

博士論文要旨

所 属 保健医療学研究科博士後期課程
専 攻 (臨床検査学専攻)

学籍番号	219DS01	氏 名	田中 慎一
<p>(博士論文題目)</p> <p>非筋層浸潤性尿路上皮癌における peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-γ) の過剰発現</p> <p>Overexpression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-γ) protein in primary Ta/T1 non-muscle-invasive urothelial carcinoma</p> <p>(目的)</p> <p>尿路上皮組織における PPAR-γ 発現を解明し、尿路上皮癌検出マーカーとして PPAR-γ が有用であるかを明らかにするために研究を行った。</p> <p>(方法)</p> <p>【免疫組織化学染色】</p> <p>国立病院機構四国がんセンターにて、採取された非筋層浸潤性尿路上皮癌 79 症例（低異型度尿路上皮癌 30 症例、高異型度尿路上皮癌 30 症例および上皮内癌 19 症例）および正常尿路組織 30 症例を対象に、パラフィン包埋ブロックを 4μm の厚さに薄切し、これを標本とした。標本は脱パラフィン後、pH 8.5 EDTA バッファーにて 95°C、64 分間の賦活処理を行い、過酸化水素を用いて、内因性ペルオキシターゼの失活を行った。抗 PPAR-γ 抗体 (mouse monoclonal; Santa Cruz Biotechnology, Inc; cat. no. sc-7273; 1:200) を一次抗体に適用し、36°C、32 分間反応させた。発色試薬として I-VIEW DAB Universal Kit (Roche Diagnostics) を使用した。これらの工程は、Benchmark ULTRA (Roche Diagnostics) により機械的に実施した。PPAR-γ 免疫組織化学染色の判定は 4 名の観察者により、PPAR-γ 発現局在、染色強度および染色範囲を判定した。PPAR-γ 染色強度は、0 (発現なし)、1 (弱陽性)、2 (中等度陽性)、3 (強陽性) の 4 段階でスコア化した。PPAR-γ 染色範囲は、0 ($\leq 10\%$)、1 (11-25%)、2 (26-50%)、3 (51-75%)、4 (76-90%)、5 ($\geq 91\%$) の 6 段階でスコア化した。PPAR-γ 染色強度および染色範囲のスコア化は、核発現および細胞質発現ともに実施した。PPAR-γ 染色強度スコアおよび染色範囲スコアの和 ≥ 4 を過剰発現とし、PPAR-γ 核発現スコア ≥ 4 を PPAR-γ 陽性と定義した。更に、尿路上皮癌検出マーカーの有用性検討として、抗 p53 抗体 (mouse monoclonal; Agilent Technologies, Inc.; cat. no. M7001; Ready-to-use) および抗 Ki-67 抗体 (mouse monoclonal; Agilent Technologies, Inc.; cat. no. M7240; 1:100) を同時に染色し、検出精度の比較を行った。</p> <p>【cBioPortal】</p> <p>がんゲノムデータの分析のために、オープンアクセス Web リソースである cBioPortal を用いた。ゲノムデータは TCGA Cell 2017、TCGA Nature 2014 および TCGA PanCancer</p>			

Atlas1 を採用し、尿路上皮癌症例における PPAR- γ の遺伝子異常を調査した。

(結果)

【尿路上皮組織における PPAR- γ 発現解析】

尿路上皮組織において、PPAR- γ 発現局在は核発現、核-細胞質発現、細胞質発現および発現なしの4つの様式を示した。非筋層浸潤性尿路上皮癌 79 症例中 78 症例において、PPAR- γ 核発現もしくは核-細胞質発現が確認された。一方、正常尿路組織 30 症例中 PPAR- γ 核発現もしくは核-細胞質発現が認められた症例は 14 症例であった。正常尿路組織において、最も高頻度に観察された PPAR- γ 発現局在は、細胞質発現であった (15/30 症例)。PPAR- γ タンパク質の局在は、非筋層浸潤性尿路上皮癌症例と正常尿路組織症例の間で有意に異なっていた ($P<0.0001$)。PPAR- γ 核発現および細胞質発現をスコア化した結果、PPAR- γ の核内過剰発現 (以下; PPAR- γ 陽性) は正常尿路組織症例に比し、非筋層浸潤性尿路上皮癌症例において高頻度に観察された ($P<0.0001$)。加えて、非筋層浸潤性尿路上皮癌を増殖様式別に分類したところ、PPAR- γ 陽性を示す症例は、乳頭状尿路上皮癌と比較して、平坦型尿路上皮癌症例では有意に少なかった ($P=0.0002$)。また、PPAR- γ 陽性を示す平坦型尿路上皮癌の PPAR- γ 染色強度は弱い傾向にあり、乳頭状尿路上皮癌と平坦型尿路上皮癌では PPAR- γ 発現の染色強度と染色範囲が異なっていた。PPAR- γ 陽性は病理学的深達度と関連性を示したが ($P=0.0003$)、年齢、性別、および組織学的異型度に関連性は認められなかった。

【尿路上皮癌における PPAR-G 遺伝子異常】

尿路上皮癌における PPAR-G 遺伝子の異常率は 16.99% (70/412 症例; TCGA、Cell 2017)、16.79% (22/131 症例; TCGA、Nature 2014) および 16.3% (67/411 症例; TCGA、PanCancer Atlas) であった。PPAR-G 遺伝子異常の大部分が、遺伝子増幅であり、PPAR-G 遺伝子増幅率は 13.59% (56/412 症例; TCGA、Cell 2017)、14.50% (19/131 症例; TCGA、Nature 2014) および 12.65% (52/411 症例; TCGA、PanCancer Atlas) であった。

【尿路上皮癌検出マーカーとしての有用性】

PPAR- γ 免疫組織化学染色の非筋層浸潤性尿路上皮癌検出感度は 79.7% であり、p53 免疫組織化学染色 (36.7%) および Ki-67 免疫組織化学染色 (44.3%) より高感度な検出マーカーであった。更に、PPAR- γ 免疫組織化学染色の診断オッズ比は 55.13 であった。PPAR- γ と同様に、p53 および Ki-67 は、非筋層浸潤性尿路上皮癌症例と正常尿路組織症例の識別において有意差を示す検出マーカーであった。しかしながら、これらの検出マーカーは低異型度尿路上皮癌の検出率が低く、組織学的異型度により異常発現率が有意に異なった。一方で、PPAR- γ は、非筋層浸潤性尿路上皮癌の組織学的異型度に関わらず、非筋層浸潤性尿路上皮癌を網羅的に検出可能なマーカーであった (低異型度尿路上皮癌; 86.7%、高異型度尿路上皮癌; 93.3%, $P=0.3980$)。更に、PPAR- γ のみが、低異型度尿路上皮癌症例と正常尿路組織症例を明確に鑑別が可能であった ($P<0.0001$)。平坦型尿路上皮癌 19 症例において、最も高感度な検出マーカーは p53 であった (12/19 症例, 63.2%)。しかしながら、PPAR- γ 陽性もしくは p53 異常発現のいずれかを示す平坦型尿路上皮癌は 19 症例中 17 症例であった。

(考察)

尿路上皮組織における PPAR- γ の発現局在、染色強度および染色範囲は、非筋層浸潤性尿路上皮癌症例と正常尿路組織症例間で有意に異なることを示した。更に、平坦型

尿路上皮癌における PPAR- γ 発現解析結果は、組織学的増殖様式との関係性を明らかにした。PPAR- γ の核内過剰発現は非筋層浸潤性尿路上皮癌で有意に多く認められ、p53 および Ki-67 よりも効率的に非筋層浸潤性尿路上皮癌を検出する検出マーカーであることを明らかにした。これらの結果は、PPAR- γ の潜在的なバイオマーカーとしての役割の解明に繋がった。

我々は、PPAR- γ タンパク質が尿路上皮組織の悪性化に伴い、核内において過剰発現すると考えた。卵巣腫瘍における過去の報告では、正常上皮と悪性腫瘍の間で PPAR- γ 発現に有意な差が示され、PPAR- γ は病変の進行に伴い核内で過剰発現することが明らかにされた。本研究では、PPAR- γ 免疫組織化学染色において、高度な核発現と中程度強度の細胞質発現を示す非筋層浸潤性尿路上皮癌症例が認められた。PPAR- γ 細胞質発現は核発現と逆相関を示し、非筋層浸潤性尿路上皮癌症例より正常上皮組織症例において有意に検出された。これらの結果は、PPAR- γ タンパク質が悪性化を伴い、細胞質から核内に移行したことを明らかにした。PPAR- γ は核内で活性化され、いくつかの遺伝子発現を調節する核内受容体型転写因子である。PPAR- γ リガンドは、さまざまな悪性腫瘍においてアポトーシスを誘導することが知られている。PPAR- γ 発現とアポトーシス、細胞周期、および尿路上皮組織の悪性化の関係については、依然として議論の余地があるが、本研究結果は、PPAR- γ 発現に関する基礎的知見を提供した。

尿路上皮癌は組織学的増殖様式に依存して、遺伝子発現異常が異なることが広く知られている。cBioPortal を使用した遺伝子発現解析により、PPAR-G 遺伝子異常が尿路上皮癌で確認されたが、組織学的増殖様式との関係性は不明なままである。過去の報告では、PPAR- γ 発現に関与する因子として組織学的異型度が言及されており、PPAR- γ 核発現は尿路上皮癌の組織学的異型度に逆相関すると報告された。しかしながら、我々の検討では、PPAR- γ 核過剰発現と組織学的異型度に関連性は認められなかった。WHO 分類において、低異型度尿路上皮癌は増殖様式から乳頭状尿路上皮癌と定義され、高異型度尿路上皮癌には、乳頭状、平坦型および浸潤性尿路上皮癌が含まれる。本研究では、PPAR- γ 発現が病理学的深達度で有意に異なることを示したが、Ta および T1 における PPAR- γ 発現に有意差は認められなかった。平坦型尿路上皮癌は病理学的深達度 Tis に対応し、乳頭状尿路上皮癌は病理学的深達度 Ta または T1 に対応する。従って、統計解析結果は、組織学的異型度および病理学的深達度ではなく、組織学的増殖様式に依存していると考えた。

尿路上皮癌と検出マーカーに関する過去の報告では、腫瘍抑制タンパク質である p53 や細胞増殖マーカーである Ki-67 などの特定のマーカーについて言及されている。低異型度尿路上皮癌症例および高異型度尿路上皮癌症例が混在した材料において、p53 免疫組織化学染色の検出感度は 26～59%、Ki-67 免疫組織化学染色の検出感度は 16～58%と報告されている。これらのマーカーは、低異型度尿路上皮癌の検出感度が著しく低い。本研究においても同様の結果が得られた。一方で、PPAR- γ 免疫組織化学染色は組織学的異型度に関わらず、非筋層浸潤性尿路上皮癌を網羅的に検出することができた。また、平坦型尿路上皮癌症例においては p53 が最も高感度な検出マーカーであったが、平坦型尿路上皮癌の検出は、p53 の単独使用よりも PPAR- γ との併用が実用的であると考えた。

本研究対象に筋層浸潤性尿路上皮癌症例もしくは培養細胞株は含まれていない。従

って、筋層浸潤性尿路上皮癌における PPAR- γ 発現は不明確であり、今後さらなる検討が必要であると考ええる。

尿路上皮癌を検出する日常的で侵襲性が低い方法に尿細胞診が挙げられる。尿細胞診は広く普及した手法であるが、尿路上皮癌の検出感度が低いため、有益なスクリーニング方法として確立されていない。尿細胞診断の精度は、尿路上皮癌の分化段階と浸潤の有無に影響される。尿細胞診では、核異型および多形性を示さない低異型度尿路上皮癌を正常な尿路上皮細胞と鑑別することが困難である。初発尿路上皮癌の約 70～75%は低異型度もしくは高異型度の乳頭状尿路上皮癌であり、低異型度尿路上皮癌は尿細胞診で頻繁に遭遇する。本研究の結果では、PPAR- γ 免疫組織化学染色が、低異型度尿路上皮癌を含む非筋層浸潤性尿路上皮癌の検出において他マーカーよりも有益であることを示した。PPAR- γ 免疫細胞化学染色を補助手法として用いた尿細胞診検査は、尿細胞診断の精度を効果的に高める可能性がある。

（結論）

我々は、PPAR- γ が尿路上皮組織の悪性化および組織学的増殖様式によって発現が異なることを示し、乳頭状尿路上皮癌細胞の核において PPAR- γ は過剰に発現することを明らかにした。加えて、PPAR- γ 免疫組織化学染色が、他マーカーよりも非筋層浸潤性尿路上皮癌の検出マーカーとして有用であることを示した。更なる検討が必要と思われるが、本研究は尿路上皮組織における PPAR- γ 発現の解明に貢献し、尿路上皮癌検出マーカーとしての有益性を示すことができたと考ええる。