

総 説

膀胱癌における中心体複製異常の臨床的意義

松山豪泰

山口大学大学院医学系研究科 情報解析医学系・泌尿器科学講座
宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 膀胱癌, 中心体複製異常, 腫瘍進展, 予後予測

抄 録

【背景】中心体は細胞分裂時, 紡錘体極を形成するタンパク複合体であり, その複製は厳密に調節されている。近年, 種々の癌腫において中心体複製異常(1細胞あたり3個以上の中心体が存在)が報告されている。そこで膀胱癌における中心体複製異常の関与とその臨床的意義について研究を行った。

【対象と方法】中心体複製異常とゲノム変異および細胞周期関連タンパクとの関連を基礎検討する目的で膀胱癌経代培養細胞株8株を対象とした。また中心体複製異常の臨床的意義を検討する目的で膀胱癌臨床検体102例を対象とした。中心体複製異常と検討には抗ペリセントリン抗体を用いた蛍光免疫染色を, ゲノム変異検索目的にはcomparative genomic hybridization (以下CGH)法, fluorescence in situ hybridization (以下FISH)法を, 細胞周期関連タンパク検索目的には免疫組織染色法をそれぞれ用いて実験を行った。

【結果】培養細胞を用いた基礎検討結果より1)中心体複製異常細胞株の定義は中心体複製異常細胞が全体の5%以上を占めること, 2)20番染色体13.2領域のコピー数増加は複製異常細胞株に特異的な変化であり, 同領域上に存在するAurora-A(中心体の成熟化や細胞質分裂を調節するキナーゼタンパクをコード)のコピー数増加および同タンパクの過剰発現が中心体複製異常株でみとめられること, 3)

これまで膀胱癌でもっとも高頻度にコピー数異常が報告されている7, 9, 17番染色体コピー数異常は中心体複製異常細胞に合併して認められること, 4)p53, BubR1などの細胞周期関連タンパクの過剰発現が中心体複製異常細胞に合併していることが明らかになった。臨床検体を用いた検討結果では59例(57.8%)に中心体複製異常を認め, 多変量解析により同複製異常は膀胱癌における臨床進展の独立予後予測因子(Risk ratio: 3.12, 95% CI: 1.36-13.4, p=0.0039)であった。

【結語】中心体複製異常はp53異常と20番染色体13.2領域のコピー数増加によるAurora-A過剰発現により発症しやすく, 膀胱癌における予後予測因子となりうることを示唆された。

はじめに

中心体は細胞分裂時, 紡錘体極を形成するタンパク複合体(assembly)であり, その数はG1後期より複製が開始され, G2-M期には2個となり, 細胞分裂により1個に戻る。その複製および成熟のメカニズムは十分解明されていないものの, 細胞やその遺伝子に種々のストレス(酸化ストレスや放射線, 抗ガン剤などのgeno-toxic stressなど)がかかることにより複製異常(1細胞あたり3個以上の中心体が存在)が発生することが報告されている。

中心体複製異常が種々の癌で発生することは19世紀末に発見されており, Boveriは中心体複製異常が発がんの原因であるという仮説(中心体発がん仮説)

を提唱している¹⁾。その後がん遺伝子やがん抑制遺伝子の発見により、同仮説は忘れ去られていた。しかしその後Vogelsteinらのグループががんは多段階発がんて発生すること、中心体複製異常が染色体不安定性 (chromosomal instability, 以下CIN) を誘導する可能性が示唆されるようになり、ふたたび脚光を浴びるようになった²⁾。

膀胱癌は7番, 9番, 17番染色体など特定染色体の変異が報告され, さらにp53変異が高頻度に認められる³⁾。われわれはこれまでに膀胱癌において7番, 9番, 17番染色体のコピー数異常が頻繁に発生していること^{3, 4)}, p53遺伝子領域の染色体決失が高頻度に発生し, 予後に強い影響を与えていることを報告してきた⁵⁾。そこで膀胱癌における中心体複製異常の関与とその臨床的意義について検討した。

対象と方法

(1) 基礎検討

中心体複製異常とゲノム変異および細胞周期関連タンパクとの関連をする目的で膀胱癌経代培養細胞株8株 (KK47, RT-4, T24, EJ-1, 5637, J-82, TCC-Sup, SCaBER) を対象とした。

中心体複製異常の検討にはウサギ抗ヒトペリセントリン抗体を用いた蛍光免疫染色を試行した。中心体複製異常株に特異的なゲノム変異を検索する目的でcomparative genomic hybridization (以下CGH) 法を行い, 複製異常株と正常株の間の差異を検討した。また7, 9, 17番染色体コピー数異常を検索する目的でfluorescence in situ hybridization (以下FISH) 法を行った。細胞周期関連タンパクとしてp53, BubR1, Aurora-Aを選択し, それぞれのモノクローナル抗体を用いて免疫組織染色法を行った。

(2) 臨床検討

治療 (経尿道的腫瘍切除術) の際, 同意の得られた膀胱癌患者102例より生検検体を採取し, ただちに -80°C で保存し, 実験に供した。症例の背景因子を表1に示す。男女比は78/24, 平均年齢は69.4歳, 病理組織学的異型度はgrade 1: 6, 2: 61, 3: 35, 病期はpTis: 2, pTa: 32, pT1: 68例であった。

生検検体はポリ-L-リジン塗布スライドガラス上にタッチ生検後風乾させ, カルノア固定 (FSIH法

検体) または -20°C 100%メタノール固定 (中心体免疫蛍光法) を行った。

FISH法は以前の報告³⁾ に準じて行った。プローベは7, 9, 17番染色体セントロメア領域のプローベ (CEP7, 9, 17, Vysis) および20q13, 2領域のプローベ (LSI ZNF217, Vysis) を用いた。カルノア固定後のプレパラートにプロトコールにそって接触ハイブリダイズ (overnight) させ, tripleband pass filter (DAPI/Spectrum Green/Spectrum Orange) を装着した蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo) 下で150個以上の核内シグナルをカウントした。

中心体蛍光免疫染色法は以前の報告⁷⁾ に従って行った。すなわちメタノール固定後検体をTritonX処理後, 一次抗体 (ウサギ抗ヒトペリセントリン抗体) を接触 (4°C , 24-48時間) させ, 洗浄後2次抗体 (Alexa594) を添加, DAPIにて核を染色後, 蛍光顕微鏡下で最低100個以上の細胞を観察し, 中心数をカウントした。

基礎検討の結果より中心体複製異常症例の定義は中心体複製異常細胞 (1細胞あたりの中心体が3個以上の細胞) が全体の5%以上を占める場合とした。CINは7, 9, 17番染色体コピー数のヒストグラムを作成し, モード以外のコピー数が全体に占める割合をvariant fraction (ばらつき分画) とし, 平均variant fractionが25%以上をCINと定義した。

表1 非浸潤性膀胱癌102例の症例背景因子と中心体複製異常

男/女:	78/24
平均年齢(中央値)	69.4±11.8歳(70.5)
Grade	1:6, 2: 61, 3: 35
Stage	pTis: 2, pTa: 32, pT1: 68
尿細胞診陽性	43 (45.6%)
平均観察期間(中央値)	48.7±34.3ヶ月(37.2)
再発	48 (47.5%)
腫瘍進展	18 (17.8%)
中心体複製異常	59 (57.8%)

結 果

(1) 培養細胞株を用いた基礎検討

表2に各培養細胞株の中心体複製異常細胞の割合, CGH法およびFISH法による20q13 gainの有無, 免疫組織染色法によるAurora-A過剰発現の有無を示す. 中心体複製異常細胞が5%以上を複製異常株と定義するとKK47, RT-4以外の6株はすべて複製異常株となり, CGH法による20q13 gain(図1), FISH法による20q13 gain(図2(a)), およびAurora-A過剰発現(図2(b))を認めた. 以上の結果より中心体複製異常症例の定義は中心体複製異常細胞が全体の5%以上を占める場合とした.

中心体数と染色体コピー数との関連について検討したところ, 中心体複製異常の細胞では染色体数コ

表2 膀胱癌継代培養細胞株を用いた基礎検討結果

Cell line	CA (%)	CGH 20q gain	FISH 20q13 gain (%)	Aurora-A overexpression
KK47	- (1.2)	-	- (2)	-
RT-4	- (0.7)	-	- (3.5)	-
T24	+ (6.78)	+	+(100)	+
EJ-1	+ (6.1)	+	+(98.5)	+
5637	+ (8.8)	+	+(89.5)	+
J-82	+ (9.64)	+	+(99)	+
TCC-sup	+ (15.4)	+	+(99.5)	+
SCaBER	+ (16)	+	+(100)	+

表3 中心体複製異常と20q13 gain, Aurora-A過剰発現の関係

	20q13領域コピー数増加		P-value	Aurora-A過剰発現		P-value
	あり	なし		あり	なし	
中心体複製異常 あり	30	19	<0.0001	43	6	<0.0001
なし	0	33		7	26	

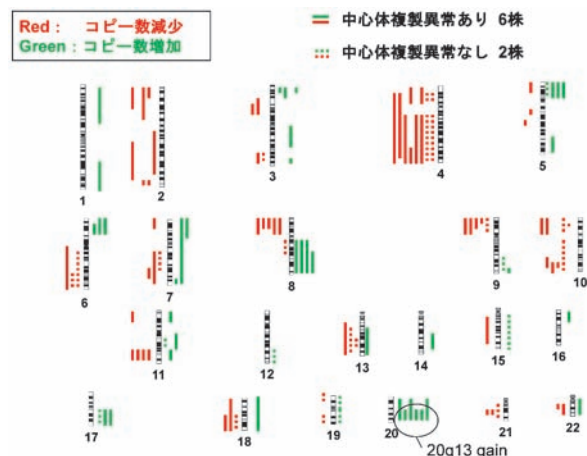


図1 膀胱癌継代培養細胞株を用いた Comparative Genomic Hybridization結果

ピー数異常の合併を認めた(図3).

(2) 臨床検体を用いた検討

中心体複製異常は102例中59例(57.8%)に認められた(表1). 図4に代表的な中心体複製異常症例の蛍光免疫組織染色結果を示す.

中心体複製異常症例はFISH法による20q13 gainおよびAurora-Aタンパク過剰発現と有意の相関を認めた(表3).

次にこれらの症例の臨床経過を観察し, 予後を検討した(平均観察期間48.7ヵ月). 腫瘍再発および

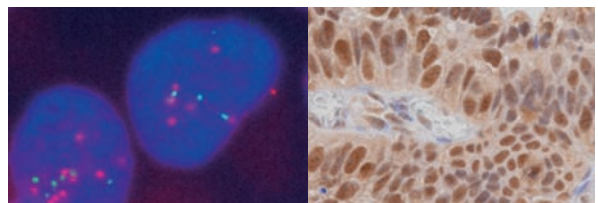


図2 20q13.2領域コピー数増加とAurora-Aタンパク過剰発現
赤: 20q13.2領域のシグナル, 青: 20番染色体セントロメアシグナル

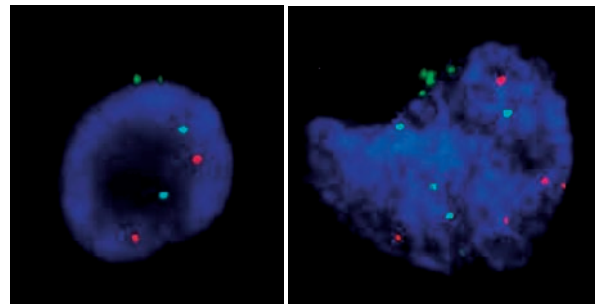


図3 中心体複製異常(CA)と染色体コピー数異常との関係

(a)は中心体数2個に対して7番, 9番染色体コピー数も2個と正常であるのに対して(b)は中心体複製異常(中心体数5個)に7番, 9番染色体コピー数異常(いずれも5個)が合併している. 緑: 中心体, 赤: 7番染色体, 青: 9番染色体

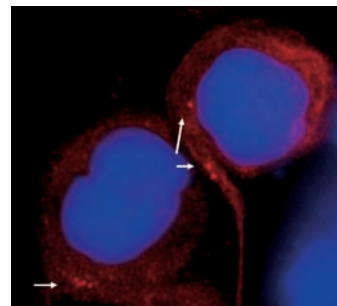


図4 中心体複製異常症例
左: 4個, 右: 3個の中心体(矢印)を求める
% centrosome amplification: 15%

腫瘍進展はそれぞれ48例 (47.5%), 18例 (17.8%)に認められた。Kaplan-Meier法を用いた検討では中心体複製異常症例は正常例に比べ、有意に腫瘍進展までの期間が短かった (図5)。Coxハザードモデルを用いた非浸潤性膀胱癌の腫瘍進展に関する予後因子では中心体複製異常は腫瘍進展を予測する独立予後予測因子であった (表4, Risk ratio : 3.12, 95% CI : 1.36-13.4, p=0.0039)。

また中心体複製異常と細胞周期調節タンパクとの関連を検討すると中心体複製異常症例は1) 20q13 gainを合併する群 (20q13 gain群), 2) BubR1変異とp53変異を合併する群 (BubR1+p53変異群), 3) 1) 2) のいずれにも属さない群 (その他の群)

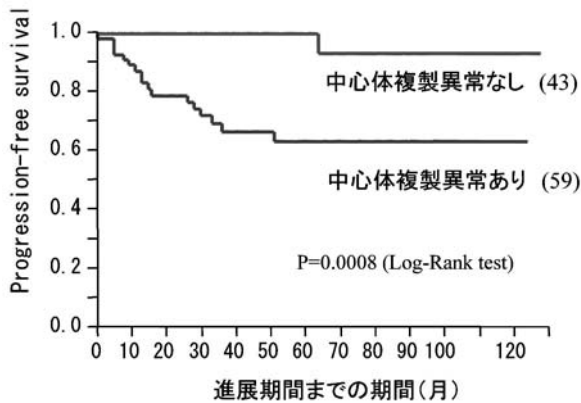


図5 中心体複製異常と腫瘍進展の関係

表4 Coxハザードモデルを用いた非浸潤性膀胱癌の腫瘍進展に関する予後因子

Factor	Category	Univariate			Multivariate		
		Risk Ratio	95% CI	P-value	Risk Ratio	95% CI	P-value
Stage	pTa vs. pT1	1.06	0.65-1.87	0.8278	-	-	-
Washing solution Cytology	Negative vs. Positive	1.72	1.06-2.93	0.029	1.31	0.80-2.28	0.2882
Touch CA	No vs. Yes	3.71	1.68-15.7	0.0002	3.12	1.36-13.4	0.0039
Grade	1,2 vs. 3	2.54	0.98-6.59	0.0543	-	-	-

表5 中心体複製異常のメカニズムと各種パラメーターの関係

	20q13	BubR1+p53	Othres	P-value
DNA index (SD)	1.75 (0.53)	1.81 (0.55)	1.09 (0.27)	<0.0001
CA細胞の割合 (SD)	11.3% (4.51)	11.8% (4.85)	16.5% (7.22)	0.0149
Months to progression (SD)	38.5 (27.6)*	20.3 (16.4)*	36.6 (30.0)	<0.05*
Months to recurrence (SD)	23.1(22.3)	14.2 (13.5)	23.1 (23.0)	0.316
Tumor grade				
1,2	5	2	15	<0.0001
3	9	20	3	
Pathological stage				
pTa	0	2	2	0.0021
pT1	10	10	8	
>=pT2	5	10	8	
Tumor size				
<1	2	1	7	0.0725
1-3	7	9	5	
>3 cm	6	12	6	
Urine cytology				
Negative	6	0	14	<0.0001
Positive	9	17	4	

* Unpaired t test

の3つのグループに大別され、BubR1+p53変異群は他の2群に比べ、尿細胞診陽性例が有意に多く、腫瘍進展までの期間が優位に短く、予後不良な経過をたどることが示唆された。一方その他の群に分類されたグループはDNA indexが1 (diploid) に近く、異型度が低く、腫瘍径が小さく、尿細胞診陽性例が少なく、癌の生物学的悪性度が低いことが示唆された (表5)。

考 察

中心体複製異常は種々の原因 (多くは細胞やその遺伝子に対する酸化ストレスや放射線, 抗ガン剤などのgeno-toxic stressなど) により発生する。しかし多くの複製異常細胞は一過性であり、分裂期チェックポイントにより細胞周期が停止すると分裂期崩壊 (mitotic catastrophe) をおこし消滅する。BubR1はmicrotubuleが染色体キネトコアへの接着を制御するキナーゼタンパクであり、分裂期チェックポイントの重要な役割を果たしている。同タンパク発現が異常をおこすと分裂期が進行し細胞周期がG1期に進行するmitotic slippageが発生する^{8, 9)}。しかしmitotic slippageによりG1期に入った細胞もp53が正常であれば、p53が調節するG1チェックポイントにおいて細胞周期が停止し、アポトーシスへむかうこととなる。しかしここでもp53変異により同チェックポイントが働かない場合、細胞周期は進行し、染色体分配異常が発生し、染色体異数体 (aneuploidy) が発生、最終的には染色体不安定性 (chromosomal instability, 以下CIN) を獲得すると推定されている。われわれは膀胱癌臨床検体において約60%に中心体複製異常が発生し、複製異常細胞内で実際に染色体コピー数異常が発生していることを報告している⁷⁾。膀胱癌では約半数にp53変異があることが報告されており、中心体複製異常をきたしやすい状態にあるといえよう。

遺伝子不安定性 (genetic instability) はCINとDNAミスマッチ修復遺伝子異常により遺伝子異常が発生しやすい状態となる microsatellite instability (以下MIN) に大別され、癌化に強い影響を与えていることが推定されている¹⁰⁾。われわれが膀胱癌の遺伝子不安定性を検討したところMINは全体の10%以下であり、約50%がCINであった¹¹⁾。

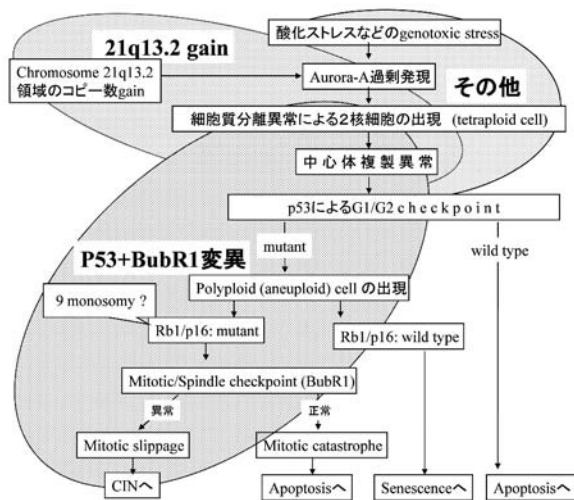


図6 中心体複製異常の発生機序

これは大腸癌（全体の約30%）とは明らかに異なり、癌の生物学的特性が異なることが示唆される。

中心体複製異常が種々の原因で発生することはすでに報告されている。われわれは継代培養細胞において中心体数が偶数である場合、染色体コピー数も偶数に増加しているという規則的な関係がみられ、とくに中心体数が4個の細胞においては細胞質分離異常（cytokinesis failure）がその主な発生機序であることを報告した。また膀胱癌においてBubR1過剰発現がタンパクレベルで発生し、過剰発現症例は中心体複製異常、CINを高頻度に合併し、予後不良であることを報告した¹²⁾。文献的にも20q13上に存在するAurora-Aキナーゼタンパクの過剰発現は膀胱癌において高頻度に発生し、中心体複製異常やCINを誘導している可能性が報告されている^{13, 14)}。図6は臨床例において3つの異なる機序と障害されている遺伝子を示したものである。このなかでもBubR1変異とp53変異を合併する中心体複製異常が最も予後不良であることが証明され、今後予後不良な膀胱癌症例の予測因子としての有用性が示唆される。

中心体複製異常は膀胱癌において高頻度に発生しているイベントであるが、これが膀胱癌の発生や腫瘍進展の根源的な変異であるか否かは不詳である。しかし臨床例における予後や生物学的悪性度に強く相関しており、予後予測のための分子マーカーとしての有用性は期待できる。またその発生機序を明らかにする過程で発見された遺伝子や細胞周期関連タンパクは今後の新規膀胱癌治療のターゲットとなり

うる¹⁵⁾。今後の研究の発展が期待できる分野であるとおもわれる。

結 語

(1) 非浸潤性膀胱癌102例における腫瘍タッチ生検を検体とした中心体複製異常の頻度は57.8%であり、腫瘍進展を予測する独立予後因子であった。

(2) 異なる検体間（腫瘍タッチ生検、膀胱洗浄液）の中心体複製異常結果の一致率は89.7%であり、膀胱洗浄液を検体とした中心体複製異常検索の妥当性が示唆された。

(3) 中心体複製異常の主な発生機序として 1) 20q13.2領域コピー数増加によるAurora-Aタンパク発現亢進に起因する中心体成熟異常および細胞質分離異常 2) BubR1の発現亢進に起因するspindle checkpoint破綻による癌細胞のM期脱出とp53変異によるpost-mitotic checkpointの破綻 3) genotoxic stressに起因するその他のメカニズムが示唆された。

文 献

- 1) Duesberg P, Rasnick D. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000 ; 47 : 81-107.
- 2) Langauer, C. Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997 ; 386 : 623-627.
- 3) Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW, Reuter VE. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst* 1993 ; 85 : 53-59.
- 4) Matsuyama H, Bergerheim US, Nilsson I, Pan Y, Skoog L, Tribukait B, Ekman P. Nonrandom numerical aberrations of chromosomes 7, 9, and 10 in DNA-diploid bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1994 ; 77 : 118-124.
- 5) Tsukamoto M, Matsuyama H, Oba K, Yoshihiro S, Takahashi M, Naito K. Numerical

- aberrations of chromosome 9 in bladder cancer. A possible prognostic marker for early tumor recurrence. *Cancer Genet Cytogenet* 2002 ; **134** : 41-45.
- 6) Matsuyama H, Pan Y, Mahdy EA, Malmström PU, Hedrum A, Uhlen M, Busch C, Hirano T, Auer G, Tribukait B, Naito K, Lichter P, Ekman P, Bergerheim USR. p53 deletion as a genetic marker in urothelial tumor by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 1994 ; **54** : 6057-6060.
- 7) Yamamoto Y, Matsuyama H, Furuya T, Oga A, Yoshihiro S, Okuda M, Kawauchi S, Sasaki K, Naito K. Centrosome hyperamplification predicts progression and tumor recurrence in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2004 ; **10** : 6449-6455.
- 8) Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998 ; **392** : 300-303.
- 9) Lee J, Lee CG, Lee KW, Lee CW. Cross-talk between BubR1 expression and the commitment to differentiate in adipose-derived mesenchymal stem cells. *Exp Mol Med* 2009 ; **41** : 873-879.
- 10) Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998 ; **396** : 643-649.
- 11) Yamamoto Y, Matsuyama H, Kawauchi S, Furuya T, Liu XP, Ikemoto K, Oga A, Naito K, Sasaki K. Biological characteristics in bladder cancer depend on the type of genetic instability. *Clin Cancer Res* 2006 ; **12** : 2752-2758.
- 12) Yamamoto Y, Eguchi S, Junpei A, Nagao K, Sakano S, Furuya T, Oga A, Kawauchi S, Sasaki K, Matsuyama H. Intercellular centrosome number is correlated with the copy number of chromosomes in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2009 ; **191** : 38-42.
- 13) Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 1998 ; **20** : 189-193.
- 14) Sen S, Zhou H, Zhang RD, Yoon DS, Vakar-Lopez F, Ito S, Jiang F, Johnston D, Grossman HB, Ruifrok AC, Katz RL, Brinkley W, Czerniak B. Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002 ; **94** : 1320-1329.
- 15) Nogawa M, Yuasa T, Kimura S, Tanaka M, Kuroda J, Sato K, Yokota A, Segawa H, Toda Y, Kageyama S, Yoshiki T, Okada Y, Maekawa T. Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest* 2005 ; **115** : 978-985.

Clinical Significance of Centrosome Amplification in Bladder Cancer

Hideyasu MATSUYAMA

Department of Urology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

Background : Centrosome is an organelle which forms bipolar spindle pole, and its replication is strictly regulated during cell cycle. Recently, centrosome amplification, defined as three or more centrosomes per cell, has been reported to occur frequently in a variety of malignancies. We investigated the role of centrosome amplification for the prognosis of bladder cancer patients.

Materials and Methods : Eight established bladder cancer cell lines were studied to clarify the relation among centrosome amplification, genomic alterations, and cell cycle-related proteins. Additionally, 102 specimens from bladder cancer patients were studied for the clinical significance of centrosome amplification in bladder cancer. To detect centrosome amplification, genomic alterations, and cell cycle-related proteins, immunofluorescent staining using anti-pericentrin antibody, comparative genomic hybridization (CGH) or fluorescence in situ hybridization (FISH), and immunohistochemical staining were applied, respectively.

Results : Basic studies from established cell lines demonstrated that centrosome amplification was defined as cases with more than 5% fraction of cells with three or more centrosomes per cell, and that the centrosome amplification was significantly associated with overexpression of aurora-A kinase protein as well as the copy number gain of its gene loci (20q13.2), alterations

of chromosome copy number including 7, 9, and 17, and several cell cycle-related proteins including p53, BubR1. Clinical investigations demonstrated the centrosome amplification occurred in 59 cases (57.8%), and proved to be an independent prognostic factors for tumor progression (Risk ratio : 3.12, 95% CI : 1.36-13.4, $p=0.0039$) for bladder cancer.

Conclusion : Centrosome amplification seems to occur through the genetic mechanisms of p53 alterations, or aurora-A overexpression by chromosomal gain of 20q23.2, and become a potential prognostic marker for the tumor progression in bladder cancer.