学会抄録

第56回日本泌尿器科学会中部地方会・未来講演 1

（2006年10月25日（水）～27日（金），於　名古屋）

超音波キャビテーションを利用した前立腺および膀胱癌治療：野崎哲夫（富山大）　超音波は診断領域ではすでに広く利用されているが，その高い集束性と深達性を生かし，温熱療法，高温度凝固壊死療法など治療への臨床応用も進められている．これらは主に超音波による熱的作用を利用したものであるが，超音波による非熱的作用を利用した癌治療への基礎的研究も近年注目されつつある．超音波が生体に及ぼす作用としてキャビテーション現象があげられる．キャビテーション気泡圧壊時に発生する局所的な力学的作用は，細胞膜に微小孔を形成することが（Sonoporation 現象）知られている．細胞膜の損傷が修復可能な範囲であれば，細胞外に存在する plasmid DNA・抗癌剤などの高分子がその微小孔を通じ，結果的に遺伝子や抗癌剤が細胞内へ導入されることが知られている．また現在臨床応用されている超音波造影剤（マイクロバブル）を併用することでキャビテーション気泡圧壊が効率的に生じ Sonoporation 現象が増強される．この手法は簡易で，標的組織の組織障害が少なく，何度でも繰り返し施行できる安全な薬物・遺伝子導入法としてその臨床応用に期待が持たれている．われわれは前立腺および膀胱癌細胞株を対象に，(1) 超音波による遺伝子導入効率の増強への試み，(2) 抗癌剤併用下超音波照射による癌細胞増殖抑制効果，(3) 超音波照射による細胞膜損傷を介した細胞致死効果などにつき治療応用を目指した基礎的研究を進めてきた．前立腺および膀胱は経直腸的あるいは経尿道的超音波照射が可能であり，本法の標的臓器として様々な解剖学的利点を有している．超音波キャビテーションを利用した新しい癌治療の可能性につき紹介する．

前立腺癌における *Mycoplasma hyorhinis* 特異蛋白 p37 の検討：中村小源太（愛知医大）　特定の癌種と感染症には因果関係があり，前立腺癌と前立腺炎との関係は疫学的に Dennis らによって報告されている．Mycoplasma 感染症と白血病に関係があるのと同様に，前立腺癌患者血清から Mycoplasma hyorhinis が検出された．われわれは，前立腺癌組織・前立腺肥大症組織を用い nested PCR を施行した．Mycoplasma hyorhinis の検出率は，前立腺癌組織67％（16/24），前立腺肥大症組織 0 ％（0/9）であった．p37 は Mycoplasma hyorhinis より得られた特異蛋白であり，p37 が前立腺癌細胞株・組織にどのような影響があるのか検討した．前立腺癌細胞株（PC-3，DU145）を用い，p37 を使用し invasion assay を施行した．コントロール群に比し，p37 treat 群に有意に invasion の増加を認めた．さらに，前立腺癌組織・前立腺肥大症組織を用い，in situ hybridizationにて p37 の発現を調べた．前立腺癌組織に，p37 の発現を認めた．これらの結果は，前立腺癌細胞株に対して，p37 が腫瘍浸潤を誘導することが示唆された．Microarray data とともに発表する予定である．

高感度バイオチップの泌尿器癌診断への応用：高田昌幸（金沢大）　日本人の死亡原因の第一位は癌であり，現在も増加傾向である．前立腺癌，膀胱癌，腎癌などの泌尿器科領域の癌も増加傾向にある．これら癌疾患に対してはその治療法もさることながら，早期発見・早期治療が予後に大いに関与する．今後医療診断分野でのセミオートメーションによる情報の数値化，少数の専門家に荷重をかけ続ける診断体制の効率化はますます重要性が増すと考えられる．また，疾病特異性がなく，偽陽性・偽陰性ともに大きい一次検診システムを改良し，無駄な検査をはぶき，手技として患者の心身ともに負担をかけず，廃棄の際も環境安全性を保証する新たな医療診断文化が望まれている．そのような診断システムを整備していく上で重要なのは，より信頼できる腫瘍マーカーの開発（究極的には all or none で癌を診断できるもの）とそのマーカーの測定法の改良・開発であろう．今回，特に注目したいのは測定法の改良・開発である．現在，前立腺検診の受診率は20％前後とまだまだ満足できるものではない．そこで，家庭レベルで測定可能な PSA 測定診断キット（capillary blood を用いたテストストリップ）の開発により潜在的な前立腺癌患者の早期発見の可能性を探りたい．また，その他のマーカーと組み合わせることで検診の精度をより高めていく努力が必要である．また一方で，今まで臨床現場では測定できなかったレベルの超微量タンパクが迅速で安価に，そして簡単に測定できるとしたらどうだろうか．ごく微量でもその存在が明らかになれば癌が存在する，そういうマーカーはより精度の高い測定法があって初めて実際の臨床の場に応用できる．北陸先端大学の協力のもと電気化学的手法を用いて PSA が fg（フェムト）のオーダーまで測定できることが確認された．また，尿中の hTERT も測定できる可能性が示唆された．この測定法を用いることで癌の早期診断システムの確立に一歩近づくことができるかもしれない．

培養ヒト膀胱癌株におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害因子を用いたシスプラチンの細胞増殖抑制効果の増強：丸山琢雄（兵庫医大）［目的］ヒストン脱アセチル化酵素阻害因子である Sodium Butyrate（SB）を用い，ヒト膀胱癌培養細胞株に対する細胞増殖抑制効果と細胞周期に与える影響を検討した．また，SB と CDDP の併用による細胞増殖抑制の増強効果を検討した．［方法］実験 1：T-24 に対する SB および CDDP の細胞増殖抑制効果　a：コントロール：SB（－），CDDP（－）　b：SB 単独群　c：CDDP 単独群　d：SB と CDDP 併用群　XTT アッセイを用いて24，48，72時間後の細胞生存率を測定．実験 2：SB と CDDP の細胞周期にあたえる影響　実験 1 のおける各群について，24時間後の細胞周期を Lazer Scanning Cytometer（LSC）を用いて解析．実験 3：他の膀胱癌培養細胞に対する SB，CDDP の単独または併用投与による細胞増殖抑制効果　膀胱癌培養細胞 253J，TCCsup，5637，UMUC3，HTB9 を用いて，実験 1 と同様に SB，CDDP の単独または併用投与による細胞増殖抑制効果を XTT アッセイにて測定．［結果］SB の単独投与群では，T24 をはじめ各膀胱癌培養細胞に軽度の細胞増殖抑制効果を認めるのみであった．しかし，SB を併用することにより，CDDP の細胞増殖抑制効果は顕著に増強された．LSC による解析では，SB は細胞周期を G1 期で停止させることにより，細胞増殖を抑制することが示された．［考察］SB を併用することにより，CDDP はより低容量で細胞増殖抑制効果を示した．SB の併用は，抗癌剤の副作用を軽減しつつ効果的な化学療法を施行するためのレジュメとして有望な候補の 1 つかもしれない．

尿路結石モデルマウスから学ぶ，結石形成機序と結石消失の可能性：岡田淳志（愛知厚生連海南）　尿路結石は90％の無機物質と数％の有機物質から構成されており，近年種々の結石内マトリックス蛋白が同定され，腎臓におけるこれら蛋白の発現が結石形成に重要な役割を持つと考えられるようになりました．私達は結石内の有機物質として最も多く含まれるオステオポンチン（OPN）を同定し，結石形成過程で重要な役割を持つこと，その作用機序が骨形成および動脈硬化発生に類似していることを示してきました．これまでの尿路結石に関わる動物研究には，シュウ酸前駆物質を投与することにより腎結石を誘発させるラット結石形成モデルが用いられてきました．このモデルでは，腎尿細管に発現した OPN などの結石関連蛋白質が，結石形成に重要な役割を果たしていると考えられています．しかしこれら蛋白質の結石形成におよぼす正確な作用機序は不明でした．近年マウスを使った研究で，特定遺伝子を組換えたり，消失させたりすることで，その遺伝子が特定疾患に与える作用を解明する研究が行われています．私たちは，これらの研究手法を結石研究に導入するため，マウスで結石を作らせることが必要と考え，マウス結石形成モデルを作ることに成功しました．このモデルでは，シュウ酸前駆物質の投与により，腎の OPN の発現が一過性に増大し，その後減少しました．さらに OPN の発現に遅れて形成された尿細管内の微小結石が，時間の経過とともに消失する現象（結石消失現象）を捉えました．一度できた結石が消失するという概念は，結石が単純な「鉱物」ではなく，結石マトリックス蛋白などの有機物質を織り込んだ「混合物」であるという事実から論じられては来ました．しかしこれまでのヒトやラットの報告では，結石消失に関わる知見はなく，私達が確認したマウスの結石消失現象は，これまでの概念を覆す結果であるといえます．さらにこの消失減少に腎間質のマクロファージが関わっている可能性が見い

だされました．またOPNノックアウトマウスを用いた研究では，結石モデルマウスで形成された結石と比較して形態学的に大きな差を認め，結石消失にも時間的に遅れが生じるなど，OPNが結石形成だけでなく消失にも重要な役割を果たしていることが示されました．今後ラットとマウスにおける結石形成・消失に関わる「種の差」について研究を進めることによって，ヒトにおける結石形成傾向というものを紐解く鍵を得，さらには結石予防薬・結石溶解薬への発展を期待して，研究を続けたいと考えます．

制御性T細胞によるドナー特異的移植免疫寛容の誘導：長濱寛二（京都大）　免疫抑制療法の進歩により，臓器移植の短期成績は著しく向上した．現在の課題は，免疫抑制に伴う合併症や，非免疫学な因子も関わる慢性拒絶による長期成績の悪化などを防ぐことである．ドナー特異的免疫寛容をレシピエントに導入できれば，このような問題への解決策となることが期待される．われわれは制御性T細胞の応用により，ドナー特異的免疫寛容の導入が可能ではないかと考えた．古典的には，自己に反応するT細胞は分化の過程で胸腺にて死滅するために自己への免疫寛容が成立すると考えられていたが，実際には胸腺での選択は完全ではなく，自己抗原に反応するT細胞が末梢に出現しており，その自己反応性T細胞が活性化することを制御するT細胞（制御性T細胞）が同時に存在することにより，自己への免疫寛容が保たれていることが明らかとなった．$CD25^{+}CD4^{+}$制御性T細胞（Treg）はマウスにおいて免疫自己寛容の維持に必須の細胞分画として同定され，ヒトにおいても同様の細胞分画が確認された．われわれはこのTregをドナー特異的免疫寛容の誘導に応用する方法に関しマウス皮膚移植モデルを用いて検討した．1，ドナーとしてC57BL6（B6）マウスを用い，この皮膚片をBALB/cヌードマウスの背部に移植した．このヌードマウスに通常のBALB/cマウスから採取した抗原刺激を受けていないナイーブT細胞を移入すると皮膚片は拒絶される．ここにTregを1週間前に移入すると，拒絶は抑制されレシピエントに免疫寛容を誘導可能であった．このようにTregは自己寛容だけではなくアロへの寛容にも関与していることが明らかとなった．2，活性化したT細胞は制御性T細胞でなくてもCD25が陽性となるので，刺激を受けた後はエフェクターT細胞と制御性T細胞をCD25では区別できない．われわれはその問題を解決できるTregの新しいマーカーとしてFolate receptor 4（FR4）を発見した．FR4の発現レベルを指標にして，ドナー抗原刺激後のCD4＋　T細胞の中から，エフェクターT細胞とTregを選別することが可能であること，刺激後のFR4高T細胞が抗原特異的なTregで，ドナー特異的な移植免疫寛容の誘導に有用であることを証明した．このようなTregの臨床応用方法として，レシピエントから取り出したリンパ球をドナー抗原で刺激し，FR4を指標にしてドナー特異的抑制活性を有するTregを選別し，レシピエントに移入することにより，ドナー特異的免疫寛容を誘導するシステムが考えられる．

pT3b前立腺癌進展メカニズムの解明：基礎的臨床的アプローチ：三宅秀明（神戸大）　pT3b前立腺癌が予後不良であることは周知の事実であるが，その機序は十分に解明されていない．本講演では，演者が以前より抱いているpT3b症例の予後の悪さが精嚢にまで浸潤した癌である故の結果だけではなく，精嚢に浸潤した故に何らかの機序によりもたらされた結果ではないかという疑問に対する回答を見出すために取り組んでいる研究の成果を報告する．まず，術前内分泌療法を受けずに根治的前立腺全摘除術を施行された症例の内，pT3bN0と診断された53例の臨床病理学的特性を解析した．観察期間の中央値は37カ月と短いにもかかわらず，24例（45.3％）に生化学的再発を認めたが，主な予後因子は，いずれも生化学的再発と有意な相関を示さなかった．また，経射精管浸潤，前立腺を超えての直接浸潤および前立腺からの転移様進展に分類した精嚢への浸潤様式も，予後との相関を認めなかった．癌の進展を最も直接的に反映する因子として腫瘍体積に注目すると，pT3bN0の53症例とほぼ同等の腫瘍体積を有するサブグループとして，pT3aN0症例の中で腫瘍体積 ＞1.0 cc を満たす51例に解析対象を限定しても，pT3b症例の予後はpT3a症例のそれに比し有意に不良であった．極論すれば，これらの所見は癌の進展を含む他の予後規定因子とは無関係に，癌が精嚢に浸潤することで，その予後を不良に導く可能性を示唆している．上記の結果を基に，精嚢の微小環境に注目し，それが前立腺癌細胞の悪性形質に及ぼす影響を解析した．まず，2種類のヒト前立腺癌細胞株を免疫不全マウスの前立腺および精嚢に移植すると，いずれの細胞株も精嚢移植した際の腫瘍生着率，腫瘍体積およびリンパ節転移頻度の方が，前立腺移植した際のそれらより有意に高かった．また，精嚢抽出液の添加により前立腺癌細胞株の浸潤能は，前立腺抽出液を添加した際より有意に亢進した．この主たる原因因子を明らかにするために，精嚢抽出液中に高濃度に含まれる成長因子やサイトカインをスクリーニングしたところ，TGF-βが誘導する浸潤能亢進作用が最も顕著であり，TGF-β中和a抗体により精嚢抽出液が誘導する浸潤能亢進作用は有意に低下し，その変化はuPA活性の低下と比例した．以上の解析により，精嚢浸潤をきたすことで前立腺癌の悪性形質が亢進し，それに伴いpT3b症例の予後が不良となり，その原因として精嚢の微小環境，特にTGF-βが重要な役割を果たしている可能性が示唆された．現在，TGF-β中和a抗体による精嚢移植後の前立腺癌細胞の進展抑制の可能性および精嚢浸潤前立腺癌の臨床標本における浸潤関連分子マーカーの発現などを検討中である．

アロ抗原拒絶のメカニズム：能見勇人（大阪医大）　同種異系移植における拒絶反応の研究において，胸腺由来T細胞のないヌードマウスでは，同種異系皮膚を生着させることから，生体内で移植急性拒絶反応における主要なエフェクター細胞は細胞傷害性T細胞（CTL）であるとされてきた．活性化されたCTLが，その主要な傷害分子として知られているパーフォリンやFasリガンド（FasL；CD95L）を用いて，移植組織を傷害するとされている．今回，われわれはCTLの主な細胞傷害活性分子の欠損マウスにおいて，移植細胞拒絶において細胞傷害活性がどのような影響を受けているのかについて検討した．P815やRL-♂1といった腫瘍細胞を異系にあたるC57BL/6（B6）マウスやC3H/HeJマウスの腹腔内に移植し，その腹腔に浸潤してくる細胞（PEC）を採取し，その傷害活性を検定した．正常マウスとパーフォリンKOマウスの間でのPECの異系細胞に対する細胞傷害活性の差は4時間assayでは顕著であるが12時間ではその差は有意なものではなかった．パーフォリンは比較的早期に作用することとin vivoの同種異系拒絶でパーフォリンが必須でないことが示唆された．正常マウスとFasL欠損マウスの間でPECの異系細胞に対する傷害活性を観たところ，4，12時間assayともこの様な差は認められなかった．早期に働くCTLの細胞傷害性物質はパーフォリンが中心的であると考えられるが，全体として，パーフォリンとFasLが相補的に作用していると推定された．この相補性がない場合を検証するため，パーフォリンとFasLの両欠損マウス（DDマウス）を交配により作成し，同種異系拒絶の検定を行った．ところが，結果はDDマウスにおいても異系腫瘍細胞が正常マウスとほぼ同時期に拒絶されることが判明した．このことから同種異系拒絶反応には別の細胞傷害性物質もしくは別の細胞傷害機構の存在していることが示唆された．従来，同種異系拒絶反応は，T細胞についての詳細な研究がなされてきている．しかし，リンパ系の免疫システムを持たない進化上，下等な生物にも自己・非自己の認識は認められることから，拒絶反応の研究においてT細胞ばかりに偏重した考え方は，拒絶機構の完全な解明といった目標からすると危険と考えられ，自然免疫も含めて広く拒絶機構について探求する必要があると考えられた．

PETを用いた中枢での初発尿意発現機構の解析：高尾徹也（大阪大）　近年，画像診断機器の進歩によりPET（Positron emission tomography）やfMRI（functional magnetic resonance imaging）を用いた排尿に関する中枢の役割を解明しようとする様々な研究が行われてきている．これまでにも橋排尿中枢（PMC）や中脳水道灰白質（PAG）の関与が示唆されてきたが，さらにその上位中枢の関与も示唆されている．しかしながら，それらの研究は直接「排尿」に注目したものであったり，最大尿意に注目したりする研究が多く，初期尿意という状態に焦点をあてているものは少ない．また膀胱内圧測定あるいは膀胱内に生理的食塩水を注入するためにカテーテルを挿入している報告が多いが，カテーテル挿入の伴う知覚は少なからず中枢に影響があると考えられる．そこで，われわれは下腹部に持続尿量モニターをつけ，カテーテルを留置しない状態でPETを行い健常成人における初期尿意と中枢の活動について検討を行った．対象は，文書による同意を得られた右利きの正常男性ボランティア（27～40歳）6人である．実験の2時間前から被験者に2L以上の飲水をさせ，最大尿意の時点で実験を開始した．被験者を仰臥位にし，下腹部に持続尿量モニター（ゆりりん®：タケシバ，神奈川）を装着し尿量測定を行い，コンドーム型集尿器をつけて排尿させた．$H_2{}^{15}O$-PETにて，初期尿意，最大尿意，排尿後尿意なしの各時点でスキャンを行い，被験者1人に

つき2～3回繰り返してスキャンを行った．画像解析は，脳の機能的賦活部位を SPM2（Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, UK）ソフトにて解析した．初期尿意では，両側小脳，右海馬傍回，左上前頭葉，左帯状回が活性化されていた．最大尿意では両側小脳，左下前頭葉，左淡蒼球，島（右側），左中脳，左視床が活性化されていた．最大尿意では，これまでの報告と同じように多数の脳賦活部位が存在した．初期尿意では，両側小脳，右海馬傍回，左上前頭葉，左帯状回が活性化されていた．小脳の活性化は c-fiber の活性化によりもたらされるとの報告や無痛性の膀胱の拡張に関与するという報告があり，初期尿意に関与している可能性が示唆された．帯状回の活性化に関しては，膀胱容量の増大に関連しているという報告があり，また海馬傍回も膀胱の排尿制御に関与するという報告がある．初期尿意に，小脳，海馬傍回，上前頭葉，帯状回が関与している可能性が示唆された．

蓚酸前駆物質負荷による蓚酸排泄の変化：永田仁夫（浜松医大）　尿路結石において約70％に蓚酸を含有しており，その吸収，代謝，排泄の動態をみることは重要である．蓚酸の前駆物質に Hydroxyprorine（Hyp），Glycolate が知られているが，その代謝における重要な酵素の1つが SPT/AGT（Serine/Pyruvate Alanine/Glyoxylate aminotransferase）である．この酵素は細胞内局在が種特異的で食習性依存性があり，ヒトにおいてはその局在が草食動物と同じ Peroxisome に存在することが知られている．また肉食動物においては Mitochondria に，雑食動物ではその両方に存在する．過去にわれわれは，ラットの SPT/AGT を Glucagon により Mitochondria へ誘導し，肉食動物モデルを作成した．また Glucagon 投与および対照ラットに Hyp，Glycolate を投与し，尿中の蓚酸関連物質およびアミノ酸を測定することにより，肉食動物（Glucagon 投与ラット）に対し Hyp を投与しても雑食（対照ラット）に比べ蓚酸の産生が少ないことを証明した．今回の研究では Hyp，Glycolate を草食動物（ウサギ）と肉食動物（イヌ）に食餌により摂取させ，得られる尿中代謝産物からその適応性について検討した．イヌの尿中蓚酸・クレアチニン比は Glycolate 投与群（0 mmol で 92.6±50.0，76 mmol で 295.2±105.3，152 mmol で 636.3±218.7）と Hyp 投与群（0 mmol で 47.1±3.3，76 mmol で 129.3±40.9，152 mmol で 143.4±51.0）の間に有意差を認めた（P<0.0001）．これらの結果より肉食動物では SPT/AGT が Mitochondria に存在するため，Hyp の負荷に比べ Glycolate の負荷により蓚酸の産生が増加すると考えられた．さらにウサギについては現在検討中であるが，草食動物では SPT/AGT の局在は Peroxisome に存在するため，Glycolate の負荷に比べ Hyp の負荷に対し蓚酸の産生が増加すると予想される．本研究は，従来行われてきた結石に対する食事指導の裏付けを，酵素・代謝の面より検証することとなり，将来的に尿路結石症の予防に役立つものと考えられる．

ラット泌尿生殖器官におけるステロイド代謝酵素の局在：組織学的検討：倉本朋未（和歌山医大）〈目的〉ヒトにおける泌尿生殖器官の発達と維持，精子形成などにステロイドホルモンは影響を及ぼす．例えば前立腺癌と前立腺肥大症はアンドロゲン感受性を示す．前立腺癌ではアンドロゲンを除去すると腫瘍が縮小することから，アンドロゲン除去療法が進行・転移期の前立腺癌に対する基本治療法となっている．しかし，ホルモン抵抗性前立腺癌も存在し，その機序が研究され，アンドロゲンレセプター遺伝子の変異の関与が示唆されている．また前立腺肥大症にはエストロゲンの上昇の関与も考えられており，アロマターゼがアンドロゲンからエストロゲンへの変換酵素であることから，アロマターゼ阻害剤の前立腺肥大症に対する有効性が示唆されている．しかし，実験動物であるラットでは泌尿生殖器官におけるステロイド合成・代謝のしくみについて十分には解明されていない．そこで今回，ラットの泌尿生殖器官におけるステロイド代謝酵素の局在をアロマターゼに対する抗体などを用いて免疫組織化学的に検討した．〈方法〉Wistar 系成熟雄性ラットを用いた．4％パラホルムアルデヒドで心臓より潅流固定した後，前立腺（腹側，外側上部，外側下部，背側），精巣，精嚢などの泌尿生殖器官を摘出し凍結切片を作製し，免疫組織化学的にステロイド代謝酵素の存在を検討した．〈結果〉前立腺ではアロマターゼの発現は，腹側，外側上部，背側の分泌上皮細胞に認められた．CYP17 および 3α-HSD の発現は，腹側，外側上部，背側の基底細胞に認められた．5β-reductase，3β-HSD，5α-reductase type 1，type 2 は分泌上皮細胞，基底細胞で発現が認められたが，発現部位は各代謝酵素によって異なる発現を示した．また 5β-reductase については前立腺腺管を取り囲む平滑筋にも発現が認められた．精巣においては，アロマターゼ，3α-HSD はライディッヒ細胞とセルトリ細胞の両方で認められたが，他の代謝酵素はライディッヒ細胞に発現した．精巣上体では，いずれの代謝酵素も分泌上皮細胞に発現し，一方尿道球腺では基底細胞に発現が認められた．〈考察〉ラットの泌尿生殖器官において，アンドロゲン合成・代謝に関与する酵素の発現を免疫組織化学的に検討し，各代謝酵素に特有な発現パターンを認めることができた．今後，合成・代謝されるステロイドが，発達・分化と加齢に伴ってどのように関与していくかについて組織化学的に検討したい．

CHOP を標的分子とした TRAIL 誘導性アポトーシスを増強する薬剤の探索：白石　匠（京都府立医大）　ホルモン非依存性前立腺癌に対しては現在のところ有効な治療法がなく，新しい治療法の開発が必要とされている．Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand（TRAIL）は正常細胞にはほとんど影響を及ぼさず癌細胞特異的にアポトーシスを誘導する理想的な薬剤として期待されている．しかしながら前立腺癌を含む多くの固形腫瘍が TRAIL に対して抵抗性を示すのが現状である．そこでわれわれは種々の薬剤と TRAIL との併用効果について検討した．前立腺癌細胞株である PC-3 細胞において小胞体ストレス誘導剤として知られている tunicamycin が TRAIL のレセプターの1つである death receptor 5（DR5）の発現誘導を介して TRAIL によるアポトーシスを強力に増強することを見出した．さらに DR5 の誘導には小胞体ストレスにより誘導される pro-apoptotic な転写因子として知られている CHOP が関与していることも明らかにした．また tunicamycin による CHOP を介した DR5 の誘導および TRAIL 誘導性アポトーシスの増強効果は正常細胞では認められなかった．一方，プロテアソーム阻害剤は DR5 の発現上昇を介して TRAIL によるアポトーシスを増強することが知られており，この併用は有望な癌治療戦略の1つとして注目されている．われわれはプロテアソーム阻害剤 MG132 と TRAIL の併用が前立腺癌細胞株である DU145 細胞においても強力にアポトーシスを誘導することを示し，さらにプロテアソーム阻害剤による DR5 の発現上昇にも CHOP が関与していることを見出した．このようにわれわれの研究から CHOP が DR5 の発現誘導における key molecule の1つであることが明らかとなった．現在 CHOP を標的分子とした新しい TRAIL 誘導性アポトーシス増強剤の探索を行っており，有望な薬剤が数種類同定されてきている．CHOP を標的分子とした TRAIL 増強剤は TRAIL の腫瘍選択性を損なうことなく，効果的に TRAIL によるアポトーシスを増強することができる可能性があり，今後の前立腺癌に対する新しい癌治療戦略において有望であると思われる．

前立腺癌細胞株における細胞膜裏打ちタンパクの役割：水谷晃輔（岐阜大）　多細胞生物がその固体を維持していくためにはそれぞれの細胞が適切な場所において適切な役割を果たしていくことが必要である．その条件として細胞1つ1つが適切な細胞外基質と接着する必要がある．正常な接着性細胞では細胞外基質との接着を失うと増殖の停止や細胞死を引き起こす．近年このような細胞の規律は細胞接着の影響を受けていることが明らかになってきている．細胞と細胞外基質の接着は細胞膜における細胞接着斑といわれる場所で起こっている．細胞接着斑では細胞と細胞外基質を連結する役目を果たす，インテグリンや細胞骨格を担うアクチンストレス繊維の末端や細胞膜裏打ちタンパクが集結している．細胞膜裏打ちタンパクは従来，インテグリンとアクチンストレス繊維を物理的につなぐ役割を担っていると考えられてきたが，最近になってシグナル伝達による細胞接着や細胞骨格の制御，接着によるシグナル伝達の制御に関係していることが明らかとなってきている．今回われわれは，前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞において，細胞膜裏打ちタンパクの一種である Vinexinb の役割を解析したので報告する．Vinexinb は細胞骨格系タンパクの1つである Vinculin に結合するタンパクとして発見され，その過剰発現が細胞の進展能力の増大，接着能力の促進，さらに細胞の非接着時に MAPK の活性化（足場非依存的な MAPK 活性化）を促すと報告されている．われわれは LNCaP 細胞における Vinexinb の発現が，より接着が強く，増殖が強い前立腺癌細胞株である PC-3 細胞より少ないことを見出した．そこで LNCaP 細胞に Vinexinb を発現させ，その機能の解析を行った．Vinexinb を発現させた LNCaP 細胞は接着能力，進展能力ともに低下した．これは従来の報告と矛盾するものであったが，Vinexinb はそれ自身にリン酸化部位をもち自身のリン酸

化が機能に影響している可能性も考え，VinexinbS149A mutant と VinexinbS149D mutant を作成しその機能を調べた．リン酸化状態と考えられる VinexinbS149D mutant は細胞の接着，進展能力とも VinexinbS149A mutant より向上していた．以上より Vinexinb は前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞において，リン酸化を受けた状態でその接着に関係していることが示唆された．

男性更年期患者の QOL：巽　一啓（関西医大，西淀）［目的］近年，中高年男性の不定愁訴が問題になっている．2002年8月末頃から男性にも更年期があると大きくマスメディアにとりあげられるようになり，社会的にも男性更年期という概念が広く認識されるようになった．しかしながら男性更年期障害に対する，明確な診断方法や治療，効果判定というものが画一されていない．当院で加療した男性更年期患者の QOL や HRT（ホルモン補充療法）による QOL の長期変化を追跡．検討を行った．［対象］対象は2002年9月から2005年5月までに関西医科大学泌尿器科更年期外来を受診しホルモン補充療法施行した患者36人．年齢平均57.65歳（37～75歳）．［方法］ホルモン補充療法はtestosterone enanthate 250 mg を 3 ～ 4 週おきに 3 回筋肉注射した．治療前，治療終了時，治療後 3 カ月後に包括的健康関連 QOL 尺度（SF-36）の記入し，スコアを日本人平均で換算し検討を行った．スコアは50点をその年齢平均とし＋10点を ＋1 SD と換算した．［結果］男性更年期患者初診時 total testosterone 値 290.81 ng/dl（110～517 ng/dl），初診時 free testosterone（RIA）値 6.93 pg/ml（3.3～11.6 pg/ml）であった．男性更年期患者の QOL は一般日本人平均に換算して著しく低い．治療前後の比較では SF-36 スコアはほぼすべての面で有意な上昇（改善）を認めた．治療前と治療後 3 カ月では身体的健康度サマリースコアと 2 つのサブスケールが $p<0.05$，精神的健康度サマリースコアと 5 つのサブスケールで $p<0.01$ の有意な改善を認めている．一方，治療後と治療 3 カ月後の比較ではどのスコアも有意差が認められなかった．［考察］ホルモン補充療法で QOL は改善する．さらにホルモン補充療法を中止しても補充したことによる QOL の改善は継続される．

前立腺癌マウスにおける Bcl-2 発現抑制による抗腫瘍効果および放射線感受性の誘導：**穴井　智**（奈良医大）　アポトーシス阻害に寄与するオンコジーン Bcl-2 は，前立腺癌における放射線および化学療法抵抗性に関与するとされる．また，癌抑制遺伝子のひとつである PTEN は，Bcl-2 の発現を抑制するといわれ，アンチセンス Bcl-2 オリゴデオキシヌクレオチド（AS Bcl-2 ODN，oblimersen sodium，Genasense，G3139）は，Bcl-2 の mRNA とハイブリダイズし，Bcl-2 の発現を減弱させる．今回，Bcl-2 強発現前立腺癌異所性マウスモデルにおいて，Bcl-2発現を抑制するためアデノウイルス PTEN（AdPTEN）の腫瘍内注入またはアンチセンス Bcl-2（AS Bcl-2 ODN）の腹腔内投与による，放射線療法との併用効果について検討した．AdPTEN および AS Bcl-2 ODN のいずれの治療においても，放射線療法との併用群は，放射線単独照射群と比較し，腫瘍サイズは約30％まで縮小していた．また，AdPTEN および AS Bcl-2 ODN 治療後の腫瘍サンプルの Bcl-2 発現は，免疫染色法およびウェスタンブロッティング法にて抑制を認めた．さらに，併用群において，アポトーシスの増強効果（TUNEL），細胞増殖（PCNA）および血管新生（VEGF & CD31）の抑制効果を確認した．以上より，AdPTEN および AS Bcl-2 ODN による Bcl-2 発現抑制の誘導と放射線療法の併用は，前立腺癌における，新しい治療法となりうる可能性が示唆された．

食餌による前立腺癌発癌機構の解析―ラットを用いた動物実験より―：**中井康友**（大阪大）　1．背景　本邦において前立腺癌は罹患率，死亡率ともに増加が著しい．この原因として環境因子，とりわけ食餌性因子の関与が各種疫学的調査から示唆されている．Heterocyclic amines（HCAs）は肉を高温で調理すると生成される mutagen であるが，食肉中で最も多く含まれる HCA である 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4，5-b] pyridine（PhIP）の摂取はヒト前立腺癌の発生と関連していることが報告されている．PhIP をラットに投与すると前立腺腹葉のみに癌が生じる．この動物モデルは，ヒトの前立腺癌発生に関連している物質で前立腺癌が生じることや，ヒト前立腺癌のように葉特異的に発癌することからヒト前立腺癌のよいモデルであると考えられる．今回われわれはこのモデルから，ヒト前立腺癌発生の解明につながる新たな知見が得られるものと考え，ラットに PhIP を投与した後，前立腺のそれぞれの葉で起こる変化を検討した．2．実験方法　F344BigBlue^{TM} rat を 3 匹ずつ，4 および 8 週間，生理食塩水または PhIP（70 mg/kg）を投与する群に分け，各前立腺葉ごとに mutation frequency（MF）および組織学的な変化を検討した．MF は Big Blue assay を用いて測定した．3．実験結果　• PhIP は前立腺すべての葉で MF を増加させた．• PhIP は癌が発生する唯一の葉である腹葉にのみ上皮細胞の増殖を亢進させるとともに肥満細胞と貪食細胞の浸潤を誘導した．4．考察　PhIP は前立腺すべての葉に遺伝子変異を引き起こす mutagen であることが明らかになった．しかしながら癌が発生するのは前立腺腹葉のみであることから，PhIP は前立腺腹葉において，発癌の初期に関わる mutagen としての活性（initiator）の他に，発癌を促進する作用（promotor）を有していると考えられる．今回の実験結果から，腹葉のみに見られた上皮細胞の増殖と炎症細胞の浸潤が promotion に関わっている可能性が考えられた．ヒト前立腺癌の発生にも炎症が関わっている可能性があることが報告されているが，今回の実験結果は，食餌性因子と炎症そして発癌との関連の傍証になるものと考えられた．

腎不全における腎障害進展のメカニズムとその治療：**玉田　聡**（ベルランド総合）　腎間質線維化は多くの進行性腎疾患にみられ腎機能の不可逆的な喪失に結びつく病態であるが，その発症の分子機構については不明な点が多く，有効な治療方法も確立していない．われわれはまず薬剤性腎障害モデルを用いて腎線維化の発症機序の解明を試みた．われわれはシクロスポリン（CsA）長期投与における Mg 喪失に伴う低 Mg 血症が慢性腎毒性の成因に関わるとの仮説を立て実験的に検証した結果，Mg 補給により慢性腎毒性が著しく改善するとの結果を得た（Transplantation 2002）．このような治療効果の機序として線維芽細胞の増殖や細胞外基質の産生抑制が重要であることを示した．一般に腎間質線維化病変は間質での炎症の持続が成因として重要と考えられる．事実，われわれは腎間質の炎症細胞の浸潤を伴う炎症が CsA による慢性腎毒性に先行して生じること，Mg 補給がこれらの炎症を抑制することにより慢性腎障害への進展を抑制することを示した（Transplantation 2002）．このように線維化に先行する炎症を抑制することが腎間質の線維化病変を抑制する優れた治療戦略であることが明らかとなった．炎症には様々なサイトカインが関わっている．そこでそれら炎症性遺伝子の転写調節を担う転写因子 Nuclear factor-kB（NF-kB）の関与を検討したところ CsA 慢性腎毒性モデルにおいてNF-kBは有意に活性化されていること，さらに Mg 補給により NF-kB の活性化が抑制されることを見いだした（Transplantation 2003）．同様の現象は慢性タクロリムス腎毒性モデルや一側尿管結紮モデルにおいても観察され，さらに NF-kB の活性化を抑制することにより，腎間質の炎症が抑制され線維化も抑制されること証明した（Kidney Int 2003，Jpn J Pharmacol 2002，Int J Mol Med 2003）．次にわれわれはクレメジンが腎不全の進行を遅らせることに注目し，そのメカニズムの解明を試みた．腎亜全摘モデルを用いて早期腎不全の状態を作成し，クレメジンの効果を検討したところ尿毒素物質をクレメジンが吸着することにより NF-kB の活性化を抑制し，その結果，腎間質の炎症と線維化の進展を予防するメカニズムを明らかにした（Int J Mol Med 13：33，2004）．これらの検討から，NF-kB の活性化を抑制するような治療は腎線維化の進展を予防するのに重要な役割を果たすことを解明した．

ファージディスプレイ法を用いたヒト抗体ライブラリーからの腎癌特異的抗体の単離：**佐藤乃理子**（藤田保衛大）　腎細胞癌は化学療法，放射線療法に抵抗性であり，進行症例での予後は非常に不良であるため，腎細胞癌の新規治療法への期待は大きい．また，腎細胞癌は他の固形癌とは異なりサイトカイン療法が有効であることなどから，免疫関連療法に対する感受性が高い腫瘍であることは以前から認められていた．これらにより樹状細胞療法，ミニ移植，ペプチドワクチンなど免疫学的治療法の臨床応用，治験が行われている．近年，ハーセプチンに代表されるような表面抗原をターゲットにした抗体治療薬は様々ながん治療の場で臨床応用や臨床治験が行われ，ある程度の治療効果を挙げている．現在，われわれは腎細胞癌の治療用抗体の開発のため，ファージ抗体ライブラリーより単離された腎癌特異的と考えられた抗体の認識抗原の同定，抗体機能の検索を行っている．共同研究者である黒澤らは AIMS ライブラリーというファージ抗体ライブラリーを作成した．このライブラリーは 1×10^{11} 種類のファージ抗体を含む巨大なものであり，ヒト免疫組織を材料とし，完全ヒト型抗体が

得られる．現在までに本ライブラリーを用いたスクリーニングにて，ハブ毒に対する抗体，ロタウイルスに対する抗体，her2/neu に対する抗体が含まれていることが含まれており，理論的には自然界に存在する蛋白に対する抗体がすべて含まれていると考えられている．まず，この抗体ライブラリーと腎癌細胞株を反応させ，細胞株に反応した抗体だけを単離した．単離された抗体を腎癌臨床検体の免疫組織染色を行い，腎癌組織のみに反応した抗体数種類を選択した．さらに樹立腎癌細胞株でフローサイトメトリーを行い，腎癌細胞膜上に抗原が存在していると考えられた抗体を選択した．さらにその抗体と腎癌細胞株を反応させ免疫沈降を行い，腎癌細胞膜上に存在している抗原を取得した．マススペクトルメトリーで抗原の蛋白配列を決定し，抗体が認識している抗原を予測することができた．これらの抗体は樹立腎癌細胞株に対する ADCC 活性があることが確認された．現在，SCID 担癌マウスを用いた in-vivo 実験を進めている．以上のことから，単離された抗体は腎細胞癌特異的と言え，ADCC 活性も見られることから，抗腫瘍効果が得られることが期待できる．従来，抗体を単離するには抗原を用いて動物を免疫するのが常道であったが，本研究にて用いた AIMS5 ライブラリーは完全ヒト抗体であるので，人に対する治療の有効性と安全性を充分に諮れるものと考えられる．将来的には臨床応用を目指したヒト抗体の単離精製が充分に期待できると考えられる．

腎移植時の阻血再灌流障害に対する腎保護作用の研究：林　泰司（近畿大）　腎移植時における，阻血再灌流障害は避けられないものである．Coulson らは，移植腎モデルラットを用い，阻血障害が腎組織に対し慢性的なダメージを生じることを報告している（transplantation 2005 Aug）．また，これまで慢性拒絶反応の主たる原因として，ドナーとレシピエントの主要組織適合性抗原（HLA）の相違による antigen dependent な因子が考えられてきた．しかし，東らは，腎阻血再灌流障害の慢性拒絶反応に対する影響を明らかにするため，移植していない naïve ラットに腎阻血再灌流障害を生じさせ，長期的に観察した．その結果，アログラフトに生じた慢性拒絶反応と同様の変化を呈し，慢性拒絶反応の発症には，腎移植時における阻血再灌流障害が非常に重要な要因であることが示唆されたと報告している．腎阻血再灌流障害は，xanthin oxidase の系から生じる superoxide がイニシエーターとして重要な役割を果たすと考えられており，種々のスカベンジャーの投与によって再灌流障害の発生が抑制されることが報告されている．今回われわれは，それらスカベンジャーの中から，β 遮断薬であるカルベジロールに着目した．カルベジロールは α 遮断作用に加えて抗酸化作用を持つ第 3 世代の β 遮断薬である．実際，心筋虚血モデルでの投与実験においてその効果が証明されている．今回，われわれは11週齢の SD ラットに対し，右腎を摘除後，左腎に 1 時間の阻血再灌流障害を起こしカルベジロール投与群と非投与群において，その効果を検証した．結果は，術後翌日の血清 Cre 値が，• sham 群 0.443±0.0350 mg/dl，• control 群 2.381±0.306 mg/dl，• carvedilol 群 1.185±0.336 mg/dl と有意差をもって control 群より carvedilol 群で改善効果が認められた．術後 4 日目も同様の結果を得た．その他，病理学的検討も含め報告する．また，抗酸化作用としての比較のため，抗酸化作用を有さない β 遮断薬である，酒石酸メトプロロノールの投与群も作製し，比較対照を行ったので報告する．

前立腺再生検に関する新規 molecular marker の検討：中山雅志（大阪大）　前立腺生検においては sampling error の可能性を排除することができないため，初回生検陰性患者においても再生検を考慮する必要がある．現在，再生検における癌の検出率は約20％と初回生検の検出率とほぼ同等かやや低い程度である．その原因として，現在再生検に関する有用な指標がないこと，特に初回生検標本より得られる情報がほとんど活用されていないことが考えられる．遺伝子の発現抑制と関連があるプロモーター領域のメチル化は，前立腺癌においても，これまで多くの遺伝子で報告されている．この DNA のメチル化は発癌や癌の進展機序の解明のみならず，molecular marker として診断への臨床応用が期待されている．今回われわれは，前立腺生検時に得られる生検洗浄液中より抽出した DNA 中の各種遺伝子のメチル化を同定し，再生検の指標としての有用性に関して検討を加えた．まず，これまで前立腺癌組織においてメチル化が報告されている 7 種の遺伝子（GSTP1，APC，RASSSF1A，MDR1，RUNX3，MGMT，E-cadherin）に関して生検洗浄液中の DNA のメチル化を同定し，生検病理組織結果と比較検討した．その結果，GSTP1 遺伝子のメチル化は癌と診断された症例の96％に認められたが，癌と診断されなかった症例では50％しか認められなかった（$p<0.01$）．その他の遺伝子のメチル化に関しては両群間で有意差を認めなかった．次に再生検施行例において，初回生検洗浄液中の GSTP1 遺伝子のメチル化と再生検の病理結果を比較検討した．18例の検討において，初回生検洗浄液中に GSTP1 遺伝子のメチル化を認めた11例中 6 例は再生検で癌が検出された．一方，GSTP1 遺伝子のメチル化を認めなかった 7 例中，再生検にて癌が検出された症例は 1 例もなかった．Preliminary な結果ではあるが，前立腺生検洗浄液中の GSTP1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化は再生検の有用な指標であることが示唆された．生検洗浄液を用いた DNA のメチル化の同定は，今後再生検の指標さらには前立腺癌の分子生物学的診断における新たな molecular marker としての応用が期待される．

先天性水腎症の遺伝子解析―分化制御因子 Id2 遺伝子欠損マウスの解析を中心に―：青木芳隆（福井大）　臨床上遭遇する先天性疾患の 1 つに尿路奇形がある．これは心奇形に次いで多い先天性疾患であり，新生児の0.6％に尿路の拡張が認められ，その約半数が腎盂尿管移行部（UPJ）の通過障害に起因するといわれる．Id2 は，細胞の分化と増殖に深く関わる bHLH 型転写因子の機能抑制因子の 1 つであるが，今回は，Id2 遺伝子欠損マウスが UPJ の通過障害に起因する先天性水腎症を高頻度に発症することを見出したことから，その詳細な解析を行った．形態学的解析では，Id2 欠損マウスは，8 週齢 $Id2^{-/-}$ マウスにおいて，雄67.2％，雌28.0％に認められ，$Id2^{+/-}$ マウスにおいても，雄49.2％，雌19.1％の頻度で水腎症を認めた．水腎症の97％は右側のみに発症していた．その発症時期は，マウス胎仔の解剖結果から胎生16日目であった．また，腎盂造影，腎盂内圧測定の結果から，水腎症は，UPJ における閉塞に起因しており，その腎盂内圧は有意に上昇していることがわかった．組織学的解析では，in situ ハイブリダイゼーション法により，Id2 遺伝子は野生型マウス胎仔の尿管平滑筋に強く発現していることがわかった．さらに，水腎症を発症した $Id2^{-/-}$ マウスの UPJ では，平滑筋層の肥厚と乱れが観察された．既知の水腎症関連遺伝子と Id2 との関係についての解析では，マウス胎仔器官培養系を用いた刺激実験では，胎仔尿管組織において，BMP4 刺激により Id2 遺伝子の発現が誘導された．Agtr1，Adamts1 遺伝子欠損マウスの全例にみられる両側性水腎症や，BMP4 遺伝子欠損マウスあるいはⅡ型アンギオテンシン受容体遺伝子欠損マウスにみられる先天性尿路奇形の多様さ（重複尿管，UPJ 閉塞，膀胱尿管逆流，低形成腎など）に比べ，Id2 欠損マウスは，雌雄差があり，片側性で，しかも UPJ 閉塞による水腎症のみが起こるという点で，一線を画しており，Id2 欠損マウスは UPJ 閉塞によるヒト先天性水腎症の発症メカニズムを解明する上できわめて貴重なモデルマウスになるものと期待される．また，$Id2^{+/-}$ マウスにおいても水腎症が認められることからヒト水腎症症例における Id2 遺伝子異常の存在が示唆された．そこで，現在は先天性水腎症の家族内発生例を中心に Id2 遺伝子変異の解析を行っており，その結果も合わせて報告したい．

尿路組織再生の試み（虚血回復時に尿中落下細胞からの尿細管由来細胞の同定と Tissue engineering を用いた尿管再生）：松沼　寛（八千代）　Ⅰ（尿細管由来細胞の同定）腎移植患者を対象に，尿細管の落下細胞と尿細管周囲毛細管の赤血球の動きを腎拡大内視鏡を用いてダイナミックに観察し，定量化した．再灌流後10分での表在尿細管内に下流に流れる尿細管落下細胞を認めた．その尿細管周囲毛細血管の赤血速度は明らかに虚血後30分以内で低下し，30分以降で改善傾向を認めた．手術中無菌的に採取した分腎尿を遠沈し，細胞で取り出した．その結果78.6％にドーム形成を有する増殖能力の高い尿細管由来の細胞を同定した．虚血後30分の早期に比し30～60分の分腎尿からのドーム形成を有する尿細管細胞は多い傾向があった．Ⅱ（尿管再生）Tissue engineering の手法を用いて尿管の再生を目標に脱細胞化尿管（UAM：ureteral acellular matrix）を scaffold として使用し，内腔に培養移行上皮細胞を播種し尿管様構造を作成後，ヌードマウス皮下に移植した．生体内における播種細胞への新生血管を促進するために骨髄単核球細胞（BM-MNC：bone marrow-derived mononuclear cell）添加を試みた．移植後14日目において BM-MNC 添加群では移行上皮の生存を確認し，UAM 内への新生血管が認められた．一方無添加群では移行上皮細胞の生存を確認できなかった．UAM は尿管再生に適切な scaffold であり BM-MNC による血管新生により移行上皮細胞の生

着が可能であった.（結論）今回のわれわれの研究結果により尿路組織再生の可能性が示唆された.