



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	第 1029 号
氏名	山田 健司
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	UQCRB is involved in bladder carcinogenesis in mouse and human (UQCRB はマウスおよびヒトの膀胱発がんに関与する) Nagoya Medical Journal, accepted for publication.
論文審査担当者	主査： 高橋 智 副査： 中西 真, 郡 健二郎

論文内容の要旨

【背景・目的】膀胱の発がん進展過程は未だ不明な点が多い。近年、がんは遺伝子変化の集積に伴って多段階で生じ、染色体レベルでのゲノムの不安定性（Chromosomal instability : CIN）がみられることが解明されてきた。しかし、膀胱がん患者は遺伝・環境背景が多様で CIN の解析は困難であった。このことから私は、膀胱がんモデルマウスを用いて CIN を検討することにより、ヒト膀胱発がんに関わる遺伝子の同定と解析を行うことを目的とした。

【方法】①array comparative genomic hybridization (CGH) 解析：6週齢の C57BL/6N 雄マウスに 0.05% *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine を自由飲水投与し、膀胱がんモデルマウスを作成した。本モデルマウスは投与開始後 4 週で過形成、12 週で高度異形成、20 週から 26 週にかけて浸潤性膀胱がんを発生するため、各々の時期の膀胱組織より DNA を抽出した。Agilent Mouse Genome CGH Oligo Microarray kit (244K) (Agilent Technologies) を用いて array CGH を行った（投与 20 週後：n=2、26 週後：n=3）。コントロールとして 6 週齢のマウスの肝臓を用いた。CIN の指標として Copy number aberrations (CNA) を観察した。CNA を認めた染色体領域にある遺伝子群について定量 PCR 法を用いてそれぞれの CNA を再検討した。その中よりヒトとの相同性のある ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein (UQCRB) に着目し、以下の検討を進めた。②モデルマウスを用いた解析：膀胱組織の病変部から Pinpoint™ Slide DNA Isolation System (Zymo Research Corporation) を用いて DNA を抽出し、UQCRB の CNA 比を定量 PCR 法を用いて各群間で比較検討した（投与 4、12、26 週後：各群 n=3）。コントロールとして 6 週齢のマウスの正常膀胱粘膜を用いた。また UQCRB と inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現を免疫組織染色で経時的に検討した。③ヒト膀胱がん組織を用いた解析：同一検体のがん部と正常粘膜部から Pinpoint™ Slide DNA Isolation System を用いて DNA を抽出した。定量 PCR 法を用いて CNA 比を各群間で比較した（pTa : n=3、pT1 : n=4、pT2 : n=3、pT3 : n=6）。また UQCRB の免疫組織染色を行い、その局在を検討した。

【結果】①array CGH 解析：array CGH の結果、2D、9F2、11C-D、13B3、14C2 の 5 領域にコピー数の増加を認めた。その領域にある 19 個の遺伝子の中で、1 コピー以上の増加を認め、ヒトとの相同性が明らかな遺伝子は UQCRB のみであった。②モデルマウスを用いた解析：UQCRB の CNA 比は 4 週後より増加傾向を示し、12 週後でピークを認め、26 週後では減少する傾向にあった。また、免疫組織学的検討では UQCRB、iNOS とともに 4、12 週後と徐々に発現の上昇を認めたが、26 週後では、浸潤がん部で発現が低下する傾向にあった。③ヒト膀胱がん組織を用いた解析：深達度の上昇に伴い CNA 比は減少する傾向にあった。免疫組織学的検討において、UQCRB は表在がんでは強く均一に発現していたが、浸潤がん部では不均一な発現傾向を認めた。

【考察】膀胱がんモデルマウスを用いて array CGH を行うことで膀胱発がんに関与する遺伝子 UQCRB を同定した。UQCRB の CNA は浸潤がんでは減少する傾向が、モデルマウスのみならず、ヒトにおいても確認された。さらに UQCRB の CNA はタンパク発現と相関していた。UQCRB はミトコンドリア内に存在し、血管新生を促進することが報告されており、今回の検討では、同じく血管新生に関わる iNOS と同様の染色パターンを示したことから、ヒト膀胱発がんの過程に iNOS を介して関与していることが示唆された。

【結論】ヒト膀胱発がんに関わる遺伝子として UQCRB を同定した。UQCRB は iNOS を介してヒト膀胱発がんの過程に関与しているものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

【目的】 がんの発生には多段階的な遺伝子変化の集積が必要で、近年の研究により染色体レベルでのゲノム不安定性 (Chromosomal instability : CIN) がその過程で生じる事が明らかにされた。そこで本研究では、マウス膀胱発癌モデルを用いて CIN を検討することにより、ヒト膀胱発癌に関わる遺伝子の同定と解析を行った。

【方法】 <実験 1> 6 週齢の C57BL/6N 雄マウスに膀胱発癌物質 *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine を飲水投与し、惹起された膀胱腫瘍組織から DNA を抽出し、Mouse Genome CGH Oligo Microarray (244K) (Agilent 社) を用いて array CGH を行った。CIN の指標として Copy number aberrations (CNA) を観察した。<実験 2> マウス膀胱病変から DNA を抽出し、ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein (UQCRB) の CNA を定量 PCR 法を用いて比較検討した。また UQCRB と iNOS の発現を免疫組織染色で検討した。ヒト膀胱癌において、同一検体の腫瘍部と正常粘膜部から DNA を抽出して CNA を比較し、UQCRB の免疫組織染色を行ってその局在を検討した。

【結果】 <実験 1> array CGH の結果、2D、9F2、11C-D、13B3、14C2 の 5 領域にコピー数の増加を認めた。その領域にある 19 個の遺伝子の中で、1 コピー以上の増加があり、かつヒトとの相同性が明らかな遺伝子は UQCRB のみであった。<実験 2> マウス膀胱発癌過程における UQCRB CNA は 4、12 週と徐々に増加し、26 週後では減少する傾向にあった。また、免疫染色では UQCRB、iNOS とともに 4、12 週と発現上昇を認めたが、26 週では浸潤癌部で発現が低下する傾向にあった。ヒト膀胱癌ではその進展に伴い UQCRB CNA は減少する傾向にあった。免疫組織学的検討において、UQCRB は表在癌では高発現していたが浸潤癌部では発現の減少を認めた。

【考察・結論】 マウス膀胱発癌モデルを用いて膀胱癌に関与する遺伝子 UQCRB を同定した。UQCRB CNA はマウスおよびヒト浸潤癌で同様に減少することが確認された。さらに UQCRB タンパク発現は UQCRB CNA と相関していた。UQCRB は iNOS と血管新生を促進することが報告されており、今回の検討では、この両者が膀胱癌において同様の染色パターンを示したことから、UQCRB は iNOS を介して膀胱発癌に関与している可能性が示唆された。

【審査内容】 主査の高橋から、膀胱腫瘍性病変ごとに UQCRB の copy 数をみたデータはないのか、膀胱癌の表層部と浸潤部では免疫染色学的に UQCRB 発現が異なっているが、これは copy 数の違いを反映していると考えているのか、ヒト膀胱癌において、異型度と UQCRB copy 数の関係について検討しているのか、など 15 項目、第一副査の中西教授からは、CNA を PCR で検討しているが、その信頼性についてはどのように考えているのか、病変が進行するにしたがって UQCRB の copy 数が減少するというデータは PCR エラーの結果ではないのか、copy 数の解析において正常細胞のコンタミネーションによる影響をどのように補正しているのか、など 11 項目、さらに第二副査の郡教授からは膀胱癌のマーカーとしてどのようなものがあるか、この研究における今後の展望についての質問があった。これらの質問に対して申請者から概ね適切な回答が得られ、学位論文の内容を十分に理解していると判断した。本研究は、UQCRB が膀胱発癌に深く関与し、そのマーカーになりうる事を明らかにした。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士 (医学) の学位を授与するに相応しいと判定した。