

学内グラント 報告書

平成23年度 学内グラント終了時報告書

小型尿路上皮癌細胞が持つ癌幹細胞的性格について

研究代表者 周東 真代（保健医療学部 健康医療科学科）

緒 言

尿路上皮癌(UC)は、欧米では最も頻度の高い悪性腫瘍の1つであり、日本でも今後、増加する腫瘍の1つと考えられている^{1,2)}。また、UCは組織学的異型度によって、臨床的予後の良い低異型度症例群と、強い浸潤性や転移を示し腫瘍死に至る高異型度症例群に分類され、それぞれ治療法が大きく異なる^{1,3-5)}。よって、各症例の細胞異型に代表される異型度の判定は、病理診断のみならず治療戦略上も重要である。すなわち、病理学的異型度を客観的に評価し、浸潤や転移能の高い予後不良の症例を早期に検出することが望まれる。

UCの異型度は、構造異型と細胞異型の観点から判断されるが、特に細胞異型の評価が重要な因子である。しかしながら、細胞異型の発生機序は不明な点が多い。我々は、細胞異型の分子病理学的背景を明らかにすべく、multicolor FISH法による染色体解析から染色体の増加が直接、細胞異型の形成に関与していることを明らかにしてきた⁶⁾。この研究の過程において、正常基底細胞に類似する小型癌細胞に注目した。

一方、正常尿路上皮は、基底細胞、中間細胞および表層細胞の3種類の細胞で構成されているが、基底細胞はCytokeratin (CK) 5, CK17や67LR, 中間および表層細胞はCK18やCK20などが発現している⁷⁾。さらに、UCでは、CK5およびCK20の発現異常が知られている^{8,9)}。このような基底細胞の性格をもった細胞がUC組織に存在すると報告されており、癌幹細胞との関連が示唆されている¹⁰⁻¹²⁾。

本研究では異型度の異なる低異型度症例および高異型度症例を対象にCK5を基底細胞、CK20を表層細胞、Ki-67を増殖能の指標として、多重蛍光免疫組織染色を行い、同一細胞の核面積を計測し、細胞核形態、CK発現異常および細胞増殖能の関係を多面的に解析し癌幹細胞的存在について検討した。

材料と方法

対象は、TUR-BTおよび手術材料で採取された低異型度UC5例および高異型度UC7例で、ホルマリン固定パラフィン包埋材料から6 μm切片を作製し、三重蛍光免疫染色を行った。

一次抗体の標識にはZenon Alexa Fluor キットを用いた。一次抗体はCK5 (clone XM26, Novocastra, Mouse mAb, IgG1), CK20 (clone Ks.20.8, DAKO, Mouse mAb, IgG2a), Ki-67 (clone MIB1, DAKO, Mouse mAb, IgG1) を用いた。CK5はZenon Alexa Fluor 555 (Invitrogen), CK20はZenon Alexa Fluor 488 (Invitrogen), Ki-67はZenon Alexa Fluor 647 (Invitrogen)で標識した。

脱パラフィン後、Target Retrieval solution pH9 (DAKO), 95℃, 40分で抗原の賦活化を行い、直接法で4℃一晩反応させた。PBSで5分3回洗浄後、5%ホルムアルデヒドで15分再固定した。再度、PBSで5分3回洗浄後、DAPI-II (Abott)で核染色した。

染色標本は蛍光顕微鏡 (Zeiss) で観察後、各症例の代表的な染色パターンを部位をCCDカメラ (Zeiss) にて対物40倍で撮影し、疑似カラーで重ね併せて染色画像とした。平均142個の腫瘍細胞のCKとKi-67発現パターンおよび核面積を計測した。核面積の計測は、画像解析ソフトIsis (Zeiss)を用いた。

結 果

1. CK発現と異型度の解析 (Table 1)

各症例の解析結果をTable 1に示す。低異型度症例では5例中3例がCK5 (+) /CK20 (+) 細胞を主体とし、高異型度症例では7例中6例はCK5 (-) /CK20 (+) 細胞を主体とした。

低異型度UCより得られた748細胞はCK5 (+) /CK20 (+) 細胞が61%, ついでCK5 (-) /CK20 (+) 細胞が36%であった。一方、高異型度UCより得られた951細胞はCK5 (+) /CK20 (+) 細胞が27%でCK5 (-) /CK20 (+) 細胞が70%であった。CK発現パターンによるカイ2乗検定 $P < 0.01$ で、低異型度UC細胞と高異型度UC細胞において、有意差がみられた。

2. Ki-67とCK発現の解析 (Table 1, Fig. 1)

Table 1の各症例の解析結果ではKi-67によるMIB-1 indexが10%を越えた症例は低異型度症例1例, 高異型度症例5例であった. また, Ki-67(+)細胞(低異型度UC: 59細胞, 高異型度UC: 180細胞)のCK発現パターンを解析したところ, いずれもCK5(-)/CK20(+)細胞が高頻度で低異型度UC細胞は59%, 高異型度細胞は69%であった(Fig. 1). しかし, CK発現パターンによる4群についてマンホイトニのU検定をしたが, 有意差はなかった.

3. CKと核面積の解析

CK発現パターンによる4群の核面積をSteel-Dwas testで比較するとCK5(+)/CK20(+)とCK5(-)/CK20(+)の間に $P < 0.01$ で有意差がみられた.

考 察

1. CK発現と異型度の解析

正常ではアンブレラ細胞のみに陽性であるCK20は,

悪性化することにより全層が陽性に転化することが知られている^{8,9)}. また, CK20の発現はFGFR-3変異よりも先であるとの報告もある¹³⁾. 今回の結果からは異型度にかかわらず, 低異型度UC細胞と高異型度UC細胞でCK20の発現はほとんどの細胞で陽性であった.

一方, CK5の発現は低異型度UC細胞で多いのに対し, 高異型度UC細胞では陰性化していた. 高度に腫瘍化した基底細胞の性質として67LRとCK17さらにはCEACAM6の同時欠乏がみられたというHe Xらの報告に類似していた¹⁰⁾.

CK発現パターンは低異型度症例ではCK5(+)/CK20(+)(+)細胞が主体で, 高異型度症例ではCK5(-)/CK20(+)(+)細胞が主体で異なった. よって, 異型度とCK発現パターンとの間には関連があると考えられた.

2. Ki-67とCK発現の解析

Ki-67(+)細胞は異型度に関わらずCK5(-)/CK20(+)(+)細胞が最も高頻度で, ついでCK5(+)/CK20(+)(+)細胞であった. このことより, MIB1陽性率が高い

Table 1. CK expression pattern and MIB-1 index (%)

Grade	Case	CK5+CK20+	CK5+CK20-	CK5-CK20+	CK5-CK20-	MIB-1 Index(%)
Low	1	71.4	0.0	28.6	0.0	2.9
	2	100.0	0.0	0.0	0.0	0.8
	3	75.9	9.5	13.6	0.9	3.6
	4	35.8	1.5	62.0	0.7	9.5
	5	20.9	0.0	77.8	1.3	21.5
High	6	16.4	0.0	83.6	0.0	9.4
	7	20.0	0.0	80.0	0.0	5.7
	8	25.0	0.0	75.0	0.0	12.2
	9	71.4	0.0	28.6	0.0	20.4
	10	39.2	0.0	56.8	4.1	33.8
	11	12.4	0.0	86.8	0.8	16.5
	12	4.5	5.6	81.6	8.4	28.5

Boxes with grey backgrounds indicate most CK expression pattern.

Boxes with black backgrounds indicate more than 10% MIB-1 positive cells.

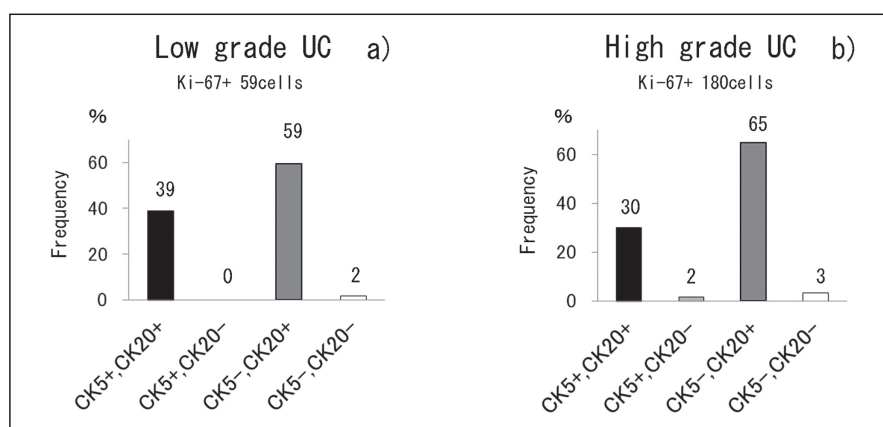


Fig. 1. CK expression pattern of Ki-67 positive cells. a) Low grade UC 59 cells, b) High grade UC 180 cells, Ki-67(+)cells were mainly CK5(-)/CK20(+) cells.

CK5 (−) /CK20 (+) 細胞が増加することが高悪性度と関わっている可能性があると考えられた。

3. CKと核面積の解析

我々は以前の研究結果⁹⁾から高異型度の小型癌細胞の存在に注目してきた。それと同時に癌幹細胞的細胞の性質としてCK5 (+) /CK20 (−) /CD44 (+) 細胞を挙げている研究¹⁴⁾からCK5 (+) /CK20 (−) 細胞を癌幹細胞との関連を示唆して注目していた。今回の解析結果でもCK5 (+) /CK20 (−) 細胞は少数であったが小型細胞として見られた。

細胞増殖能を示すKi-67 (+) 細胞を組み合わせた解析ではCK5 (−) /CK20 (+) 細胞が最も多く見られた。CK5 (−) /CK20 (+) 細胞は小型から大型のものまで様々な大きさで出現していた。このことよりCK5 (−) /CK20 (+) 細胞にも癌幹細胞との関連から注目する必要があると考えられた。

総合するとUCでは正常では表層細胞のみに陽性を示すCK20が全層陽性化し、基底側で発現していたCK5は陰性化した。異型度に関係なく、細胞周期に入っているKi-67 (+) 細胞のほとんどはCK20を発現していた。これらのことから、UC細胞の核の形態異常を形成する背景には、細胞増殖能異常に関係したサイトケラチン発現異常が存在すると考えられた。今後も小型癌細胞の形質について面積を併せた解析を進め、癌幹細胞的性格を検討していきたい。

文 献

- 1) Mueller CM, Caporaso N, Greene MH. Familial and genetic risk of transitional cell carcinoma of the urinary tract. *Urol Oncol* 2008;26:451-64.
- 2) Matsuda T, Marugame T, Kamo K, Katanoda K, Ajiki W, Sobue T. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2003: based on data from 13 population-based cancer registries in the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) Project. *Jpn J Clin Oncol* 2009;39:850-8.
- 3) Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Lyon: IARC Press; 2004.
- 4) Oosterlinck W, Solsona E, Akaza H, Busch C, Goebell PJ, Malmstrom PU, et al. Low-grade Ta (noninvasive) urothelial carcinoma of the bladder. *Urology* 2005;66:75-89.
- 5) Cheng L, Davidson DD, MacLennan GT, Williamson SR, Zhang S, Koch MO, et al. The origins of urothelial carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010;10:865-80.

- 6) Shuto M, Seyama A, Gotoh Y, Kamada K, Nakamura M, Warigaya K, et al. Significant correlation between chromosomal aberration and nuclear morphology in urothelial carcinoma. *Acta Histchem. Cytochem* 2012;45:25-33.
- 7) Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 2008;129:705-33.
- 8) Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002;40:403-39.
- 9) Langner C, Wegscheider BJ, Rehak P, Ratschek M, Zigeuner R. Prognostic value of keratin subtyping in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows Arch* 2004;445:442-8.
- 10) He X, Marchionni L, Hansel DE, Yu W, Sood A, Yang J, et al. Differentiation of a highly tumorigenic basal cell compartment in urothelial carcinoma. *Stem Cells* 2009;27:1487-95.
- 11) McConkey DJ, Lee S, Choi W, Tran M, Majewski T, Lee S, et al. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urol Oncol* 2010;28:429-40.
- 12) Tran MN, Goodwin Jinesh G, McConkey DJ, Kamat AM. Bladder cancer stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010;5:387-95.
- 13) van Oers JM, Wild PJ, Burger M, Denzinger S, Stoeck R, Roskopf E, et al. FGFR3 mutations and a normal CK20 staining pattern define low-grade noninvasive urothelial bladder tumours. *Eur Urol* 2007;52:760-8.
- 14) Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:14016-21.

研究成果リスト

論文

Shuto M, Seyama A, Gotoh Y, Kamada K, Nakamura M, Warigaya K, et al. Significant correlation between chromosomal aberration and nuclear morphology in urothelial carcinoma. *Acta Histchem. Cytochem* 2012;45:25-33.

学会発表

周東真代, 村田晋一, 瀬山敦, 後藤義也, 中村勝, 鎌倉靖夫, 鎌田孝一, 清水道生, 渡辺宏志, 福田利夫. 尿路上皮癌細胞におけるサイトケラチン発現と核形態および細胞増殖能の解析, 第50回日本臨床細胞学会秋期大会, 平成23年10月, 新宿