



膀胱癌におけるリゾフォスファチジン酸受容体1の 発現解析と浸潤メカニズムの解明

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2015-10-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 片岡, 政雄 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000141

膀胱癌におけるリゾフォスファチジン酸受容体 1 の発現解析と

浸潤メカニズムの解明

泌尿器科学講座

片岡 政雄

【概要】

・目的

リゾフォスファチジン酸 (lysophosphatidic acid : LPA) は血清や腹水、尿中に存在する生理活性物質の一つで、細胞の増殖や浸潤などに関与する。その受容体は G 蛋白共役型受容体であり、様々な癌腫において治療の標的物質とされている。今回我々は、膀胱癌における LPA 受容体の発現解析と、浸潤能に及ぼす影響について解析した。

・方法

膀胱癌患者 (Ta、T1 : 12 例、T2-T4 : 15 例) から得られた組織検体を用いて、リアルタイム PCR と免疫組織化学染色により LPA 受容体発現解析を行った。ヒト膀胱癌細胞株を用いて、マトリゲルインベージョンアッセイ、ウエスタンブロット法、蛍光染色により LPA が浸潤能に与える影響について解析した。

・結果

筋層浸潤性膀胱癌 (muscle invasive bladder cancer : MIBC) では筋層非浸潤性膀胱癌 (non muscle invasive bladder cancer : NMIBC) に比べて LPA 受容体 1 (LPA1) mRNA 発現が著明に亢進していた。免疫組織化学染色の結果でも MIBC の浸潤細胞において LPA1 発現が確認された。LPA1 陽性群は LPA1 陰性群に比べて有意差をもって生存率が低かった。LPA 投与にて、ヒト膀胱癌

細胞株 T24 の浸潤能は亢進したが、siRNA による LPA1 のノックダウン、あるいは LPA1 阻害剤の投与により膀胱癌細胞の浸潤能は抑制された。LPA 投与により Rho kinase 1 (ROCK1) 発現やミオシン軽鎖 (myosin light chain : MLC) のリン酸化が亢進し、細胞の円型化やラメリポディアの形成が誘導された。

・考案

本研究により、LPA シグナルは LPA1 を活性化し、膀胱癌細胞の浸潤能を亢進に関与していることが示された。膀胱癌においては、LPA1 発現は進展リスク因子となり得ること、また新規治療の標的になり得ることが示唆された。

【略語】

- LPA : lysophosphatidic acid
- LPAR : lysophosphatidic acid receptor
- LPA1 : lysophosphatidic acid receptor 1
- ROCK : Rho kinase
- MIBC : muscle-invasive bladder cancer
- NMIBC : non-muscle-invasive bladder cancer
- GPCRs : G protein coupled receptors
- LysoPLD : lysophospholipase D
- MLC : myosin light chain

【序論】

筋層浸潤性膀胱癌（MIBC）は進行が速く、転移能も高く、予後の悪い疾患である。新規抗癌剤が使用されるようになった今日でも、その効果は満足できるものではない^{1,2}。Sunitinib や Sorafenib のような分子標的薬治療も試みられているが、標準治療である MVAC 療法や GC 療法などの抗癌化学療法よりも生存率は低かった^{3,4}。そのため、膀胱癌の増殖能抑制を主眼とした治療のみでは十分ではなく、浸潤能の高い膀胱癌を早期発見することや、新たな治療戦略の開発が待ち望まれている。

我々は G 蛋白共役型受容体（GPCRs）を受容体とする生理活性物質であるブラジキニンが膀胱癌の浸潤能を亢進させることを報告した⁵。GPCRs とその下流のシグナルは様々な細胞機能を制御しており、様々な癌腫の増殖や進展に影響を及ぼしてもいる⁶。

リゾフォスファチジン酸（LPA）は GPCRs を受容体とする生理活性物質の一つであり、細胞遊走、細胞浸潤、細胞増殖などに関与している。LPA 受容体とその下流のシグナルは様々な癌腫において治療の標的になり得ると考えられている⁷⁻⁹。LPA 産生酵素である LysoPLD は尿中にも存在し、LPA は 0.02 - 0.86 μM の濃度で尿中に存在している¹⁰。しかしながら、これまで膀胱癌における LPA の発現解析や機能解析は行われてこなかった。今回我々は、膀胱癌臨床検体を

用いて膀胱癌における LPA 受容体の発現解析と、膀胱癌細胞株を用いた浸潤能解析を行った。

【対象および方法】

対象と膀胱癌組織

当院にて経尿道的膀胱腫瘍切除術を施行された 27 症例から臨床検体を得た。患者の平均年齢は 71 歳であった。正常膀胱粘膜は腫瘍部位から最低 5cm は離れた部位から採取した。臨床検体の採取にあたっては、当院の倫理委員会の承認を得た（受付番号 2049）。膀胱癌の診断は H.E 染色にて行った。

細胞株

ヒト膀胱癌細胞株 T24 は DS ファーマバイオロジカルから購入し、10%ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培養液で培養した。T24 は 100 mm 培養プレート上で 5% CO₂ 下、37°C で培養した。

LPA と Ki16425

1-Oleoyl-sn-glycero-3-phosphate (LPA) と LPA 受容体 1・LPA 受容体 3 の阻害剤である Ki16425 はシグマアルドリッチ社より購入した。

免疫組織化学染色

免疫組織化学染色に用いるため、抗 EDG2 (LPA1) 抗体は Assay Bio Tech 社より、

抗 LPA2 抗体、抗 LPA3 抗体は Atlas antibodies 社より、抗 ENPP2 (ATX) 抗体は Abcam 社より購入した。経尿道的膀胱腫瘍切除術にて得られた膀胱癌組織や、肉眼的に正常である膀胱粘膜組織をパラフィン固定し、抗 LPA 受容体抗体で染色した。3 μ m の厚さの切片を作成し、キシレンにて脱パラフィン化を行い、エタノールで脱水処理を行った。切片は 10 分間電子レンジにて加熱処理し、抗原賦活化を行った。0.03%過酸化水素にて内因性ペルオキシダーゼ活性を抑制し、5%スキムミルク含有 PBS にて 30 分間ブロッキング処理を行った。1 次抗体である抗 LPA1 抗体、抗 LPA2 抗体、抗 LPA3 抗体はそれぞれ 1/500、1/20、1/100 に希釈し 4°Cで一晩反応させた。2 次抗体はビオチン標識抗 IgG 抗体を用いて、室温で 20 分間反応させた。その後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用いて室温で 10 分間反応させ、0.02%に希釈したジアミノベンジジンで 4 分間反応させて発色させた。最後にヘマトキシリンにて核染を行った。

RNA 抽出とリアルタイム PCR

ISOGEN システム (日本 GENE) のプロトコールにのっとり total RNA 抽出を行い、Superscript III First-Strand Synthesis (インビトロジェン社) を用いて cDNA を抽出した。定量的リアルタイム PCR は Step One Software v2.1 (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。プライマーは、LPA1

(5'-GCCTTTATCATCTGCTGGACTCC-3', 5'-CGGCTGGTTCCTCATCTCAGTT-3'),
LPA2 (5'- GCGCCCTCTCAGCAACCCGC-3'、
5'-CGATGGCTGCTATGACCAGCAG-3'), LPA3
(5'-GCGGGTGAACGTGAGCGGATG-3'、 5'-
CGGAGA-AACCAGCGGTTGACAG-3') と設計した。混合溶液はそれぞれ 20 μ l
とし、増幅サイクルは 95°C で 15 秒、60°C で 60 秒を 40 サイクル行った後、50°C
で 2 分、95°C で 10 min とした。正常膀胱粘膜に対しての相対的な mRNA 発現
量を算出した。データは CYBR Green 法を用いて 18srRNA により標準化した。

siRNA トランスフェクション

LPA1 mRNA を標的とした siRNA は QIAGEN より購入した。HiPerFect
Transfection Reagent を QIAGEN より購入し、プロトコールに従って siRNA と対
照オリゴヌクレオチドのトランスフェクションを行った。ウシ胎児血清非含有
RPMI1640 培地 100 μ l に 3 μ l の HiPerFect Transfection Reagent、siRNA、対照オリ
ゴヌクレオチドはおのおの 5 nM ずつ、T24 膀胱癌細胞は 2.0×10^5 cells/well ず
つ 24 ウェル培養プレートに注入した。

細胞浸潤アッセイ

浸潤アッセイは BD Biosciences 社より購入した 24 ウェルマトリゲルインベージョンチャンバーを用いて行った。T24 細胞は一晚血清飢餓状態とし、その後、0.1%BSA 含有無血清培地に分注した。マトリゲルにてコーティングされ、8- μm の孔のあいた上槽に 2500 個の細胞を注入し、下槽には 0.1%BSA 含有無血清培地 750 μL に、0, 0.01, 0.1, 1, 10 μM の濃度になるように LPA を投与した。37°C、CO₂ 濃度 5%下で 22 時間培養した後、上槽に残った非浸潤細胞は取り除いた。マトリゲル内を浸潤し、膜の下面に存在する細胞は 70%エタノールで固定し、ヘマトキシレンで染色した後に 200 倍の倍率で検鏡し、細胞数を計測した。

LPA1 のノックダウンや阻害剤処理を行った T24 細胞を用いて、同様の手法で浸潤能を測定した。それぞれの条件で 3 回ずつアッセイを行い、浸潤細胞の平均数 \pm 標準偏差で表した。

増殖能アッセイ

Roche 社より購入した BrdU ラベリングアンドディテクションキット III を用いて細胞増殖能を測定した。96 ウェルの細胞培養プレートに 4×10^3 /ウェルとなるように T24 細胞を播種し、12 時間血清飢餓状態とした後に 0.1%BSA および LPA 含有 RPMI 培地をそれぞれのウェルに分注した。24 時間ないし 48 時間培養後に 5-ブロモ-2-デオキシウリジンを各ウェルに分注した。4 時間後にメディウムを取

り除いた後に細胞を固定した。抗 BrdU-POD 抗体と ABST サブストレイトを加え、490nm のリファレンスで 405nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。各条件につき 3 回ずつ施行した。

ウエスタンブロッティング

抗 ROCK1 抗体、抗 ROCK2 抗体は BD バイオサイエンス社から、抗 MLC 抗体、抗リン酸化 MLC 抗体は Cell signaling 社から、抗 MYPT1 抗体、抗リン酸化 MYPT1 抗体は Millipore 社から、抗 β アクチン抗体はシグマアルドリッチ社から購入した。蛋白は SDS-PAGE 法にて抽出した。バンドは ECL Advance Western detection reagents による可視化して ChemiDoc XRS plus system (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)を用いて測定した。

T24 細胞のファロイジン染色

ラメリポディアの形成など、細胞形態変化を確認するため、ファロイジン染色を行った。Cytoskelton 社より購入した TRITC-ファロイジンを 14 μ M に濃度調整し、アクチンフィラメント染色を行った。サブコンフルエントの状態まで培養した T24 細胞に 0.1 μ M となるように LPA を加え、5 分間培養した。その後、細胞を 10 分間パラフォルムアルデヒドで固定し、PBS で 30 秒洗浄した後に

0.5%TritonX-100にて透過処理を5分間行い、TRITC ファロイジンで30分間処理した。染色した細胞にFluoromountをのせ、カバーガラスで覆い、580nmの励起波長で鏡顕した。

統計学的解析

全ての実験系は3回試行し、測定値は平均値±標準偏差で表記した。解析においてはマンホイットニー順位和検定にてP値<0.05を持って有意差とした。多重比較には一元配置分散分析を選択し、 $p < 0.05$ を有意とした。

【結果】

膀胱癌組織と膀胱正常粘膜臨床検体における LPA 受容体発現

膀胱癌組織 27 検体のうち、12 検体は筋層非浸潤性膀胱癌と診断され、15 検体は筋層浸潤性膀胱癌であった。免疫組織化学染色の結果、多くの筋層浸潤性膀胱癌では LPA1 染色陽性であった (Figure 1A)。筋層浸潤性膀胱癌では、LPA2、LPA3 染色は比較的弱かった (Figure 1B、C)。一方、筋層非浸潤性膀胱癌ではほとんど LPA 受容体染色が陰性であった (Figure 1E、F、G)。膀胱正常粘膜の基底細胞は LPA3 染色で陽性であった (Figure 1K) が、LPA1、LPA2 染色は陰性であった (Figure 1I、J)。LAP 産生酵素である ATX は、筋層浸潤性膀胱癌、筋層非浸潤性膀胱癌、正常膀胱粘膜で陽性であった (Figure 1D、H、L)。

膀胱癌組織における LPA 受容体 mRNA 発現

膀胱癌における LPA1、LPA2、LPA3 の mRNA を測定したところ、いずれも筋層浸潤性膀胱癌、筋層非浸潤性膀胱癌で発現が確認された。筋層浸潤性膀胱癌では、筋層非浸潤性膀胱癌に比べて LPA 受容体 mRNA の発現レベルが亢進していた。そのなかでも LPA1mRNA は筋層浸潤性膀胱癌において最も発現が亢進していた (Figure 2A)。筋層非浸潤性膀胱癌では、筋層浸潤性膀胱癌に比べ、有意差をもって LPA1mRNA の発現が亢進していた (Figure 2B、 $p < 0.01$)。一方、LPA2mRNA

や LPA3mRNA も、筋層非浸潤性膀胱癌に比べ筋層浸潤性膀胱癌で発現が亢進していたが、有意差は認められなかった(Figure 2C、2D)。

LPA1 発現と予後

患者背景と腫瘍の特性を Table1 に記した。LPA1mRNA 発現レベルが正常粘膜に比べ 5 倍以上で、免疫組織化学染色で明らかに LPA1 染色陽性である群を LPA1 陽性群と定義した。LPA1 陽性の有無と筋層浸潤の有無において有意差をもって相関が認められた。さらに、LPA1 陽性群の予後は LPA1 陰性群に比べ有意差をもって悪かった。(Figure 3、 $p < 0.05$)。

LPA は T24 膀胱癌細胞の浸潤を促す

LPA1-siRNA により、T24 膀胱癌細胞の LPA1mRNA 発現は 80% 抑制できた (Figure 4A)。マトリゲルインベージョンチャンバーを用いた浸潤能の検討によると、LPA 投与により膀胱癌細胞の浸潤能は亢進した。最も浸潤能が高かったのは 0.1 μ M で、ノーマルコントロール群に比べ 2.5 倍の浸潤能亢進が確認された (Figure 4B, $p < 0.05$ vs. control)。浸潤能の亢進が LPA によるものであることを検証するために、LPA1 を標的とした siRNA 処理および、LPA1 阻害剤処理も施したところ、siRNA 処理、阻害剤処理のいずれでも、膀胱癌の浸潤能亢進抑制

が確認された (Figure 4C, $p < 0.05$)。

LPA の T24 膀胱癌細胞増殖への影響

T24 膀胱癌細胞は 12 時間血清飢餓状態とし、その後に 0, 0.01, 0.1, 1.0, or 10 μM の各濃度になるよう LPA を投与した。細胞増殖能を見るために異なる時間経過毎に Brd-U アッセイを行った。10% FBS 含有培養液中で培養された T24 細胞はコントロールに比べ 2 倍の増殖を認めた。しかし、各濃度の LPA 処置では増殖亢進は認められなかった。培養時間を長くしても、LPA 処置群では増殖能亢進は認められなかった (Figure 5)。

LPA によるミオシン軽鎖のリン酸化

LPA の下流シグナルである Rho/ROCK 経路を経たアクチン細胞骨格変化を確認するため、ウエスタブロットティングを用いて蛋白発現、蛋白リン酸化を調べた。LPA 刺激により ROCK1 発現は有意差をもって亢進し、LPA1-siRNA 処置や Ki16425 投与により ROCK1 発現は抑制された (Figure 6A, 6B, $p < 0.05$)。

ROCK2 発現も LPA 刺激により亢進したが、有意差は認められなかった (Figure 6C)。ROCK はミオシン軽鎖を制御する蛋白であるが、特にミオシン脱リン酸化酵素のサブユニットである MYPT1 をリン酸化することでミオシンリン酸化酵

素活性を低下させる。そのため、MYPT1 とミオシン軽鎖のリン酸化について検討した。LPA 刺激によりミオシン軽鎖と MYPT1 のリン酸化は優位に亢進し、LPA1 のノックダウンや阻害剤の投与によりリン酸化は抑制された(Figure 6D, p < 0.01, 6E, p < 0.01)。

LPA による T24 膀胱癌細胞の形態学的変化

癌細胞において膜状仮足の形成は細胞膜表面積を増大し、そこから分泌される蛋白分解酵素により局所融解を引き起こし癌細胞浸潤を誘導する。Phalloidin TRITC アクチン繊維染色によりアクチン細胞骨格変化を確認した。LPA 不存在下では T24 膀胱癌細胞は培養プレート上に伸展した形態で存在した。0.1 μ M の LPA 投与により、細胞の円型化や膜状仮足の形成が認められた(Figure 7B)。LPA1 のノックダウンあるいは阻害剤前処置により、これらの細胞形態変化は抑制された(Figure 7C、7D)。

【考察】

我々の検討によると、膀胱癌組織では LPA1、LPA2、LPA3 発現が認められた。その中でも、LPA1 は筋層浸潤性膀胱癌において最も高発現していた。LPA 産生酵素である ATX も、膀胱癌組織や正常膀胱粘膜に発現していた。筋層浸潤性膀胱癌において LPA1 が高発現していることを初めて明らかにした。さらに、LPA は膀胱癌細胞の形態変化をもたらし、浸潤能を亢進させることを明らかにした。筋層浸潤性膀胱癌や転移性膀胱癌は予後の悪い疾患であるため、その浸潤過程の解明や、進展の危険因子の同定は、悪性度の高い癌種の早期発見や新規治療薬の開発に役立つと考えられる。

LPA 受容体は G 蛋白共役型受容体の一つで¹¹、癌細胞の遊走、接着、癌化などに関与している¹²⁻¹⁵。これまで、癌細胞進展について LPA1、LPA2、LPA3 の3つのサブタイプについての検討が盛んになされてきたが¹²⁻¹⁶、近年は LPA 受容体には6つのサブタイプが存在することが報告されている¹⁷⁻²³。LPA 受容体の機能は癌の種類によって異なると言われている。膵臓癌では LPA1 が高発現しており、癌細胞遊走能を亢進させるが¹²、LPA2 は遊走能を抑制すると報告されている¹³。乳癌では、LPA1 がミオシン軽鎖のリン酸化を誘導し、癌細胞の遊走能を亢進させている¹⁴。一方、卵巣癌では LPA2 と LPA3 が悪性度に関与している^{15,24}。

我々の検討によると、筋層浸潤性膀胱癌では LPA1 が高発現しており、癌細胞の浸潤過程に重要な役割を果たしていると考えられた。LPA 受容体の発現や LPA の機能は癌種によって異なるため、それぞれの癌腫における LPA 受容体発現や機能解析は重要であると考えられる。

癌細胞の転移は、癌細胞の原発巣からの遊走から始まり、周辺組織や血管内への浸潤によって進行する。この過程で、様々な因子が癌細胞の遊走や接着に影響する。Rho 蛋白は LPA 受容体の下流のシグナルとして重要な機能を持っており、細胞外からの刺激により Rho キナーゼ (ROCK) の活性化し、アクチン細胞骨格や核内にシグナルを伝達する。膀胱癌細胞株においては、ROCK は癌細胞遊走に重要な役割を果たしており、ROCK 阻害剤は癌細胞の遊走能を抑制した²⁵。Kamai らは膀胱癌組織やリンパ節転移組織での RhoA、RhoC、ROCK 発現は、正常膀胱粘膜や正常リンパ節組織よりも高い傾向があることを報告している²⁶。今回、我々は膀胱癌細胞株 T24 において LPA1 が ROCK1 を活性化すること、ミオシン軽鎖のリン酸化を亢進させることを示した。膀胱癌細胞株 T24 において LPA は LPA1-Rho/ROCK-ミオシン軽鎖リン酸化経路を経て浸潤能を亢進させた。さらに、LPA1 のノックダウンにより ROCK の活性化、ミオシン軽鎖のリン酸化、浸潤能は抑制された。

LPA は尿中にも存在し、ROCK 活性化を経て細胞遊走に重要な役割を果たして

いる。そのため、LPA1 は浸潤能の高い膀胱癌の治療の標的になりうると考えられる。LPA1、LPA3 の特異的阻害剤である Ki16425 もまた、T24 膀胱癌細胞株の ROCK 活性化やミオシン軽鎖リン酸化を抑制し、浸潤能も抑制していた。

LPA 産生酵素である ATX はリゾフォスホリパーゼ D (LysoPLD) 活性を持つ。LysoPLD 活性は尿中にも認められ、尿中には 0.02-0.86 μM の濃度で LPA が存在する。我々は、生理的尿中濃度の LPA により膀胱癌の浸潤能が亢進することを示した。膀胱癌患者と正常対象者の尿中 LPA 濃度の比較までは行えなかったが、測定してみる価値はあると考えられる。我々の検討によると、生理的尿中濃度の LPA 存在下において、LPA1 発現が膀胱癌浸潤において重要であった。

本研究にて、我々は LPA1 が膀胱癌の転移過程に重要な役割を果たしていることを *in vitro* で証明した。LPA 受容体阻害剤は T24 膀胱癌細胞浸潤を効果的に抑制したが、細胞増殖能は抑制できなかった。そのため、腫瘍増殖能抑制を目的とした薬剤と、LPA1 阻害剤の併用の効果が期待される。

【結語】

筋層浸潤性膀胱癌組織では LPA1 が高発現しており、*in vitro* での検討によると LPA は LPA1 を介して膀胱癌の浸潤能を亢進させていた。LPA1 は浸潤能の高い膀胱癌の早期発見に役立つバイオマーカーや、浸潤能の高い膀胱癌の新規治療の標的としての可能性を秘めていると考えられた。

【引用文献】

- [1] Saxman SB, Propert KJ, Einhorn LH, et al. Long-term follow-up of a phase III intergroup study of cisplatin alone or in combination with methotrexate, vinblastine, and doxorubicin in patients with metastatic urothelial carcinoma: a cooperative group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1997; 15: 2564-9.
- [2] von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, et al. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000; 18: 3068-77.
- [3] Dreicer R, Li H, Stein M, et al. Phase 2 trial of sorafenib in patients with advanced urothelial cancer: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer*. 2009; 115: 4090-5.
- [4] Grivas PD, Daignault S, Tagawa ST, et al. Double-blind, randomized, phase 2 trial of maintenance sunitinib versus placebo after response to chemotherapy in patients with advanced urothelial carcinoma. *Cancer*. 2014; 120: 692-701.
- [5] Baba K, Yamaguchi O. Effects of bradykinin on cytoplasmic calcium and motility in murine bladder tumor cells. *The Journal of urology*. 2001; 165: 259-62.
- [6] Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2007; 7: 79-94.
- [7] Komachi M, Sato K, Tobo M, et al. Orally active lysophosphatidic acid receptor antagonist attenuates pancreatic cancer invasion and metastasis in vivo. *Cancer science*. 2012; 103: 1099-104.
- [8] Ogata S, Morishige K, Sawada K, et al. Fasudil inhibits lysophosphatidic acid-induced invasiveness of human ovarian cancer cells. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2009; 19: 1473-80.
- [9] Lee SJ, Yun CC. Colorectal cancer cells - Proliferation, survival and invasion by lysophosphatidic acid. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010; 42: 1907-10.
- [10] Ohkawa R, Hisano N, Nakamura K, Okubo S, Yokota H, Yatomi Y. Lysophospholipase D activity exists in the urine to catalyse the formation of lysophosphatidic acid. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2006; 21:

3612-3.

- [11] Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid signalling. *Current opinion in cell biology*. 1995; 7: 203-10.
- [12] Yamada T, Sato K, Komachi M, et al. Lysophosphatidic acid (LPA) in malignant ascites stimulates motility of human pancreatic cancer cells through LPA1. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279: 6595-605.
- [13] Komachi M, Tomura H, Malchinkhuu E, et al. LPA1 receptors mediate stimulation, whereas LPA2 receptors mediate inhibition, of migration of pancreatic cancer cells in response to lysophosphatidic acid and malignant ascites. *Carcinogenesis*. 2009; 30: 457-65.
- [14] Kim JH, Adelstein RS. LPA(1) -induced migration requires nonmuscle myosin II light chain phosphorylation in breast cancer cells. *Journal of cellular physiology*. 2011; 226: 2881-93.
- [15] Yu S, Murph MM, Lu Y, et al. Lysophosphatidic acid receptors determine tumorigenicity and aggressiveness of ovarian cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008; 100: 1630-42.
- [16] Boucharaba A, Serre CM, Guglielmi J, Bordet JC, Clezardin P, Peyruchaud O. The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103: 9643-8.
- [17] Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J. Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *The Journal of cell biology*. 1996; 135: 1071-83.
- [18] An S, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ. Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273: 7906-10.
- [19] Bandoh K, Aoki J, Hosono H, et al. Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry*. 1999; 274: 27776-85.
- [20] Noguchi K, Ishii S, Shimizu T. Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278: 25600-6.
- [21] Kotarsky K, Boketoft A, Bristulf J, et al. Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006; 318: 619-28.
- [22] Lee CW, Rivera R, Gardell S, Dubin AE, Chun J. GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *The Journal of*

biological chemistry. 2006; 281: 23589-97.

[23] Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, et al. Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *The Journal of biological chemistry*. 2009; 284: 17731-41.

[24] Ren J, Xiao YJ, Singh LS, et al. Lysophosphatidic acid is constitutively produced by human peritoneal mesothelial cells and enhances adhesion, migration, and invasion of ovarian cancer cells. *Cancer research*. 2006; 66: 3006-14.

[25] vom Dorp F, Sanders H, Boergermann C, et al. Inhibition of Rho-kinase abrogates migration of human transitional cell carcinoma cells: results of an in vitro study. *Urologia internationalis*. 2011; 86: 220-7.

[26] Kamai T, Tsujii T, Arai K, et al. Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003; 9: 2632-41.

【図説明】

Figure 1. 膀胱癌組織と正常膀胱粘膜組織における LPA 受容体と ATX の免疫組織化学染色結果。抗 LPA1 抗体染色では、筋層浸潤性膀胱癌 (MIBC) で強陽性を示し (A)、筋層非浸潤性膀胱癌 (NMIBC) や正常膀胱粘膜では染色陰性もしくは弱陽性であった (E、I)。抗 LPA2 抗体と抗 LPA3 抗体は MIBC では弱陽性を示し (B、C)、NMIBC では染色陰性であった (F、G)。LPA3 は正常膀胱粘膜において高発現が確認された (K)。LPA 産生酵素である ATX は MIBC、NMIBC、正常膀胱粘膜において発現が確認された (D、H、L)。スケールバーは 200 μ m。

Figure 2. 膀胱癌における LPA 受容体 mRNA 発現。各データは 18srRNA 発現により標準化し、それぞれ正常膀胱粘膜における発現量との比を算出した。MIBC においては LPA1mRNA 発現が最も高かった(A)。MIBC では NMIBC に比べて有意差をもって LPA1mRNA 発現が高かった($p < 0.05$) (B)。LPA2mRNA、LPA3mRNA も NMIBC に比べ MIBC で高発現していたが、有意差は認められなかった(Figure 2C, 2D)。

Figure 3. 生存率 (Kaplan-Meier 法)

Figure 4. LPA が T24 膀胱癌細胞の浸潤能に与える影響。LPA1-siRNA により T24 の LPA1mRNA 発現は 80%抑制された(A)。浸潤細胞数を数え、浸潤率を算出した。浸潤率が最も高かったのは LPA 濃度が 0.1 μ M の時であった ($p < 0.05$) (B)。LPA により誘発される浸潤能の亢進は、Ki16425 や LPA1-siRNA により抑制された($p < 0.05$) (C)。

Figure 5. LPA が T24 膀胱癌細胞の増殖能に与える影響。LPA は投与濃度、投与時間を変えても、T24 の増殖能には影響しなかった。

Figure 6. LPA は ROCK1 発現を亢進し、MYPT1 やミオシン軽鎖のリン酸化を亢進させた。ROCK1 発現、MYPT1 やミオシン軽鎖のリン酸化は Ki16425 投与や siRNA トランスフェクションにより抑制された。ウエスタンブロッティングのバンドは Image Lab 2.0 software を用いて検出し、定量比較した。それぞれ 3 回ずつ測定を行い、平均値 \pm 標準偏差で解析した。

Figure 7. LPA による T24 膀胱癌細胞の形態学的変化。(a; control): LPA 刺激なしの T24。T24 前処置なし (b), siRNA トランスフェクション (c), 1 μ M Ki16425 前投与 (d)。その後 0.1 μ M LPA を投与し 5 min 後に細胞固定 (b-d)。LPA 投与に

よりラメリポディアの形成や細胞の円型化が確認された（矢印）が、siRNA トランスフェクションや Ki16425 による前処置により細胞形態変化は抑制された。

【図と表】

Figure1

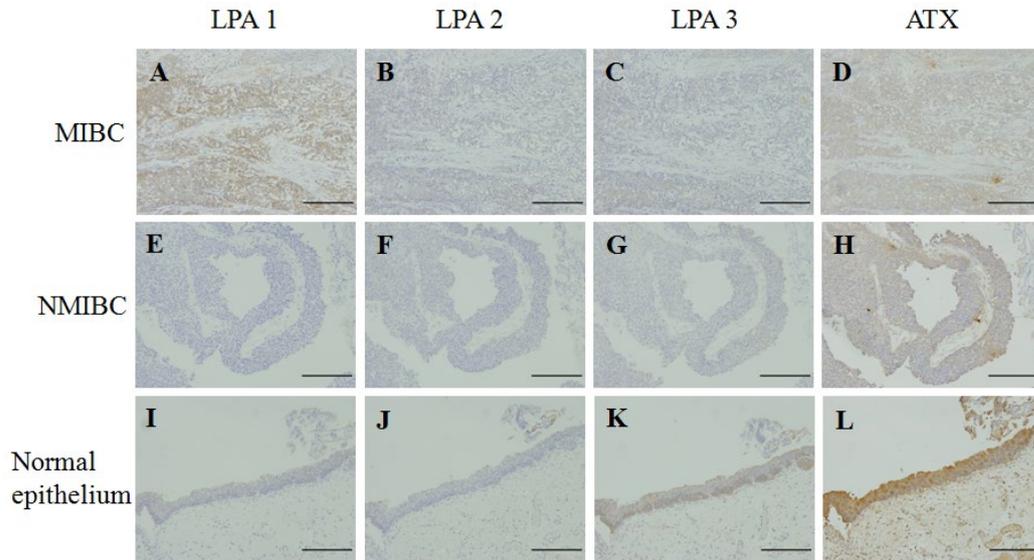


Figure2

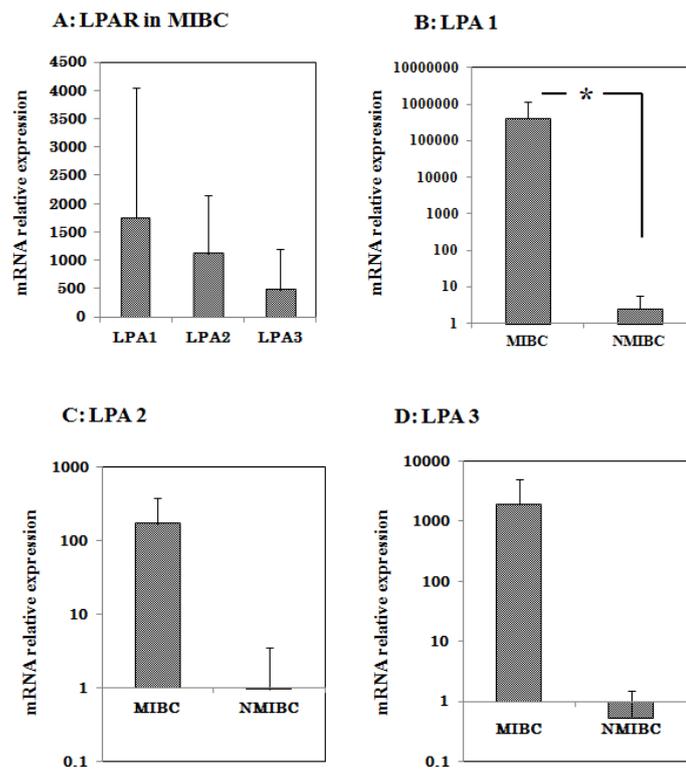


Figure3

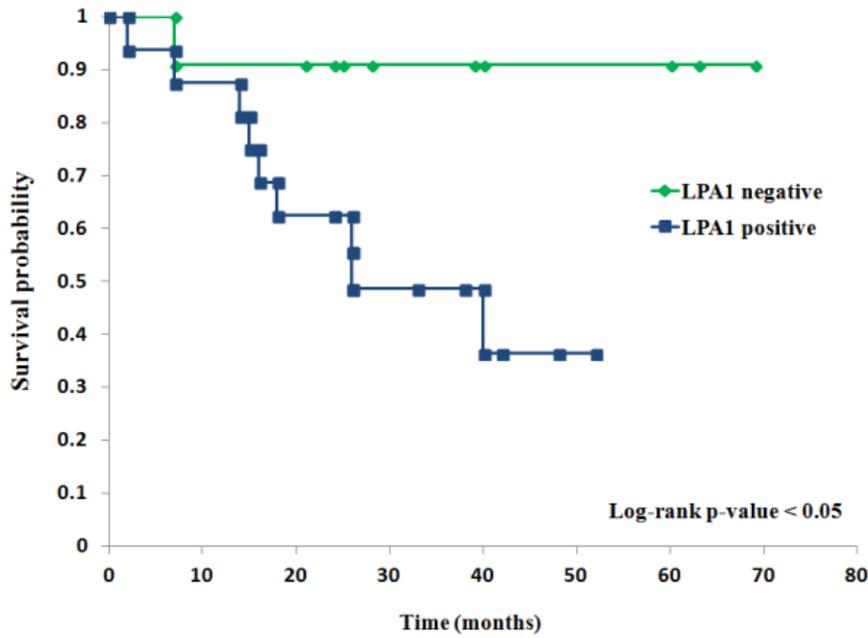


Figure4

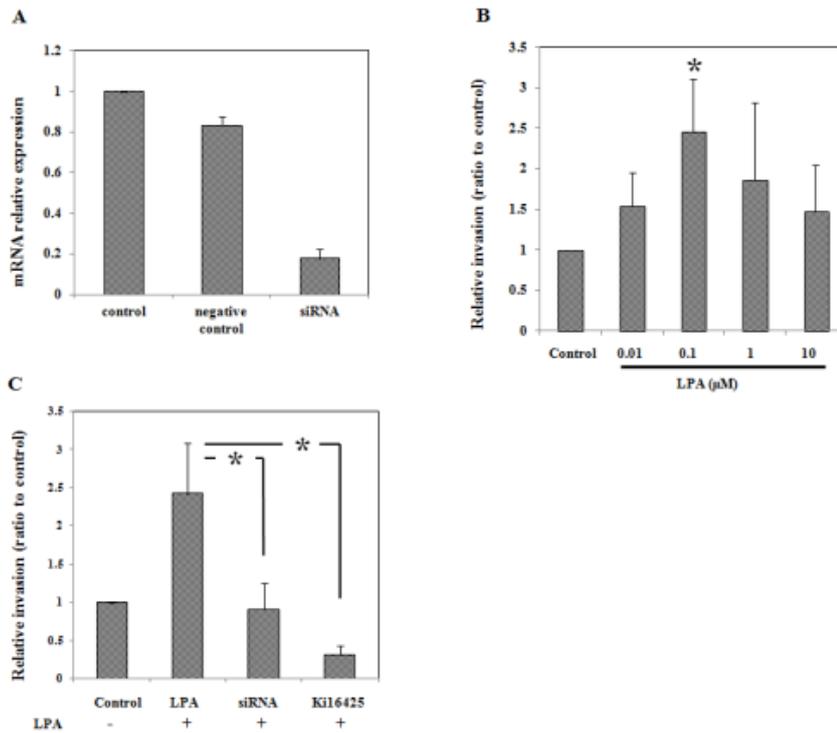


Figure5

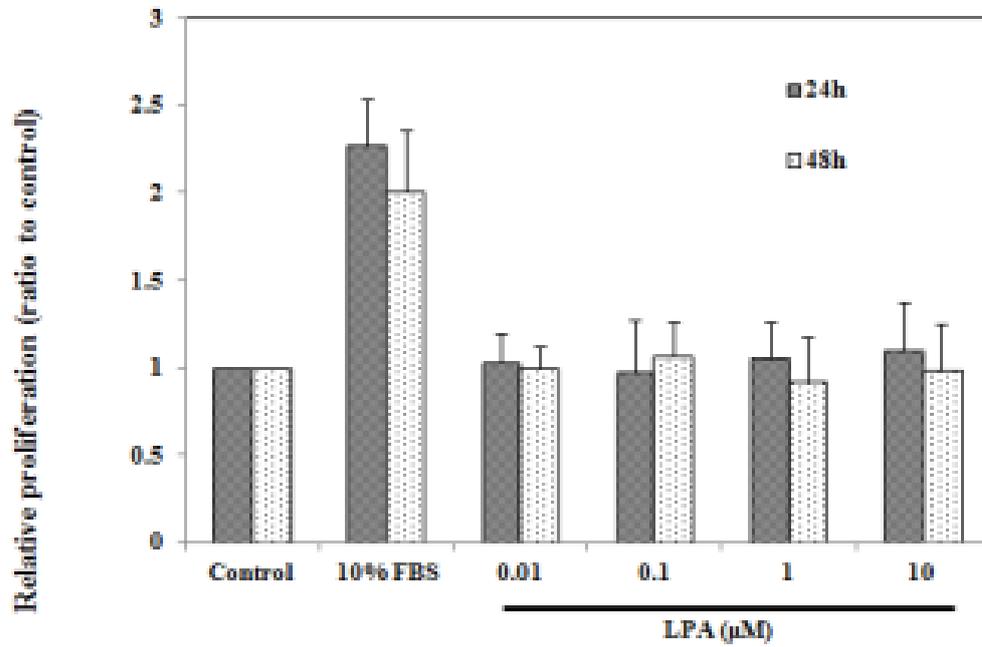


Figure6a

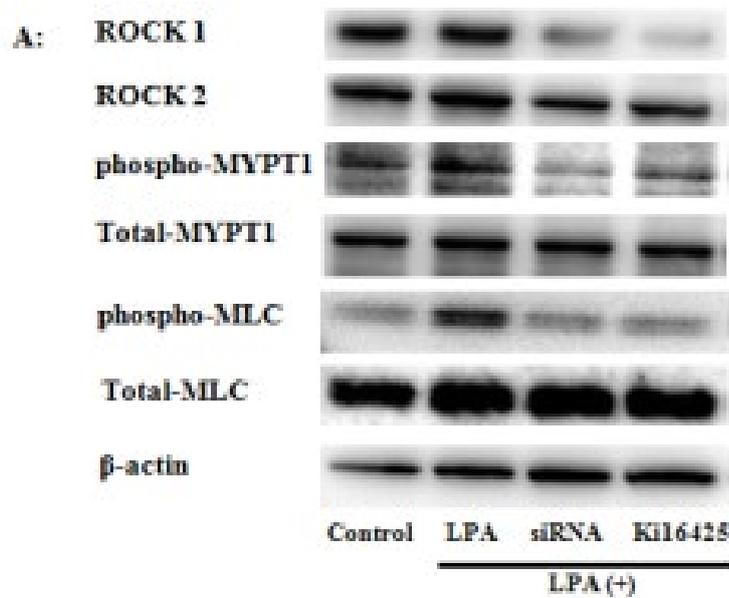


Figure6b

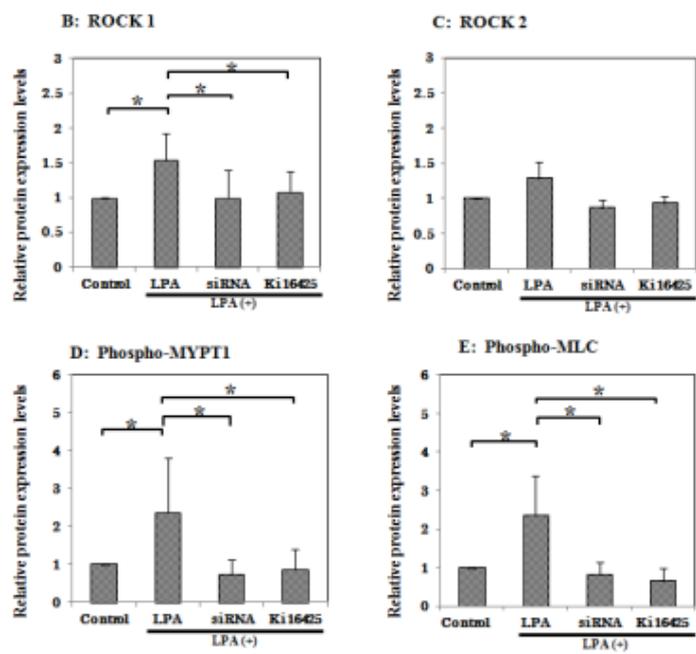


Figure7

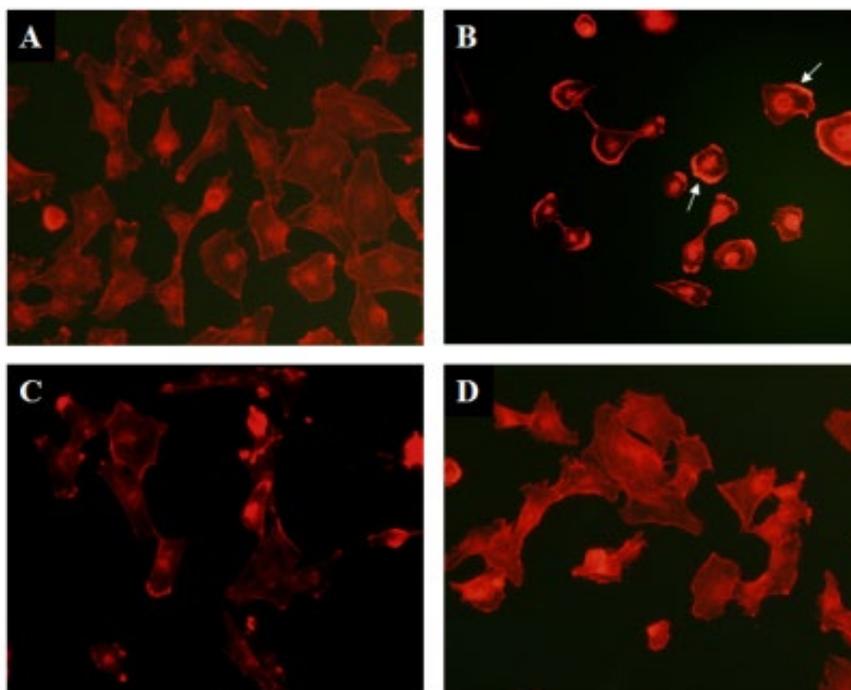


Table 1

Table 1 Comparison of clinical and pathological features			
Features	LPA1 positive (n=16)	LPA1 negative (n=11)	p
Age at diagnosis, year	70.9±6.9	72.7±8.7	>0.05
Sex, No. (%)			>0.05
Female	7 (43.7)	2 (18.2)	
Male	9 (56.3)	9 (81.8)	
Stage of tumor			>0.05
Ta	1	6	
T1	3	2	
T2	7	2	
T3	4	1	
T4	1	0	
Muscle invasion			<0.05
MIBC	12	3	
NMIBC	4	8	
Histologic subtype			>0.05
High grade	13	7	
Low grade	3	4	

【謝辞】

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました泌尿器科学講座教授 小島祥敬先生に深謝いたします。また、病理組織の取り扱いや免疫組織染色において、御指導を賜りました基礎病理学講座教授 千葉英樹先生、同講座スタッフの皆様 に厚く御礼申し上げます。

最後に、直接御指導御助言を下された当講座准教授 石橋啓先生はじめ泌尿器科学講座スタッフに厚く御礼申し上げます。