

(様式4)

## 学位論文の内容の要旨

周東 真代 印

(学位論文のタイトル)

**Correlation analysis of nuclear morphology, cytokeratin and Ki-67 expression of urothelial carcinoma cells**

(尿路上皮癌細胞のサイトケラチン、Ki-67の発現と核形態の相関分析)

(学位論文の要旨)

**【背景】**

正常尿路上皮の研究で高分子サイトケラチン(HWM-CKs)は基底尿路上皮細胞のマーカーで、サイトケラチン(CK)20は表層細胞のマーカーであることが知られている。しかし、尿路上皮癌(UC)では、CK5、CK6、CK14のようなHWM-CKsとCK20を含む種々のCKが異常発現を示すことが知られている。CK発現異常は過去に多くの報告があり、細胞異型に関与する因子の一つとして考えられているにもかかわらず、細胞骨格に関連するUC細胞の核の形態形成を検討する報告は少数である。

さらに最近、いくつかの研究で、尿路上皮癌幹/前駆細胞は、低増殖率と高い寿命を持つ基底尿路上皮幹細胞に似ていることが示されている。このような基底細胞の性格を持った細胞がUC組織に存在すると報告されており、HWM-CKsとCK20はUCの癌幹/前駆細胞のマーカーとしても注目されている。しかし、細胞形態学と癌幹/前駆細胞または分化した癌細胞との間の関係は不明確である。

本研究ではCK5を基底細胞、CK20を表層細胞の指標とし、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することにより、UC細胞のCK発現と細胞増殖活性および核の形態異常の形成の関連を調べた。

**【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 $\mu$ m切片を作製し、CK5、CK20およびKi-67の蛍光三重免疫染色を行った。低異型度UC748細胞および高異型度UC951細胞、総計1699細胞についてCK5、CK20およびKi-67の発現パターンと核面積の計測により核形態との相関の解析を行った。

**【結果】**

CK発現パターンは、CK5とCK20の発現の組み合わせで、CK5(+)/CK20(+)、CK5(+)/CK20(-)、CK5(-)/CK20(+)、CK5(-)/CK20(-)の4群に分類した。UC細胞の大部分はCK5(+)/CK20(+)(40.5%)またはCK5(-)/CK20(+)(56.0%)で異常な細胞分化を示した。基底細胞あるいは癌幹/前駆細胞の表現型であるCK5(+)/CK20(-)細胞は、非常に小さな集団(1.9%)を占め、低増殖活性を示した。

Ki-67とCK発現パターンの相関分析では、Ki-67(+)細胞はKi-67(-)細胞と比較してCK5(-)/CK20(+)細胞は有意に高頻度でCK5(+)/CK20(+)細胞は少なかった。(P<0.01、スチールデュワス検定)。

核面積とCK発現パターンの相関分析では、CK5(-)/CK20(+)細胞(71.3 $\pm$ 25.9 $\mu$ m<sup>2</sup>)の核面積はCK5(+)/CK20(+)細胞(66.6 $\pm$ 25.5 $\mu$ m<sup>2</sup>)に比べて有意に大きかった(P<0.01、スチールデュワス検定)。

UC細胞の異型度とCK発現パターンは、CK5(+)/CK20(+)細胞は低異型度に多かったのに対し、CK5(-)/CK20(+)細胞は高異型度に多かった。

#### 【考察】

UC細胞の大部分がCK異常発現を示す異常な細胞分化をしていた。癌幹細胞仮説は、現在多くの種類の癌で受け入れられており、UCの研究では、いくつかの報告がUC幹細胞の特性を明らかにしているが、癌幹/前駆細胞の明確な生物学的マーカーが発見されていない。CK5(+)/CK20(-)細胞は以前の研究でも腫瘍形成性基底細胞や尿路上皮癌幹/前駆細胞として認識されていたが、本研究でも小集団で低増殖活性を示した。病理細胞学的観点から、CK5(+)/CK20(-)細胞の核形態と尿路上皮癌幹/前駆細胞との間の関係に焦点を当てることが重要であると考えた。

Ki-67(+)細胞は、正常尿路上皮ではCK5(+)/CK20(-)基底細胞の間に見出されるが、異常な細胞分化を示すものに増殖細胞がみられたことがわかった。また、Ki-67(+)細胞の核面積はKi-67(-)細胞より有意に大きかった。これらの結果は我々の以前の報告と互換性のある細胞周期のG2/M期に核のサイズが大きくなることを示している。さらに、Ki-67(-)細胞のうちCK5(-)/CK20(+)細胞はCK5(+)/CK20(+)細胞の核面積より有意に大きかった。細胞分化と増殖活性の観点からCK5(+)/CK20(+)細胞よりもCK5(-)/CK20(+)細胞に異常な細胞特性があるかもしれないと考えた。

最後に、異型度とCK発現パターンは、CK5(-)/CK20(+)細胞は高異型度に多くみられ、高異型度UCの細胞増殖が高頻度でより大きい核の大きさに関連することを示唆していた。

#### 【結語】

我々は、CKの発現パターンと細胞増殖活性に関連した核形態に焦点を当てた。CK5(+)/CK20(-)尿路上皮細胞は癌幹/前駆細胞に加えて、悪性度の低い性質を持つ集団かもしれない。真の癌幹/前駆細胞集団を検出するために、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性のようなUC幹細胞の他のマーカーによって追加の研究が必要である。

さらにKi-67を用いて、細胞周期の増殖期にある細胞の分化に焦点を当てた解析では、CK5(-)/CK20(+)/Ki-67(+)細胞の増加はより高い悪性度と関連しており、過去と現在の研究を考慮して、核の大きさは、染色体数と細胞増殖活性やCK発現パターンに関連していると結論付けた。