

論文内容要旨

Kdm6a Deficiency Activates Inflammatory Pathways,
Promotes M2 Macrophage Polarization, and Causes
Bladder Cancer in Cooperation with *p53* Dysfunction

(*Kdm6a* 欠失は炎症経路を活性化し、M2 マクロファージ極性変化を誘導し、*p53*機能不全と協調して膀胱癌を発症する。)

Clinical Cancer Research, 2020, in press.

主指導教員：神沼 修 教授

(原爆放射線医科学研究所 疾患モデル解析研究分野)

副指導教員：稲葉 俊哉 教授

(原爆放射線医科学研究所 がん分子病態)

副指導教員：亭島 淳 准教授

(医系科学研究科 腎泌尿器科学)

小嶋 浩平

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【緒言】

エピゲノムの脱制御は発癌に深く関与する。膀胱癌 (BC) は、病理組織学的のみならず分子的特徴も大きく異なる二つのタイプ、筋層非浸潤癌と筋層浸潤癌 (MIBC) に大別される。そのいずれにおいても、ヒストン H3K27 脱メチル化酵素 KDM6A のコーディング遺伝子 *KDM6A* の機能欠失型変異が高頻度に認められる。この変異頻度は他癌腫に比べても突出して高く、*KDM6A* 機能欠失が BC に極めて重要な役割を担っている事を示唆している。しかし *KDM6A* の BC における分子的作用には不明な点が多い。

【目的】

MIBC において、*KDM6A* 機能欠失型変異が担う役割を解明すると共に、その新規治療標的としての可能性を探索する。

【方法】

尿路上皮特異的 *Kdm6a* 欠失 (*Kdm6a^{ΔΔ}*) マウスとコントロール (*Ctrl*) マウスを作製する。更に MIBC の主な特徴の一つである *p53* 変異を模したヘテロノックアウト (*p53^{+/-}*) マウスと交配させる (*Kdm6a^{ΔΔ} p53^{+/-}* および *Ctrl p53^{+/-}* マウス)。これらを用いて MIBC 発症過程における *Kdm6a* 欠失の分子的作用解析を行う。

【結果】

上記マウスを用いて、BC 自然発症を期待して生後 1 年まで経過観察を行ったのち採材した。*Kdm6a^{ΔΔ} p53^{+/-}* マウスの 60% に、MIBC の主要な前病変とされる異形成～上皮内癌を自然発症した。一方で、その他のマウスには病理組織学的異常を認めなかった。この結果は、*Kdm6a* 欠失単独では表現型獲得には至らないが、*p53* 機能欠失と協調する事で異形成～上皮内癌発症に至る事を示している。また、*Kdm6a^{ΔΔ} p53^{+/-}* 膀胱粘膜下層は *Ctrl p53^{+/-}* マウスと比較してマクロファージの有意な集積を認めた。

次に、早期の MIBC 発症を目的として、マウスに膀胱特異的発癌物質 BBN を投与した。野生型マウスでは MIBC 発症に通常半年程度の投与期間が必要であるが、*Kdm6a^{ΔΔ} p53^{+/-}* マウスはわずか 10 週で MIBC を発症した。MIBC 発症前段階の尿路上皮を単離してフローサイトメトリー解析を行ったところ、*p53^{+/-}* との交配の有無に関わらず、*Kdm6a^{ΔΔ}* 尿路上皮では *Ctrl* と比較して癌幹細胞マーカーである CD44 陽性細胞が増加していた。また、*p53^{+/-}* 存在下の比較では更に、細胞周期マーカーである BrdU 陽性細胞が増加していた。この結果は、*Kdm6a* 機能欠失が癌幹細胞増加に寄与し、さらに *p53* 機能欠失による細胞周期の脱制御が生じる事で、表現型を獲得する事を示している。

次に、*Kdm6a* 欠失尿路上皮における遺伝子発現変化を観察するため、RNA-sequence を施行した。その結果、自然発症群、化学発癌誘導群共に、*Kdm6a* 欠失によりサイトカイン-サイトカイン受容体結合に関わる経路の亢進を認めた。同経路の中でも特に、主要な遺伝子として *Il6*, *Ccl2* の発現亢進が重要であると考えられた。

これらの現象の検証を目的として、マウス BC 細胞株 MBT2 を用いて *Kdm6a* ノックアウト (KO) 株と対照群 (EV) 株を作製した。KO 株では EV 株と比較して、有意な *Il6*, *Ccl2* の発

現亢進を認めた。更に、野生型マウス由来のマクロファージとの共培養を行うと、KO 株では有意なマクロファージの遊走能および、M2 への極性変化誘導能が亢進している事が明らかとなった。IL6 および CCL2 リコンビナントを添加したメEDIUMと、上記マクロファージを共培養すると、濃度依存的にマクロファージ遊走能および、M2 への極性変化誘導能が亢進した。同種移植実験として KO 株、EV 株を野生型マウスに移植したところ、KO 株では腫瘍増殖能の亢進および腫瘍内 M2 マクロファージの増加を認めた。

IL6 と CCL2 は、互いに正のフィードバックの関係にあるとする報告がある。そこで我々はこれまでの結果を踏まえ、IL6 と CCL2 の同時阻害によって *Kdm6a* 欠失膀胱癌の成長を抑制できるかを検証した。CCL2 レセプター (CCR2) 阻害剤である Propagermanium と、IL6 レセプター (IL6R) 抗体である MR16-1 の 2 種類の薬剤を用意し、KO 株の同種移植後に単剤または併用投与を行った。各薬剤は単剤では腫瘍成長を抑制できなかったが、併用により有意に対照群 (IgG コントロール) と比較して腫瘍成長を抑制し、さらに有意な M2 マクロファージの減少も認めた。

【結論】

尿路上皮における *Kdm6a* の機能欠失は炎症経路の亢進、癌幹細胞性の亢進、M2 マクロファージの誘導を惹起する。さらに *p53* 変異と協調する事で増殖能が亢進し、上皮内癌から MIBC を発症する。IL6, CCL2 の阻害剤併用療法は、*Kdm6a* 機能欠失型変異を有する MIBC に対する新規治療となり得る。