

学 位 論 文 題 名

膀胱癌の上皮内進展におけるインテグリン $\beta 4$ の発現低下と ラミニンによる細胞運動亢進の関与

学位論文内容の要旨

I. 目的

膀胱癌は発育形態により乳頭状癌と結節状癌の2種類に分けられ、比較的良好な経過を示す乳頭状癌に対して、結節状癌は浸潤・転移をおこし予後が悪い事が知られている。結節状癌には高頻度に上皮内癌（以下CIS）が合併すること、CISには結節状癌が続発することなどの臨床病理学的観察から、CISが結節状癌の前駆病変と考えられている。CISではその成立機転の一つとして癌細胞の上皮内進展（以下IES）が関わっていると考えられるが、そのメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、その分子機構を解明する事を目的とし、ヒト膀胱癌細胞株の*in vivo*のIES能を調べ、IESを起こす細胞の生物学的特性を検討した。

II. 材料と方法

- 1) 細胞株：ヒト移行上皮癌細胞6株 (EJ, UMUC-2, UMUC-6-dox, DAB-1, KU-1, KU-7)、ヒト不死化移行上皮細胞2株 (SV-HUC-1, alpha E-7)を用いた。
- 2) 癌細胞移植：SCIDマウスの露出した腎実質内に 2×10^6 個の細胞を注入、または経尿道に留置した24Gカテーテルを通して膀胱内に 2×10^6 個の細胞を注入することにより移植し、7週、2週後にマウスを屠殺しパラフィン包埋標本を作製し腫瘍を組織学的に観察した。
- 3) 接着、遊走、運動能試験：ラミニン(LN)、フィブロネクチン(FN)をコートしたマイクロプレートに 1×10^5 個の細胞を撒き37℃、30分間で接着した細胞をメタノール固定染色し吸光度を測定し接着能を評価した。下面にLN、FNを塗布した8 μ m孔径フィルター上に細胞浮遊液を加え、37℃、8時間で下面に移動した細胞数を算定し遊走能を評価した。LN、FNをコートした35mm培養皿に細胞を撒き、位相差顕微鏡に接続した低速度撮影ビデオ装置で細胞を18時間連続記録撮影し運動能を評価した。
- 4) ウェスタンブロット法、免疫沈降法、細胞表面ラベル法：総蛋白あるいは抗インテグリン $\alpha 6$ 抗体による免疫沈降物をSDS-PAGEで展開し、抗インテグリン $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 4$ 抗体を用いたウェスタンブロット法で検出した。細胞表面ラベル法では、細胞をビオチン加炭酸ナトリウム緩衝液中で30分間反応させたのち蛋白を抽出し、抗インテグリン $\alpha 6$ 抗体を用いた免疫沈降法の後、SDS-PAGEで展開して検出した。
- 5) 遺伝子導入：ヒト正常角化細胞の全RNAからRT-PCR法によって得たインテグリン $\beta 4$ cDNAをpCR3-CMV発現ベクターに組み込み、lipofection法により細胞へ導入し、neomycinにより選択し、安定発現株をウェスタンブロット法で選別した。pCR3-CMV発現ベクターのみを導入した細胞をコントロールとして用意した。
- 6) 免疫組織化学法：膀胱癌症例の膀胱全摘出術時に得られた組織を冷メタノールで固定、パラフィン包埋し5 μ mの切片を作成、ABC法にてインテグリン $\beta 4$ の発現を検討した。

III. 結果

1) 腎盂・膀胱におけるIES: EJ、UMUC-2、KU-7の3株は腎でIESを伴う平坦な腫瘍を形成するのにに対し、UMUC-6-dox、DAB-1、KU-1の3株では腎盂での腫瘍形成は低頻度で、形成した腫瘍は境界明瞭であった。膀胱においても前3株はIESを示したのに対し、UMUC-6-dox腫瘍を形成するもIESを伴わず、DAB-1とKU-1は腫瘍の形成を認めなかった。これらの結果より、前者3株をIES細胞、後者3株を非IES細胞と分類し、以下の検討を行った。

2) 細胞外基質に対する反応: 非IES細胞および不死化移行上皮細胞に対して、IES細胞はLN上での培養でコロニーを作らず著明に分散する培養形態を示した。IES細胞はLNに対する高い接着能、遊走能、運動能を示すのに対して、非IES細胞ではいずれも低く、不死化移行上皮細胞では、接着能、遊走能は高いが、低い運動能を示した。

3) インテグリンの発現、遺伝子導入: インテグリン $\beta 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ の発現レベルはIES細胞、非IES細胞、不死化移行上皮細胞間で一定の傾向を認めなかったが、IES細胞ではインテグリン $\beta 4$ の発現レベルが著しく低く、抗インテグリン $\alpha 6$ 抗体を用いた免疫沈降法でインテグリン $\alpha 6\beta 4$ に対して $\alpha 6\beta 1$ が優位であった。非IES細胞であるもののインテグリン $\beta 4$ の発現が低いKU-1においては、 $\beta 1$ を全く発現していなかった。インテグリン $\beta 4$ の遺伝子導入により、EJ、UMUC-2から各2株の発現クローンを選択単離した。これらは、コントロールに比して、LN上での培養で緩いコロニーを形成し、運動能の低下を示した。マウス腎でのIESは、UMUC-2のコントロールクローンで100%(11/11)に認められたのに対して、発現クローンでは62%(8/13)、55%(6/11)と有意に低下していた。

4) 臨床材料におけるインテグリン $\beta 4$ の発現: 正常膀胱上皮では、基底層の細胞の基底面と側面に濃縮しているのに対し、CISでは、2例中全例で発現が著明に低下していた。乳頭状癌では2例全例とも発現は非癌部と同様に保持されていたが、浸潤癌では6例中2例で発現が低下していた。

IV. 考察

膀胱癌に見られるIESについては、膀胱由来の癌細胞株のIESがLNにより増強すること、カドヘリンの欠如した細胞ではpagetoid型の広がりを出すことが報告されているが、いずれも培養皿の平面上での現象である。本研究では、3次元空間であるマウス生体内で膀胱癌細胞株のIESを評価し、特定の癌細胞に起こる現象であることが観察された。生体内では多くの因子により細胞の増殖・運動形態が規定されているが、細胞外基質上での培養形態と生体内での腫瘍形態の類似性から、癌細胞表面のインテグリンと細胞外基質との関係が示唆された。すなわち、正常上皮細胞に豊富であるインテグリン $\beta 4$ の発現低下とその結果生ずる相対的インテグリン $\alpha 6\beta 1$ の優位性、および基底膜に豊富に存在する基質であるLNにより誘導される運動能の亢進がIESに関わっている可能性が考えられた。この反応を抑制すべくインテグリン $\beta 4$ の導入実験を行ったところ、*in vitro*ではLN上での運動能の低下、*in vivo*ではマウス腎におけるIESの抑制が認められた。これらの結果はLNとインテグリン $\alpha 6\beta 1$ との動的な接着と $\alpha 6\beta 4$ との静的な接着とのバランスの破綻がIESという現象の機序の一部であることを示している。また、実際の臨床材料においてもCISと一部の結節状癌でインテグリン $\beta 4$ の発現低下が認められた。

V. 結語

ヒト膀胱癌におけるIESとCISの成立過程にはインテグリン $\beta 4$ の発現低下とラミニンによる運動の亢進が関わっている可能性が示された。これらの現象の検出と抑制によりヒト膀胱癌の進展を予防することができると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 細 川 真澄男

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 小 柳 知 彦

学 位 論 文 題 名

膀胱癌の上皮内進展におけるインテグリン $\beta 4$ の発現低下と ラミニンによる細胞運動亢進の関与

膀胱癌は発育形態により乳頭状癌と結節状癌の2種類に分けられ、比較的良好な経過を示す乳頭状癌に対して、結節状癌は浸潤・転移をおこし予後が悪い事が知られている。結節状癌には高頻度に上皮内癌（以下CIS）が合併すること、およびCISには結節状癌が続発することなどの臨床病理学的観察から、CISが結節状癌の前駆病変と考えられている。CISではその成立機転の一つとして癌細胞の上皮内進展（以下IES）が関わっていると考えられるが、そのメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、その分子機構を解明する事を目的とし、ヒト膀胱癌細胞株の*in vivo*のIES能を調べ、IESを起こす細胞の生物学的特性を検討した。

ヒト移行上皮癌細胞6株（EJ, UMUC-2, UMUC-6-dox, DAB-1, KU-1, KU-7）、ヒト不死化移行上皮細胞2株（SV-HUC-1, alpha E-7）を用い、SCIDマウスの露出した腎実質内に 2×10^6 個の細胞を注入、または経尿道に留置した24Gカテーテルを通して膀胱内に 2×10^6 個の細胞を注入することにより移植し、7週、2週後にマウスを屠殺しパラフィン包埋標本作製し腫瘍を組織学的に観察した。その結果、EJ、UMUC-2、KU-7の3株は腎でIESを伴う平坦な腫瘍を形成するのに対し、UMUC-6-dox、DAB-1、KU-1の3株では腎盂での腫瘍形成は低頻度で、形成した腫瘍は境界明瞭であった。膀胱においても前3株はIESを示したのに対し、UMUC-6-dox腫瘍を形成するものもIESを伴わず、DAB-1とKU-1は腫瘍の形成を認めず、前者3株がIES細胞、後者3株が非IES細胞と分類された。次に、ラミニン（LN）、フィブロネクチン（FN）をコートしたマイクロプレートに 1×10^5 個の細胞を撒き37℃、30分間で接着した細胞をメタノール固定染色し吸光度を測定し接着能を、また、下面にLN、FNを塗布した8 μ m孔径フィルター上に細胞浮遊液を加え、37℃、8時間で下面に移動した細胞数を算定し遊走能を、LN、FNをコートした35mm培養皿に細胞を撒き、位相差顕微鏡に接続した低速度撮影ビデオ装置で細胞を18時間連続記録撮影し運動能を評価した。非IES細胞および不死化移行上皮細胞に対して、IES細胞はLN上での培養でコロニーを作らず著明に分散する培養形態を示した。IES細胞はLNに対する高い接着能、遊走能、運動能を示すのに対して、非IES細胞ではいずれも低く、不死化移行上皮細胞では接着能、遊走能

は高いが、低い運動能を示した。細胞抽出総蛋白あるいは抗インテグリン $\alpha 6$ 抗体による免疫沈降物をSDS-PAGEで展開し、抗インテグリン $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 4$ 抗体を用いたウェスタンブロット法で検出した。細胞表面ラベル法では、細胞をビオチン加炭酸ナトリウム緩衝液中で30分間反応させたのち蛋白を抽出し、抗インテグリン $\alpha 6$ 抗体を用いた免疫沈降法の後、SDS-PAGEで展開して検出した。その結果、インテグリン $\beta 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ の発現レベルはIES細胞、非IES細胞、不死化移行上皮細胞間で一定の傾向を認めなかったが、IES細胞ではインテグリン $\beta 4$ の発現レベルが著しく低く、抗インテグリン $\alpha 6$ 抗体を用いた免疫沈降法でインテグリン $\alpha 6 \beta 4$ に対して $\alpha 6 \beta 1$ が優位であった。非IES細胞であるもののインテグリン $\beta 4$ の発現が低いKU-1においては、 $\beta 1$ を全く発現していなかった。そこで、EJ、UMUC-2にインテグリン $\beta 4$ 遺伝子を導入し、各2株の発現クローンを選択単離し生物学的性状を検索した。これら遺伝子導入細胞は、コントロールに比して、LN上での培養で緩いコロニーを形成し、運動能の低下を示し、マウス腎でのIESは、UMUC-2のコントロールクローンで100%(11/11)に認められたのに対して、発現クローンは62%(8/13)、55%(6/11)と有意に低下していた。臨床材料におけるインテグリン $\beta 4$ の発現を観ると、正常膀胱上皮では、基底層の細胞の基底面と側面に濃縮しているのに対し、CIS全2例で発現が著明に低下し、乳頭状癌全2例でその発現は非癌部と同様に保持されていたが、浸潤癌では6例中2例で発現が低下していた。

公開発表にあたって、副査小柳知彦教授より、1) 用いた培養細胞の元の癌の病理組織学的性状、2) 長期観察した場合のマウスにおける腫瘍の病理組織学的性状と浸潤先端部におけるインテグリンの発現、3) 臨床応用などについて、副査長嶋和郎教授より、1) 多くの遺伝子が関係する癌の研究での遺伝子発現の検索へのDNAチップの応用の有用性、2) インテグリン $\beta 4$ の発現の制御機構、3) 他のインテグリンの関与、4) 細胞増殖能との関係などについて、フロアの癌研細胞制御浜田淳一助教授から、1) ラミニンのマウス膀胱における発現、2) インテグリン $\beta 4$ 遺伝子の発現調節機構について、主査細川真澄男教授より、1) インテグリンを介した接着の動物種特異性、2) 動的接着と静的接着の違い、3) 浸潤性の弱い細胞のインテグリン $\beta 4$ 発現を抑制する実験についてなど多数の質問があったが、いずれの質問に対しても、申請者は自らの実験成績や文献的知識を引用して妥当に回答し得た。

本研究は、ヒト膀胱癌における上皮内進展(IES)と上皮内癌(CIS)の成立過程にはインテグリン $\beta 4$ の発現低下とラミニンによる運動の亢進が関わっている可能性を示したものである。今後、これらの成果はヒト膀胱癌の進展の予測と予防に応用できることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、研究期間中の研鑽なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。