

論 文 内 容 要 旨

題目 A DDX31/mutant-p53/EGFR axis promotes multistep progression of muscle invasive bladder cancer

(DDX31/p53 変異/EGFR 経路は筋層浸潤膀胱癌の多段階進展を促進する)

著者 Kei Daizumoto, Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Tomoya Fukawa, Hisaori Uehara, Masaya Ono, Masato Komatsu, Hiro-omi Kanayama and Toyomasa Katagiri
平成 30 年発行 Cancer Research に掲載予定

内容要旨

筋層浸潤性膀胱癌の治療は膀胱全摘術が標準であるが、再発率が高く予後が非常に不良である。進行症例や転移症例に対してシスプラチンベースの化学療法を行うが難治症例が多いことや重篤な副作用のため継続困難なことが深刻な問題となっている。以上の問題点を克服するために新規治療法の開発が切望されている。近年のがんゲノムシーケンス解析の発展により、筋層浸潤性膀胱癌において多くの遺伝子異常が同定され、その中でも、p53 経路や EGFR 経路の遺伝子異常や発現変化が多く認められている。しかし、膀胱癌の進展過程においてこれらがどのように関連しているか明確な機序はわかっていなかった。

今回、申請者は既報の筋層浸潤性膀胱癌と正常尿路上皮組織と比較した網羅的遺伝子発現解析を通じて、癌組織で著しく発現亢進している DDX31 (DEAD box polypeptide 31) に着目した。筋層浸潤性膀胱癌では、p53 変異を多く認めることがわかっており、DDX31 が変異型 p53 タンパク質と関連し癌進展に関与するのではないかという仮説をたて研究を進めた。DDX31 と変異型 p53 タンパク質との関連性を免疫染色解析で評価したところ、DDX31 高発現かつ p53 高発現の症例が非常に予後不良であることがわかった。詳細なメカニズムを調べるために膀胱癌細胞株を用いて DDX31 のノックダウン実験と過剰発現実験をおこなった。どのようなフェノタイプに関連しているかを調べたところ、DDX31 高発現は浸潤能、遊走能及び足場非依存性増殖を促進することが分かった。さらに免疫沈降法及び ChIP assay を行い DDX31 は変異型 p53 と転写因子 SP1 との複合体を形成することで、遊走能および浸潤能の亢進の機能を有する EPB41L4B 遺伝子の転写亢進を導くことを発見した。さらに興味深いことに、ステージの進行した浸潤性膀胱癌においては免疫染色解析で DDX31 が細胞質に発現していること

様式(8)

がわかり、免疫沈降法と細胞質・核分画法を行うことで DDX31 は核内より細胞膜直下に移行して、nucleolin (NCL) と EGFR との三者複合体を形成して、EGFR を安定化することを発見した。また EGFR を安定化することで Akt シグナルの活性を導き、癌進展を促進していることを明らかにした。以上の結果から浸潤性膀胱癌の初期には核内で DDX31/変異型 p53/転写因子 SP1 の複合体を形成しており、さらに進行した浸潤性膀胱癌では DDX31/NCL/EGFR の複合体を形成し多段階的に癌進展を引き起こしていることが示唆された。

特に治療薬開発の観点として DDX31-NCL 相互作用を標的とした DDX31 アミノ酸配列由来のドミナントネガティブペプチド(DDX31-peptide)を開発した。これを用いた DDX31-NCL 複合体の形成阻害による EGFR の不安定化の誘導を介した Akt シグナル阻害により、in vitro および in vivo での抗腫瘍効果を証明した。以上の成果により、DDX31-NCL 相互作用を標的とした筋層浸潤性膀胱癌の新規治療法の開発の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1371 号	氏名	大豆本 圭
審査委員	主査 常山 幸一 副査 丹黒 章 副査 西岡 安彦		

題目 A DDX31/mutant-p53/EGFR axis promotes multistep progression of muscle invasive bladder cancer
(DDX31/p53 変異/EGFR 経路は筋層浸潤膀胱癌の多段階進展を促進する)

著者 Kei Daizumoto, Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Tomoya Fukawa, Hisanori Uehara, Masaya Ono, Masato Komatsu, Hiro-omi Kanayama and Toyomasa Katagiri

平成 30 年発行 Cancer Research に掲載予定
(主任教授 金山博臣)

要旨 筋層浸潤性膀胱癌の標準治療は膀胱全摘術であるが、再発率が高く予後は不良である。進行症例に対しては化学療法が施行されるが根治は困難であり、重篤な副作用のため継続が困難なこともある。以上の問題点を克服するために新規治療法の開発が切望されている。

一方、筋層浸潤性膀胱癌において p53 経路および Epidermal growth factor receptor (EGFR) 経路の遺伝子異常や発現変化が高頻度に認められるが、癌進展過程におけるそれぞれの関連性および詳細な機序は不明である。

申請者らは、筋層浸潤性膀胱癌で発現上昇を認める DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 31 (DDX31) に着目し、DDX31 と変異型 p53 タンパク質の関連性が膀胱癌進展に関与するのでは

ないかという仮説のもとに研究を行った。

得られた結果は以下の通りである。

- 1) 臨床検体を用いた免疫染色解析で、DDX31 高発現かつ p53 高発現であることと膀胱癌の予後不良との間に強い関連を認めた。
- 2) 膀胱癌細胞株を用いた DDX31 のノックダウン実験と過剰発現実験により、DDX31 高発現は浸潤能、遊走能及び足場非依存性増殖を促進することが分かった。
- 3) DDX31 は変異型 p53 と Sp1 transcription factor (SP1) と複合体を形成し、この複合体形成が遊走能および浸潤能の亢進に関連する Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1 Like 4B (*EPB41LAB*) の転写亢進を誘導することが示された。
- 4) DDX31 は主に核内に存在するが、進行した浸潤性膀胱癌細胞では、核内から細胞質に移行して、リン酸化 nucleolin (p-NCL) と EGFR との三者複合体を形成し、EGFR の安定化および Akt シグナルの活性化を誘導した。
- 5) DDX31-NCL 相互作用を標的とした DDX31 アミノ酸配列由来のドミナントネガティブペプチドによる DDX31-NCL 複合体の形成阻害は、EGFR の不安定化および Akt シグナル阻害を介し、顕著な *in vivo* 抗腫瘍効果を示した。

本研究結果は、DDX31 が浸潤性膀胱癌の初期段階では核内で変異型 p53/SP1 と複合体を形成すること、さらに進行した浸潤性膀胱癌では、細胞質にて p-NCL/EGFR と複合体を形成することを介して多段階的に癌進展に関与することを示唆している。

以上より、本研究は筋層浸潤性膀胱癌の多段階的癌進展機序の解明および新規治療薬の開発につながる可能性を示しており、浸潤性膀胱癌治療の新たな展開に寄与するところ大であり、学位授与に値すると判定した。