

## 学位論文の内容の要旨

専攻	分子情報制御医学	部門	病態制御医学
学籍番号	04D735	氏名	岡添 誉
論文題目	Expression and Role of GPR87 in Urothelial Carcinoma of the Bladder		

## (論文要旨)

## 【目的】

近年、G蛋白共役型受容体 (GPCR) の中でorphan受容体であったGPR87のligandが生理活性脂質 lysophosphatidic acid (LPA) であることが判明した。LPAは多彩な生理作用を持つ脂質メディエーターとして知られており、これまで悪性腫瘍における増殖能や浸潤能、血管新生などとの関連が報告されている。今回我々は膀胱尿路上皮癌でのGPR87蛋白発現を解析し、病理学的悪性度や腫瘍細胞増殖能との関連を解析する。さらに、ヒト膀胱癌細胞株におけるRNA干渉 (GPR87ノックダウン) 実験を行い、膀胱癌細胞におけるGPR87発現の意義を探る。

## 【対象と方法】

7種のヒト膀胱癌細胞 (J82、RT4、RT112、HT1197、TCSSUP、J253、T24) におけるGPR87遺伝子発現レベルをRT-PCRおよびWestern blot法にて解析した。その結果、高発現を示したHT1197細胞株を用いてshRNA発現アデノウイルス (Ad-shGPR87) を導入した細胞株を作成しGPR87ノックダウン実験を行った。GPR87発現の抑制効果はMTT法にて解析した。

2006年1月から2009年12月までに、当院で経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TUR-Bt) を施行した表在性膀胱尿路上皮癌71症例の病理標本を用いてGPR87の蛋白発現を解析した。男女比は59:12、年齢中央値は72歳 (41-95歳)、臨床病期はTis:2例、Ta:53例、T1:16例、Tumor gradeはlow grade:46例、high grade:25例であった。

GPR87の発現は抗GPR87ラビットポリクローナル抗体を一次抗体として用い免疫組織染色を行った。細胞増殖能についてはKi-67 (MIB-1) indexを用い、評価はKi-67の陽性率が高い視野内での陽性細胞率とし、18%未満をcut-offとした。

また、GPR87の発現別に膀胱内再発 (Intravesical recurrence-free survival) と浸潤性膀胱癌への進行 (progression-free survival) についてKaplan-Meier法 (log-rank test) を用いて解析した。さらに、膀胱内再発について10項目 (性別、発症、腫瘍数 (単発vs. 多発)、最大腫瘍径 (<3cm vs. ≥3cm)、腫瘍タイプ (乳頭状vs. 非乳頭状)、T stage、Tumor grade、膀胱内注入療法の有無、Ki-67 index、GPR87発現) の臨床パラメーターについて単変量および多変量解析を行った。

## 【結果】

7種のヒト膀胱癌細胞株のうち5種 (J82、RT4、RT112、HT1197、TCSSUP) についてGPR87のmRNA及び蛋白の高発現を認めた。

最もGPR87高発現を示したHT1197細胞において、Ad-shGPR87導入120時間後に、GPR87遺伝子発現抑制がみられ ( $p < 0.005$ )、Ad-shGPR87導入細胞株で未導入細胞株と比較して細胞増殖能が10 MOI (multiplicity of infection) で55%、20 MOIで41%と用量依存的な低下を示した ( $p < 0.005$ )。表在性膀胱尿路上皮癌の71症例中38例 (54%) にGPR87陽性を認めた。腫瘍の病理組織学悪性度 (2004WHO/ISUP) とGPR87陽性率は、Low grade (n=46) で48%、High grade (n=25) で64%と有

意な差は認めなかった ( $p=0.136$ )。しかし、Ki-67 indexの中央値は、GPR87陰性群 ( $n=33$ ) で2%、GPR87陽性群 ( $n=38$ ) で13%と有意な差を認めた ( $p<0.0001$ )。

また、Kaplan-Meier法にて膀胱内再発率 (Intravesical RFS) はGPR87陰性群に比べ陽性群では有意に増加していた ( $p=0.010$ )。2年非再発率は陽性群で33%に対して陰性群では66%であった。筋層浸潤性膀胱癌への進行 (PFS) は陽性群において4例認めたのみであったが、統計的な有意差は認めなかった ( $p=0.056$ )。

膀胱内再発について10項目の臨床パラメーターについて単変量解析を行ったところ、腫瘍数 ( $p=0.012$ )、最大腫瘍径 ( $p=0.033$ )、GPR87 ( $p=0.010$ ) が再発に関する因子として有意であったが、その3項目で多変量解析を行ったところ、GPR87のみが膀胱内再発における独立した予測因子であった ( $p=0.041$ )。

#### 【結論】

RNA干渉実験により膀胱癌細胞におけるGPR87を介した増殖刺激シグナルの存在が強く示唆された。表在性膀胱尿路上皮癌におけるGPR87発現はKi-67 labeling indexを用いた細胞増殖能と相関があった。また、GPR87の発現は膀胱内再発と相関があり、筋層浸潤癌への進展に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

掲 載 誌 名	International Journal of Molecular Sciences 第 14 卷, 第 6 号		
(公表予定) 掲 載 年 月	2013 年 6月	出版社 (等) 名	MDPI
Peer Review	④ . 無		