(図4)。以上より、閉経モデルマウスにおいて膀胱粘膜上皮におけるASIC1が求心性C線維を介した酸感受性亢進に關与することが示されたと同時に、閉経後の高齢女性における膀胱機能障害にASIC1をはじめとした感覚受容体の発現変化が關与していることが示された。

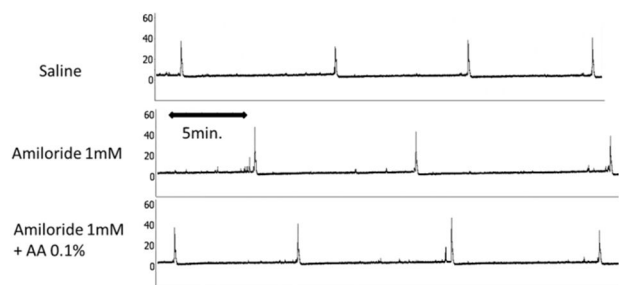


図3: OVX群におけるAmiloride膀胱内注入効果

## (2) 感覚受容体を含めた膀胱発癌、悪性化に關連する分子の同定

### マウスBBN発癌モデルの確立

マウスBBN発癌モデルのフェノタイプと分子発現変化の解析: 12週より異形成(5/15, 33.3%) 16週より上皮内癌(9/15, 60.0%)の形成を認めた。浸潤癌は16-20週において33.3%(10/30)の形成を認めた。このマウスBBN発癌モデルにより、週数に応じたフェノタイプの、安定した膀胱発癌を認めた(図5)。

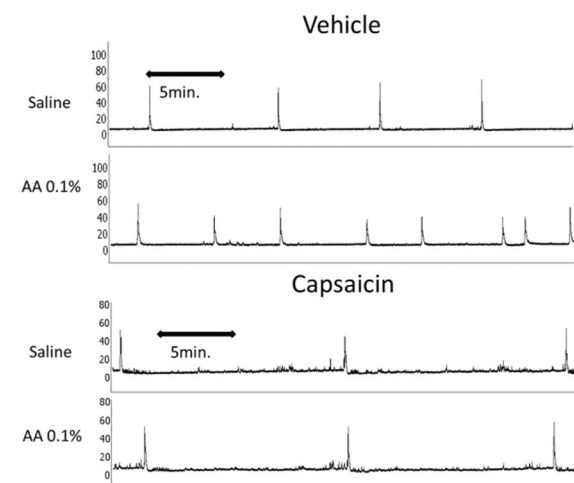


図4: OVX群におけるC線維除神経の効果

感覚受容体に関連する分子発現変化については、ASIC1-4 や Scn1 の経時的な遺伝子発現変化を解析した。これらは BBN 投与によって発現の亢進を認めたが、経時的な遺伝子発現上昇は認めなかった(図 6)。

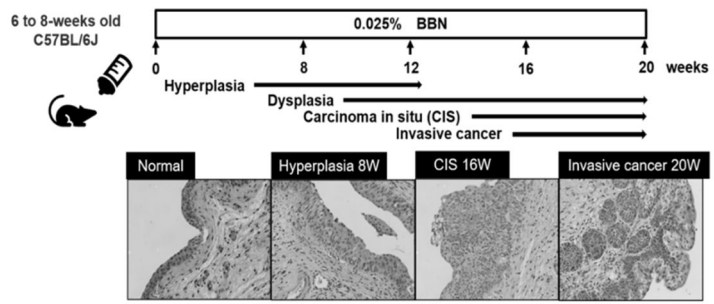


図5: マウスBBN発癌モデルのフェノタイプ

ヒト膀胱癌における感覚受容体関連分子と浸潤・予後との関係に関する解析: ヒト膀胱癌において ASIC1,3,5 ならびに SCNN1A,1B,1G の発現を認めた。さらに ASIC1 は pT2 以下の症例と比較して pT3-4 の症例において有意な発現上昇を認めた ( $p < 0.001$ ) (図 7)。男性と女性で ASIC 1 の発現に有意な差は認めなかった(図 7)。また、ASIC1-5、SCNN1A-G の遺伝子発現と予後との関係について Kaplan-Meier 法を用いて検討した結果、ASIC1,4, SCNN1A の発現亢進は予後不良因子であった(それぞれ  $p < 0.001$ ,  $p = 0.0096$ ,  $p = 0.026$ ) (図 7)。

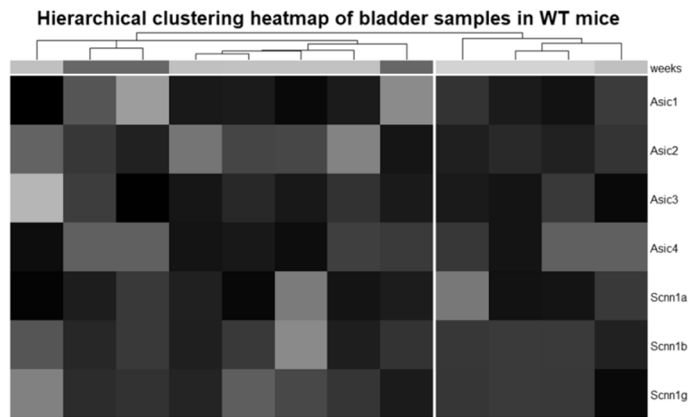


図6: マウスBBN発癌モデルにおける感覚受容体発現

以上の結果より、膀胱癌における浸潤と予後の両者に関連する感覚受容体関連分子として、ASIC1 が候補として挙げられた。

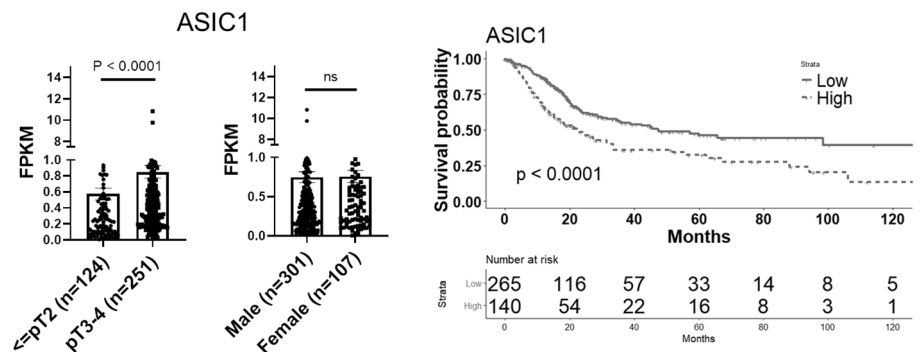


図7: ヒト膀胱癌検体 (TCGAコホート) におけるASIC 1 の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiga M, Miyazaki J, Tanuma K, Nagumo Y, Yoshino T, Kandori S, Negoro H, Kojima T, Tanaka R, Okiyama N, Fujisawa Y, Watanabe M, Yamasaki S, Kiyohara H, Watanabe M, Sato TA, Tahara H, Nishiyama H, Yano I.	4. 巻 -
2. 論文標題 The liposome of trehalose dimycolate extracted from M. bovis BCG induces antitumor immunity via the activation of dendritic cells and CD8 <sup>+</sup> T cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-021-02870-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takaoka EI, Kurobe M, Okada H, Takai S, Suzuki T, Shimizu N, Kwon J, Nishiyama H, Yoshimura N, Chermansky CJ.	4. 巻 37(8)
2. 論文標題 Effect of TRPV4 activation in a rat model of detrusor underactivity induced by bilateral pelvic nerve crush injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurourology and Urodynamics	6. 最初と最後の頁 2527-2534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/nau.23790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sekido N, Takaoka EI, Nishiyama H, Ochi H, Satoh T.	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Impact of clean intermittent catheterization on quality of life of patients with neurogenic lower urinary tract dysfunction due to radical hysterectomy: A cross-sectional study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lower Urinary Tract Symptoms	6. 最初と最後の頁 168-176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/luts.12350. Epub 2020 Sep 14.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 南雲義之、神鳥周也、田中 建、河原貴史、小島崇宏、西山博之
2. 発表標題 膀胱癌におけるPLD1を介した浸潤メカニズムの解明
3. 学会等名 第30回泌尿器分子・細胞研究会（名古屋・WEB）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志賀正宣, 宮崎淳, 田沼光三郎, 神鳥周也, 根来宏光, 小島崇宏, 西山博之
2. 発表標題 BCG由来のTDMを用いたリポソーム製剤による新規治療法の開発
3. 学会等名 第30回泌尿器分子・細胞研究会(名古屋・WEB)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takaoka E, Suzuki T, Mizoguchi S, Kurobe M, Ni J, Kwon J, Shimizu N, Onozawa M, Miyazaki J, Nishiyama H, Yoshimura N.
2. 発表標題 Mechanisms underlying bladder hypersensitivity in female mice with estrogen deficiency.
3. 学会等名 International Continence Society (ICS) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takaoka E, Takai S, Suzuki T, Shimizu N, Kwon J, Okada H, Chermansky C, Yoshimura N.
2. 発表標題 Effect of ovariectomy on bladder function in mice.
3. 学会等名 Geriatric Urological Society (GUS) Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takaoka E, Suzuki T, Mizoguchi S, Ni J, Miyazaki J, Nishiyama H, Yoshimura N,
2. 発表標題 Characterization of bladder dysfunction induced by ovariectomy in mice.
3. 学会等名 Annual Meeting AUA (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	小島 崇宏  (KOJIMA TAKAHIRO)  (40626892)	筑波大学・医学医療系・准教授   (12102)	
研究 分担者	神鳥 周也  (KANDORI SHUYA)  (50707825)	筑波大学・医学医療系・講師   (12102)	
研究 分担者	高岡 栄一郎  (TAKAOKA EIICHIRO)  (50625340)	国際医療福祉大学・医学部・准教授   (32206)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------