

論文の内容の要旨

論文題目 尿路生殖器がんにおける細胞膜裏打ちタンパク質 4.1B の異常とその意義に関する研究

氏名 金谷 淳志

4.1B は細胞膜直下に存在するアクチン結合タンパク質であり、膜タンパク質 - 4.1B - アクチン経路は細胞骨格、細胞接着およびシグナル伝達に参与している。4.1B をヒトがん細胞に強制発現させると腫瘍増殖が抑制させることから、4.1B の発現欠如はがんの無秩序な増殖や浸潤、転移に重要な役割を果たしていると考えられる。尿路生殖器腫瘍における 4.1B の分子生物学的機構を解明するために、これまで明らかでなかった膀胱がんにおける 4.1B の発現と機能解析を行った (1.膀胱がんにおける細胞膜裏打ちタンパク質 4.1B の検討)。次に精巣胚細胞腫瘍における 4.1B の発現を解析した (2.精巣胚細胞腫瘍における 4.1B の検討)。

1.膀胱がんにおける細胞膜裏打ちタンパク質 4.1B の検討

4.1B が正常膀胱で発現しているか、及び発現欠如が膀胱がん細胞株において認められるかどうか検証するため、手術で採取されたヒト膀胱検体及び 15 種のヒト膀胱がん細胞株におけるこれらの mRNA、タンパク質の発現を検討した。RT-PCR 法による解析の結果、15 種の細胞株のうち、11 種 (73%) の細胞株で発現の欠如が認められた。次にウェスタン・ブロット解析を行った結果、15 種の細胞株のうち、12 種 (80%) の細胞株で発現の欠如が認められた。正常非がん部膀胱では mRNA、タンパク質ともに発現を認めた。4.1B の mRNA の発現とタンパク質の発現の間には相関が認められ、4.1B の発現は主に転写段階で制御されていることが示唆された。DNA プロモーター領域のメチル化が 4.1B の発現欠如の主たる原因となっている可能性が考えられ、5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC)を用いた脱メチル化処理により 4.1B mRNA の発現が回復するか検討した。RT-PCR 法で mRNA の発現を認めなかった細胞株を 5-aza-dC 処理後に RT-PCR 法で解析した。11 種中 2 種で mRNA の発現回復を認めた。脱メチル化処理によって mRNA の発現が回復しなかった 9 種の細胞株に 5-aza-dC 処理に加えて Trichostatin A による処理を追加し、ヒストン脱アセチル化の 4.1B 不活化への影響を検討した。その結果、9 株中 5 株で mRNA の発現回復を認めた。これらの結果から、膀胱がん細胞株における 4.1B の不活化の原因として、メチル化、およびヒストン脱アセチル化が主な原因のひとつであることが示唆された。次に胃がん、非小細胞肺癌で 4.1B の発現を抑制することが報告されている miR-223 に関して検討した。内因性に 4.1B を発現している膀胱がん細胞株 UMUC-3 に miR-223 をトランスフェクション

したところ、コントロールに比して有意に 4.1B の発現が抑制されることが明らかとなった。

4.1B 発現の異常がヒト原発性膀胱がんにおいて認められるかどうか検証するため、免疫組織化学にてヒト原発性膀胱がん組織標本におけるタンパク質の発現を解析した。正常のヒト尿管組織、非がん部膀胱組織で 4.1B の発現を解析したところ、尿路上皮の細胞膜に 4.1B の発現を認めた。115 例のヒト原発性膀胱がん組織において 4.1B の発現を解析したところ、21 例 (18%) では正常膀胱尿路上皮と同様に細胞膜での 4.1B の発現が認められたが、94 例 (82%) では細胞膜での発現が欠如していた。膀胱がんの深達度 (pT ステージ) との相関を解析した所、pT2-4 の筋層浸潤性膀胱がんの群では pTa,pT1 の筋層非浸潤膀胱がんの群に比し、4.1B 発現欠如が有意に高頻度であった。4.1B 発現の欠如は早期病変 (pTa,pT1) でも高率に認められるが、病期が進行するに従ってより高頻度となり、膀胱がんの進展に関与する可能性が示唆された。パイロシーケンス法による解析の結果、免疫組織化学的検討で 4.1B 陰性であった症例 5 例中、3 例で 4.1B のメチル化を認めた。一方 4.1B 陽性であった症例 5 例中、メチル化を認めたのは 1 例のみで残り 4 例ではメチル化が認められなかった。この結果から、4.1B のメチル化はヒト原発性膀胱がんにおける 4.1B の発現欠如の原因の 1 つである可能性が示唆された。miR-223 に関してもヒト膀胱がんにおける発現を検討した。有意差は認めなかったものの、4.1B 発現欠如群では miR-223 の高発現を認める症例を 10 例中 3 例認めた。4.1B 発現欠如の原因の 1 つとして miR-223 の上昇が関与している可能性が示唆された。

膀胱がんにおける 4.1B の機能的役割を明らかにするため、4.1B の発現が欠如している膀胱がん細胞株を用いて 4.1B 強制発現株を樹立した。4.1B 強制発現株とベクター単独導入株との間に細胞の *in vitro* の増殖速度に有意な差を認めなかったが、細胞遊走試験において、4.1B 強制発現細胞ではベクター単独導入細胞に比してトランスウェルを通過する細胞の数が有意に減少し、4.1B の発現は膀胱がん細胞の遊走能を抑制することが示された。Soft-agar colony formation assay の検討により、4.1B 強制発現細胞はベクター単独導入細胞に比し、有意にコロニー数の減少を認め、4.1B の発現は足場非依存的に増殖する、悪性形質転換を抑制することが示された。*In vivo* における細胞の増殖に対する抑制能を検討するため、ヌードマウスへ腫瘍皮下移植モデルで検討した。ベクター単独導入細胞群では、日数が経過するに従い皮下腫瘍は著明に増大したが、4.1B 強制発現細胞群では皮下腫瘍の増大は有意に抑制された。以上の結果より 4.1B は膀胱がん細胞において *in vitro* での細胞形態や増殖速度に著明な変化をもたらさないが、*in vitro* において遊走能を抑制し、また足場非依存的な細胞増殖を抑制することが示された。さらに *in vivo* においてヌードマウスの皮下移植腫瘍の増殖をも抑制することが示され、4.1B の分子機能の破綻は膀胱がんの進展に関与することが示唆された。

2. 精巣胚細胞腫瘍における 4.1B の検討

4.1B がヒト正常精巣で発現しているか解析した。免疫組織化学にてヒトでの発現を評価

した。精粗細胞、精母細胞、精子細胞いずれにおいても細胞膜に 4.1B の発現を認めた。4.1B 発現の異常がヒト原発性精巣胚細胞腫瘍において認められるかどうか、がん組織標本を評価した。セミノーマ 62 例、非セミノーマ 28 例の全例で 4.1B の発現を認めなかった。一方精母細胞性セミノーマは 2 例中 2 例とも発現を認めた。精巣胚細胞がんの上皮内がん病変である IGCNU は全例で発現が低下もしくは欠如していたが精細管内には 4.1B 陽性の精細胞が混在するため定量的な診断は困難であった。精母細胞性セミノーマのみで 4.1B 陽性であるという結果から、4.1B は精母細胞性セミノーマの鑑別に有用な特異度の高い陽性マーカーになりうることを示された。