

## 学位論文審査の結果の要旨

平成 25 年 8 月 29 日

審査委員	主査	今井田 克己			
	副主査	鈴木 康之			
	副主査	岡田 信			
願出者	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				
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格 ・ <input type="radio"/> 不合格 (該当するものを○で囲むこと。)				

〔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発現の意義を探索する。

【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.  $\geq 3$  cm)、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。

以上をプレゼンテーション後より、指定討論者、主査、副主査より質問があった。

主な質問は、PR87の発現による腫瘍増殖に関するメカニズムに関して質問を受けたが、現在メカニズムを示している論文はないが、当教室でも解析中であると返答した。

GPR87の染色については細胞膜に存在しているレセプターであるが細胞質内にも存在しているように見えているがどのように考えられるかとの質問を受け、細胞質も染色されている可能性はあり理由は分からないが、核内は染色されていなかったと返答した。

膀胱癌の複数再発例は腫瘍間での染色性の差が無いかとの質問には、今回の手術標本では腫瘍ごとに分けての検討は不可能であったが、ほぼ全体的に均一な染色が見られたと返答した。

また、膀胱癌以外の泌尿器癌についての報告はないかとの質問もあり、現在報告はなく、泌尿器癌以外の肺、子宮頸部、頭頸部の扁平上皮癌で報告されていることを説明した。

最後に今後の実験について質問を受け、今後は膀胱癌では生命予後にかかわる筋層浸潤癌におけるGPR87と予後や病理学的事項との関係について膀胱全摘標本を用いて解析を行う予定であると返答した。

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

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。