京都大学	博士（医学）	氏　名	川西　博晃
論文題目	Secreted CXCL1 Is a Potential Mediator and Marker of the Tumor Invasion of Bladder Cancer (分泌蛋白 CXCL1 は膀胱がん浸潤に関わる重要な因子であり尿中腫瘍マーカーにもなりうる)		

（論文内容の要旨）

膀胱癌は浸潤傾向を示さない非浸潤癌と間質から筋層へと浸潤していく浸潤癌とに分類される。前者は比較的良好な予後をたどるが、再発を繰り返しやがて浸潤能を獲得するものが存在する。後者は高転移能を有するため予後不良であり 5 年生存率は 50～60%である。尿細胞診や、BTA、NMP22 などの尿中腫瘍マーカーが膀胱癌の診断に貢献しているが、非浸潤癌と浸潤癌の区別は困難とされる。従って、癌の浸潤能を反映し得る尿中マーカー開発、および、浸潤能獲得に関連する分子群を標的にした治療法の開発は膀胱癌の予後改善に有用である。

一般的に分泌蛋白質群の中には増殖、進展に関わる分子が存在し、癌細胞において産生が亢進している場合は腫瘍マーカーや治療標的分子となることが知られている。一方、培養癌細胞培養上清液は癌細胞が特異的に産出・分泌する蛋白質が含まれることから分泌蛋白質群同定に適した試料である。そこで、細胞培養上清中蛋白のプロテオミクスにより膀胱癌浸潤に関与する蛋白質同定を試みた。まず、Matrigel invasion chamber assay を用いて 6 種の膀胱癌細胞株の中から高浸潤性を有する T24 細胞と低浸潤能を示す RT112 細胞を選択した。両細胞を無血清培地で 24 時間培養した上清を回収し液体クロマトグラフィーにて分画処理後、培養上清中の分泌蛋白質群の LC-MS/MS による網羅的解析（ショットガンプロテオミクス）を行った。T24 細胞で特異的に同定された分泌蛋白質群の中から蛋白質データベース情報（Swiss Prot）より分泌蛋白だけを絞り込んだ。さらに、当科が作製した膀胱癌臨床検体 cDNA マイクロアレイデータベースを用いて、正常膀胱粘膜に対して膀胱癌での発現が高く、間質浸潤とも相関を認める分子の同定を行った。上記の解析の結果、22 種の分泌蛋白質群が T24 細胞のみで同定されケモカインの一種である CXCL1 が臨床検体マイクロアレイデータベースにおいても、浸潤癌における mRNA 発現が非浸潤癌、および正常粘膜に比較して有意に高値を示した。In vitro においても RT112 細胞、T24 細胞を含む 6 種の細胞株において、CXCL1 発現量（ELISA）と浸潤能に正の相関が認められ、手術標本の免疫組織染色においても浸潤性膀胱癌において同蛋白質の発現亢進を認めた。次に CXCL1 が in vitro で膀胱癌細胞株の浸潤能を制御しているか検討を行った。同ケモカインを高発現している T24 細胞を用いて siRNA 発現ベクターによりその発現を抑制したところ浸潤能の低下を認め、また、同細胞に CXCL1 中和抗体を加えるとその浸潤能が抑制された。発現を認めない RT112 細胞に CXCL1 遺伝子を強制発現させると浸潤能亢進を認めた。T24 細胞培養上清に CXCL1 中和抗体を添加すると同細胞における MMP-13 の発現が抑制されることが c-DNA マイクロアレイ解析より明らかとなり、CXCL1 が in vitro で MMP-13 の発現を制御すること、手術標本免疫染色においても CXCL1 発現と MMP-13 発現が正の相関を示すことが判明した。これらの結果より MMP-13 を介する作用機序で CXCL1 が浸潤に関与している可能性が示唆された。尿中腫瘍マーカーとしての有用性を検討するために臨床検体 (n=98) の尿中 CXCL1 量を ELISA 法にて測定したところ、コントロール群 (7.8±2.5pg/mg creatinine（n=31)）に比して膀胱癌患者群で有意な上昇を認め、腫瘍間では浸潤癌で臨床検体の尿中 CXCL1 量が亢進していた（T1 以上：112±25 pg/mg creatinine（n=35)、Ta:17±3.7 pg/mg creatinine(n=32))。

以上の結果より、CXCL1 は膀胱癌浸潤に重要な役割をはたしており、新規尿中腫瘍マーカーとしても有用であることが示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

膀胱癌においては尿を用いた細胞診が標準的かつ非侵襲的な検査法であるが、特異性は高いものの感度に問題があり、さらに有用な尿中マーカーが求められている。本研究では、膀胱癌培養細胞の培養液上清を対象としたプロテオーム解析法により、膀胱癌の浸潤能に関与する分泌蛋白質としてCXCL1を同定し、その尿中マーカーとして有用性を検討している。まず、浸潤能の異なる二種の膀胱癌細胞株RT112(低浸潤性)およびT24(高浸潤性)を用い、その培養液上清をLC-MS法により網羅的に解析した。同時に先行研究として行っていた尿路上皮癌の遺伝子発現情報との比較にて浸潤に関連する分泌蛋白を絞込み、候補蛋白としてCXCL1を同定した。次いで、CXCL1高発現のT24に対しsiRNAによる発現抑制及び中和抗体による機能抑制を行ったところ、浸潤能が抑制された。一方、CXCL1の発現のないRT112にCXCL1遺伝子を導入すると浸潤能が亢進した。網羅的遺伝子発現解析による検討ではCXCL1がMMP13の発現を制御する可能性が示唆された。さらに、尿中CXCL1発現量はコントロール群に比して膀胱癌患者群で有意に亢進し、特に浸潤癌で高発現していた。

以上の研究は浸潤性膀胱癌の発生機序の解明に貢献し、有用な膀胱癌尿中マーカーの開発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21年7月6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。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降