

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御科学領域泌尿器腫瘍学教育研究分野 今西 賢悟
<p>(論文題目)</p> <p><b>Invadopodia formation is essential for transurothelial invasion bladder cancer cells</b></p> <p>(浸潤突起形成は膀胱癌細胞の尿路上皮浸潤に必須である)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p><b>【背景】</b></p> <p>筋層浸潤膀胱癌は膀胱壁筋層への浸潤能が高く、脈管内への浸潤を経て全身転移をきたしやすい予後不良な上皮性腫瘍である。癌細胞が膀胱上皮から筋層へ浸潤するためには、尿路上皮並びに基底膜へ浸潤しなければならない。癌細胞が原発巣で増殖して原発巣外に浸潤する過程には多段階の複雑な分子機構が存在する。癌細胞の浸潤と転移の分子機構を解明し、それを制御する方策を講じるには、個々のステップに関して詳細に検討する必要がある。一般的に、筋層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り、浸潤突起における F-actin とコータクチンの共発現が重要な意義を持つことは様々な癌において確認されている。しかし、浸潤過程のごく初期段階において、膀胱癌細胞は尿路上皮の間隙から浸潤する必要があるが、この段階における浸潤突起の重要性や詳細な分子機構については明らかになっていない。</p> <p>今回、我々は、膀胱癌の浸潤過程の中でも特に尿路上皮内における浸潤突起の意義と分子機構について検討した。</p> <p><b>【対象と方法】</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>① 根治的膀胱全摘除術を施行した膀胱癌症例 (324 例) の再発率と生存率を筋層浸潤の有無によって比較した。全生存率曲線は Kaplan-Meier 法でプロットし、ロジスチックテストで検討した。</li> <li>② 膀胱癌患者 4 例の手術標本より初代培養細胞株を樹立した (筋層浸潤膀胱癌初代培養株 : P1、P3、非筋層浸潤膀胱癌初代培養株 : P2、P4)。この 4 株と筋層浸潤膀胱癌由来株 YTS-1 および非筋層浸潤膀胱癌由来株 RT-4 を用いて、Matrigel invasion assay にて浸潤能を検討した。</li> <li>③ 正常尿路上皮細胞の培養株 : HUC (Human urothelial epithelial cell) を用いて尿路上皮細胞層への浸潤能を invasion assay にて検討した。</li> <li>④ 共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて、浸潤突起形成及び F-actin とコータクチンの発現と局在に関する検討を行った。</li> <li>⑤ 膀胱癌細胞が浸潤するには、浸潤突起からマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を分泌し、周囲の組織や細胞外マトリックスを破壊する必要がある。そこで、培養上清中の MMP2 活性を gelatin zymography 法で検討した。</li> <li>⑥ 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 cortKD を作成し、cortKD 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を用いた Western blot を行った。</li> <li>⑦ cortKD とコントロールの浸潤突起形成及び F-actin と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。</li> <li>⑧ cortKD とコントロールの MMP2 活性を gelatin zymography 法で検討した。</li> </ol>	

⑨ cortKD とコントロールの尿路上皮細胞層への浸潤能を、HUC を用いた invasion assay にて検討した。

#### 【結果】

- ① 非筋層浸潤膀胱癌に比べ筋層浸潤膀胱癌は再発率が高く、全生存率は有意に低かった。(P<0.0001)
- ② Matrigel invasion assay では筋層浸潤膀胱癌由来株 (YTS-1、P1、P3) で浸潤能が有意に高かった。
- ③ HUC を用いた invasion assay では筋層浸潤膀胱癌由来株 (YTS-1、P1、P3) の尿路上皮細胞への浸潤能が有意に高かった。(P<0.05)
- ④ 共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した結果、筋層浸潤膀胱癌由来株には F-actin とコータクチンの共発現が認められ、明瞭な浸潤突起の存在を確認した。
- ⑤ 筋層浸潤膀胱癌由来株 (YTS-1、P1、P3) では MMP2 活性が高かった。
- ⑥ cortKD ではコータクチンの発現が抑制されていることを Western blot で確認した。
- ⑦ 共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した結果、コントロールにおいて F-actin とコータクチンの共発現が認められ、浸潤突起の存在を確認した。一方、cortKD ではこの共発現を認めなかった。
- ⑧ cortKD では MMP2 の活性が著明に低下していた。
- ⑨ HUC を用いた invasion assay において cortKD はコントロールに比べて尿路上皮細胞層への浸潤能が有意に低下していた。

#### 【考察】

癌細胞が原発巣で浸潤する際に、浸潤突起の出現および浸潤突起における F-actin とコータクチンの共発現が非常に重要なイベントであることは、種々の癌において報告がなされている。しかし、浸潤の極めて早期段階での尿路上皮層の細胞間隙を通過する浸潤能の検討はほとんど行われていなかった。そこで、本研究では膀胱癌細胞が尿路上皮層へ浸潤する際の分子機構に関して検討を行った。

筋層浸潤膀胱癌由来株は高い浸潤能と浸潤突起の形成、そして F-actin とコータクチンの共発現と高い MMP2 分泌能という特徴を有していた。そこで、浸潤突起を形成する重要な要素であるコータクチンをノックダウンしたところ、浸潤突起形成が阻害され、MMP2 分泌能が抑制され、結果として尿路上皮層浸潤能が著明に低下することを確認した。

癌細胞の浸潤過程は非常に複雑であるが、本研究によって癌細胞の浸潤という現象の極めて早期のステップにおける分子機構の一端が明らかになった。このことは、複雑な浸潤過程のわずかひとつの段階に関する知見に過ぎないかもしれないが、コータクチンの発現をコントロールすることで、筋層浸潤膀胱癌の浸潤制御の可能性を示唆するものである。本研究を糸口にさらに検討を進めていきたい。