

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	西澤 恒二
論文題目	Fluorescent imaging of high grade bladder cancer using a specific antagonist for chemokine receptor CXCR4. (ケモカイン受容体CXCR4に対する特異的アンタゴニストを用いた高悪性度膀胱癌に対する蛍光イメージング法の開発に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
【背景】高悪性度膀胱癌(上皮内癌)は浸潤・転移をきたしやすく、浸潤癌となる前に癌を同定する事が重要である。しかし、上皮内癌は平坦病変であるため、通常の白色光の膀胱鏡検査では局在診断は容易ではない。このため、上皮内癌を可視化する検査法の開発は臨床上重要である。今回、膜貫通型受容体である CXCR4 の膀胱癌における発現を検討するとともに、CXCR4 を標的分子とした蛍光イメージング法の可能性を検討した。 【対象と方法】<u>BBN誘導性マウス膀胱発癌モデルの作成</u> C57BL/6 マウス (n=50) に対し <i>N</i>-butyl-<i>N</i>-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) 0. 025%を経口投与して膀胱発癌を誘導し、発癌経過に従い時系列に膀胱を摘出した。<u>マウスおよびヒト膀胱癌におけるCXCR4 の発現解析</u> ヒト膀胱癌細胞株 (3 種) と膀胱癌臨床検体、非癌尿路上皮およびマウスBBN誘導性膀胱癌を用い、CXCR4 の発現をウェスタンブロット法および免疫染色法で検討した。<u>蛍光標識CXCR4 アンタゴニストTY14003 の作成</u> CXCR4 特異的アンタゴニストT140 を基に、D-Lys8 の部位を蛍光標識したプローブTY14003 を作成した。コントロールプローブには、構成するアミノ酸を全てD体に入れ替えたTR14009 とランダムに順序を入れ替えたTR14010 を用いた。<u>TY14003 によるヒト膀胱癌細胞の可視化</u> 膀胱癌細胞株と膀胱癌患者の尿沈査検体をTY14003 (100nM) で標識し蛍光顕微鏡で観察した。対照として尿路感染症患者の尿沈査を用いた。<u>TY14003 によるマウス膀胱癌の可視化</u> マウス膀胱発癌モデルを用い、TY14003 (200nM) を膀胱内に注入した後、膀胱を切開し十分に洗浄した。その後、蛍光顕微鏡または蛍光内視鏡を用いて膀胱粘膜を観察した。マウスは、肉眼的には膀胱内に腫瘍を認めないが、病理学的に上皮内癌が確認されるBBN投与 12 週目の時期のマウス (n=6) を用いた。 【結果】1) マウス膀胱発癌モデルでは、BBN 投与 12 週目では 86%(7/8) のマウス膀胱に上皮内癌を、16 週目では全てのマウス膀胱 (n=12) に上皮内癌、うち 33% (4/12) に浸潤性高悪性度膀胱癌(pT1 以上) を認めた。CXCR4 発現は BBN 投与前に比べ 14 週目で有意に発現上昇していた (p<0. 01)。2) 臨床検体における CXCR4 の発現は、非癌尿路上皮 (n=6) に比べ高悪性度上皮内癌 (n=16) で有意に亢進していた (p<0. 01)。一方、低悪性度非筋層浸潤癌(pTa) では発現上昇を認めなかった。3) TY14003 は CXCR4 を発現するヒト膀胱癌細胞株 (3 種) を標識したが、CXCR4 を発現しない線維芽細胞は標識しなかった。尿沈査中の剥離細胞を TY14003 により標識を評価したところ、膀胱癌患者 (n=9) では 79%(SD、9. 4%) の尿路上皮細胞が蛍光標識された。一方、尿路感染患者 (n=5) の尿沈査中には蛍光標識された尿路上皮を認めなかった。4) TY14003 によるマウス膀胱癌の可視化を検討したところ、蛍光顕微鏡および蛍光内視鏡にて蛍光標識される病変が描出された。一方、コントロールプローブでは描出されなかった。また BBN 非投与のマウスでは蛍光標識される粘膜病変は観察されなかった。 【結論】高悪性度膀胱癌では、上皮内癌の段階から CXCR4 の発現が上昇していた。CXCR4 特異的蛍光プローブ TY14003 を用いる事により、尿中に剥離した膀胱癌細胞や肉眼的に同定できない段階のマウス膀胱癌を可視化できることを示した。本研究成果から、CXCR4 を標的とした蛍光イメージング法は新規膀胱癌診断法の開発につながると考えられた。			

(論文審査の結果の要旨)
高悪性度の筋層非浸潤性膀胱癌(上皮内癌)は浸潤・転移をきたしやすいが、上皮内癌は平坦病変であり通常の白色光の膀胱鏡検査では局在診断は容易ではないため、上皮内癌を可視化する検査法の開発は臨床上重要である。申請者は、膜貫通型受容体である CXCR4 の膀胱癌における発現を検討するとともに、CXCR4 を標的分子とした蛍光イメージング法の可能性を検討した。まず、高悪性度膀胱癌を発生する BBN 誘導性マウス膀胱発癌モデルと膀胱癌臨床検体を用いたウェスタンブロット法・免疫染色法での解析を行い、CXCR4 の発現は非癌尿路上皮に比べ高悪性度上皮内癌で有意に亢進していることを見出した。そこで蛍光標識 CXCR4 アンタゴニスト TY14003 を作成し、対照プローブとともに尿中に剥離した尿路上皮細胞の標識を評価した。膀胱癌患者では TY14003 により尿路上皮細胞が蛍光標識された一方、尿路感染症患者の尿沈査中には蛍光標識された尿路上皮を認めなかった。この結果をうけマウス膀胱発癌モデルで TY14003 による上皮内癌可視化を検討したところ、蛍光顕微鏡および蛍光内視鏡にて蛍光標識される粘膜病変が描出されたが、BBN 非投与のマウスでは蛍光標識される病変は観察されなかった。以上により、高悪性度膀胱癌では上皮内癌の段階から CXCR4 の発現が上昇しており、CXCR4 標識蛍光プローブにて尿中に剥離した膀胱癌細胞や肉眼的に同定困難な段階のマウス膀胱癌を可視化でき、CXCR4 を標的とした蛍光イメージング法の可能性が示唆された。
以上の研究は、高悪性度の筋層非浸潤性膀胱癌(上皮内癌)に対する診断標的分子の解明に貢献し、臨床上重要である新規膀胱癌診断法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 23 年 3 月 31 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