

## 論文の内容の要旨

論文題目 EBAG9 の膀胱癌における役割に関する研究

指導教員 北村 唯一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

外科学泌尿器科専攻

熊谷仁平

### 1 はじめに

膀胱癌は、尿路（腎臓・腎孟、尿管、膀胱、尿道、前立腺）に発生する悪性腫瘍の中で、男性では前立腺癌について 2 番目に、女性では最も頻度が高い癌である。膀胱癌は、表在性膀胱癌と浸潤性膀胱癌（筋層、膀胱外への浸潤）に分けられる。新規に診断される膀胱癌の 55–60% は表在性膀胱癌である。表在性膀胱癌の臨床上の問題点としては、経尿道的膀胱腫瘍切除後に頻回に再発を繰り返すため定期的な精査が必要であること、10–20% は浸潤性膀胱癌に進行する

ことが挙げられる。浸潤性膀胱癌の治療は、膀胱全摘術であるが、臨床上の問題点として膀胱全摘術後に再発した場合の治療が困難であること、予後因子として腫瘍進達度 (T)、細胞異型度 (G) が知られているが予後予測が不十分であることが挙げられる。近年、DNA チップ、マイクロアレイ、TOF-MAS によるプロテオミクス、などの分子生物学的手法の技術が進歩したことにより、膀胱癌においても分子生物学的アプローチがなされ、転移に関係する分子として E-cadherin、N-cadherin、増殖を反映する分子として Ki-67、Cell cycle regulator (polo-like kinase, Cyclin)などの研究が進められているが、分子標的治療の target として、あるいは予後因子として活用し日常的にスクリーニングで使用できるレベルには至っていない。

EBAG9(Estrogen receptor binding fragment-associated antigen 9)は、1998 年に Watanabe らにより報告された遺伝子である。免疫組織化学の手法により、乳癌、前立腺癌、腎癌、肝細胞癌、卵巣癌において悪性度の高い癌で、EBAG9 発現が増大することが示された。また EBAG9 の機能に関する報告として、我々の研究によりヒト腎癌において、EBAG9 の発現が予後不良因子であり、腎癌細胞株 Renca に EBAG9 を過剰発現させた株(Renca-EBAG9)は、培養細胞の系では、増殖に変化はないが、BALB/c マウスに移植したところ

Renca-EBAG9 がコントロールと比較して有意に大きな腫瘍を形成することが示された。以上より、EBAG9 はさまざまな腫瘍で過剰発現し、悪性の表現型に寄与していると考えられるが、分子学的機序については明らかでないことが多い。

## 2 ヒト膀胱癌における EBAG9 の発現と予後との関係（研究 1）

本研究では、1982 年より 2000 年までに当院において根治的膀胱全摘術を実施し、文書にて患者の同意を得た膀胱癌 60 症例を対象とした。EBAG9 免疫染色により、EBAG9 発現と臨床病理パラメーターとの相関、および Kaplan-Meier 法により EBAG9 と生命予後との相関を解析した。本研究の結果、EBAG9 は正常膀胱組織においては、膀胱粘膜上皮に染色を弱く認めた。一方、膀胱癌 60 例中 27 例(45%) に EBAG9 の染色を強く認めた。膀胱癌における細胞内局在に関しては、EBAG9 陽性群では、細胞質に均一かつ強い発現を認めた。EBAG9 と臨床病理パラメーターの相関を解析した結果では、EBAG9 発現は、リンパ節転移およびリンパ管浸潤と相関した。 $(P = 0.0008$  および  $0.0017)$ 。Kaplan-Meier 法により生存曲線を解析した結果から EBAG9 高発現群は低発現群に比べて癌特異生存率は有意に不良であった( $P = 0.0001$ )。各臨床病理パラメーターと癌特異生存

率との相関を単変量解析した結果、リンパ節転移および Stage と有意に相關した ( $P = 0.005, 0.018$ )。一方、EBAG9 の発現は  $P < 0.001$  と癌特異生存率との最も有意な相関を認めた。Cox regression hazard model を用いて多変量解析をした結果、EBAG9 は 4 つのパラメーターのうち唯一有意な予後因子であった ( $P = 0.003$ )。

### 3 EBAG9 が培養細胞の系での増殖、軟寒天内コロニー形成、移動能、に及ぼす作用（研究 2）

免疫組織化学の結果を説明するモデルを構築するため、ヒト膀胱癌細胞株 EJ を用いて、癌増殖の機構における EBAG9 の機能解析を行なった。まずヒト膀胱癌細胞株 EJ に N 末 FLAG tag つきの EBAG9 遺伝子またはベクター(pCDNA3)のみを導入した後、薬剤選択にて生存したクローンを回収し、EBAG9 安定発現株 (EBAG9 株)、およびコントロール株 (Vector 株) を得た。次に得られたクローンの EBAG9 の発現を抗 FLAG 抗体および抗 EBAG9 抗体を用いて、Western Blotting にて確認した。EBAG9 発現が、培養細胞の系での増殖に及ぼす影響を調べるため、セルカウンターにより細胞数を経時的に計測した。次に EBAG9 発現が、軟寒天培地コロニー形成に及ぼす影響を調べるため、軟寒天培地で 3 週間培養後コロニー数

をカウントした。さらに EBAG9 発現が細胞移動能に及ぼす影響を調べるため、Boyden Chamber 法によりメンブレン孔を通過する細胞を計測した。本研究の結果、培養条件下での増殖および軟寒天培地でのコロニー形成は、EBAG9 株および Vector 株で統計学的に有意な差はなかった。一方で、EBAG9 株で、同様な培養条件下で、Vector 株と比較して細胞移動能亢進が起きていることを示した。

#### 4 EBAG9 が in vivo において腫瘍増殖に及ぼす作用（研究 3）

EBAG9 発現が in vivo において腫瘍の増殖に及ぼす作用を検討するため、EBAG9 安定発現細胞株を BALB/c nude mouse の背部皮下に移植し、形成された腫瘍を経時的に解析した。移植後、14 日から両群ともマウス背部皮下に肉眼的な腫瘍を確認できた。その後、両群の腫瘍は時間経過とともに増大していったが、計測後、4 週の時点では EJ-EBAG9 腫瘍群は、対照 EJ-Vector 腫瘍群に比べて統計学的に有意に腫瘍増大を認めた。

#### 5 まとめ

本研究の目的は、膀胱癌における EBAG9 の役割を探ることである。まず、私はヒト膀胱癌組織における EBAG9 の発現を検討した。膀

膀胱の約半数（45%）に EBAG9 の発現が確認され、EBAG9 は膀胱癌患者における有用な予後不良因子であった。次に、同蛋白の機能を解析するために、膀胱癌細胞株 EJ に、EBAG9 を導入した EBAG9 安定発現細胞株を作成した。培養細胞を用いた系での腫瘍増殖および軟寒天培地コロニー形成能について EBAG9 発現株と Vector 株で有意な差はなかった。一方、Boyden chamber を用いた細胞移動能の計測により、EBAG9 発現株では Vector 株と比べ、細胞移動能が有意に亢進していた。またヌードマウスに EJ 細胞を移植し腫瘍形成を計測したところ、EBAG9 発現株では Vector 株と比べ、腫瘍が有意に増大していた。以上より、EBAG9 はヒト膀胱癌において予後不良因子であり、EBAG9 発現そのものが、腫瘍の増大に寄与していることが示唆された。