

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08744

研究課題名(和文) BCG failure症例に出現する異型細胞の形態学的・分子生物学的研究

研究課題名(英文) Investigation of malignant cells in BCG failure cases using morphometrical and biological methods

研究代表者

渡邊 壽美子 (WATANABE, Sumiko)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：90404087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年問題となっているBCG膀胱療法が効かないBCG failure群に対しては、診断基準は確立されていない。そこで、BCG failure群に出現する異型細胞はBCGに対して反応しない細胞であると考え、本研究を行った。その結果、治療前自然尿細胞診に出現する比較的小型で核中心が濃染する異型細胞は、BCG failureを示唆する細胞である可能性があること、培養細胞の実験から、細胞周期関連タンパクの複雑な動きが関与していること、BCG曝露回数と形態的变化には関連性があり、BCG failure群に出現する異型細胞を診断できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年問題となっているBCG膀胱療法が効かないBCG failure群に対しては、全く検討がなされておらず診断基準は確立されていない。BCG failure群に出現する異型細胞はBCGに対して反応しない細胞(BCG非感受性細胞)であると考えて形態学および分子生物学的検討を行った。BCG failure群に出現するBCG非感受性異型細胞を正確にとらえる研究が進むことは、最適治療法の選択という視点から患者のQOLにとり重要なことであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Intravesical bacillus Calmette-Guerin (BCG) is the standard adjuvant therapy for high-grade non-muscle-invasive bladder tumor (BT). The number of patients for whom BCG treatment does not work (BCG-failure cases) is of concern. Here, we used two methods to examine the characteristics of malignant cells that are observed in the urine cytology of BCG-failure cases: morphologic measurement and intranuclear protein expression using 15 urine cytology with BT and culture cells: T24 and RT4. Using the staining of pRB and p21, the reactive cells for BCG of T24 was fewer than RT4. The malignant cells of 4 BCG-failure cases had the following nuclear features: small nuclear area, large morphological irregularity, and nuclear chromatin that has translocated to the center. It is suggested that the morphological change is correlated with biological activities for BCG exposure, and thus the evaluation of morphology of malignant cells might help determine the effectiveness of BCG treatment.

研究分野：細胞診断

キーワード：BCG failure症例 自然尿細胞診 膀胱癌 培養細胞 核形態指標 細胞周期関連タンパク 診断基準作成

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、膀胱癌に対する BCG 膀胱注入療法 (以下、BCG 膀胱注療法) の機序を研究している中で、BCG 曝露時間と核内タンパク発現の関連性から、BCG を 2 時間曝露させた T24 細胞において細胞周期を停止させる働きがある p21 および p27 の核内発現率が最大となるとともに、細胞周期に入っている指標である pKi67 は減少すること、BCG6 回曝露実験において、p21 と p27 の核内共発現が効果的に細胞周期を停止させることを、見出してきた。また臨床現場において、自然尿細胞診による異型細胞の抽出は膀胱癌の早期発見に寄与しているが、近年問題となっている BCG 膀胱注療法が効かない BCG failure 群 (再発群) に対しては、全く検討がなされておらず診断基準は確立されていない。そこで、我々は、BCG failure 群に出現する異型細胞は BCG 曝露に対して反応しない (BCG 非感受性) 細胞であると考え、その特徴を掴むべく本研究を行った。BCG failure 群を早期発見する判定基準の作成は、BCG failure 群に相当する患者にとって、早期に最適治療を受ける機会に結び付き、臨床的な意義が高いと考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 膀胱癌由来株化細胞を用いて、BCG 非感受性の異型細胞における細胞周期関連タンパクの発現パターンおよび形態学的変化を調べる
- (2) 臨床検体を用いて、BCG failure 群に特異的に出現する異型細胞の特徴を明らかにする、ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BCG 非感受性異型細胞における細胞周期関連タンパク発現パターンおよび形態学的変化：低分化尿路上皮癌由来株化細胞である T24 と、膀胱乳頭腫由来株化細胞である RT4 を用いた。両株とも対数増殖期の細胞に BCG を 2 時間曝露後、細胞周期関連タンパクである pRB および p21、p27 を蛍光色素で標識された抗体を用い、二重染色 (pRB と p21、pRB と p27) を実施した。その後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細な画像を取得し、核内発現状況・Radial Distribution (独自に開発した核クロマチンの分布を客観化する指標で、マイナスになるほど核クロマチンが中心に局在することを表す: RD) 値・核面積・核円形度・核アスペクト比 (核の長径・短径比)・Solidity 値 (核形不整の指標) を計測し、コントロール (BCG の代わりに生食水) と比較検討を行った。各回 200 個の細胞を取得し、3 回独立試験を行い、画像解析には Image J を用いた。

(2) BCG failure 群 (再発群) に特異的に出現する異型細胞の特徴の検索：

病理組織学的に膀胱癌と診断され BCG 膀胱注療法を受け、予後が判明している 15 症例 (再発群：4 例、非再発群：11 例) を対象とした。全症例とも、初診または BCG 膀胱注療法開始前の自然尿細胞診標本を用いた。標本の中心 1cm 区画に出現する尿路上皮細胞は異型の有無に関わらずすべてを対象として光学顕微鏡を用いて画像を取得後、Image J を用いて、RD 値・核面積・核円形度・核アスペクト比・Solidity 値を計測した。

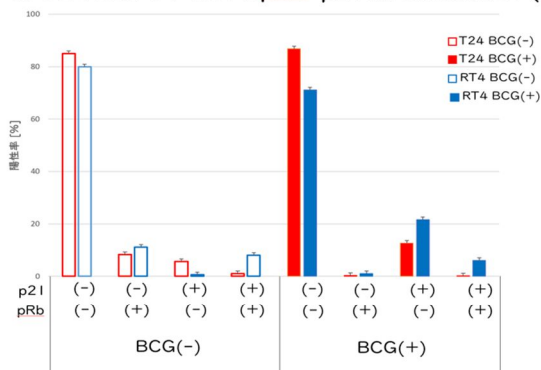
4. 研究成果

(1) pRB と p21 の二重染色による核内発現の有用性：

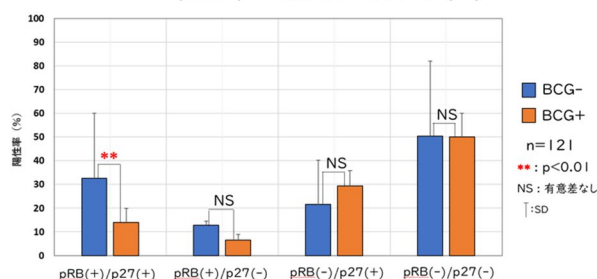
両細胞の対数増殖期は、浸潤癌由来である T24 は培養 4 日目、一方、乳頭腫 (浸潤癌ではない) 由来である RT4 では培養 6 日目であった。対数増殖期の両細胞に BCG を 2 時間曝露させ、pRB と p21 の二重染色を行い、核内発現率を比較した。BCG 曝露前後において、両細胞には pRB 単独核内発現細胞の減少と p21 単独核内発現細胞の増加が観察された (図 1a)。また、BCG 曝露前では、pRB と p21 がともに核内発現が見られない double negative が両細胞とも 80% 以上みられ、有意差はみられなかった (T24: 85.0 ± 1.78 、RT4: 80.0 ± 2.32 、 $p=0.1882$)。しかし、BCG 曝露後では、RT4 では double negative が約 10% 減少したのに対して、T24 では変化がなく有意差がみられた (T24: 86.8 ± 1.71 、RT4: 71.1 ± 5.02 、 $p=0.0001$)。この結果から、T24 は RT4 に比較し BCG 感

図 1 BCG曝露と細胞周期関連タンパクの関連性

a. T24とRT4 におけるpRB・p21核内発現陽性率(%)



b. T24におけるpRB・p27核内発現陽性率(%)



受性細胞が少ない可能性が示唆された。

(2) pRB と p27 の二重染色による核内発現の有用性：

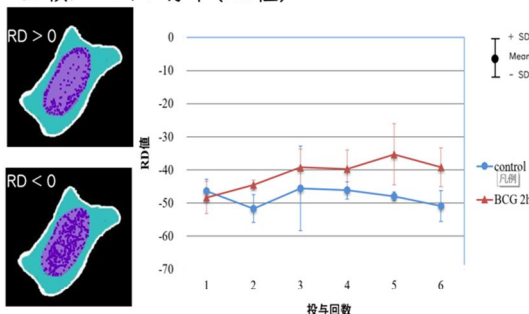
対数増殖期の T24 に BCG を 2 時間曝露させ、pRB と p27 の二重染色を行い、核内発現率を比較した。BCG 曝露前後において、pRB と p27 がともに核内発現が見られない double negative に有意差は認められなかったが、pRB と p27 がともに核内発現が見られる double positive が有意に減少することが分かった (図 1b)。これは pRB と p21 の二重染色とは異なる結果であった。

図2 核内蛋白発現と核形態の関連性

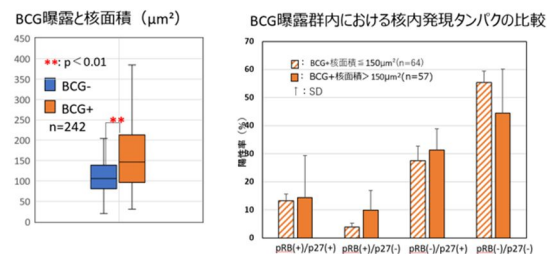
(3) BCG 曝露は核形態に変化をもたらす：

BCG 曝露により T24 では、曝露回数に伴い、核クロマチンの分布 (RD 値) や核形態に変化がみられることが分かった (図 2a)。つまり、BCG 曝露にともない核は丸くなり、核クロマチンは核辺縁に分布する。また、BCG 曝露により RT4 では核面積に大きな変化はみられなかったが、T24 においては核面積が大きくなる傾向がみられた。また、BCG 曝露により核面積が大きくなった (150 μm² 以上) T24 では、核面積に変化がみられなかったもの (150 μm² 未満) に比較し、pRB と p27 がともに核内発現が見られない double negative が少ない傾向がみられた (図 2b)。

a. 核クロマチン分布 (RD 値)



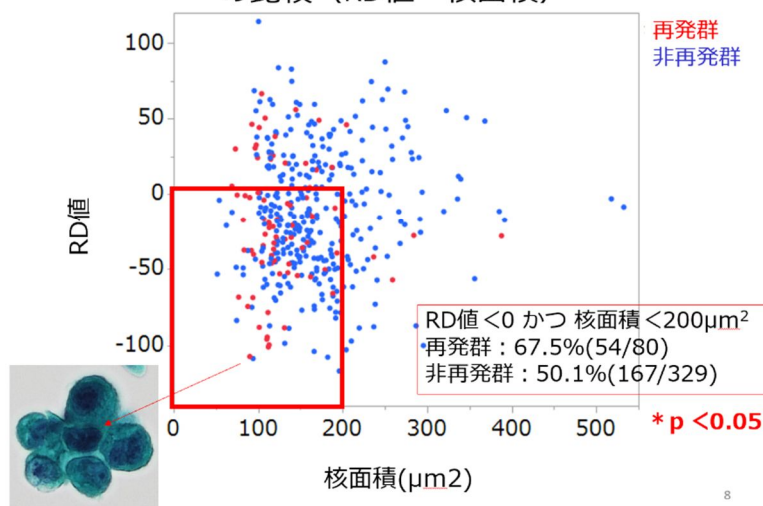
b. 核面積とpRB・p27の核内発現パターンとの関連性



(4) 核中心が濃染し核型不整を有する小型異型細胞は BCG failure 群 (再発群) を示唆する：

初診時細胞診標本に出現する尿路上皮細胞：再発症例 (4 症例：細胞数 61)、非再発症例 (11 症例：細胞数 310) を対象とした。RD 値に関しては、再発症例が -20 ± 4.59 、非再発症例が -12.8 ± 2.38 であった。再発群において RD 値は低い数値となり、核クロマチンがより中心に分布する傾向がみられたが、有意差はみられなかった ($p=0.18$)。核面積に関しては、再発群は $131.6 \pm 5.555 \mu\text{m}^2$ 、非再発症例は $172.8 \pm 3.530 \mu\text{m}^2$ となり、再発群において有意に小さい値となった ($p<0.01$)。核円形度に関しては、再発症例が 0.853 ± 0.00650 、非再発症例が 0.876 ± 0.00295 となり、再発群において有意に低い値となつた ($p<0.01$)。核アスペクト比に関しては、再発症例が 1.36 ± 0.0245 、非再発症例が 1.34 ± 0.0142 となり、有意差は見られなかった ($p=0.23$)。Solidity 値に関しては、再発症例が 0.959 ± 0.00232 、非再発症例が 0.969 ± 0.000580 となり、再発群において有意に低い値となった ($p<0.01$)。つまり、再発群では非再発群に比較し、治療前の尿細胞診において、より小型で核型不整を有している核が出現している可能性が示唆された (図 3)。

図3 初診時自然尿細胞診における再発群と非再発群の比較 (RD値・核面積)



RD値 < 0 かつ 核面積 < 200 μm²
再発群：67.5% (54/80)
非再発群：50.1% (167/329)
* p < 0.05

BCG failure 群 (再発群) の早期の発見には、より多くの症例の集積、および、分子生物学的検討が必要であるが、本研究の結果から、BCG failure 群 (再発群) においては、非再発群に比較して、BCG 膀胱療法前の自然尿細胞診に核中心が濃染し核型不整を有する小型異型細胞がより多く出現していることが分かった。また BCG 膀胱療法開始後に、pRB と p21 の核内二重染色を実施し、核内 double negative の減少率を観察することにより、BCG failure 群を早期に発見することが可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishimura K, Watanabe S, Kato K, Sugishima S	4. 巻 -
2. 論文標題 Serum starvation induces abnormal spindle location, RhoA delocalization, and extension of intercellular bridge with the midbody.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1443791.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 下代清香, 渡邊壽美子, 加来恒壽, 桑岡勲, 杉島節夫, 大屋正文	4. 巻 57(5)
2. 論文標題 子宮頸部扁平上皮病変におけるHPV (human papillomavirus) 感染と細胞像の関連性.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本臨床細胞学会雑誌	6. 最初と最後の頁 251-258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5795/jjscc.57.251	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sumiko Watanabe, Shota Yamaguchi, Naoto Fujii, Natsuki Eguchi, Hitoshi Katsuta, Setsuo Sugishima, Tsuyoshi Iwasaka, Tsunehisa Kaku	4. 巻 71
2. 論文標題 Nuclear Co-expression of p21 and p27 Induced Effective Cell-cycle Arrest in T24 Cells Treated with BCG	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 219-229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10616-018-0278-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hossain Alamgir, Arimura Hidetaka, Kinoshita Fumio, Ninomiya Kenta, Watanabe Sumiko, Imada Kenjiro, Koyanagi Ryoma, Oda Yoshinao	4. 巻 80
2. 論文標題 Automated approach for estimation of grade groups for prostate cancer based on histological image feature analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Prostate	6. 最初と最後の頁 291 ~ 302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pros.23943	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平井絵梨花, 渡邊 壽美子, 加来恒寿, 岩坂剛, 杉島節夫
2. 発表標題 BCG曝露とpRBの関連性
3. 学会等名 第56回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前田裕亮, 渡邊壽美子, 藤井直人, 加来恒寿, 岩坂剛, 杉島節夫
2. 発表標題 BCG曝露におけるT24細胞のp21発現へのp27の影響
3. 学会等名 第56回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鶴留えりか, 渡邊 壽美子, 加来恒寿, 岩坂剛, 杉島節夫
2. 発表標題 血清飢餓状態における培養日数と二核細胞の生存能力に関する検討
3. 学会等名 第56回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 近藤守, 渡邊壽美子, 西村和徳, 加来恒寿, 岩坂剛, 杉島節夫
2. 発表標題 培養日数と二核細胞の変化に関する検討
3. 学会等名 第56回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡邊壽美子、平井絵梨花、藤井直人、江口奈津希、山口将太、加来恒壽、岩坂剛
2. 発表標題 細胞周期関連タンパク発現からみたBCG膀胱内注入療法の効果判定：実験的考察
3. 学会等名 第59回日本臨床細胞学会 春期大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田裕亮、渡邊壽美子、藤井直人、加来恒壽、岩坂剛、杉島節夫
2. 発表標題 BCG曝露によるT24細胞のp21・p27発現における客観的検討
3. 学会等名 第59回日本臨床細胞学会 春期大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森山拓人、渡邊壽美子、軍馬麻紀、鷺山和幸、加来恒壽、杉島節夫
2. 発表標題 BCG failure症例の自然尿細胞診に出現する異型細胞の形態学的検討
3. 学会等名 第59回日本臨床細胞学会 春期大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤守、渡邊壽美子、鶴留えりか、西村和徳、加来恒壽、岩坂剛、杉島節夫
2. 発表標題 栄養状態と二核細胞の細胞周期に関する検討
3. 学会等名 第59回日本臨床細胞学会 春期大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中司成、渡辺寿美子、平井絵梨花、加来恒壽、岩坂剛
2. 発表標題 BCG曝露T24細胞におけるpRbとp21発現の関連性
3. 学会等名 第57回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺寿美子、中司成、上原俊貴、遠峰由希恵、加藤聖子、小田義直、加来恒壽、岩坂剛
2. 発表標題 腺癌細胞の核内所見と細胞周期の関連性：培養細胞を使用して
3. 学会等名 第60回日本臨床細胞学会総会 春期大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中司成、渡辺寿美子、上原俊貴、加来恒壽、岩坂剛
2. 発表標題 BCG曝露T24細胞におけるpRbとp21発現の関連性 II
3. 学会等名 第60回日本臨床細胞学会総会 春期大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原俊貴、渡辺寿美子、前田 裕亮、加来恒壽、岩坂剛
2. 発表標題 蛍光染色を用いたタンパク質発現判定法の検討 - シングルセル解析 -
3. 学会等名 第60回日本臨床細胞学会総会 春期大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原俊貴、大喜雅文、渡邊壽美子、大久保文彦、山元英崇、加藤聖子、小田義直、加来恒壽、岩坂剛
2. 発表標題 内膜細胞診におけるDeep Learningの有用性の検討
3. 学会等名 第35回日本臨床細胞学会九州連合会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細山田理葉、中司成、上原俊貴、加来恒壽、岩坂剛、渡邊壽美子
2. 発表標題 BCG曝露T24細胞におけるpRBとp27の関連性
3. 学会等名 第58回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎遥菜、近藤守、上原俊貴、加来恒壽、岩坂剛、渡邊壽美子
2. 発表標題 二核細胞の分裂に関する検討
3. 学会等名 第58回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	大喜 雅文 (OHKI Masafumi) (10160441)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	勝田 仁 (KATSUTA Hitoshi) (50333240)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	
研究 分 担 者	加来 恒壽 (KAKU Tsunehisa) (60185717)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	