

主論文の要旨

**Nuclear Factor- κ B Promotes Urothelial
Tumorigenesis and Cancer Progression via
Cooperation with Androgen Receptor Signaling**

〔 Nuclear Factor- κ B シグナルはアンドロゲン受容体経路との
協調を介して尿路上皮の発癌および癌の進行を促進する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 泌尿器科学分野

(指導：後藤 百万 教授)

井上 聡

【緒言】

膀胱癌は尿路上皮に発生する癌であり筋層非浸潤癌と筋層浸潤癌に分類される。筋層非浸潤膀胱癌患者は経尿道的膀胱腫瘍切除術を受けた後に膀胱内注入療法を受けて長期生存するが、膀胱内再発のリスクが高い。一方、筋層浸潤膀胱癌患者は膀胱全摘除術や補助化学療法の積極的治療を受けたとしても癌が進展するリスクが高い。

膀胱癌の発生リスクは性差があることから、膀胱癌の発生における性ホルモン受容体シグナルの役割が調べられている。アンドロゲン受容体(androgon receptor: AR)シグナルが膀胱癌の発生と進展に重要な役割を果たすことが報告されてきているが、尿路上皮における AR と関連シグナルの正確な機序は依然としてあまり解明されていない。

Nuclear factor (NF)- κ B は RelA (p65)、RelB、c-Rel、NF- κ B1 (p105/p50)、NF- κ B2 (p100/p52)で構成される転写因子のタンパク複合体で、免疫、炎症、細胞増殖、分化の過程に関与している。リン酸化によって活性化された NF- κ B は癌の発生、進展に関与する。

我々は最近、アンドロゲンが NF- κ B/p65 の発現とその核内移行を導くことによって AR 陽性膀胱癌細胞株において化学療法薬剤のシスプラチンの細胞活性を減らすことを示した。今回我々は NF- κ B が膀胱癌の発生と進展において AR シグナルと関連してどのように働くのかを調べた。

【方法】

ロチェスター大学メディカルセンターおよびジョンズホプキンス病院で経尿道的膀胱腫瘍切除術を施行された膀胱癌 149 例の膀胱組織より tissue microarray(TMA)を作成し、NF- κ B、phospho-NF- κ B(p-NF- κ B)/p65 に対する抗体を使用して免疫染色を行った。染色陽性率によるスコアと染色強度によるスコアを乗じることで German immunoreactive score を算出して、陰性(0)、弱陽性(1+)、中等度陽性(2+)、強陽性(3+)に分類した。

不死化したヒトの正常尿路上皮細胞株(SVHUC)、ヒト尿路上皮癌株(UMUC3、647V)、その安定した細胞株の垂型である、SVHUC-vector/SVHUC-AR、UMUC3-control-short hairpin RNA(shRNA) /UMUC3-AR-shRNA、647V-vector/647V-AR を培養した。同様に NF- κ B/p65-shRNA レンチウイルス粒子を SVHUC-AR、UMUC3 に発現させた。また、発癌物質である 3-methylcholanthrene (MCA)を曝露させて 6 週間培養することで SVHUC を悪性形質転換させた。

In vitro 実験として、MTT アッセイ、プレートコロニー形成アッセイ、スクラッチ創傷治癒アッセイ、細胞浸潤アッセイ、ウエスタンブロッティング、逆転写およびリアルタイム PCR、レポーター遺伝子アッセイを行った。

雄の C57BL/6 マウスに N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine(BBN)を経口摂取させた膀胱発癌実験モデルを作製した。また、雄の免疫不全 athymic NCr-nu/nu マウスの脇腹に UMUC3 由来の細胞と細胞外マトリックスを混ぜたものを注入して、マウ

ス xenograft モデルを作製した。

【結果】

膀胱癌 149 例のうち、NF- κ B/p-NF- κ B は正常尿路上皮で 100%(25% 1+, 40% 2+, 35% 3+)/47%(36% 1+, 10% 2+)、癌組織で 100%(9% 1+, 38% 2+, 52% 3+)/69%(44% 1+, 24% 2+, 1% 3+)であった。また、癌組織において NF- κ B と p-NF- κ B の発現は有意な正の相関を認めた。高リスク癌、筋層浸潤癌において p-NF- κ B の陽性の割合はそれぞれ低リスク癌、筋層非浸潤癌と比較して有意に高かった。さらに、筋層浸潤膀胱癌患者において p-NF- κ B 陽性群は無増悪生存および癌特異的生存が優位に低く、多変量解析で p-NF- κ B が独立した予後予測因子であった。加えて高リスク筋層非浸潤膀胱癌において NF- κ B 陽性(2+/3+)と AR 陽性は有意な正の相関を認めた。

正常尿路上皮における NF- κ B と AR の関連を調べるためにウエスタンブロッティングを行った。SVHUC-AR 細胞で NF- κ B 活性剤(betulinic acid:BA)と NF- κ B 阻害剤(parthenolide:PAR)は NF- κ B と p-NF- κ B のタンパク発現をそれぞれ増加、減少させた。さらにリアルタイム PCR を行い、BA 5-10 μ mol/L で NF- κ B と AR の遺伝子発現が増加し、PAR 5-10 μ mol/L で NF- κ B/p65 と AR の遺伝子発現が減少した。

SVHUC-AR 細胞を MCA によって悪性形質転換させた細胞(MCA-SVHUC-AR)に抗アンドロゲン剤である hydroxyflutamide(HF)を投与すると、MTT アッセイ、プレートコロニー形成アッセイにおいて、癌の増殖、コロニー形成が抑制された。加えて、BA と別の NF- κ B 活性剤(tumor necrosis factor- α :TNF- α)が癌の増殖、コロニー形成を促進し、PAR と別の NF- κ B 阻害剤(dehydroxymethylepoxyquinomicin:DHMEQ)が癌の増殖、コロニー形成を抑制したが、MCA-SVHUC 細胞では NF- κ B 活性剤、NF- κ B 阻害剤はいずれも作用しなかった。SVHUC-AR 細胞に NF- κ B をノックダウンすると、同様に悪性形質転換が抑制された。リアルタイム PCR の結果、MCA-SVHUC-AR 細胞において PAR は癌遺伝子である c-myc の発現を増加させ、癌抑制遺伝子である p21、p53、UDP-glucuronosyltransferase-1A(UGT1A)の発現を減少させた。

また BBN を経口摂取させた膀胱発癌実験モデルの血尿の有無に尿試験紙を用いて、早期の膀胱癌の発生を調べた。BA 群は mock 群と比較して血尿の発生が優位に多く、PAR 群は血尿の発生が少ない傾向にあった。週齢 22 週の BBN 投与後のマウスの中で膀胱癌が発生した割合はそれぞれ mock 群 56%、BA 群 89%、PAR 群 22%であった。

さらに、膀胱癌細胞における NF- κ B と AR シグナルの関連を調べるために同様の実験を行った。ウエスタンブロッティングで AR 陽性細胞(UMUC3-control-shRNA/647V-AR)の NF- κ B/p-NF- κ B の発現は AR 陰性細胞(UMUC3-AR-shRNA/647V-vector)よりも高かった。SVHUC-AR 細胞と同様に BA と PAR は NF- κ B/p-NF- κ B と AR の発現をそれぞれ増加、減少させた。またレポーター遺伝子アッセイで、BA と PAR は AR ルシフェラーゼ活性をそれぞれ増加、減少させた。一方、UMUC3 細胞において NF- κ B ノックダウンが AR の発現を減少させた。アンドロゲンの一種である

dihydrotestosterone(DHT)が AR 陽性細胞において NF- κ B の転写活性を促進した。

MTT アッセイ、プレートコロニー形成アッセイの結果、AR 陰性細胞ではなく AR 陽性細胞において BA が癌の増殖、コロニー形成を促進し、PAR がそれらを抑制した。スクラッチ創傷治癒アッセイ、細胞浸潤アッセイも同様に、AR 陽性細胞においてのみ BA/PAR が癌の遊走、浸潤をそれぞれ促進、抑制した。

マウス xenograft モデルに BA/mock/PAR を投与し UMUC3-control-shRNA/UMUC3-AR-shRNA の腫瘍径を測定した。最初に AR ノックダウンが腫瘍の形成、成長を抑制した。次に BA と PAR が UMUC3-control-shRNA の腫瘍の形成、成長をそれぞれ促進、抑制した。それに相当するものとして、BA と PAR は Ki-67 の免疫組織染色で決定づけられる細胞増殖指数をそれぞれ促進、抑制した。加えて、免疫組織染色で BA と PAR は NF- κ B の発現をそれぞれ促進、抑制した。

【考察】

以前の報告で、腎盂、尿管の正常尿路上皮よりも癌組織において NF- κ B が過剰発現しており、NF- κ B の発現が癌特異的生存の独立した予後予測因子であった。我々が行った免疫組織染色において、p-NF- κ B の高発現が低悪性度よりも高悪性度で、筋層非浸潤癌よりも筋層浸潤癌で、正常尿路上皮よりも膀胱癌で認められた。一方、p-NF- κ B と筋層非浸潤癌の膀胱内再発、進展との間に有意な相関を認めなかったが、p-NF- κ B 陽性が筋層浸潤膀胱癌に対する独立した予後不良因子であることが示された。

AR 陰性膀胱癌細胞での過去の報告と対照的に、我々は AR の存在下で NF- κ B が尿路上皮の発癌を促進することを示した。加えて、NF- κ B の活性剤と阻害剤/ノックダウンが AR 陽性膀胱癌細胞においてのみ癌の増殖、遊走、浸潤をそれぞれ促進、抑制し、マウス xenograft モデルでも同様であった。また、AR ノックダウン、AR の過剰発現が NF- κ B と p-NF- κ B の発現をそれぞれ増加、減少させた。活性化された AR が NF- κ B による尿路上皮癌の発生と進展を制御するのに必要であることが明らかになった。前立腺癌細胞で報告されていた NF- κ B と AR シグナルとの機能的な相互作用が尿路上皮細胞で確立された。

【結語】

NF- κ B は膀胱癌で活性化され、癌の進展に関連した。また AR が活性化された尿路上皮細胞において NF- κ B の調節は癌の発生および進展を制御した。従って、NF- κ B の抑制は AR の不活性化とともに尿路上皮癌の化学予防および有効な治療方法となる可能性がある。