

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名 氏名 得居範子	腫瘍制御科学領域泌尿器腫瘍学教育研究分野
(論文題目) Extravasation during bladder cancer metastasis requires cortactin-mediated invadopodia formation (膀胱癌の転移過程における血管外脱出にはコータクチンによる浸潤突起形成が必要である)	
(内容の要旨) 【背景】 癌細胞が原発巣で増殖して血管内に侵入し、標的臓器に到達して転移巣を形成する過程には多段階の複雑な分子メカニズムが存在する。循環血液中に存在する癌細胞が標的臓器において転移巣を形成するための最初の重要なステップが血管内から血管外へ脱出する過程である。浸潤性の癌細胞が原発巣において周囲組織へ浸潤するには、浸潤突起の形成が必要である。浸潤突起には F-actin とコータクチンが共存しているが、浸潤突起は癌細胞が血管内へ浸潤する過程においても重要な役割を果たしていることが明らかになっている。しかし、転移標的臓器での血管内から血管外への脱出過程における浸潤突起の重要性は明らかになっていない。肺は血行性転移におけるもっとも一般的な標的臓器であり、膀胱癌の遠隔転移部位としても最も頻度が高い。今回、我々は膀胱癌の肺転移巣における血管外脱出と浸潤突起の関連について検討した。 【対象と方法】 浸潤性膀胱癌細胞株 YTS-1 を親株とし、コータクチンの発現を shRNA で抑制した細胞株 CrtKD を作成して以下の実験を施行した。 ① CrtKD およびコントロールの total cell lysate に対して抗コータクチン抗体および抗アクチン抗体を用いた Western blot を行った。 ② CrtKD およびコントロールの <i>in vitro</i> の増殖能を比較検討した。 ③ CrtKD とコントロールの浸潤突起形成及びコータクチンの発現と局在に関する検討を共焦点レーザー蛍光顕微鏡を使用して行った。 ④ CrtKD とコントロールの MMP2 活性を gelatin zymography 法で検討した。 ⑤ CrtKD とコントロールの浸潤能を matrigel invasion assay で検討した。 ⑥ 血管外への脱出能は HMVEC(human microvascular endothelial cell)を用いた invasion assay で検討した。 ⑦ <i>in vivo</i> の肺転移形成能については CrtKD とコントロールをヌードマウスに尾静注して検討した。ヌードマウスの左肺を摘出後 4μm にスライスして HE 染色し、転移巣の形成を定量的に検討した。 【結果】 ① Western blot によって CrtKD ではコータクチンの発現が抑制されていることを確認した。 ② CrtKD およびコントロールの <i>in vitro</i> の増殖能に有意差を認めなかった。 ③ 共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、コントロールにおいて F-actin とコータクチンが共存する構造が認められ、浸潤突起の存在を確認した。 一方、CrtKD ではこの構造を認めなかつた。 ④ CrtKD では MMP-2 の活性が著明に低下していた。	

- ⑤ matrigel invasion assay では CrtKD はコントロールに比べて浸潤能が有意に低下していた。
- ⑥ HMVEC を用いた invasion assay において、CrtKD はコントロールに比べて血管内皮細胞間隙への浸潤能(血管外への脱出能)が有意に低下していた。
- ⑧ コントロールの YTS-1 細胞はヌードマウスの尾静注の系において多数の肺転移巣を形成するが、CrtKD は肺転移巣を形成できなかった。

【考察】

これまで様々な癌細胞において、原発巣の浸潤における浸潤突起の役割および F-actin とコータクチンの共発現の重要性が確認されてきた。しかし、血行性転移における標的臓器の血管内から血管外への癌細胞の浸潤に関する検討はほとんどなされていなかった。そこで、本研究では膀胱癌細胞が肺の血管内皮の間隙から血管外へ脱出する際の分子機構に関して検討を行った。コータクチンをノックダウンすると浸潤突起形成が阻害され、膀胱癌細胞の浸潤能が著明に低下することを確認した。さらに、*in vivo* の系を使用して転移形成能を評価したところ、コータクチンをノックダウンすると転移巣がほとんど形成されないことを明らかにした。以上の知見は本研究によって初めて明らかにされたことである。

癌転移の分子機構は非常に複雑であるが、本研究によってコータクチンの発現は原発巣における浸潤のみならず、血行性転移の標的臓器における転移巣形成においても非常に重要な意義を有していることが明らかになった。このことは、血行性転移の分子機構に関する重要な新知見であるが、コータクチンの発現をコントロールすることで新規治療法開発の可能性をも示唆するものである。さらに検討を進めていきたいと考えている。