

論文要旨

Identification of differentially expressed genes in human bladder cancer through genome-wide gene expression profiling

〔 網羅的遺伝子発現解析を用いた
膀胱癌浸潤関連遺伝子の探索 〕

川上 一 盛

【序論および目的】

膀胱移行上皮癌はその腫瘍深達度から表在癌と浸潤癌に大別される。膀胱癌の予後は腫瘍の筋層への浸潤に相関し、このことが予後を予想する上で、また治療方法の選択の上で極めて重要な要点となる。さらに表在癌の中には浸潤癌に移行するタイプがあり診断上重要である。しかしながら、表在癌、浸潤癌を区別する分子マーカーは現在実用化されていない。今回我々は、膀胱移行上皮癌臨床検体を用いた遺伝子発現解析から膀胱癌新規分子標的の探索を行い膀胱癌の新たな診断法の確立を目的とした。

【材料および方法】

2001年10月から2004年3月までに鹿児島大学部附属病院泌尿器科で手術を受けた21症例を対象とした。術式はTUR-BTが12例、膀胱全摘術が9例であった。組織型はすべて移行上皮癌であり、T1が10例、T2が6例、T3が5例であった。14検体(T1:9例、T2:3例、T3:2例)よりtotal RNAを抽出し、正常膀胱組織をコントロールとして、約30,000個の遺伝子が搭載されたオリゴアレイ(日立ソフト; AceGene)を用いてマイクロアレイ解析を行った。正常膀胱組織に対して発現変動を認めた遺伝子群についてはGENEONTOLOGY (<http://www.geneontology.org/>) および GeneCards (<http://www.genecards.org/index.html>) を参照して機能分類をおこない、さらに定量PCRを用いた解析をおこない、マイクロアレイ結果の再現性を確認した。選ばれた1つの遺伝子については症例を追加して、発現比と深達度との相関について検討した。

【結 果】

マイクロアレイ解析の結果、14 例中 12 例 (85.7%) で 1.5 倍以上発現が亢進していた遺伝子が 136 個検出された。このうち 21 個は 14 例すべてにおいて発現が亢進していた。一方、69 個の遺伝子は 14 例中 12 例 (85.7%) で正常膀胱組織と比べて発現比が 2/3 以下と低下しており、このうち 25 個は 14 例すべてにおいて発現が低下していた。

機能分類では、発現が上昇していた遺伝子群では代謝・転写に関連するものが多く含まれ、発現が低下していた遺伝子群では細胞接着・細胞骨格に関連するものが多く含まれていた。マイクロアレイ解析の結果、膀胱癌で発現比の高かった上位 6 つの遺伝子 (*FABP5*, *PABPC1*, *CKS2*, *SF3B1*, *DDX5*, *EIF3S6*)、また発現比の低かった下位 2 つの遺伝子 (*TAGLN*, *TPM2*) についての real time RT-PCR 結果はすべてマイクロアレイの結果と有意に相関していた ($p < 0.01$)。発現が亢進していた上位 6 つの遺伝子のうち、表在癌 9 例・浸潤癌 5 例との相関を検討したところ *CKS2* ($p=0.04$) は浸潤癌で有意に発現が亢進していた。さらに正常膀胱組織 4 例・表在癌 10 例・浸潤癌 11 例で検討したところ、*CKS2* は正常膀胱と表在癌 ($p=0.005$)、表在癌と浸潤癌 ($p=0.001$)、正常膀胱と浸潤癌 ($p=0.001$) において発現比と進達度との間に有意な相関が認められた。

【結論及び考察】

膀胱癌の浸潤に関わる遺伝子の網羅的遺伝子発現解析としてマイクロアレイ解析は有用であることが示唆された。*CKS2* は細胞周期を促進すると報告されており、リンパ球性白血病の細胞増殖や、大腸癌の肝転移に関連があることが示されている。

今後の症例数の追加が望まれるが、今回の実験結果から *CKS2* は膀胱癌の浸潤に関連があることが示唆され、新規の腫瘍マーカーとなり得ると考えられた。

(Oncology Reports 2006 ; 16 (3) : 521-531 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	医研第 650 号	氏名	川上 一盛
審査委員	主査	秋山 伸一	
	副査	米澤 傑	山田 勝士

Identification of differentially expressed genes in human bladder cancer through genome-wide gene expression profiling

(網羅的遺伝子発現解析を用いた膀胱癌浸潤関連遺伝子の探索)

膀胱癌は組織型により表在性膀胱癌と浸潤性膀胱癌に分類され、約 3 割が浸潤性膀胱癌である。浸潤性膀胱癌は一般に予後不良であり、根治的膀胱全摘出術が標準的治療であるが、表在癌、浸潤癌を区別する分子マーカーは現在実用化されていない。本研究では、膀胱移行上皮癌臨床検体を用いた網羅的遺伝子発現解析から膀胱癌の浸潤に関与する遺伝子群の探索を行い膀胱癌の新たな診断法の確立を目的とした。

膀胱癌 21 症例（表在癌 10 例、浸潤癌 11 例）から total RNA を抽出し、そのうちの 14 例において正常膀胱組織の RNA をコントロールとして、約 30,000 個の遺伝子が搭載されたオリゴアレイを用いてマイクロアレイ解析を行った。正常膀胱組織に対して発現変動を認めた遺伝子群については定量 PCR を用いた解析をおこない、マイクロアレイ結果の再現性を確認した。選ばれた 1 つの遺伝子については発現比と深達度との相関について検討した。

マイクロアレイ解析の結果、膀胱癌で発現比の高かった上位 6 つの遺伝子 (*FABP5*, *PABPC1*, *CKS2*, *SF3B1*, *DDX5*, *EIF3S6*)、また発現比の低かった下位 2 つの遺伝子 (*TAGLN*, *TPM2*) についての real time RT-PCR 結果はすべてマイクロアレイの結果と有意に相関していた ($p < 0.01$)。発現が亢進していた上位 6 つの遺伝子のうち、表在癌 9 例・浸潤癌 5 例との相関を検討したところ *CKS2* ($p = 0.04$) は浸潤癌で有意に発現が亢進していた。さらに正常膀胱組織 4 例・表在癌 10 例・浸潤癌 11 例で検討したところ、*CKS2* は正常膀胱と表在癌 ($p = 0.005$)、表在癌と浸潤癌 ($p = 0.001$)、正常膀胱と浸潤癌 ($p = 0.001$) において発現比と進達度との間に有意な相関が認められた。*CKS2* の機能はこれまで明らかにされていないが、その 80% の相同性を有する *CKS1* は p27 のユビキチン化を介した分解機序において、トリガーとして働くことが報告されている。我々の実験では、*CKS2* も膀胱癌においては、いわゆる Oncogene として働くことや、新しい診断的、かつステージ予測マーカーとしての可能性が示唆された。

本研究は、マイクロアレイ解析が膀胱癌の浸潤に関与する遺伝子群の探索に有用であることを示し、さらに *CKS2* が膀胱癌の浸潤に関連がある新規の腫瘍マーカーとなり得ることを明らかにしたもので、膀胱癌の新たな診断法の開発に極めて有用で意義深いものと考えられる。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 650 号	氏名	川上 一盛
審査委員	主査	秋山 伸一	
	副査	米澤 傑	山田 勝士
<p>主査および副査の3名は、平成19年2月20日、学位請求者 川上一盛 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 浸潤癌において採取された組織の中に間質成分がどの程度含まれていたか？ (回答) レーザーマイクロキャプチャーを用いて癌組織のみを採取しての実験が理想的であったが、今回は設備上の問題で癌組織と間質成分が混在した検体から RNA を抽出した。</p> <p>質問2) 今回の症例において上皮内癌と乳頭状癌との割合はどれくらいか？ (回答) 今回の症例は上皮内癌を含んでおらず、乳頭状癌と広基性癌とで構成されていた。</p> <p>質問3) 上皮内癌は急速に進行するものがあるがどう考えるか？ (回答) 現在のところそのメカニズムは解明されていないため、上皮内癌と他の膀胱癌とのマイクロアレイ実験をおこない、その遺伝子発現プロファイルと比較・検討し、進行性に関連する遺伝子を探索することを考えている。</p> <p>質問4) 今回の症例に転移を有する症例は含まれていないのか？ (回答) T3の症例に2例含まれていたが、今回は転移に関する検討はおこなっていない。</p> <p>質問5) CKS2の機能は何か？また p27などとの関連はあるか？ (回答) CKS2はCDK1と結合することは分かっているが、詳細な機能については不明である。CKS familyの1つであるCKS1も今回の実験において膀胱癌で発現が亢進していたが、CKS1はp27の分解に関与するSKP2のco-factorであることが分かっている。その後の実験でCKS1とSKP2は膀胱癌の深達度に相関して発現が亢進することが分かった。膀胱癌の深達度とp27蛋白の発現が負の相関を示すことが既に報告されている。</p> <p>質問6) CKS2の蛋白レベルでの発現はどうか？ (回答) 今回は検討していないが、子宮頸癌におけるリンパ節転移陽性の症例において、免疫染色で有意に発現亢進が認められたとの報告がある。</p> <p>質問7) 前立腺癌も最近頻度が高いが、なぜ膀胱癌を選んだか？ (回答) 膀胱癌は再発を繰り返すことが特徴であり、その過程で表在癌から浸潤癌へ変化することもある。最初の内視鏡手術の検体から、その癌が浸潤癌に移行しやすいか予測できれば治療において有利であると考えた。</p> <p>質問8) 浸潤癌は再発を繰り返すとのことだが、今回の症例にも再発例が含まれていたのか？ (回答) 初発例がほとんどであるが再発例も4例含まれていた。再発群と非再発群との遺伝子発現プロファイルの比較もおこなったが、症例数が少なく有意な所見は得られなかった。</p> <p>質問9) 悪性度(G1~G3)とCKS2の発現との関連はあるか？</p>			

(回答) CKS2 の発現と悪性度との関連は検討していないが、先に述べた SKP2 と CKS1 は悪性度と相関して発現が有意に亢進していた。G1 症例と G3 症例との間でマイクロアレイ実験をおこなってみたい。

質問 10) 浸潤癌になるとなぜ CKS2 の発現が亢進するのか？

(回答) CKS2 の機能はまだはっきり分かっていないが、浸潤癌になるから CKS2 の発現が亢進するのではなく、CKS2 の発現が亢進するため細胞周期が異常に促進され、浸潤癌に移行していくと考えている。

質問 11) CKS2 の発現が悪性度と負の相関を示す癌は報告されているか？

(回答) 検索した限りでは、CKS2 の発現は癌の悪性度と正の相関を示すようである。

質問 12) 表在癌と浸潤癌とで化学療法の内容に違いがあるか？

(回答) 表在癌においては BCG の膀胱内注入療法が有効である。浸潤癌には膀胱内注入療法は保険適応がなく、4 剤併用の MVAC 療法が有効な治療法である。

質問 13) CKS2 は膀胱癌で発現が亢進しているようだが、臨床的にはどのように応用できると考えるか？

(回答) 例えば、CKS2 蛋白の発現が尿中で測定可能であれば、低侵襲であり、膀胱癌のスクリーニングまたは腫瘍マーカーとして応用できると考えている。

質問 14) Affymetrix 社製のマイクロアレイに比べ今回使用した日立ソフト社製のマイクロアレイが優れている点は何か？

(回答) Affymetrix 社製のマイクロアレイが最もポピュラーであると考えているが、今回日立ソフト社製のマイクロアレイを使用して、14 例の膀胱癌において 14 例すべてで発現が亢進または低下している遺伝子が 2~30 個検出できたため、再現性という面では評価できると考えられた。一般的には cost の面で Affymetrix 社製のマイクロアレイより日立ソフト社の方が有利である。

質問 15) thymidine phosphorylase の発現は亢進していなかったか？

(回答) 今回は 14 例中 12 例以上で発現が亢進している遺伝子のリストアップをおこなったが、その中には thymidine phosphorylase は含まれていなかった。

質問 16) E-cadherin の発現はどうであったか？

(回答) E-cadherin もリストには入らなかったが、細胞接着に関与する遺伝子は今回の実験では膀胱癌では発現が低下しているものが多く、E-cadherin もおそらく発現が低下していると思われる。

質問 17) 表在癌と浸潤癌は別物ではなく表在癌から浸潤癌に移行するのか？

(回答) 表在癌から浸潤癌に移行するものが 15~20%ほどであるとされている。

質問 18) 今回の症例の中には化学療法を受けた症例も含まれているか？含まれていた場合は遺伝子発現のプロファイルが変わってくる可能性はないか？

(回答) 理想的には治療を受けていない症例のみで実験をおこないたかったが、膀胱内注入療法を受けた症例も含まれている。遺伝子発現プロファイルが変化している可能性は否定できない。

質問 19) 膀胱癌はどのようにして発見されるのか？

(回答) 症状としては無症候性肉眼的血尿が最も多く、膀胱鏡検査で診断される。前立腺癌は PSA という優れた腫瘍マーカーが存在するが、膀胱癌では BTA・尿細胞診など感度が低いものしかないのが現状である。

今回の実験から診断・治療に有効な腫瘍マーカーの開発につなげたいと考えている。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。