

令和元年5月7日現在

機関番号：24701  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2016～2018  
 課題番号：16K08653  
 研究課題名(和文)尿路上皮癌の高悪性度化には チューブリンと染色体不安定性が中心的役割を果たす

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of structural and cellular atypia of urothelial carcinoma

研究代表者  
 村田 晋一 (Murata, Shin-ichi)  
 和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20229991  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ヒト膀胱尿路上皮癌における構造異型と細胞異型の分子病理学的形成機序を明らかにすることであった。

A)  $\gamma$ -tubulinの位置異常の解析およびtubulin関連蛋白の発現の解析； $\gamma$ -tubulin発現位置異常が尿路上皮癌の異型度と相関があることを明らかになった。さらに、tubulinに関わる蛋白であるMAP7の発現が異型度や深達度と相関があることを示した。  
 B) In situで点突然変異を視覚化する手法を開発するための基礎的研究；人工核酸PNAをprobeとしたFISH法やin situ RCA法の可能性を探ってきたが、さらに基礎的研究を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、ヒト膀胱尿路上皮癌における構造異型と細胞異型の分子病理学的形成機序を明らかにすることであり、引いては高異型度化の分子機構に繋げることであった。本研究内容は基礎的側面のみならず、主観的に行われている病理診断に対して科学的根拠やより客観性に富んだ診断基準を提供するといった臨床病理学的側面があり、病理形態の観点と遺伝子・染色体異常という腫瘍分子学的観点を関連させて行うユニークな研究であり、他に類を見ない。

研究成果の概要(英文)： Aim of this study is analysis of molecular mechanism of structural and cellular atypia of urothelial carcinoma (UC). Summary of the research results is as follows,; 1) Expression and intracellular positioning of gamma-tubulin (gTub) and microtubule-associated protein (MAP) 7 were related with grade and invasion of UCs. Low-grade UC cases expressed gTub and MAP7 at the surface side near the nucleus, whereas high-grade cases randomly expressed gTub around the nucleus. Moreover, expression of MAP7 in high grade invasive UCs with invasion was decreased. 2) We did not have satisfied results in development of methodology to detect intracellular point mutation of genes in situ. We are still undergoing the development of the methodology.

研究分野：診断病理学

キーワード：尿路上皮癌 MTOC tubulin MAP7

## 1. 研究開始当初の背景

尿路上皮癌は、臨床的予後の良い低異型度群と、強い浸潤や転移を示す高異型度群に分かれ、腫瘍死に至る高悪性度群の発生機序を解明することは臨床的にも重要である。高異型度癌の発生については、発生時より高異型度である de novo 型と低異型度癌が高異型度化する 2 次型がある。いずれにおいても、高悪性度尿路上皮癌の発生には、p53 の遺伝子変異や p16 遺伝子の欠失が関与していると報告されているものの、遺伝子異常と細胞や組織構築の高異型度化との関係はまったく不明である。

一方、我々は、培養細胞やヒト腫瘍組織を使った解析から、悪性腫瘍における構造異型や細胞異型の形成に関わる分子病理学的機構を明らかにしてきた。具体的には、癌細胞に特有の核の切れ込み(核溝)の形成に チュープリンが関与していること(Virchows Arch. 2009)。

大型核や強い核型不整は染色体不安定性とともに起こること (Am J Clin Pathol 2010, ACHC. 2012)、癌細胞のクロマチン分布の異常には chromosome territory が関与していること (Thyroid 2007)、間期細胞内の チュープリンの位置が、正常腺管や高分化型腺癌においては管腔側の一定位置に存在しているのに対して、低分化型腺癌においては細胞内に無秩序に分布していること(Virchows Arch. 2015)、を報告してきた。

以上の研究成果を基に、本研究では解析をさらに進め、ヒト膀胱尿路上皮癌において、低異型度型から高異型度型へ、あるいは非浸潤性から浸潤性へとより高悪性度化する際の分子病理学的機序を明らかにすることを目的とする。我々は、既に研究を開始しており、尿路上皮癌の間期細胞において チュープリンの位置が、低異型度癌では細胞内の内腔側に位置するのに対して、高異型度癌では内腔側・基底膜側問わず無秩序に分布していること、および

高異型度尿路上皮癌において、染色体不安定性が必発していることを認めている。すなわち、尿路上皮癌の高悪性度化には チュープリンと染色体不安定性が中心的役割を果たすという我々の仮説が正しいことを示唆するデータと考えられる。

## 2. 研究の目的

我々は腫瘍細胞の核形態異常(異型)の形成機序を様々な観点から明らかにし、その分子機構を明らかにしてきた (Thyroid 2007; Virchows Arch. 2009; Am J Clin Pathol 2010; ACHC. 2012; Pathology Int. 2013; Virchows Arch. 2015)。本研究の目的は、この研究成果をさらに進め、ヒト膀胱尿路上皮癌において低異型度型から予後不良な高異型度型へと高悪性度化する分子病理学的機序に チュープリンや染色体不安定性が中心的役割を果たしていることを明らかにすることにある。我々は、既に、高異型度尿路上皮癌において、チュープリンの細胞内分布に異常が起こっていることを見だしており、私達の仮説が正しいことを裏付けるデータと考えている。

## 3. 研究の方法

### (研究方法の概要)

本研究は、低異型度および高異型の尿路上皮癌に対して、以下の3つの解析を行う。

- チュープリンとその関連蛋白の細胞内位置異常および核膜蛋白との関連性の解析；  
蛍光免疫組織化学染色により チュープリンやその関連蛋白である Microtubule Associated Protein (MAP) 蛋白群 (MAP4 と MAP7) を染色し、チュープリン、MAP4 と MAP7 の細胞内位置を核と上皮基底膜との関係から半定量的に解析する。また、これらの蛋白と核膜蛋白の関連について解析する。
- p16 遺伝子(9p21)の欠失と染色体不安定性の解析； Multi-color FISH 法によって、3番、7番、17番染色体と9番染色体の9p21を視覚化することによって行う。
- in situ clamp RCA 法の開発と FGFR3 と p53 遺伝子の点突然変異の視覚化  
人工核酸 conjugated PNA は鳥取大学工学部櫻井敏彦准教授と in situ RCA 法は愛媛大学医学部北澤荘平教授らとともに開発を行い、FGFR3 と p53 遺伝子の点突然変異の視覚化を行う。

### (具体的な研究方法)

- チュープリンおよび MAP4 と MAP7 の位置異常の解析；  
多重蛍光免疫組織化学染色法により チュープリンや MAP4・MAP7 を赤色(Alexa Fluor 568)に、細胞膜を E-cadherin で緑色(Alexa Fluor 488)に染色し、DAPI により核染色する。  
緑色の E-cadherin で囲まれた1つの腫瘍細胞内において、ドット状赤色に染まる チュープリンの細胞内位置を DAPI に認識される核との位置関係から半定量的に解析する。  
チュープリンが、核に対して内腔側、基底膜側および核の側方側と3つに分け、その位置をカウントする。  
MAP4・MAP7 の腫瘍細胞内の発現部位や発現強弱について解析する。
- in situ clamp RCA 法の開発のための基礎的研究；  
FGFR3 や p53 遺伝子が wild type の細胞と点突然変異を伴う mutant type のヒト尿路上皮癌由来培養細胞を用いる。  
まず、培養細胞から抽出した RNA/DNA を使った clamp RCA 法を確立する。

一塩基の差異を検知するために最適なプローベ (padlock probe と PNA/LNA probe) の設計は既に完了している (鳥取大学工学部櫻井敏彦准教授のチームとの共同開発)。この時、wild type と mutant type の配列を認識する PNA/LNA probe は異なった種類の蛍光をラベルする。FGFR3 や RAS 遺伝子が wild type と mutant type の培養細胞から抽出した DNA に対して、温度を変化させながら、上記で設計したプローベを用いて、RCA 法を行い、一塩基の違いを検出するための最適な条件を検討する。

培養細胞 (in situ) での基礎的研究

で検討した結果を用いて、in situ RCA 法を行う。RCA 法については愛媛大学医学部北澤荘平教授らとプロトコルの開発を行っている。

in situ clamp RCA 法のヒト膀胱尿路上皮癌組織への応用

in situ clamp RCA 法をヒト膀胱尿路上皮癌組織に応用し、FGFR3 と p53 遺伝子の点突然変異の視覚化を行う。この際、FGFR3 と p53 遺伝子の点突然変異の有無と チュープリンの位置異常を関連させ、細胞単位で両者の異常の関連を解析する。

C) p16 遺伝子 (9p21) の欠失と染色体不安定性の解析;

Multi-color FISH 法によって、3 番、7 番、17 番染色体と 9p21 (p16 遺伝子) を視覚化することによって行う。この際、p16 遺伝子の欠失や染色体不安定性の有無と チュープリンの位置異常を関連させ、細胞単位で両者の異常の関連を解析する。

C-1) 標本作製:

通常の病理パラフィン包埋材料のみならず、出来る限り染色性がよい状態にするため開発した凍結置換法 (Thyroid 2007) によるパラフィン包埋材料も用いる。

\* 凍結置換法による組織固定:

組織小片を -170 に冷やしたイソペンタンとプロパンの混合液中に入れる。

-80 冷却した 2%パラホルム・アセトンで 4-8 時間固定する。

漸次、温度を上げ、室温にする。

通常の手順で、パラフィン包埋材料とする。

C-2) プローベ:

3 番、7 番、17 番染色体セントロメアおよび 9 番上の p16 遺伝子 (9p21) に対するプローベ (いずれも Abbott 社)

必要に応じて自作するプローベ:

BAC (bacterial artificial chromosome) を用いて、特異的遺伝子に対するプローベを作成する。

#### 4. 研究成果

A) チュープリンとその関連蛋白の細胞内位置異常および核膜蛋白との関連性の解析;

非浸潤性尿路上皮癌組織に対して、 $\alpha$ -tubulin と E-cadherin の多重蛍光組織染色を行い、E-cadherin で囲まれる個々の細胞内のドット状に染色される  $\alpha$ -tubulin 発現位置を核の位置との関係から解析した。その結果、 $\alpha$ -tubulin は、低異型度症例では核の表層側に、高異型度症例では核の周囲に不規則に発現していた。

核膜蛋白の解析では、尿路上皮癌症例に対して Emerin, LAP2, Lamin A/C, Lamin B1, Lamin B2, Baf, SUN1 の免疫組織染色を行った結果、各核膜蛋白の発現は、個々の症例によって発現パターンは異なったものの、低異型度と高異型度症例の間で優位な差は認められなかった。

MAP4 と MAP7 について免疫組織学的に解析を行ったところ、MAP4 には有意な変化は認められなかったが、MAP7 の発現が異型度と深達度と相関を示した。すなわち、MAP7 の発現は低異型度症例では tubulin と同様の細胞質内部位にかつ強発現を示したのに対し、高異型度では細胞質内の発現部位の異常や発現の低下が認められ、かつ、深達度が進行するに従い、その傾向が顕著化した。

B) In situ clamp RCA (rolling circle amplification) 法の開発のための基礎的研究;

人工核酸を用いた PNA および PEG-PNA コンジュゲート (鳥取大学・化学生物応用工学専攻; 櫻井敏彦准教授提供) を probe とした FISH 法を行った。共同研究を行っている鳥取大学・化学生物応用工学専攻; 櫻井敏彦准教授のグループが生きた膀胱癌培養細胞内での RAS 遺伝子の点突然変異を特異的に認識することに成功した。しかしながら、我々の研究室では、PNA および PEG-PNA コンジュゲートいずれの方法によっても、点突然変異の細胞内視覚化は良好な結果は得られなかった。

Padlock probes を用いた in situ RCA 法の可能性を探った。まず、液状検体を用いた検討では RAS 遺伝子の点突然変異の検出が可能であった。しかしながら、細胞および組織標本を用いた in situ RCA 法では、点突然変異の細胞内視覚化について、良好な結果は得られなかった。現在、BaseScope による in situ での点突然変異の視覚化の可能性について、基礎的研究を継続している。

C) p16 遺伝子 (9p21) の欠失と染色体不安定性の解析;

Multi-color FISH 法によって、3 番、7 番、17 番染色体と 9p21 (p16 遺伝子) を視覚化することによって、p16 遺伝子の欠失や染色体不安定性の有無を解析した。p16 遺伝

子の欠失は低異型度症例の一部と高異型度症例に、3番、7番、17番染色体の増幅に示される染色体不安定性は低異型度症例にはほとんど認めず、高異型度症例ではほとんどの症例に認められた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計19件)

1. Identification of a novel CCDC22 mutation in a patient with severe Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and aggressive natural killer cell leukemia. Yamashita Y, Nishikawa A, Iwahashi Y, Fujimoto M, Sasaki I, Mishima H, Kinoshita A, Hemmi H, Kanazawa N, Ohshima K, Imadome KI, Murata SI, Yoshiura KI, Kaisho T, Sonoki T, Tamura S. *Int J Hematol*. 2019 Jan 31. doi: 10.1007/s12185-019-02595-0. [Epub ahead of print]
2. High-Risk Human Papillomavirus E6/E7 mRNA Is Rarely Detected in Nonanogenital Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: An RNA In Situ Hybridization-Based Tissue Microarray Study. Fujimoto M, Matsuzaki I, Takahashi Y, Iwahashi Y, Warigaya K, Kojima F, Jinnin M, Murata SI. *Am J Dermatopathol*. 2019 Mar;41(3):205-210. doi: 10.1097/DAD.0000000000001289.
3. Aggressive TFEB-rearranged renal cell carcinoma mimicking chromophobe and clear cell renal cell carcinoma. Kojima F, Kuroda N, Matsuzaki I, Miyai H, Hara I, Murata SI, Hes O. *Pathol Int*. 2019 Jan;69(1):51-53. doi: 10.1111/pin.12744. Epub 2019 Jan 8.
4. Calreticulin Regulates Syncytialization Through Control of the Synthesis and Transportation of E-Cadherin in BeWo Cells. Iwahashi N, Ikezaki M, Matsuzaki I, Yamamoto M, Touda S, Murata SI, Ihara Y, Ino K. *Endocrinology*. 2019 Feb 1;160(2):359-374. doi: 10.1210/en.2018-00868.
5. Intraoperative liquid-based cytology of rinsed tissue fragments from head and neck lesions. Kinoshita Y, Inaba M, Kobayashi TK, Murata SI. *Diagn Cytopathol*. 2019 May;47(5):389-393. doi: 10.1002/dc.24114. Epub 2018 Nov 12.
6. Image Gallery: Granulomatous dermatitis due to infection with the chlorophyllous green alga *Desmodesmus*. Fujimoto M, Inaba Y, Takahashi T, Nakanishi G, Muraosa Y, Yahiro M, Kamei K, Murata SI. *Br J Dermatol*. 2018 Oct;179(4):e167. doi: 10.1111/bjd.17007. N
7. EBV-positive nodal low-grade B-cell lymphoma with BCL3, IgA and IRTA1 expression: Is this a polymorphic lymphoproliferative disorder or an EBV-positive nodal marginal zone lymphoma? Fujimoto M, Yamashita Y, Haga H, Akasaka T, Iwahashi Y, Warigaya K, Kojima F, Hama Y, Tamura S, Sonoki T, Murata SI. *Pathol Int*. 2018 Sep;68(9):538-540. doi: 10.1111/pin.12687.
8. Predominant Improvement of Alpha Cell Function after Steroid Therapy in a Patient with Autoimmune Pancreatitis: Case Report. Takeshima K, Ariyasu H, Iwakura H, Kawai S, Uraki S, Inaba H, Furuta M, Warigaya K, Murata SI, Akamizu T. *Diabetes Ther*. 2018 Jun;9(3):1385-1395. doi: 10.1007/s13300-018-0434-0.
9. Loss of SWI/SNF complex expression in undifferentiated renal carcinoma in acquired cystic kidney. Kojima F, Ueda Y, Matsuzaki I, Hara I, Murata SI. *Pathol Int*. 2018 Apr 19. doi: 10.1111/pin.12671. [Epub ahead of print]
10. A case report of atypical Spitz tumor harboring a novel MLPH-ALK gene fusion with discordant ALK immunohistochemistry results. Fujimoto M, Togashi Y, Matsuzaki I, Baba S, Takeuchi K, Inaba Y, Jinnin M, Murata SI. *Hum Pathol*. 2018 Oct;80:99-103. doi: 10.1016/j.humpath.2018.02.021.
11. 2016 measles outbreak in Japan: A report of two cases with reappraisal of histological features. Iwahashi Y, Fujimoto M, Tanaka M, Kusutani N, Furukawa F, Tsuruta D, Yamamoto Y, Murata SI. *J Dermatol*. 2018 Jul;45(7):e185-e186. doi: 10.1111/1346-8138.14224.
12. Novel Application of Loop-mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of Gene Translocation. Matsuzaki I, Iguchi H, Mikasa Y, Morishita H, Okuda K, Nakaguchi K, Mori Y, Iwahashi Y, Warigaya K, Fujimoto M, Kojima F, Murata SI. *Acta Histochem Cytochem*. 2017 Dec 26;50(6):169-176. doi: 10.1267/ahc.17024. Epub 2017 Dec 7.
13. HER2 is frequently overexpressed in hepatoid adenocarcinoma and gastric carcinoma with enteroblastic differentiation: a comparison of 35 cases to 334 gastric carcinomas of other histological types. Fujimoto M, Matsuzaki I, Nishino M, Iwahashi Y, Warigaya K, Kojima F, Ono K, Murata SI. *J Clin Pathol*. 2018

Jul;71(7):600-607. doi: 10.1136/jclinpath-2017-204928.

14. Macrocystic ductal adenocarcinoma of prostate: A rare gross appearance of prostate cancer. Kojima F, Koike H, Matsuzaki I, Iwahashi Y, Warigaya K, Fujimoto M, Ono K, Urata Y, Kohjimoto Y, Hara I, Murata SI. Ann Diagn Pathol. 2017 Apr;27:7-13. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2016.12.002.

15. Rapid On-Site Evaluation by Endosonographers during Endoscopic Ultrasonography-Guided Fine-Needle Aspiration for Diagnosis of Gastrointestinal Stromal Tumors. Tamura T, Yamashita Y, Ueda K, Kawaji Y, Itonaga M, Murata SI, Yamamoto K, Yoshida T, Maeda H, Maekita T, Iguchi M, Tamai H, Ichinose M, Kato J. Clin Endosc. 2017 Jul;50(4):372-378. doi: 10.5946/ce.2016.083. Epub 2017 Jan 16.

16. Adipophilin expression in cutaneous malignant melanoma. Fujimoto M, Matsuzaki I, Yamamoto Y, Yoshizawa A, Warigaya K, Iwahashi Y, Kojima F, Furukawa F, Murata SI. J Cutan Pathol. 2017 Mar;44(3):228-236. doi: 10.1111/cup.12868.

17. Tumor budding is an independent risk factor for lymph node metastasis in cutaneous squamous cell carcinoma: a single center retrospective study. Fujimoto M, Yamamoto Y, Matsuzaki I, Warigaya K, Iwahashi Y, Kojima F, Furukawa F, Murata S. J Cutan Pathol. 2016 Sep;43(9):766-71. doi: 10.1111/cup.12740.

18. Novel Methodology for Rapid Detection of KRAS Mutation Using PNA-LNA Mediated Loop-Mediated Isothermal Amplification. Itonaga M, Matsuzaki I, Warigaya K, Tamura T, Shimizu Y, Fujimoto M, Kojima F, Ichinose M, Murata S. PLoS One. 2016 Mar 21;11(3):e0151654. doi: 10.1371/journal.pone.0151654. eCollection 2016.

19. A novel immunopathological association of IgG4-RD and vasculitis with Hashimoto's thyroiditis. Minamino H, Inaba H, Ariyasu H, Furuta H, Nishi M, Yoshimasu T, Nishikawa A, Nakanishi M, Tsuchihashi S, Kojima F, Murata S, Inoue G, Akamizu T. Endocrinol Diabetes Metab Case Rep. 2016;2016:160004. doi: 10.1530/EDM-16-0004.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 村田 晋一 「尿細胞診の細胞像と報告様式」富山県臨床細胞学会学術集会(招待講演)2018年
2. 村田 晋一 「膀胱癌の病理診断」スペシャリストと顕微鏡を見る会(招待講演)2018年
3. 村田 晋一 「中心体が関与する核異型や核極性異常の形成」第58回組織細胞化学学会(招待講演)2017年
4. 松崎 生笛、村田 晋一 「LAMP法を応用した遺伝子転座を迅速簡便に検出する手法の検討」第58回組織細胞化学学会2017年

〔図書〕(計 1 件)

村田 晋一 「標準病理学 第6版」(北川 昌伸 編)医学書院 2019

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
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： 村田 晋一
- 2) 研究分担者： 松崎 生笛

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。