

氏 名	伊 藤 将 彰
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3172 号
学位授与の日付	平 成 20 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	P-21 Activated Kinase 1: A New Molecular Marker for Intravesical Recurrence After Transurethral Resection of Bladder Cancer (P-21 Activated Kinase 1:表在性膀胱癌の経尿道的内視鏡下切除術後膀胱内再発の新規分子マーカー)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 田 亮 教 授 武 藤 誠 教 授 平 岡 眞 寛

論 文 内 容 の 要 旨

膀胱癌症例のうち70%以上は表在性膀胱癌であり、治療として経尿道的内視鏡下切除が施行される。しかし、内視鏡手術が施行されても50%以上の症例に2年以内の膀胱内再発を、5~25%の症例に浸潤性癌への進展を認める。このため、膀胱内再発を予測する分子マーカーの探索は臨床重要である。本研究では表在性膀胱癌の再発を予測する分子マーカーを同定することを目的とし、cDNA マイクロアレイ法を用いて表在性膀胱癌における網羅的遺伝子発現解析を行った。京都大学附属病院泌尿器科にて2000~2004年の間に経尿道的内視鏡下切除を受けた表在性膀胱癌患者のうち、術後1年以上の経過観察が行われた27症例に対してcDNA マイクロアレイ解析(Pacific Edge Biotechnology社製:3万遺伝子収載)を施行した。更にcDNA マイクロアレイ解析の対象症例とは異なる表在性膀胱癌検体を用い半定量的リアルタイムPCR(semi-qRT-PCR)法(86症例)および免疫染色法(103症例)にて評価を行った。膀胱内再発の有無については、術後3ヶ月毎に膀胱鏡と細胞診にて検査した。1年以内に膀胱内再発した症例を早期再発群と定義したところ、27症例中16例が早期再発群に群分けされた。cDNA マイクロアレイ解析の結果、早期再発群16例とそれ以外の11例との間で有意($p<0.001$)に発現量が異なる遺伝子25個が同定された。これらの遺伝子の中でPak1に着目しsemi-qRT-PCR法および免疫染色法での解析を行った。Pak1は細胞の運動性や付着、浸潤性などの機能が示唆されている遺伝子である。正常移行上皮7例におけるPak1-mRNAの発現量をsemi-qRT-PCRにて解析し、その最大発現量よりも高値を示す症例をPak1高発現症例と定義した。Pak1高発現は高異型度症例(Grade3)や膀胱内再発率と有意に相関していた($p=0.009$ 、 0.0001)。抗Pak1抗体による免疫染色法では、強染色域が腫瘍の20%以上である症例を抗Pak1強陽性群と定義したところ、強陽性群で膀胱内再発率は有意に高かった($p=0.0006$)。膀胱内再発に関する多変量解析では、Pak1免疫染色性と腫瘍多発性とは独立した予後因子であった。次に膀胱癌細胞におけるPak1の機能解析を行った。膀胱癌細胞株におけるPak1発現量をWestern-blot法にて検討したところ、253J株では低値を、EJ株では高値を示した。このため、253Jに対してはconstitutively active formであるT423E-Pak1を、EJに対してはdominant negative formであるK299R-Pak1をそれぞれ遺伝子導入し、コントロールとしてvectorのみの遺伝子導入を行った細胞を用いた。表現形の解析としては、ピペットの先で作成した傷の治癒の程度を評価するwound healing assayとMatrigelを用いたmigration assayを用いた。Wound healing assayでは253Jコントロール株に比較してT423E-Pak1導入株において傷の治癒が促進され、一方、EJコントロール株に比較してK299R-Pak1導入株で抑制された。Migration assayでも253Jコントロール株に比較しT423E-Pak1導入株で細胞の浸潤が促進された。以上の結果からPak1の発現は表在性膀胱癌の膀胱内再発の予測因子となりうる可能性が示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

表在性膀胱癌の治療上の問題点の一つに経尿道的内視鏡下切除術後の膀胱腔内再発があり、腔内再発を予測するマーカーの開発は重要である。

本研究では cDNA マイクロアレイ法にて表在性膀胱癌における発現遺伝子を解析し、術後腔内再発に関連する遺伝子を検討した。まず表在性膀胱癌 27 例を対象として 1 年以内の腔内再発の有無にて 2 群に分類し、統計学的に関連する 25 候補遺伝子を同定した。次に細胆接着・細胞運動・細胞周期などに関係する Pak1 に着目し腔内再発との関連性を検証した。検証方法は定量的 PT-PCR 法（症例数 86 例）および免疫組織染色法（症例数 103 例）を用いたが、何れの解析方法においても Pak1 の発現亢進が腔内再発と有意に相関していた。多変量解析にて Pak1 高発現（免疫組織染色法）は腔内再発に関する独立した予後因子であった。

次に膀胱癌細胞株 253J 株と EJ 株を用い、wound healing assay 法と migratlon assay 法にて Pak1 の機能を解析した。活性化型 Pak1 の導入は膀胱癌細胞の細胞運動能を亢進させるのに対し、キナーゼ不活型 Pak1 の導入は細胞運動能を抑制した。これらの結果から Pak1 は表在性膀胱癌の腔内再発に関係し腔内再発抑制の標的分子となると考えられた。以上の研究は表在性膀胱癌における腔内再発の機序解明に貢献し、表在性膀胱癌に対する個別化治療の確立に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 19 年 12 月 19 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。