

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2013～2015
 課題番号：25460459
 研究課題名(和文)核クロマチン分布解析を用いたBCG膀胱内注入療法における治療効果評価法の確立

 研究課題名(英文)Evaluation of Nuclear Chromatin Distribution in Urothelial Atypical Cells for Effectiveness of BCG intravesical instillation therapy

 研究代表者
 渡邊 壽美子(Watanabe, Sumiko)

 九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

 研究者番号：90404087

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：[はじめに]BCG膀胱療法は表在性膀胱癌の標準的治療であるが、作用機序や治療効果判定方法は未だ確立されていない。[方法]尿路上皮癌の尿細胞診標本を用いて異型細胞の核染色性を数値化するとともに、培養細胞を用いて細胞周期関連蛋白を調べた。[結果]再発症例では非再発症例に比べて初診時尿細胞診のRD値が有意に低値を示した。実験的にはBCG曝露によりpRB陽性細胞は、p21の陽性率が有意に高くなる結果を得た。[結論]核染色性の数値化は初診時の再発予測や膀胱療法効果判定に有用である。BCG曝露によりp21の発現が増加し細胞周期逸脱が起こるが、pRB発現が影響している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：[Objective] The purpose of this study is to investigate the usefulness of the nuclear chromatin distribution (NCD) as a predictive factor (PF) and the mechanism of BCG. [Materials and Methods] We analyzed NCDs of atypical cells stained by Pap-method (Pap) and DAPI in 93 urine cytological samples obtained from 16 patients with urothelial carcinoma (UC) using in Image J. And we observed expression of proteins related cell cycle with T-24 cells exposed to BCG. [Results] In cases with recurrence, RD values of nuclei stained by Pap in initial samples were significant lower than in without recurrence. And the positive ratio of p21 in pRB positive T-24 cells was significant higher than in pRB negative cells. [Conclusion] It is suggested that NCD in initial urine cytological samples could be a PF for UC recurrence. And exposure to BCG led to induction of p21 expression related to pRB, then some T-24 cells could escape from the cell cycle.

研究分野：細胞診断学

キーワード：膀胱癌 再発 BCG膀胱内注入療法 クロマチン分布 細胞周期 pRB p21

1. 研究開始当初の背景

近年膀胱癌は、より高齢者にかつ表在性膀胱癌の比率が年次推移で多くなっている。表在性膀胱癌の標準的治療としては、TURBT(経尿道的膀胱腫瘍切除術)のあと BCG(Bacillus Calmette-Guerin: カルメット・ゲラン桿菌)膀胱内注入療法 (BCG 膀胱療法) が選択されることが多く、そのフォローアップに自然尿細胞診検査 (以下、尿細胞診) が活用されている。以前より細胞診において“核クロマチン”の重要性が指摘されてはいるが、その具体的判定法や分子生物学的意味に関しては未だ確立していない。また、現在 BCG の作用機序としては“免疫応答細胞障害説”と“p21 の発現促進による細胞周期の G1/S arrest 説”の2つが提唱されているが、未だ確定されておらず、BCG 膀胱療法後の再発のメカニズムについても議論の余地が残されている。

我々はこれまで『核クロマチンの分布と“悪性度”あるいは“細胞周期”の関連性』について検討を重ね、以下の点を見出してきた。

- (1) 細胞診の代表的な染色である Pap. 法による核の染色性から核クロマチン分布は3つ (辺縁型、中心型、混在型) に分類可能であり、その割合は悪性症例との関連性が高い。
- (2) 核クロマチン分布の辺縁型は細胞周期を逸脱している可能性が高い。
- (3) 核クロマチン分布を客観的に評価する Radial Distribution (RD) 法を独自に開発し、核クロマチン分布を数値化 (RD 値) した。

2. 研究の目的

(1) BCG 膀胱内注入療法における治療効果の判定法として“核クロマチン分布解析”の“有用性”を明らかにする: BCG 膀胱療法が施された膀胱癌症例の長期間観察が可能であった尿細胞診標本を収集し、出現する異型細胞の RD 値を算出し、病理組織診断および予後と合わせて総合的に解析し、治療効果と RD 値の関連性を調べる。

(2) BCG 膀胱注入療法の機序の一つである“細胞周期 arrest 説”の検証: 膀胱癌由来培養細胞を使用し、臨床と同様に6回 BCG 曝露を繰り返すモデル実験を行い、p21 および p27 の発現を二重免疫蛍光染色にて観察し、“細胞周期 arrest”の状況を調べる。

3. 研究の方法

(1) “核クロマチン分布解析”の“有用性”の検討: 尿細胞診標本 (病理組織学的に尿路上皮癌と診断された16症例 (非再発症例10症例、再発症例6症例) 93 標本および非膀胱癌症例3症例: コントロール) を使用

自然尿細胞診 Pap. 染色標本中に出現している N/C 比 0.6 以上かつ細胞長径 15 μm 以上の尿路上皮細胞を選択し、光学および蛍光両方が観察可能な顕微鏡 (オールインワ

ン蛍光顕微鏡) で撮影した。

Pap. 染色標本を脱色後 DAPI 染色を行い、で撮影した同じ細胞をオールインワン蛍光顕微鏡で撮影した。

および で取得した画像から核内グレイ値 (細胞核画像をグレースケール画像に変換し、核内の各ピクセルのグレイ値を測定) および RD 値を計測し Pap. 染色と DAPI 染色画像から得られる核内グレイ値の相関係数 (GY-CC) を算出した。

の過程を該当するすべての細胞に対して行い、各症例ごと経時的に解析した。有意差検定には t 検定および Mann-Whitney の U 検定を用いた。

(2) “細胞周期 arrest 説”の検証: 培養細胞 (T-24 細胞) を使用

T-24 細胞を 5x10⁴/mL の濃度に調整後、37 °C、5%CO₂ の条件下で4日間チャンバースライドを用いて培養。

BCG40mg/mL を2時間曝露後、PBS で洗浄。のちトリプシンで細胞採取。

とを BCG 曝露回数が6回になるまで繰り返した。コントロールは BCG の代わりに生理食塩水を用いた。

pRB 染色: 全 pRB 量を反映する Total-pRB と、pRB の Serin780 のリン酸化を反映する S780 (G1 期) および pRB の Threonin821 のリン酸化を反映する T821 (R-point を超えた S 期) の3種類の抗体を用いて細胞周期の位置を調べた。

Total-pRB と p21 の二重染色を行った。

細胞をランダムに200個選択し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、核内発現、細胞質内発現を検討した (3~6回独立実験実施)。

4. 研究成果

(1) クロマチン分布解析が初診時の再発予測や膀胱療法効果判定に有用である:

Pap. 染色および DAPI 染色双方において、再発症例 (6 症例) では非再発症例 (10 症例) に比べて初診時の RD 値が有意に低値を示した。DNA とマイナスに荷電している核内蛋白双方が染まる Pap. 染色の方が DNA のみを染色する DAPI 染色より RD 値の有意差が大きい結果が得られた (図1)。

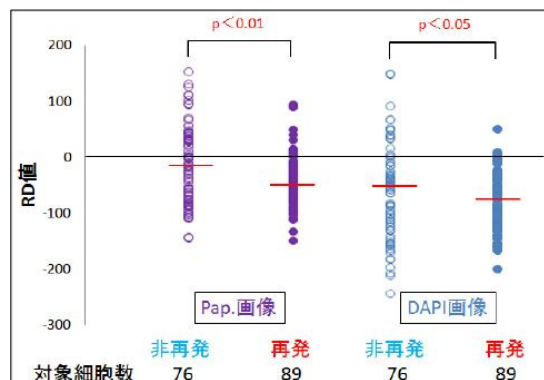


図1. 初診時標本のRD値

初診時標本の GY-CC について非再発症例と再発症例を比較すると非再発症例に比べて再発症例で有意に高い相関が得られた ($p < 0.01$)。しかし、TURBT 後の GY-CC について非再発症例と再発症例を比較すると非再発症例と再発症例の間に有意差は見られなかった ($p = 0.21$)。尿細胞診標本において再発を予測するためには初診時標本が重要である可能性が示唆された。

膀胱療法の過程で非再発症例では核内グレイ値の相関係数 (GY-CC) が低下し、再発症例では上昇する傾向が見られた。さらに、非再発症例では二峰性であったヒストグラムが再発症例では一峰性となった。このことから、非再発症例では GY-CC の低い細胞とやや高い細胞の二種類が出現しているのに対し、再発症例では GY-CC の高い細胞のみが多く出現していることがわかった。この結果から、初診時の GY-CC を比較することでその後の再発を予測できる可能性が示唆された。また、初診時の尿細胞診標本に出現する対象細胞を比較すると、非再発症例よりも再発症例でより核染色性と核 DNA 量が相関している細胞が多く出現している可能性が示唆された。

つまり、初診時の自然尿細胞診標本を用いて核クロマチンを評価した結果 RD 値が有意に低い、GY-CC が有意に高い、Pap. 染色の核内グレイ値が有意に高いことから再発を予測することができ、さらに膀胱療法の過程で GY-CC が上昇することで効果が不良であることを推察できる可能性が示唆された。初診時の RD 値や核内グレイ値は Pap. 染色だけでも非再発症例と再発症例で有意差を認めため、現在行われている尿細胞診で利用できる評価項目であると言える。

(2) BCG 曝露というストレスは細胞周期関連蛋白の発現率に影響し、結果、T-24 細胞の増殖能を低下させる：

p21 と p27 の二重染色から、BCG 曝露の有無および回数に関係なく (1~6 回すべてにおいて) p21 の核内発現は、p27 の核内発現 (+) の細胞においてのみみられ、コントロール群に比較して約 20% 高いことが分かった。つまり、p21 と p27 はともに細胞周期を止める働きがあるといわれているが、両者間にも何らかの関連性が示唆された。

Total pRB 核内陰性細胞では、BCG 群・コントロール群ともに p21 の発現はほとんど見られなかったが、Total pRB 核内陽性細胞では BCG 群で p21 陽性率がコントロール群に比較して、有意に高い結果となった (図 2)。つまり、pRB 発現がない細胞においては、BCG 曝露による p21 の発現増加は望めず、細胞周期を止める効果は低くなる可能性が示唆さ

れた。

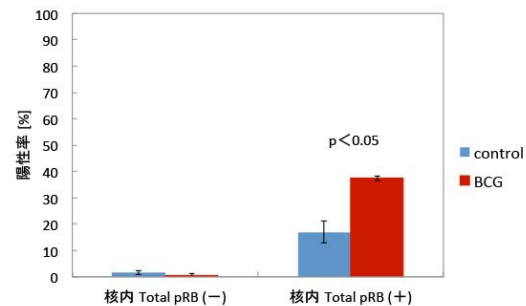


図2. p21の核内陽性率

Total pRB、pRB-S780 については、各曝露回数において有意差はみられなかった。しかし、pRB-T821 では BCG 曝露 2 回目以降で陽性率が有意に低い結果となった。pRB-T821 において 1 回の BCG 曝露でコントロール群との間に有意差がみられなかったことから、BCG 曝露 1 回では pRB のリン酸化には影響しない可能性が示唆された。

核クロマチン分布 (RD 値) に関して、BCG 2h 曝露細胞は、曝露回数が増えるにつれて RD 値が上昇する傾向がみられた。RD > 0 の細胞は核クロマチン分布が中心より辺縁にある事を示しているため、BCG 曝露によって核クロマチン分布が辺縁に位置する細胞が増加していくことが示唆された。つまり、細胞周期から逸脱するものの出現を意味すると考えられる (図 3)。

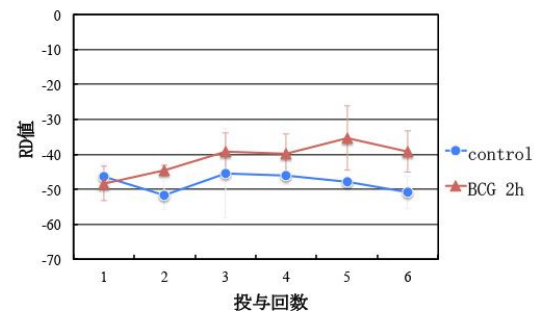


図3. 核クロマチン分布

今後の展望：

以上の結果から、BCG 曝露というストレスは細胞周期関連蛋白の発現率に影響し、結果、細胞の増殖能を低下させていることが分かった。さらにこの現象は通常の細胞診染色における核内クロマチンの状態を詳細に観察することにより、類推可能であることも示唆された。しかし、個々の細胞周期関連蛋白の優位性の問題が残されたため、RT-PCR などを含め分子生物学的手法を追加し、さらなる膀胱癌に対する BCG 膀胱療法における細胞周期停止のメカニズムの解明を進めて行く必要がある。

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 2 件)

軍場麻紀, 渡邊壽美子, 鷲山和幸, 杉島節夫, 加来恒壽. 尿細胞診標本を用いた核DNA ロケーションと Pap 染色法の比較検討. 第 54 回日本臨床細胞学会秋期大会. 20151121. 「名古屋国際会議場」(愛知県・名古屋市).

江口奈津希, 渡邊壽美子, 杉島節夫, 加来恒壽. 膀胱癌培養細胞における BCG 曝露効果の検討-pRB, p21 の発現-. 第 53 回日本臨床細胞学会秋期大会. 20141108. 「下関市民会館」(山口県下関市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 壽美子 (WATANABE, Sumiko)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：90404087

(2)研究分担者

大喜 雅文 (OHKI, Masafumi)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：10160441

勝田 仁 (KATSUTA, Hitoshi)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：50333240

加来 恒壽 (KAKU, Tsunehisa)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：60185717

(3)連携研究者

()

研究者番号：