

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 金谷 淳志

本研究は尿路生殖器がんにおける細胞膜裏打ちタンパク質 4.1B の異常とその意義を明らかにするため、ヒト原発性膀胱がんおよび膀胱がん細胞株を用いて 4.1B の発現の解析、機能の検討、ヒト精巢胚細胞腫瘍を用いて免疫組織学化学的に 4.1B の発現を解析し、以下の結果を得ている。

1. 膀胱がん細胞株における 4.1B mRNA 発現、タンパク質発現の解析の結果、15 種のヒト膀胱がん細胞株のうち、11 種(73%)の細胞株で mRNA の発現欠如が認められ、12 種(80%)の細胞株でタンパク質の発現欠如を認めた。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。
2. 5-aza-2'-deoxycytidine および Trichostatin A を用いた脱メチル化、ヒストン脱アセチル化阻害により、内因性に 4.1B を発現していない 11 種の膀胱がん細胞株のうち、7 種(64%)で mRNA の発現回復を認めた (RT-PCR 法)。miR-223 は他のがん腫において 4.1B 発現を抑制することが報告されている。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することで、4.1B の発現が抑制されることが示された (ウェスタンブロット法)。
3. 免疫組織化学的検討によりヒト原発性膀胱がん組織標本における 4.1B タンパク質の発現を解析した。正常の尿管尿路上皮、非がん部膀胱尿路上皮に 4.1B の発現を認めた一方、115 例中 94 例 (82%) で細胞膜への発現の欠如を認めた。膀胱がんの深達度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 欠如症例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。
4. 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 4.1BDNA 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 例のみであった。miR-223 に関してもヒト膀胱がんにおける発現を検討した。4.1B 陽性 10 例と陰性 10 例の間に有意差は認めなかったものの (P=0.082)、4.1B 陰性例のうち 3 例で miR-223 の高発現を認めた。ヒト膀胱がんにおいても、膀胱がん細胞株同様、メチル化、miR-223 の上昇により 4.1B の発現が欠如している可能性が示唆された。
5. 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 強制発現細胞を樹立した。4.1B 強制発現細胞とベクター単独導入細胞との間に細胞の *in vitro* の増殖速度に有意な差を認めなかった。細胞遊走試験にお

いて、4.1B 強制発現細胞は、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た。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 において、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た。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。

6. *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、ヌードマウスへの腫瘍皮下移植モデルを用いた。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。これに比し、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。

7. ヒト原発性精巣胚細胞腫瘍における 4.1B の発現を免疫組織学的解析により検討した。非がん部精細管では、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。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。精母細胞性セミノーマ以外の精巣胚細胞腫瘍では発現が欠如していたことから、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。

以上、本論文はヒト膀胱がんの 80%において 4.1B の発現が欠如していること、*in vitro* において 4.1B は膀胱がん細胞の遊走能を抑制し、また足場非依存的な細胞増殖を抑制すること、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抑制することを明らかにした。ヒト精巣胚細胞腫瘍においては精母細胞性セミノーマのみが 4.1B を発現していることを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、細胞膜裏打ちタンパク質 4.1B の尿路生殖器腫瘍への関与の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。