

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20791125

研究課題名（和文） 新規膀胱癌マーカー蛋白質ペリプラキンの尿細胞診への応用と膀胱癌における機能解析

研究課題名（英文） The application of new bladder cancer marker protein ,peripurakin, to urinary cytology and functional analysis.

研究代表者 佐々木 裕 (HIROSHI SASAKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：80349589

研究成果の概要（和文）：

我々は、プロテオミクス解析によって膀胱癌組織で発現が消失する新規マーカー蛋白質ペリプラキン（PPL）を発見した。尿中剥離細胞でPPL発現を免疫組織化学的に検討した。尿中PPL発現は癌患者群でコントロール群と比べて有意に低下した。また、癌陽性で細胞診が陰性であった31例中23例（74.2%）でPPL陽性率が異常値を示した。このことから、PPLの免疫染色と従来の尿細胞診と併用することにより、診断精度を向上させる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：研究成果の概要（英文）： We found the novel cancer marker protein, periplakin, which disappeared appearance by proteomics analysis of the large molecular weight in bladder cancer. We aimed to establish the noncritical inspection method in urine and examining the PPL appearance in the immunohistochemical analysis. In this study, PPL appearance by the shift epithelial cell in urine has significantly decreased in the cancer patient group compared with the control group. Consequently, it was done by immunostaining of PPL and urinary cytology and using it together the possibility of improving the diagnosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：尿器上皮癌・プロテオミクス・ペリプラキン・マーカー・尿細胞診

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は膀胱粘膜に発生する悪性腫瘍で、わが国では1年間に人口10万人あたり約8人の発生が見られる。男女比はほぼ3:1であり、50~70歳台に好発する。膀胱癌は症状が出現しづらく、多くは肉眼的血尿を初発症状として発見されることが多い。早期発見のためには、健康診断で顕微鏡的血尿を認めた時点で尿中剥離細胞の細胞診断を行うことが重要とされている。しかし、尿細胞診の陽性率は70%前後とされ、また診断医による診断のばらつきも大きい。そのため、尿細胞診はあくまでも補助診断の領域を出ず、最終的に多大な苦痛を伴う膀胱鏡内視鏡検査を行う必要性が高い。また、膀胱癌術後の再発の確認にも尿細胞診検査が行われているが、上記のように信頼性が乏しいため、定期的に膀胱鏡内視鏡検査が行われているのが実情である。

2. 研究の目的

我々は、高分子量のプロテオミクス技術によって膀胱癌組織で発現が消失する新規膀胱癌マーカー蛋白質ペリプラキン (PPL) を発見した。本研究では PPL の臨床応用の一環として、尿中剥離細胞でその発現を免疫組織化学的に検討することにより、より精度の高い膀胱癌の非侵襲的検査法を確立することを第一の目的とする。さらに、PPL の膀胱における機能を解析することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 尿中剥離細胞における PPL 発現の検討

①対象

東京慈恵会医科大学で同意を得て採取された尿 (尿路上皮癌患者群 43 例、コントロール群 99 例) を対象とした (表 1)。

②尿中剥離細胞の免疫染色

回収した尿から尿中剥離細胞のプレパラートを作製し、抗 PPL 抗体で免疫染色を行った。

③PPL 発現の評価

免疫組織染色の染色性に関しては、尿中剥離細胞中の移行上皮細胞での PPL 陽性率で評価した。

	Cancer	Control
N	43	99
Sex (M/F)	32/11	74/25
Age, mean (range)	62.9 (36-94)	64.3 (26-94)
Disease		
Bladder Ca	41	
Ureter Ca	2	
Bt post-op f/u		39
Hematuria		38
Others		22
Cytology		
Class I	4	14
Class II	19	76
Class III	8	7
Class IV	2	0
Class V	10	2

④統計解析

尿中剥離細胞での PPL 陽性率と実際の膀胱癌の有無や尿細胞診の結果とを比較し、その臨床的有用性を評価した。

表 1 対象

(2) 尿中での PPL 発現の検討

①対象

東京慈恵会医科大学で同意を得て採取された尿 (膀胱癌患者群 6 例、コントロール群 3 例) を対象とした。

②ウェスタンブロットによる PPL 発現の検討

回収した尿のウェスタンブロットを行い、PPL 発現を検討した。

(3) 培養細胞における PPL の細胞増殖に与える影響

①培養細胞

膀胱乳頭腫由来の RT4 細胞株を使用した。培養には 10% 牛胎児血清と抗生剤、抗真菌剤を添加した Roswell Park Memorial Institute 1640 を用いた。

②PPL ノックダウンプラスミドの作製

BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP (Invitrogen) を用いて、PPL の miR RNAi 発現ベクター用オリゴ DNA (miR RNAi Select, Invitrogen) を組み込んだ PPL miR RNAi 発現プラスミドを作製

した。

③RT4 細胞への PPL ノックダウンプラスミドの導入と細胞増殖の解析

96 well プレートに 0.5×10^4 個/well の細胞を培養した。TransIT-LT1 (Mirus) を用いて、Negative control プラスミドと PPL miR RNAi 発現プラスミドを導入した。

3 日後、細胞増殖を Cell counting kit 8 (Dojindo) を用いて測定した。また、同じ日の細胞から RNA を回収し、リアルタイム PCR にて、PPL mRNA 発現を解析した。

*: $p < 0.01$

4. 研究成果

(1) 尿中剥離細胞における PPL 発現

PPL 発現は、尿中剥離細胞で認められた (図 1)。尿中移行上皮細胞での PPL 陽性率は、尿路上皮癌患者群で 55.0%、コントロール群で 70.5% であり、癌患者群で有意に低値を示した (図 2、Mann-Whitney U-test、 $p < 0.001$)。

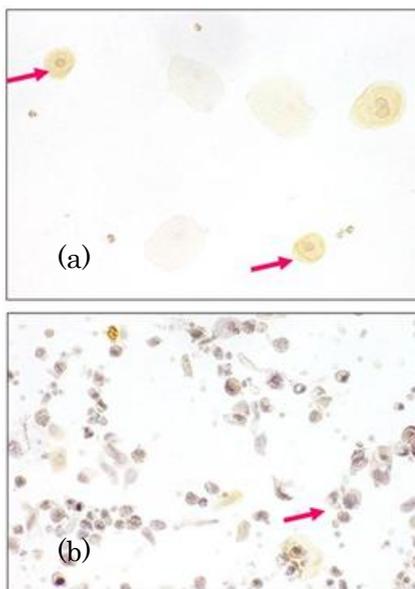


図 1 尿中剥離細胞における PPL 発現
(a) : 正常細胞、(b) 癌細胞

図 2 尿中移行上皮細胞での PPL 発現

ROC 曲線 (図 3) より、PPL 陽性率のカットオフ値を 66% とすると、感度 74.4%、特異度 69.7% で尿路上皮癌を検出できた。

細胞診での結果は、感度 27.9%、特異度 98% であり、細胞診よりも特異度は低いものの高感度に尿路上皮癌を検出できることが明らかとなった。

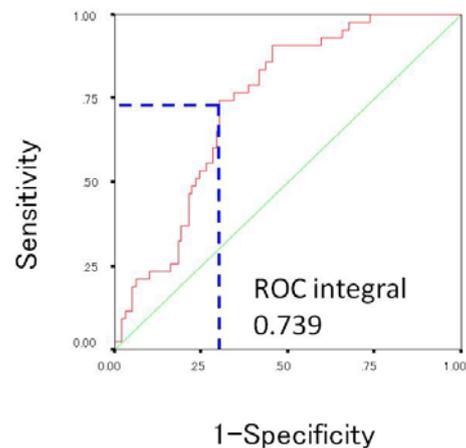


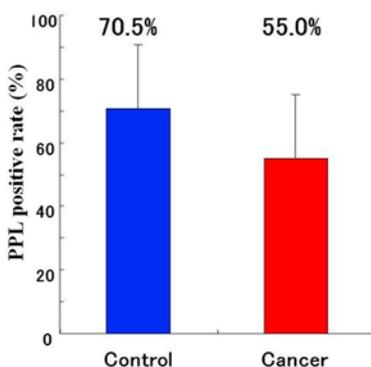
図 3 PPL 発現の ROC 曲線

本検討では、癌患者群であるにもかかわらず、細胞診が陰性 (class III 以下) であった症例が 31 例/43 例 (72%) 存在した (表 1)。この 31 例のなかで、PPL 陽性率がカットオフ値以下の症例は 23 例 (74%) であった。

これらのことから、従来の細胞診検査と PPL 陽性率測定を併用することにより、診断率を向上させる可能性があることが明らかとなった。

(2) 尿中での PPL 発現の検討

これまでの検討は、尿中剥離細胞を対象に検討したものである。この方法では、診断率を向上させる可能性はあるが、自動化し、より簡便に測定することは難しい。そこで、尿中に PPL タンパク質が存在するかどうかを明らかにし、癌患者群とコントロール群でその発現が異なるかどうかをウェスタンブロット法で解析した。PPL タンパク質は、期待さ



れた分子量よりも小さい位置に検出された。これは、PPL の分解産物の可能性があると考えられた。癌患者群 6 例中 5 例、コントロール群 3 例中 1 例でこの小さいタンパク質を認められ、癌で発現が増加し、新たな尿中マーカーとなる可能性が示された。

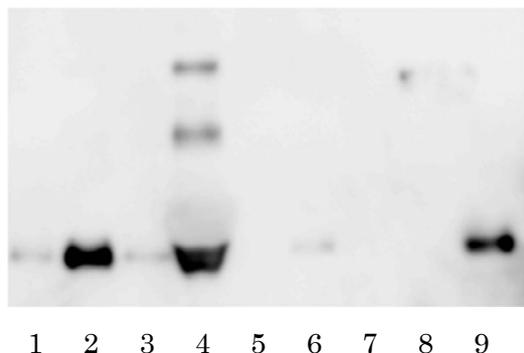


図 4 尿中 PPL 発現のウェスタンブロット法による解析
レーン 1-6：膀胱癌患者尿、7-9：コントロール尿

(3) 培養細胞における PPL の細胞増殖に与える影響

PPL を発現する膀胱乳頭腫由来の RT4 細胞株に PPL をノックダウンする miRNA を発現するプラスミドを導入したところ、PPL の mRNA 発現は 73%に減少した。このとき、PPL ノックダウン細胞の増殖は Negative control と比べ、有意差は認めなかったものの減少した(図 5)。このことから、膀胱癌で PPL が減少することにより、細胞増殖は減少する可能性があることが示唆された。

図 5 RT4 細胞における PPL ノックダウンによる細胞増殖への影響

以上の結果から、PPL の尿中移行上皮細胞での検出は、単独でも感度 74.4%、特異度 69.7%で癌を検出できることが明らかとなった。さらに細胞診検査との併用により、より診断率を向上させる可能性があることが明らかとなった。また、尿中細胞からの検出にとどまらず、PPL は尿でも検出されたことから、この測定がさらに簡便な膀胱癌診断法となる可能性も示唆された。

PPL の膀胱における機能について、今回の検討では、PPL が減少することにより、細胞増殖が抑制される傾向があることが明らかとなった。今後、膀胱癌におけるより詳細な PPL の機能解析を行う必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

鎌田裕子、車英俊、鷹橋浩幸、木村高弘、下村達也、佐々木裕、三木淳、松本和将、西森孝典、朝長毅、野村文夫、山田順子、颯川晋、新規癌マーカー候補タンパク質 Periplakin の上部尿路癌での発現、および尿細胞診での応用、第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009 年 4 月 17 日、岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 裕 (HIROSHI SASAKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：80349589