

氏 名 (本 籍) 影 山 進 (大阪府)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 第 4 6 8 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 6 年 3 月 2 5 日

学 位 論 文 題 目 High expression of human uroplakin Ia in urinary bladder transitional cell carcinoma
(膀胱移行上皮癌におけるウロプラキン Ia 発現に関する研究)

審 査 委 員 主 査 教 授 岡 部 英 俊
副 査 教 授 岡 村 富 夫
副 査 教 授 野 田 洋 一

論文内容要旨

*整理番号	470	氏 <small>(よりがな)</small> 名	かげやま すすむ 影山 進
学位論文題目	High expression of human uroplakin Ia in urinary bladder transitional cell carcinoma (膀胱移行上皮癌におけるウロプラキン Ia 発現に関する研究)		
<p>【目的】 尿路上皮表面には電子顕微鏡で特殊な構造 (asymmetric unit membrane) が見られ、組織特異的膜タンパク質の存在が 1960 年代より推測されていたが長らく同定不能であった。1990 年代に入り、ウシ膀胱から尿路上皮特異的膜タンパク質としてウロプラキン (UP) がようやく同定された。これには UP-Ia、Ib、II および III の 4 つの構成タンパク質がある。われわれは世界に先駆けてヒト UP-Ib および III の遺伝子同定に成功し (Jpn J Cancer Res, 1998; Int J Urol, 1999)、以後 UP に関する研究を進めてきた。当該研究ではヒト UP-Ia に対するポリクローナル抗体を作成し、膀胱癌における発現を免疫組織化学的に明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 試料 1979～95 年までに滋賀医科大学泌尿器科で膀胱全摘除術を施行した膀胱癌 63 検体と、進行性尿路上皮癌の剖検例から得た転移巣 18 検体のパラフィン包埋標本を試料とした。抗体反応の臓器特異性確認のために 27 検体の正常組織 (心、肺、胃、小腸、結腸、肝、膵、脾、腎、甲状腺、副腎、前立腺、など) のパラフィン包埋標本を用いた。 2. 抗 UP-Ia ポリクローナル抗体作成 ヒト UP-Ia の 141～152 番目のアミノ酸配列 (DQGQELTRLWDR) から合成ポリペプチドを作り KLH (keyhole limpet hemocyanin) と結合させてウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を作成した。抗体の検証を行う目的でチオレドキシン融合ヒト UP-Ia リコンビナントタンパク質を試料としたウエスタンブロットを行った。その際、免疫原の合成ペプチドを予め抗体と反応させる吸収試験も行った。 3. RT-PCR 法 UP-Ia mRNA 発現の臓器特異性を検証するために、脳、心、肺、肝、腎、虫垂、精巣、卵巣、末梢血リンパ球、正常膀胱上皮、膀胱癌の各組織から抽出した RNA を試料として RT-PCR を行った。 4. 免疫組織化学 免疫染色には SAB (streptavidin-biotin complex) 法を用いた。抗体反応に際してはトリプシン処理による抗原賦活を行った。癌組織の 10% を越える領域に染色性が認められた場合に陽性と判断した。 5. 臨床病理学的諸因子との検討 膀胱全摘症例では組織の UP-Ia 発現の程度と臨床病理学的諸因子の検討を行った。単変量解析は t 検定、Fisher 検定および log-rank 検定で、多変量解析は Cox 比例ハザードモデルで解析した。 			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、
2 千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】

1. 上記の合成ペプチドを免疫原として抗 UP-Ia ポリクローナル抗体を得た。チオレドキシソニ融合ヒト UP-Ia リコンビナントタンパク質を試料としたウエスタンブロットでは単一の強いバンドを認め、そのバンドは合成ペプチドによる吸収試験で著しく減弱した。以上よりこの抗体の認識する抗原決定基はヒト UP-Ia の 141～152 番目のアミノ酸配列内に存在することを検証できた。
2. RT-PCR 法では UP-Ia mRNA 発現は正常膀胱および膀胱癌組織のみに認められ、他の臓器には発現していないことが確かめられた。
3. この抗体を用いた膀胱を含む種々の臓器のパラフィン切片での免疫染色では尿路上皮のみに強い染色性を認め、臓器特異的反応性が確かめられた。
4. 膀胱全摘標本の免疫染色では 63 例中 61 例、96.8%と非常に高い陽性率を認めた。転移巣でも 18 検体中 13 検体、72.2%と比較的高率に陽性所見を認めた。
5. 膀胱全摘標本において発現の程度(癌組織内の UP-Ia 発現が 50%以上と 50%未満で分類)で高発現群(53 例)と低発現群(10 例)に分けて臨床病理学的諸因子と検討した。異型度、深達度、腫瘍径、腫瘍数、脈間浸潤の有無、などと UP-Ia 発現の程度との間に相関は見られなかった。また、有意な予後因子ともなり得なかった。

【考察】

構成タンパク質の一つである UP-III では他のグループより同様の検討がなされているが、UP-Ia に対する抗体を樹立し尿路上皮癌での UP-Ia 発現を検討した報告は当該研究が初めてである。UP-Ia は予後因子としては有用でなかったものの、高～中分化癌のみならず低分化癌においても発現が保たれ、組織特異タンパク質として病理学的診断等に応用可能であると考えられた。泌尿器科領域では前立腺特異抗原(PSA)が組織特異タンパク質として知られており、その臨床的有用性は周知のごとくである。われわれは既に膀胱癌患者血中の UP-II mRNA の検出により、微小転移を検出できることを報告してきたが(Clin Cancer Res, 2000)、UP タンパク質も血清中あるいは尿中から検出できるアッセイ法が開発されれば新規疾病マーカーとして高い有用性が期待され、当該研究の結果はその基礎を成すものと思われる。

【結論】

UP-Ia は正常尿路上皮のみならず、膀胱癌細胞でも発現が強く保存されていた。その発現は原発巣だけでなく遠隔転移巣においても見られ、原発不明癌の組織診断等に利用できる組織特異的マーカーになり得ると考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	470	氏名	影山 進
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>尿路上皮特異的膜タンパク質であるウロプラキン(UP)は現在までに Ia、Ib、II および III の 4 つの構成タンパク質が同定されている。申請者はヒト UP Ia の合成部分ペプチドを免疫原として家兔ポリクローナル抗体を作成し、免疫組織化学的手法で尿路上皮癌組織における UP Ia の発現を検討した。膀胱を含む多数の正常臓器パラフィン切片における免疫染色と、リコンビナント UP Ia タンパク質を試料としたウエスタンブロット吸収試験で抗体の特異性を検証し、その上で多数の尿路上皮癌標本に対し免疫染色を行った。その結果、原発巣・転移巣ともに高頻度で陽性所見を認め、癌組織でも UP Ia 発現が保たれていることを明らかにした。これまで尿路上皮癌においては組織特異的マーカーなるものが皆無であったが、本研究は、癌組織でも発現が強く保持されている UP_{Ia} を、原発不明腫瘍の病理診断等への臨床応用の可能性を示唆した点において意義深い。</p> <p>以上より本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。</p>			
(平成16年1月18日)			