総 説

膀胱癌の悪性度・浸潤性判定のための細胞生物学的アプローチ

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室

橘 政 昭

CELLULAR BIOLOGICAL APPROCHES FOR DETERMINING OF MALIGNANT
POTENTIAL AND INVASIVENESS OF BLADDER CANCERS

Masaaki Tachibana

Department of Urology, School of Medicine, Keio University

はじめに

膀胱移行上皮癌は grade-1, 表在性腫瘍のような極めて予後の良好なものから, grade-3浸潤性腫瘍のような予後不良なものまで, その悪性度・浸潤性は幅広いスペクトラムを有することは周知の事実である¹⁾²⁾。しかしながらこれら悪性度あるいは浸潤性を規定する因子は現時点においては形態学を中心とした組織学的検討が中心であり未だ一般的に臨床応用するに足る指標が存在しないのが現状であると言わざるを得ない。本稿では, 膀胱移行上皮癌における悪性度・浸潤性を規定する基礎的ならびに臨床的事項を review し, 今後の展望を探ることとする。

表在性膀胱癌の自然史

一度, 膀胱内に腫瘍の存在が証明されると, それが極めて小さく, かつ単発で grade-1の移行上皮癌であったとしても, その後の患者の予後を予想することは困難であると言える。その最大の理由は膀胱癌においてはその多くが種々の間隔をもって再発を繰り返す, その間に腫瘍悪性度の増悪を来し, 時には膀胱全摘術を余儀なくされる場合あるいは転移性病変を来す症例も少なくないからである³⁾。一方, National Bladder Cancer Group の報告によれば, 多くの筋層浸潤膀胱癌は診断の最初から筋層浸潤癌であることが示されている⁴⁾。また, 表在性腫瘍の浸潤性の予測に関しては腫瘍悪性度が最も信頼しえる指標となっている。例えば Heney ら⁵⁾によれば grade-1の腫瘍では2%以下に, また grade-2では11%, さらに grade-3では45%に筋層浸潤を伴う progression が最初の診断より2年の内に生じることが報告されている。さらには, 30~50%の grade-3, pT1腫瘍はその後の経過中に筋層浸潤や

遠隔転移を生じることを報告している^{6)~9)}。しかしながら, これら組織学的悪性度の判定はかならずしも単純ではなく, 単一の grade の腫瘍細胞が均一に存在するとは限らず, 実際には種々の grade の腫瘍細胞が混在しており, 正確に grading を行うには困難を伴うことが多いのが現状であると言えよう。ごく最近, Kakizoe ら¹⁰⁾により膀胱癌の進展および転移の細胞生物学に関する review が報告されており, 膀胱癌の生物学的特性の理解に有用であろう。

染色体解析

膀胱癌腫瘍組織における染色体解析に関する報告では, 染色体の数が通常と異なる数的異常と, 染色体の転座や欠損などの質的異常があり, これら染色体解析によるその異常は腫瘍の浸潤性および予後を規定する因子として極めて重要であることが示されている¹¹⁾。最近, restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析法により軽微な遺伝子欠損を細胞遺伝子学的手法より高率に検出することが可能となった¹²⁾。この手法により対立遺伝子の欠損は loss of heterozygosity (LOH) として補えられる¹³⁾。これら遺伝子欠損として膀胱癌では chromosome 3p, 9q, 11p, 13q, 17p, および18qの欠損が報告されている^{12)~14)}。また, chromosome 9qの欠損は膀胱癌進展の比較的早期に認められる頻度の高い異常であるとする報告がある¹⁴⁾。さらには17pの欠損は約70%の進行膀胱癌症例に認められたとする研究は¹⁴⁾p53癌抑制遺伝子の存在する染色体がこの部分であることから極めて興味深い。その他, chromosome 5の短腕の isochromosome, chromosome 7の trisomy あるいは chromosome 9の monosomy などの膀胱移行上皮癌に特異的な染色体

異常が報告されている¹¹⁾¹⁴⁾。

染色体の数的異常について最近では in situ hybridization 法を用いて比較的簡便に特異的な染色体の数的異常を検出することが可能となり、これら検討より染色体 7 番と 17 番の数的異常が癌細胞の悪性度および深達度とよく相関することが報告されており^{16)~18)}、今後の臨床応用が期待される。

形態計量 (モルフォメトリー)

コンピューターを使用した画像解析装置を用いて腫瘍細胞の形態を客観的に解析しようとする試みがなされている¹⁹⁾²⁰⁾。核面積、核の円周、細胞質面積を求め、平均核面積 (mean nuclear area NA)、NA の標準偏差 (SD of NA, SDNA)、などの客観的細胞形態計測値が腫瘍の組織学的悪性度と良好に相関することが報告されている。非乳頭状腫瘍は乳頭状腫瘍に比較して 2 倍の nuclear variables が認められ、また grade-3 腫瘍は grade-1 腫瘍に比し同様に 2 倍の nuclear variables が認められたとする報告がある²⁰⁾²¹⁾。さらには表在性腫瘍の進展は上述の NA あるいは SDNA と密接に関連すること、またリンパ節、遠隔転移は nuclear variables の大きな腫瘍に高率に認められることが報告されており²⁰⁾²²⁾膀胱癌の客観的悪性度評価法として注目されている。また平均核面積の大小と患者生存率は密接に相関し、予後予測因子としての臨床的意義も報告されている^{21)~23)}。しかしながら、従来の組織学的検索、フローサイトメトリー、およびモルフォメトリーを対比した検討では、乳頭状腫瘍におけるモルフォメトリーの予後因子としての有用性には限界があることも指摘されている²⁴⁾。肉眼的観察をより客観的に表現するという意味では有効な方法であるが、予後予測因子としての信頼性については今後のさらなる検討を要するものと考えられる。

フローサイトメトリー

多くの癌においてその染色体の異常が腫瘍の増殖性あるいは浸潤・転移性を判断するひとつの指標となり得ることが報告され、その解析の方法の一つとして flow cytometry (FCM) の応用が各種の悪性腫瘍において検討されてきた。FCM は多数の細胞集団の genetic content を短時間に測定できることより、細胞生物学および臨床医学への応用が急速になされたものの一つといえる。特に核 DNA 量の解析は癌細胞の細胞生物学特性を反映するものとして多くの注目を集めた。しかしながら、FCM の適応は単に細胞核の DNA 量の測定のみならず他のパラメーター、例えば

膀胱癌関連抗原の同定、増殖期細胞に特異的なマーカーの観察など多項目を同時に解析し得る可能性を有しており、今後癌浸潤性に関連するより有力かつ特異的なマーカーの開発により更にその有用性は増すことが予想される。本項では膀胱癌における DNA ploidy 解析を中心にその現状を述べる。

一般に FCM による DNA histogram は DNA diploid と DNA aneuploid とに分けて論じられるのが通常である。Barlogie ら²⁵⁾は 4,900 におよぶ腫瘍細胞の DNA ploidy 解析を行い原発腫瘍と転移性腫瘍の評価より DNA aneuploid 腫瘍のより aggressive な生物学的傾向を明らかにした。膀胱癌においては組織学的に high-grade あるいは high-stage の腫瘍において高率に DNA aneuploid が認められ膀胱癌悪性度診断上、また予後因子として極めて重要な検査法であることが報告されている²⁶⁾²⁷⁾。

事実、grade-3 の膀胱癌では 60~80% に DNA aneuploid が認められるのに対し、grade-1 腫瘍の 70~80% は DNA diploid を示し、T4 腫瘍の 70% は DNA aneuploid に対し Ta-T1 腫瘍の 70% が DNA diploid であることが示されている^{28)~30)}。

また DNA aneuploid がリンパ節転移あるいは遠隔転移における有用な予後因子となり得ることが報告されている。つまり DNA aneuploid 腫瘍は diploid 腫瘍に比し高率にリンパ節転移あるいは遠隔転移を有することが示されており²⁸⁾²⁹⁾、その当然の結果として DNA aneuploid 腫瘍の予後が diploid 腫瘍に比し不良であるとする報告が多くなされている^{22)23)28)~33)}。

一方、FCM による DNA ploidy 解析は病理組織学的評価以上の予後因子としての情報をもたらすものではないとする意見もある。例えば Murphy ら³⁴⁾は、63 例の膀胱癌症例の検討よりフローサイトメトリーによる DNA ploidy 解析は組織学的悪性度診断を凌駕する予後因子とはなっていないことを報告している。さらに Pauwels ら³⁵⁾によれば DNA ploidy 解析は治療方針決定の判断材料にするほどには信頼性のある検査方法であるとは言い難いと結論している。相反して、deVere White ら³⁶⁾は DNA histogram は組織学的悪性度・深達度を凌駕する予後因子として有用であると結論している。著者らの検討では 203 例の膀胱癌症例における予後を腫瘍の grade, stage の組織学的指標と各種 FCM 上の parameter を多変量解析で詳細に解析したところ、4n 以上の DNA 含量を有する hyper-tetraploid を 5% 以上有する群における予後への関与

図1 フローサイトメトリーによる膀胱癌組織のDNA histogram.

図2 膀胱癌症例の hypertetraploid の有無による生存率.

HT: hypertetraploid

は組織学的悪性度と同様の最も重い寄与を認め、つぎに $4n$ のDNA含量を持つtetraploidyを示す細胞を10%以上有する群ではそれにつぐ予後因子として重要であったことが認められた³⁷⁾。さらにこのhypertetraploidの有無により一般的に予後不良とされるgrade-3腫瘍の予後が比較的明確に区別できる可能性が示された。ここでもう一つ重要なことは、通常のDNA histogramの判定法であるDNA index (明らかな2つのG0+G1ピークを有するか否か)では組織学的判定を凌駕する予後因子としては認められなかったことである。つまりフローサイトメトリーによるDNA histogram上の異常をどのように判定するかの一貫した意見が現在まだ確立しておらず、異なる見解が生じる結果を招いていることが予想される。いずれにしても膀胱

癌においてDNA diploidを示す腫瘍の予後が良好なことは多くの施設において一致した見解である。吉川ら³⁸⁾は94例の膀胱癌症例の予後とDNA ploidyを検討し、癌死例8例、担癌生存例5例のいずれの症例もDNA aneuploidyであり、DNA diploid症例の予後が良好であることを報告している⁸⁾。このようにDNA ploidy解析に対する異なる見解が生じる原因としてまず第一に腫瘍におけるheterogeneity (異質性)が挙げられる。LipponenらはDNA ploidyの腫瘍内heterogeneityは細胞生物学的多クローン性と手技的要因によることを指摘している³⁹⁾。第2点として腫瘍内の著明な炎症性細胞浸潤は腫瘍のaneuploidピークをマスクしDNA diploidと誤認する結果を生じる可能性が指摘されている¹⁰⁾。

このような現状で、膀胱癌に対するフローサイトメトリーによるDNA ploidy解析の意義に関してWhelessらにより⁴¹⁾“Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in bladder cancer”と題した論文が発表されている。彼らは膀胱癌のDNA ploidy解析に関する代表的な論文を多数評価した上で、現状におけるとらえ方の指標を示したもので、ここでの一つの結論として、表在性膀胱癌(Ta, T1, TIS)におけるDNA ploidyとその進展の危険性においては、複数のDNA aneuploid populationの存在>一つのDNA aneuploid populationの存在>DNA tetraploid populationの存在>DNA diploid populationの順でより大きな危険因子と考えるのが妥当であることが示されている。しかしながら、一方においてT2~T4の浸潤癌においては治療方針決定の根拠とするような情報をもたらすものと断定し得るものとはなっていないと結論し、今後のさらなる検討が必要であるとしている。

フローサイトメトリーによるDNA ploidy解析が一般的な膀胱癌の悪性度判定基準としてさらに広く臨床応用されるためには、今後、統一されたDNA ploidyの判定基準の整備とともにDNA ploidy解析を補助するさらに腫瘍に特異的なマーカーを同時に解析するなどの研究が必要であると考えられる。

細胞増殖性

癌細胞におけるその増殖性の検討は細胞のDNA合成能が直接的に癌の増殖進展に関連することよりその予後を検討する上で極めて重要であると言える。Meyerら⁴²⁾は数多くの腫瘍細胞における増殖性の検討より、細胞増殖と癌の浸潤性が極めて密接に関連す

表1 膀胱癌組織におけるフローサイトメトリーを使用した bromodeoxyuridine 標識率

Disease	Grade 1(No.)	Grade 2(No.)	Grade 3(No.)	Totals(No.)
Superficial	5.3±2.7(11)	6.7± 5.2(38)	11.1±7.9(7)	6.9±5.5(56)
Muscle-invasive	—	20.9±12.9(3)	16.5±8.0(22)	17.0±8.5(25)
Totals	5.3±2.7(11)	7.7± 8.9(41)	15.2±8.2(29)	10.0±8.0(81)

High grade and muscle c-invasive tumors tended to have a larger bromodeoxyuridine labeled cell index.

ることを報告している。しかしながらこれらの従来の検討においては、S期細胞に選択的に取り込まれる thymidine を³H を中心とした放射性物質により標識しその増殖性を検討する方法が主体であった。最近になり、これら細胞増殖に関連する物質あるいは抗原が明らかにされ、これら物質を応用した癌細胞の増殖性の観察が行われるようになった。これらの物質には proliferating cell nuclear antigen (PCNA), DNA polymerase- α , Ki-67, そして bromodeoxyuridine などが挙げられる。Lipponen らは PCNA の免疫組織染色の結果と膀胱移行上皮癌の予後とは密接な関連があったことを報告している。

1982年、Gratzner ら⁴³⁾は thymidine の analogue である bromodeoxyuridine に対する抗体を開発し、このことは従来放射性物質を使用した thymidine の取り込み率の検討をより容易に行うことを可能とし、特に最近ではフローサイトメトリーを用いたより客観的な細胞増殖動態の解析方法として注目されている^{44)~46)}。著者らは bromodeoxyuridine (Brd U) を in vitro において腫瘍細胞に標識し、フローサイトメトリーにより標識率を求め膀胱癌の悪性度・浸潤性との対比あるいは予後との関連を検討した^{47)~49)}。81例の膀胱癌の検討において、11例の grade-1症例における BrdU 標識率は5.3±2.7%、41例の grade-2症例では7.7±8.9%、29例の grade-3症例では15.2±8.2%であり膀胱癌全体の平均は10.0±8.0%であった。また、表在性膀胱癌56例の BrdU 標識率は6.9±5.5%であったのに対し、25例の筋層浸潤腫瘍では17.0±8.5%であり、筋層浸潤性腫瘍の BrdU 標識率は有意に高値を示した。これを grade-1の BrdU 標識率の平均+2SD である10.7%で区別してその予後を検討すると、51例の低 BrdU 標識腫瘍の3年生存率は98.0%であったのに対し、30例の高 BrdU 標識腫瘍のそれは42.9%と BrdU 高標識腫瘍の予後は不良であった。さらに、これを grade-3腫瘍に限って検討すると、7例の低 BrdU

図3 Grade-3膀胱癌症例の bromodeoxy-uridine 標識率の差による予後の検討。

BrdU-LI: bromodeoxyuridine 標識率

図4 組織学的悪性度と bromodeoxyuridine 標識率によるスコア別生存率。

腫瘍の3年生存率は85.7%に対し、22例の高 BrdU 腫瘍のそれは27.3%と,grade-3腫瘍の予後を BrdU 標識率により区別し得る可能性があるものと考えられた。さらに、著者らは BrdU 標識率と組織学的悪性度より膀胱癌のスコアリングを試みた⁵⁰⁾。このスコアリングで最も低値の膀胱癌症例では3年生存率は100%であったのに対し最も高スコアを呈した症例の3年生存率は17.3%とその予後は極めて不良であった。これら結果より膀胱癌の細胞増殖はその予後と極めて密接に関連することが予想される。

BrdU と同様細胞の増殖性を検討するマーカーとして proliferating cell nuclear antigen (PCNA) が

挙げられる。PCNA は1987年 Miyachi ら⁵¹⁾がSLE 患者血清中の自己免疫抗体の核内抗原に対して命名し、その後、増殖期の細胞に出現する核蛋白として同定されていた cyclin と同一物質であることが明らかにされた。DNA polymerase- δ の補助蛋白であり、DNA 合成に深く関与し、細胞周期の late G1 から S 期に発現が認められるとされている。PCNA はパラフィン包埋標本においてもその検討が可能なることより病理組織像との対比が容易である⁵²⁾。Lipponen ら⁵³⁾は178例の膀胱移行上皮癌を検討し、PCNA の陽性染色率は浸潤癌で高値であり、表在性膀胱癌の予後因子として有用であることを報告している。同様に Hattori ら⁵⁴⁾も膀胱癌における PCNA 標識率の測定は膀胱癌浸潤性の指標および予後因子として有用であることを示している。

増殖期細胞の指標として Ki-67 の研究も数多く報告されている。Ki-67 は Gerdes ら^{55)~56)}により増殖期細胞関連蛋白に対する抗体として開発され各種細胞の増殖性の研究に用いられて来た。Ki-67 陽性細胞は G1, S, G2/M に広く分布し、mRNA 合成のための DNA 複製の際に必要な酵素と考えられており、resting cell (G0) 以外の細胞においてはその存在が認められる。Fontana ら⁵⁷⁾は膀胱癌101症例に対し Ki-67 に対する抗体による免疫組織染色の検討を行い Ki-67 陽性細胞と組織学的悪性度とは極めて密接な関連があることを報告している。さらに彼らは、Ki-67 陽性細胞の腫瘍組織内での分布を検討し、浸潤癌においては腫瘍基部を中心に腫瘍全体に分布するのに対し、表在性癌においては表層部を中心に分布していたとしている。Tsujihashi ら⁵⁸⁾、Bush ら⁵⁹⁾も Ki-67 の膀胱癌浸潤性規定因子あるいは予後因子としての有用性を報告している。

さらに、細胞増殖のマーカーとして核小体形成体関連蛋白である argyrophilic nuclear organizer region associated protein (AgNOR) が細胞増殖と関連することが多くの臓器において報告されている⁶⁰⁾。AgNOR は RNA polymerase 1 による rDNA 転写活性の指標と考えられており、細胞増殖能の亢進した細胞核内では核小体の解離が起こり、AgNOR が分散し、AgNOR 数の増加として観察される。他の増殖性マーカーと同様に high-grade, high-stage の膀胱癌においてその数が増加する傾向が報告されている⁶¹⁾⁶²⁾。さらに AgNOR は表在性膀胱癌の進展あるいは予後と密接に関連するが非乳頭状増殖を示す膀胱癌における有用性は少ないことが報告されている⁶³⁾。さらに興味あ

る報告として、移行上皮癌においては AgNOR 数は c-erb B2 蛋白の発現と密接に関連し、c-erbB-2 発現の有無と細胞増殖の差が示されている⁶³⁾。

これら 3 種の細胞増殖マーカーを膀胱癌において比較検討した報告がある⁶⁴⁾。ここでの知見として、BrdU 標識率と Ki-67、PCNA 標識率とは有意な相関が認められたが、BrdU 標識率と AgNOR との間には有意な相関が認められなかったとしている。また、これら細胞増殖マーカーは腫瘍の組織学的 grade と相関するものの stage との相関は乏しかったことを報告している。

この他、最近の molecular biology の発展に伴い、syk, c-fyn, c-lyn, c-fgr, c-yes など細胞増殖あるいはシグナル伝達に関連する各種の oncogene product に対する抗体が開発され臨床との対比が進められているのが現状である。

いずれにしても、膀胱癌細胞の増殖活性がその浸潤性あるいは悪性度と密接に関連することは事実である。しかしながら、現時点において、はたしてこのことが癌細胞の特性として発現しているのか、あるいは種々の要因の結果を捉えているのかは明らかではなく、今後これら増殖性を規定する要因のさらなる解析により客観的な細胞生物学的特性の指標として臨床応用の可能性が期待される。

膀胱癌細胞における特異物質の産生と浸潤性

膀胱癌細胞の多くをしめる移行上皮癌は比較的特徴に乏しい細胞であるが、いくつかの特異的蛋白の産生が古くより報告されている。

Human chorionic gonadotropin (hCG)⁶⁵⁾、fibrinolytic protein⁶⁶⁾、angiogenic factor⁶⁷⁾、prostaglandin⁶⁸⁾、CEA⁶⁹⁾、epithelial membrane antigen⁷⁰⁾あるいは human B-cell differentiation factor⁷¹⁾さらには各種 hematopoietic cell growth factor の産生⁷²⁾⁷³⁾が証明されている。特に hCG については悪性度あるいは浸潤性の高い腫瘍においてその発現が認められるとする報告が多い。Shah ら⁷⁴⁾によれば grade-1, -2 の移行上皮癌における hCG の検出率は41症例中 0 であったのに対し、grade-3, -4 では56例中12例と高率に検出されたことが報告されている。同様に Campo ら⁷⁵⁾も high-grade の移行上皮癌における hCG の高い検出率を報告している。一方、Dexeus ら⁷⁶⁾は血清 β -hCG レベルの検討を92例の進行移行上皮癌症例に行った結果、 β -hCG 値が高値を示した症例の化学療法の反応性は不良であり治療の反応性あるいは進展を予想する上

図5 膀胱癌組織に対する抗 G-CSF 抗体による免疫組織染色。膀胱癌細胞に陽性染色所見が認められる。

で有用であるとしている。また、彼らは進行尿路上皮癌症例における carcinoembryonic antigen (CEA) および β -hCG の血清値を測定し、16例(17%)に CEA 値の高値を、また13例(14%)に β -hCG の高値を、さらに6例(6%)に両者の高値を認め、これらマーカーが症例の予後あるいは化学療法に対する反応性を判断する指標となり得る可能性を指摘している。しかしながら、多くの症例ではたとえ高度浸潤癌であっても、これら腫瘍マーカー値は正常であり、progression をしたとしても、マーカー値が高値を呈することはなく、尿路上皮細胞の CEA あるいは hCG 産生と腫瘍浸潤性とはかならずしも関連を認めないのが通常である。Smith ら⁷⁷⁾は163例の膀胱全摘術を施行した症例の血清 β -hCG 値を測定し病理組織診断における grade と stage を検討した。その結果10%の患者に β -hCG の高値が認められたものの腫瘍の grade, stage, 予後との関連は認められなかったことを結論している。

今後これらマーカーの発現機序の解明がその浸潤性との関連を検討する上で不可欠であると考えられる。

増殖因子と癌の増殖

各種増殖因子は細胞表面の特異的 receptor と結合し増殖に関する各種活性を惹起する。癌細胞においてはときとしてこれら増殖因子ないし増殖因子 receptor の異常産生あるいは異常発現をし、異常な細胞増殖を生じる可能性がある。

Epidermal growth factor (EGF) は分子量6,000の

蛋白で唾液腺、胎盤、前立腺、遠位尿細管、血小板などの正常細胞において産生されていることが知られている⁷⁸⁾⁷⁹⁾。この EGF receptor (EGF-R) は多くの上皮細胞に存在し、EGF の receptor への結合は EGF-R の tyrosine kinase 活性を刺激し、その signal 伝達の initiation を起こすことが知られている⁸⁰⁾。

EGF はヒト尿中に多量に排出されており、正常尿路上皮はもとより尿路癌も常にこの EGF の暴露を受けていることになる。Kuranami ら⁸¹⁾はヒト正常尿が移行上皮癌細胞の増殖を亢進する事実を報告している。また興味ある研究として、rat 膀胱癌モデルを使用し、異なる部位に移植した腫瘍が正常 rat の尿中 EGF により promote されることが示されている⁸²⁾⁸³⁾。さらに Messing らのグループ⁸⁴⁾は膀胱癌症例の尿中 EGF 濃度を測定した結果、膀胱癌症例では正常コントロールに比較して有意に EGF 濃度が低下していたことを報告している。

一方、EGF-R に関しては、免疫組織染色あるいは autoradiography による EGF-R 発現が研究され、正常尿路上皮に比し癌細胞に EGF-R の発現が増加していること、また high-grade あるいは invasive 腫瘍において顕著であることが示されている⁸⁵⁾。Messing ら⁸⁶⁾は EGF-R の分布は正常尿路上皮では基底層の細胞を中心に存在するのに対し、悪性あるいは異型性の部分では全体的に分布することを報告している。ここでの最大の興味は EGF-R は予後不良症例において顕

図6 ヒト膀胱癌培養細胞における RT-PCR による G-CSF および G-CSF receptor mRNA の同定.

著であり⁸⁷⁾, この EGF-R の遺伝子は chromosome 7 に存在し⁸⁸⁾ さらに chromosome 7 の hyperploidy は浸潤性移行上皮癌における最も頻度の高い cytogenetic な所見である点であろう⁸⁹⁾. また, Sauter らは⁹⁰⁾, 膀胱癌における EGF-R の発現と腫瘍の増殖性との関連を BrdU 標識率により検討し, EGF-R の発現と BrdU 標識率とに強い相関を認め, 膀胱癌増殖性と EGF-R 発現との関連を指摘している.

以上のように EGF あるいは EGF-R は他の癌種と同様膀胱癌においてもその増殖・進展に関連している可能性が高いが, より詳細なその機序の解明が今後の臨床的有用性を高める上で必要であると考えられる.

細胞増殖をコントロールする液性因子には前述の EGF のように細胞の増殖を促進する因子と, 逆に制御因子としての増殖抑制因子が存在し, その代表として transforming growth factor β (TGF- β) が挙げられる^{91)~93)}. Cooms ら⁹⁴⁾ は 7 種類の膀胱癌培養細胞株と 40 例の膀胱癌症例に対し TGF- β の mRNA 発現を Northern blotting により解析し, TGF- β 1 発現の減少

した群はその発現が正常な群に比し予後が不良であったことより TGF- β 1 の発現と予後に関連する可能性を示している.

つぎに癌細胞は各種のサイトカインを産生する可能性が多く報告されている^{95)~97)}. 膀胱癌では granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) が膀胱癌細胞より cloning され注目されている⁷²⁾. 一般的には G-CSF 産生膀胱癌の場合, 著明な白血球増多症を伴い, この腫瘍随伴症状を伴う症例の予後は通常極めて不良であり, また腫瘍の急速な進展増殖を来したような時期と一致することが多い⁷⁸⁾⁷⁹⁾. このような臨床的事実を考えると腫瘍産生の G-CSF が腫瘍自体の増殖を促す autocrine growth を強く予想させるものである.

著者らはヒト膀胱癌由来培養細胞株における G-CSF receptor の発現を¹²⁵I 標識 G-CSF を使用した receptor 結合試験により解析し, KU-1 および NBT-2 細胞に G-CSF に対する機能的受容体の存在を報告した⁹⁹⁾. これら細胞においては 1~500ng/ml 濃度の G-

CSF の添加によりその³H-thymidine の取り込みが有意に増加し G-CSF による増殖性の亢進が示唆された。一方、ごく最近、著者らは G-CSF 産生膀胱癌細胞の樹立に成功し、この細胞における増殖機序を研究したところ、本細胞は RT-PCR 法により G-CSF, G-CSF receptor 両者の mRNA を発現し、外因性 G-CSF によりその増殖が亢進し、autocrine growth を示していることが証明された¹⁰⁰⁾。このことは、膀胱癌細胞における癌の進展発育に各種増殖因子が関連する可能性を示唆するものであり、今後これら増殖因子あるいはその receptor の発現機序の解明とともに癌細胞の特性解明上興味あるものと考えられる。

また、さらに最近の知見としてこれら各種サイトカインが癌細胞における ICAM-1 あるいは integrin などの細胞接着分子の発現を増強させることが報告され¹⁰¹⁾¹⁰²⁾、癌の浸潤・転移とも関連し興味ある今後の研究課題であると考ええる。

なお、接着因子に対する分子生物学的アプローチによる癌の進展・転移に関しては香川による詳細な review がなされているので参照されたい¹⁰³⁾。

癌遺伝子と癌抑制遺伝子

膀胱移行上皮癌は他の多くの固型癌と同様に遺伝子レベルでの異常による癌の進展が予想されている¹⁰⁴⁾¹⁰⁵⁾。これらは癌遺伝子の変化あるいは増幅としてとらえられるほか癌抑制遺伝子の変化、転座あるいは欠失による不活化が知られている。泌尿器科癌に関する分子生物学の詳細は Yoshida ら¹⁰⁶⁾により詳細な review が発表されているので、ここではごく簡単に膀胱癌浸潤性との関連についてのみ述べることにする。

ヒト膀胱癌細胞においては EJ/T24 細胞の H-ras 癌遺伝子の変化が発見され¹⁰⁷⁾、その後の各種癌における癌遺伝子研究の発端となった。しかしながら、膀胱癌における ras 遺伝子の変異の発見率は 10% 以下であるのが現在までの研究の結論である¹⁰⁸⁾。最近では c-erb B-2/neu oncogene が重点的に研究されている¹⁰⁹⁾。なぜなら、c-erb-2 oncogene が重点的に研究されている¹⁰⁹⁾。なぜなら、c-erb-2 oncogene は epidermal growth factor receptor (EGF-R) と密接に関連することが判明したためである。

Wright ら¹¹⁰⁾は膀胱癌において c-erbB-2/neu の蛋白の過剰発現を報告している。また Sato ら¹¹¹⁾は c-erbB-2 oncogene を免疫組織化学および Western blotting で分析し、54 例中 17 例に c-erbB-2 産物の発現が認められこれは high-grade, high-stage の症例、な

らびにリンパ節転移症例に高率に認められたとしている。

その他、c-myc の methylation における過剰発現あるいは変化の報告があるが¹²⁾、現時点ではその真の役割は明らかでない。

一方、chromosome 17p の LOH は多くの腫瘍において存在し、大腸癌における先駆的研究では進行大腸癌の大多数においてこのことが認められている¹¹³⁾。p53 遺伝子はこの chromosome 17p に存在し、多くの大腸癌およびほぼ全ての癌種において p53 の変異が報告されている¹¹⁴⁾¹¹⁵⁾。p53 蛋白は、SV40 large T 抗原と特異的に結合する細胞由来の核内リン酸化蛋白 (分子量 53kDa) として見い出され、当初トランスフォームした細胞にその発現が認められることより p53 遺伝子は oncogene と考えられていた。その後の研究により正常型 (野生型) p53 蛋白は細胞のトランスフォーメーションを阻害し、むしろ癌化を抑制する機能を有する癌抑制遺伝子として位置付けられた¹¹⁶⁾。膀胱癌においては Sidransky ら¹¹⁷⁾が 18 例の膀胱癌中 61% に p53 gene mutation が存在したことを最初に報告し、この変異は high-stage, high-grade の腫瘍に認められ、表在性腫瘍においては稀であることを報告しており、これを支持する報告が多い¹¹⁸⁾¹¹⁹⁾。

Uchida ら¹²⁰⁾は 43 例の膀胱癌症例に対する chromosome 17p と p53 gene mutation を検討し、50% に 17p13 の LOH を認め、その 90% は pT2 以上の症例であったとしている。一方、p53 gene mutation は 43 例中 20 例 (46.5%) に認め、その 95.0% は grade-2 以上の悪性度であり、85% は pT2 以上の症例であり、high-grade, high-stage の症例で高率にその mutation が存在したとしている。さらに彼らは、p53 gene mutation の有無による予後を検討し、p53 mutation の無い群の 5 年生存率は 79.4% であったのに対し、p53 mutation の存在した群のそれは 33.3% であり p53 mutation の有無は膀胱癌予後因子としても重要であるとしている。著者らの教室においても再発例の表在性膀胱癌における p53 gene の mutation を PCR-SSCP 法により解析すると 30 例の膀胱腫瘍における検討で 4 例に p53 の mutation が存在し、その内 3 例が再発を来し、さらに 2 例は筋層浸潤癌に進展しており、表在性腫瘍においても p53 gene の mutation が存在する膀胱腫瘍の予後は不良であることが認められている¹²¹⁾。

Mutant p53 蛋白は正常型の p53 蛋白に比し、長い半減期を有しており、免疫組織染色で容易に判定しえる

ことが報告されている¹²²⁾。一方、免疫組織学的 p53 蛋白の同定は p53 gene の missense mutation に対する検査法としては有用であるが、p53 の gene nonsense mutation に対しては同定が困難であり、免疫組織化学的手法だけで p53 gene の変異を解析することは理論上限界があるように考えられる。今後さらなる解明が進み膀胱癌浸潤性と癌抑制遺伝子とのより密接な関連が明らかになることが期待される。

おわりに

以上、膀胱癌の浸潤性、進展に関連する細胞生物学的要因を中心に論じて来た。これら要因は多岐にわたり本稿においてその全てを論ずることは不可能である。Molecular biology が膀胱癌の発生ならびに進展に関する理解に大きなインパクトをもたらすであろうことが予想される。事実 Vogelstein らのグループは大腸癌における発癌と進展における遺伝子変化を詳細に明らかにしている。現状では膀胱癌で同様な変化を明らかにすることは困難であるが、これら変化に関する知見は新たな技術の開発とともに日進月歩で発展している。これら個々の発見は即座に診断・治療につながるものではないが、これらの努力が最終的には画期的な発見へのステップとなるものと期待される。

文 献

- 1) Russell, P., Raghavan, D., Philips, J. and Wills, E.J.: The biology of urothelial cancer. In the management of bladder cancer. Edited by Raghavan, D., pp. 1—41, 1988. Edward Arnold (Publishers) Ltd.
- 2) Liu, B.C.-C. and Liotta, L.A.: Biochemistry of bladder cancer invasion and metastasis (clinical implication). *Urol. Clin. North Am.*, **19**, 621—627, 1992.
- 3) Heney, N.M.: Natural history of superficial bladder cancer. *Urol. Clin. North Am.*, **19**, 429—433, 1992.
- 4) Kaye, K.W. and Lange, P.H.: Mode of presentation of invasive bladder cancer: Reassessment of the problem. *J. Urol.*, **128**, 31—33, 1982.
- 5) Heney, N.M., Ahmed, S., Flanagan, M.J., Frable, W., Corder, M.P. and Hafermann, M.D.: Superficial bladder cancer: Progression and recurrence. *J. Urol.*, **130**, 1083—1086, 1983.
- 6) Birch, B.R.P. and Hartland, S.J.: Review: The pT1 G3 bladder tumor. *Br. J. Urol.*, **64**, 109—116, 1989.
- 7) Smith, G., Elton, R.A., Chisholm, G.D., Newsam, J.E. and Hargreave, J.B.: Superficial bladder cancer: Intravesical chemotherapy and tumor progression to muscle invasion or metastasis. *Br. J. Urol.*, **58**, 659—663, 1986.
- 8) Malmström, P., Busch, H. and Norlén, B.J.: Recurrence, progression and survival in bladder cancer. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, **21**, 185—195, 1987.
- 9) Abel, P.D., Hall, R.R. and Williams, G.: Should pT1 transitional cell cancers of the bladder be classified as superficial? *Br. J. Urol.*, **62**, 235—239, 1988.
- 10) Kakizoe, T., Fair, W.R., Smith, P.H., Algaba, F., Ferrari, P., Grossman, H.B., Zirkali, Z., Tsukamoto, T., Tachibana, M.: Grossman, H. B., Zirkali, Z., Tsukamoto, T., Tachibana, M.: What is the biology of invasion and metastasis in bladder cancer? *Int. J. Urol.*, **2** (Suppl. 2), 58—63, 1995.
- 11) Gibas, Z., Prout, G.R. Jr., Conolly, J.G., Pontes, J. E. and Sandberg, A.A.: Non-random chromosomal changes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.*, **44**, 1257—1264, 1984.
- 12) Fearon, E.R., Feinberg, A.O. and Hamilton, S. R.: Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in bladder cancer. *Nature*, **318**, 377—380, 1985.
- 13) Tsai, Y.C., Nichols, P.W., Hiti, A.L., Williams, Z., Skinner, D.G. and Jones, P.A.: Allelic losses of chromosome 9, 11, and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res.*, **50**, 44—47, 1990.
- 14) Olumi, A.F., Tsai, Y.C., Nichols, P.W., Skinner, D.G., Cain, D.R.: Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinomas of the bladder. *Cancer Res.*, **50**, 7081—7083, 1990.
- 15) Gibas, Z. and Sandberg, A.A.: Chromosomal rearrangement in bladder cancer. *Urology*, **33** (Suppl.), 3—9, 1984.
- 16) Nemoto, R., Nakamura, I., Uchida, K. and Harada, M.: Numerical chromosome aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization. *Brit. J. Urol.*, **75**: 470—475, 1995.
- 17) Hopman, A.H.N., Moesker, O., Smeets, A.W.G. B., Pauwels, R.P.E., Vooijs, G.P. and Ramaekers, F.C.S.: Numerical chromosome 1,7,9, and 11 aberration in bladder cancer detected by in situ hybridization. *Cancer Res.*, **51**, 644—651, 1991.
- 18) Waldman, F.M., Carroll, P.R., Kerschmann, R., Cohen, M.B., Field, F.G. and Mayall, B.H.: Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and label-

- ling index in human bladder cancer. *Cancer Res.*, **51**, 3807—3813, 1991.
- 19) Helander, K., Hofer, P.A. and Holmberg, G.: Karyometric investigations on urinary bladder carcinoma correlated to histological grading. *Virchows Arch. (A)*, **403**, 117—125, 1984.
 - 20) Lipponen, P.K., Eskelinen, M.J. and Sotarauta, M.: Prediction of superficial bladder cancer by histoquantitative methods. *Eur. J. Cancer*, **26**, 1060—1063, 1990.
 - 21) Lipponen, P. and Eskelinen, M.: Nuclear morphometry in grading transitional cell bladder cancer compared with subjective histological grading. *Anticancer Res.*, **10**, 1725—1730, 1990.
 - 22) Blomjous, C.E.M., Schipper, N.W., Baak, J.P.A., Vas, W., de Voogt, H.J. and Meijer, C.J.: The value of morphometry and DNA flow cytometry in addition to classic prognosticators in superficial urinary bladder carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, **91**, 243—248, 1989.
 - 23) Blomjous, C.E.M., Schipper, N.W., Baak, J.P.A., de Voogt, H.J. and Meijer, C.J.: Comparison of quantitative and classic prognosticators in urinary bladder carcinoma. *Virchows Arch. (A)*, **415**, 421—428, 1989.
 - 24) Lipponen, P., Eskelinen, M. and Kiviranta, J.: Classic prognostic factor, flow cytometric data, nuclear morphometric variables and mitotic indexes as predictors in transitional cell bladder cancer. *Anticancer Res.*, **11**, 911—916, 1991.
 - 25) Barlogie, B., Raber, M.N., Shumann, J., Johnson, T.S., Drewinko, B., Swartzendruber, D.E., Göhde, W., Andreeff, M. and Freireich, E.J.: Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res.*, **43**, 3982—3997, 1983.
 - 26) Klein, F.A., Herr, H.W., Sogani, P.C., Whitmore, W.F. Jr. and Melamed, M.R.: Detection and follow-up of carcinoma of the urinary bladder by flow cytometry. *Cancer*, **50**, 389—395, 1982.
 - 27) Tribukait, B., Gustafson, H. and Esposti, P.L.: The significance of ploidy and proliferation in the clinical and biological evaluation of bladder tumours: A study of 100 untreated cases. *Brit. J. Urol.*, **54**, 130—135, 1982.
 - 28) Lipponen, P.K., Eskelinen, M.J. and Nordling, S.: Progression and survival in transitional cell bladder cancer: A comparison of established prognostic factors, S phase fraction and DNA ploidy. *Eur. J. Cancer*, **27**, 877—881, 1991.
 - 29) Malmström, P.U., Norlen, B.J., Andersson, B. and Busch, C.: Combination of blood group ABH antigen status and DNA ploidy as independent prognostic factor in transitional cell carcinomas. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, **64**, 49—55, 1989.
 - 30) Shaaban, A.A., Tribukait, B., El-Bedeiwy, A.F. A. and Ghoneim, M.A.: Prediction of lymph node metastasis with deoxyribonucleic acid flow cytometry. *J. Urol.*, **144**, 884—887, 1990.
 - 31) Tribukait, B.: Flow cytometry in assessing the clinical aggressiveness of genitourinary neoplasms. *World J. Urol.*, **5**, 108—122, 1987.
 - 32) Masters, J.R.W., Camplejohn, R.S., Constance-Perkinson, M. and Woodhouse, C.R.: DNA ploidy and the prognosis of stage pT1 bladder cancer. *Br. J. Urol.*, **64**, 403—408, 1989.
 - 33) Blomjous, C.E., Schipper, N.W., Baak, J.P.A., van Galen, E.M., de Voogt, H.J. and Meyer, C. J.: Retrospective study of prognostic importance of DNA flow cytometry of urinary bladder carcinoma. *J. Clin. Pathol.*, **41**, 21—25, 1988.
 - 34) Murphy, W.M., Chandler, R.W. and Trafford, R. M.: Flow cytometry of deparaffinized nuclei compared to histological grading for the pathological evaluation of transitional cell carcinomas. *J. Urol.*, **135**, 694—697, 1986.
 - 35) Pauwels, R., Smeets, A., Schapers, R. and Beck, H.: Are cytoflowmetry or chromosome studies or other predictors of any help determining the prognosis of low-grade superficial tumors? *Prog. Clin. Biol. Res.*, **303**, 503—510, 1989.
 - 36) deVere White, R.W., Deitch, A.D., West, B. and Fitzpatrick, J.M.: The predictive value of flow cytometric information in the clinical management of stage O (Ta) bladder cancer. *J. Urol.*, **139**, 279—282, 1988.
 - 37) Tachibana, M., Deguchi, N., Baba, S., Jitsukawa, S., Hata, M. and Tazaki, H.: Multivariate analysis of flow cytometric deoxyribonucleic acid parameters and histological features for prognosis of bladder cancer patients. *J. Urol.*, **146**, 1530—1534, 1991.
 - 38) 吉川和行: Flow cytometry による膀胱腫瘍の研究. 第2報. Flow cytometric DNA analysis による膀胱腫瘍の予後と腔内再発の解析. *日泌尿会誌*, **78**, 227, 1987.
 - 39) Lipponen, P.K., Eskelinen, M.J. and Nordling, S.: Intratumoral heterogeneity of DNA indices in transitional cell bladder cancer: Relation to tumor histology. *Eur. Urol.*, **20**, 311—314, 1991.
 - 40) Kirkhus, B., Clausen, O.P.F., Fjordvang, H. and

- Helander, K.: Characterization of bladder tumors by multiparameter flow cytometry with special reference to grade II tumors. *A.P.M.I.S.*, **96**, 783–792, 1988.
- 41) Wheelless, L.L., Badalament, R.A., deVere White, R.W., Fradet, Y. and Tribukait, B.: Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in bladder cancer. *Cytometry*, **14**, 478–481, 1993.
 - 42) Meyer, J.S.: Growth and cell kinetic measurements in human tumors. *Pathol. Annual.*, **16**(pt2), 53, 1981.
 - 43) Gratzner, H.G.: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, **218**, 474–475, 1982.
 - 44) Danova, M., Wilson, W., Riccardi, A., Mazzini, G., Ucci, G., Giordano, M., Brugnattelli, S., Luoni, R., McNally, N.J. and Ascari, E.: In vivo administration of bromodeoxyuridine and flow cytometry for cell kinetic studies in human malignancies. *Haematologica*, **72**, 115–119, 1987.
 - 45) Dolbeare, F., Gratzner, H., Pallavicini, M.G. and Gray, J.W.: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 5573, 1983.
 - 46) Nishizaki, T., Orita, T., Furutani, Y., Ikeyama, Y. and Aoki, H.: Flow-cytometric DNA analysis and immunohistochemical measurement of Ki-67 and BUdR labeling indices in human brain tumors. *J. Neurosurg.*, **70**, 379–384, 1989.
 - 47) Tachibana, M., Deguchi, N., Jitsukawa, S., Baba, S., Hata, M. and Tazaki, H.: Quantification of cell kinetic characteristics using flow cytometric measurements of deoxyribonucleic acid and bromodeoxyuridine for bladder cancer. *J. Urol.*, **145**, 963–967, 1991.
 - 48) Tachibana, M., Deguchi, N., Baba, S., Jitsukawa, S., Hata, M. and Tazaki, H.: Prognostic significance of bromodeoxyuridine high-labeled bladder cancers measured by flow cytometry: Dose flow cytometric determination predict the prognosis of patients with transitional cell carcinoma of the bladder? *J. Urol.*, **149**, 739–743, 1993.
 - 49) Miyakawa, M., Tachibana, M. and Tazaki, H.: Flow cytometric measurements of deoxyribonucleic acid ploidy and proliferative activity for evaluating malignant potential of human bladder cancers. *Cancer Detection and Prevention*, **19**, 165–172, 1995.
 - 50) Tachibana, M., Miyakawa, A., Deguchi, N., Baba, S., Murai, M. and Tazaki, H.: New scoring system based on the histological behavior and proliferative activity of tumor cells for grading the malignant potential of bladder cancers. *Int. J. Urol.*, **1**, 37–42, 1994.
 - 51) Miyachi, K., Fritzler, M.J. and Tan, E.M.: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.*, **121**, 2228–2234, 1978.
 - 52) Woods, A.L., Hall, P.A. and Shepherd, N.A.: The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathology*, **19**, 21–27, 1991.
 - 53) Lipponen, P.K. and Eskelinen, M.J.: Cell proliferation of transitional cell bladder tumors determined by PCNA/cyclin immunostaining and its prognostic value. *Br. J. Cancer*, **66**, 171–176, 1992.
 - 54) Hattori, K., Uchida, K., Akaza, H., Koiso, K., Nemoto, R. and Harada, M.: Proliferating cell nuclear antigen cyclin in human transitional cell carcinoma. *Br. J. Urol.*, **75**, 162–166, 1995.
 - 55) Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H., Schwab, U. and Stein, H.: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.*, **133**, 1710, 1984.
 - 56) Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H. and Stein, H.: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer*, **31**, 13, 1983.
 - 57) Fontana, D., Bellina, M., Gubetta, L., Fasolis, G., Rolle, L., Scoffone, C., Porpiglia, F., Colombo, M., Tarabuzzi, R. and Leonardo, E.: Monoclonal antibody Ki-67 in the study of the proliferative activity of bladder carcinoma. *J. Urol.*, **148**, 1149–1151, 1992.
 - 58) Tsujihashi, H., Nakanishi, A., Matsuda, H., Uejima, S. and Kurita, T.: Cell proliferation of human bladder tumors determined by BRDURD and Ki-67 immunostaining. *J. Urol.*, **145**, 846–849, 1991.
 - 59) Bush, C., Price, P. and Norton, J.: Proliferation in human bladder carcinoma measured by Ki-67 antibody labeling: Its potential clinical importance. *Br. J. Cancer*, **64**, 357–360, 1991.

- 60) Derenzini, M., Pession, A., Farabegoli, F., Tere, D., Badiali, M. and Dehan, P.: Relationship between interphasic nuclear organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. *Am. J. Pathol.*, **134**, 925–932, 1989.
- 61) Lipponen, P.K., Eskelinen, M.J. and Nordling, S.: Nucleolar organiser regions as prognostic factors in transitional cell bladder cancer. *Br. J. Cancer*, **64**, 1139–1144, 1991.
- 62) Lipponen, P.K. and Eskelinen, M.J.: Argyrophilic nucleolar organiser regions (Ag-NORs) in transitional cell bladder tumours related to established prognostic factors. Progression and independent prognostic value. *Oncology*, **49**, 152–157, 1992.
- 63) Lipponen, P., Eskelinen, M. and Syrjanen, S.: The use of immunohistochemically demonstrated c-erb B-2 oncoprotein expression as a prognostic factor in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur. Urol.*, **20**, 238–242, 1991.
- 64) Cohen, M.B., Waldman, F.M., Carroll, P.R., Kerschmann, R., Chew, K. and Mayall, B.H.: Comparison of five histopathologic methods to assess cellular proliferation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum. Pathol.*, **24**, 772–778, 1993.
- 65) Iles, R.K., Oliver, R.T.D., Kitau, M., Walker, C. and Chard, T.: In vitro secretion of human chorionic gonadotropin by bladder tumour cells. *Br. J. Cancer*, **55**, 623–626, 1987.
- 66) Kinjo, M., Oka, K., Naito, S., Kohga, S., Tanaka, K., Oboshi, S., Hayata, Y. and Yasumoto, K.: Thromboplastic and fibrinolytic activities of cultured human cancer cell lines. *Br. J. Cancer*, **39**, 15–23, 1979.
- 67) Chodak, G.W. and Summerhayes, I.: Detection of angiogenesis activity in malignant bladder tissue cells. *J. Urol.*, **132**, 1032–1035, 1984.
- 68) Droller, M.J., Perlmann, P. and Schneider, M. U.: Enhancement of natural and antibody-dependent lymphocyte cytotoxicity by drugs which inhibit prostaglandin production by tumor target cells. *Cellular Immunology*, **39**, 154–164, 1979.
- 69) Hall, R.R., Laurence, D.J.R., Munro, A. and Wallace, D.M.: Carcinoembryonic antigen and urothelial carcinoma. *Br. J. Urol.*, **45**, 88–92, 1973.
- 70) Russell, P., Raghavan, D. and Gregory, P.: Bladder cancer xenografts: A model of tumor cell heterogeneity. *Cancer Res.*, **46**, 2035–2040, 1986.
- 71) Christie, J.F., Gallagher, G. and Stimson, W.H.: The human bladder carcinoma line T-24 secretes a human B-cell differentiation factor. *Immunology*, **60**, 467–469, 1987.
- 72) Welte, K., Platzar, E., Lu, L., Gabrilove, J.L., Levi, E., Mertelsmann, R. and Moore, M.A.S.: Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 1526–1530, 1985.
- 73) Sato, K., Terada, K., Sugiyama, T., Matsuda, H., Kakinuma, H. and Kato, T.: Granulocyte colony-stimulating factor produced by bladder carcinoma of a patient with leukemoid reaction did not affect proliferation of the tumor cells. *J. Urol.*, **151**, 1687–1690, 1994.
- 74) Shah, V., Newman, J., Crocker, J.M., Chapple, C.R., Collard, M.J., O'Brien, J.M. and Considine, J.: Ectopic β -human chorionic gonadotropin production by bladder urothelial neoplasia. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **110**, 107–111, 1986.
- 75) Campo, E., Algaba, F., Palacin, A., Germa, R., Sole-Balcells, F.J. and Cardesa, A.: Placental proteins in high-grade urothelial neoplasms: An immunohistochemical study of human chorionic gonadotropin, human placental lactogen, and pregnancy-specific beta-1-glycoprotein. *Cancer*, **63**, 2497–2504, 1989.
- 76) Dexeus, F., Logothetis, C., Hossan, E. and Samuels, M.L.: Carcinoembryonic antigen and beta-human chorionic gonadotropin as serum markers for advanced urothelial malignancies. *J. Urol.*, **136**, 403–407, 1986.
- 77) Smith, D.J., Evans, H.J., Newman, J. and Chapple, C.R.: Ectopic human chorionic gonadotropin (HCG) production: Is the detection by serum analysis of HCG of clinical relevance in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br. J. Urol.*, **73**, 409–412, 1994.
- 78) Cohen, S.: Epidermal growth factor. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **23**, 239–242, 1987.
- 79) Gregory, H.: Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature*, **259**, 325–327, 1975.
- 80) Drucker, B.J., Mamon, H.J. and Robert, T.M.: Oncogenes, growth factors, and signal transduction. *N. Engl. J. Med.*, **321**, 1383–1391, 1989.
- 81) Kuranami, M., Yamaguchi, K., Fuchigama, M., Imanishi, K., Watanabe, T., Abe, K., Asanuma, F. and Hiki, Y.: Effect of urine on clonal growth of human bladder cancer cell lines.

- Cancer Res., **51**, 4631–4635, 1991.
- 82) Momose, H., Kakinuma, H., Shariff, S., Mitchell, G.B., Rademaker, A. and Oyasu, R.: Tumor promoting effects of urinary epidermal growth factor in rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.*, **51**, 5487–5490, 1991.
 - 83) Yura, Y., Hayashi, O., Kelly, M. and Oyasu, R.: Identification of epidermal growth factor as a component of rat urinary bladder tumor-enhancing urinary fractions. *Cancer Res.*, **49**, 1548–1553, 1989.
 - 84) Sidransky, D. and Messing, E.M.: Molecular genetics and biochemical mechanisms in bladder cancer. *Urol. Clin. North Am.*, **19**, 629–639, 1992.
 - 85) Neal, D.A. and Mellom, K.: Epidermal growth factor receptor and bladder cancer: A review. *Urol. Int.*, **48**, 365–371, 1992.
 - 86) Messing, E.M.: Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res.*, **50**, 2530–2537, 1990.
 - 87) Smith, K., Fennelly, J.A., Neal, D.E., Hall, R.R. and Harris, A.L.: Characterization and quantification of the epidermal growth factor receptor in invasive and superficial bladder tumors. *Cancer Res.*, **49**, 5810–5815, 1989.
 - 88) Shimizu, M.I., Kondo, I., Gamous, S., Behzadian, M.A. and Shimizu, Y.: Genetic analysis of hyperproduction of epidermal growth factor receptors in human epidermoid carcinoma A 431 cells. *Somat. Cell Mol. Genet.*, **10**, 45–53, 1984.
 - 89) Waldman, F.M., Carroll, P.R., Chew, K., Field, F., Germain, L. and Mayall, B.: Interphase cytogenetics and proliferative activity in bladder carcinoma (abstract). *J. Urol.*, **145**, 248A, 1991.
 - 90) Sauter, G., Haley, J., Chew, K., Kerschmann, R., Moore, D., Carroll, P., Moch, H., Gudat, F., Mihatsch, M.J. and Waldman, F.: Epidermal growth factor receptor expression is associated with rapid tumor proliferation in bladder cancer. *Int. J. Cancer*, **57**, 508–514, 1994.
 - 91) Moses, H.L., Yang, Y.E. and Pietenpol, J.A.: TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation: New mechanistic insights. *Cell*, **63**, 245–247, 1990.
 - 92) Jatten, A.M., Shirley, J.E. and Stoner, G.: Regulation of proliferation and differentiation of respiratory tract epithelial cells by TGF- β . *Exp. Cell Res.*, **167**, 539–549, 1986.
 - 93) Kurokawa, M., Lynch, K. and Podolsky, D.K.: Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: TGF- β inhibits proliferation and stimulates differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 775–782, 1987.
 - 94) Cooms, L.M., Pigott, D.A., Eydmann, M.E., Proctor, A.J. and Knowles, M.A.: Reduced expression of TGF- β is associated with advanced disease in transitional cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, **67**, 578–584, 1993.
 - 95) de Reijke, T.M., Vos, P.C.N., de Boer, E.C., Bevers, R.F.M., de Muinck-Keizer, W.H., Kurth, K.H. and Schamhart, D.H.J.: Cytokine production by the human bladder carcinoma cell line T24 in the presence of bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Urol. Res.*, **21**, 349–352, 1993.
 - 96) Hedges, S., Agace, W., Svensson, M., Sjögren, A., Ceska, M. and Svanborg, C.: Uroepithelial cells are part of a mucosal cytokine network. *Infect. Immun.*, **62**, 2315–2321, 1994.
 - 97) Kaashock, J.G.J., Mout, R., Falkenburg, J.H.F., Willemze, R., Fibbe, W.E. and Landegent, J.E.: Cytokine production by the bladder carcinoma cell line 5637: Rapid analysis of mRNA expression levels using a cDNA-PCR procedure. *Lymphokine Cytokine Res.*, **10**, 231–235, 1991.
 - 98) Sires, C., Neely, S. and Skinner, D.: Leukemoid reaction in a patient with bladder and prostatic cancer. *J. Urol.*, **135**, 366–367, 1986.
 - 99) Ohigashi, T., Tachibana, M., Tazaki, H. and Nakamura, K.: Bladder cancer cells express functional receptors for granulocyte-colony stimulating factor. *J. Urol.*, **147**, 283–286, 1992.
 - 100) Tachibana, M., Miyakawa, A., Tazaki, H., Nakamura, K., Kubo, A., Hata, J., Nishi, T. and Amano, Y.: Autocrine growth of transitional cell carcinoma of the bladder induced by granulocyte-colony stimulating factor. *Cancer Res.*, **55**, 3438–3443, 1995.
 - 101) Vitolo, D., Palmieri, B.M., Ruco, L.P., Rendina, E., Bonsignore, G. and Baroni, C.D.: Cytokine production and expression of adhesion molecules and integrins in tumor infiltrating lymphomononuclear cells of non-small cell carcinoma of the lung. *Am. J. Pathol.*, **145**, 322–329, 1994.
 - 102) Bernasconi, S., Matteucci, C., Sironi, M., Conni, M., Colotta, F., Mosca, M., Colombo, N., Bonazzi, C., Landoni, F., Corbrtte, G., Mantovani, A. and Allavena, P.: Effects of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) on expression of adhesion molecules and pro-

- duction of cytokines in blood monocytes and ovarian cancer-associated macrophages. *Int. J. Cancer*, **60**, 300—307, 1995.
- 103) 香川 征: 泌尿器科腫瘍学における分子生物学. 日泌尿会誌, **86**, 963—978, 1995.
 - 104) Weinberg, R.A.: Oncogenes, antioncogens, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.*, **49**, 3713—3721, 1989.
 - 105) Bishop, J.M.: The molecular genetics of cancer. *Science*, **235**, 305—311, 311, 1987.
 - 106) Yoshida, O., Habuchi, T. and Ogawa, O.: Recent advances in the molecular genetics of urogenital tumors. *Int. J. Urol.*, **1**, 1—16, 1994.
 - 107) Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E. and Barbacid, M.: Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E. and Barbacid, M.: A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties of the T-24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature*, **300**, 149—152, 1982.
 - 108) Fujita, J., Srivasta, S.K., Kraus, M.H., Rhim, J. S., Tronick, S.R. and Aaronson, S.A.: Frequency of molecular alterations affecting ras protooncogenes in human urinary tract tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 3849—3853, 1985.
 - 109) Slamon, D.J., Clark, S.G., Wong, W.J., Levin, W. J., Ullrich, A. and McGuire, W.L.: Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogene. *Science*, **235**, 177—182, 1987.
 - 110) Wright, C., Mellon, K., Neal, D.E., Johnston, P., Corbett, I.P. and Horne, C.H.: Expression of c-erb B-2 protein product in bladder cancer. *Br. J. Cancer*, **62**, 764—765, 1990.
 - 111) Sato, K., Moriyama, M., Mori, S., Saito, M., Watanuki, T., Terada, K., Okuhara, E., Akiyama, T., Toyoshima, K., Yamamoto, T. and Kato, T.: An immunohistologic evaluation of C-erbB-2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. *Cancer*, **70**, 2493—2498, 1992.
 - 112) Masters, J.R., Vesey, S.G., Munn, C.F., Evan, G. I. and Watson, J.V.: C-myc oncoprotein levels in bladder cancer. *Urol. Res.*, **16**, 341—344, 1988.
 - 113) Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M.: Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., van Tuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y.: Chromosome 17p deletion and p53 gene mutations in colorectal carcinoma. *Science*, **244**, 219—221, 1989.
 - 114) Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S.H., Davidson, N., Baylin, S. and Devilee, P.: Mutations in the p53 gene occur in diverse tumor types. *Nature*, **342**, 705—708, 1989.
 - 115) Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C.: p53 mutations in human cancer. *Science*, **253**, 49—53, 1991.
 - 116) Levine, A.J., Momand, J. and Finlay, C.A.: The p53 tumor suppressor gene. *Nature*, **351**, 453—456, 1991.
 - 117) Sidransky, D., Von Eschenbach, A., Tsai, Y.C., Jones, P., Summerhayes, I., Marshall, F., Paul, M., Green, P., Hamilton, S.R. and Frost, P.: Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science*, **252**, 706—709, 1991.
 - 118) Fujimoto, K., Yamada, Y., Okajima, E., Kakizoe, T., Sasaki, H., Sugimura, T. and Terada, M.: Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res.*, **52**, 1393—1398, 1992.
 - 119) Habuchi, T., Takahashi, R., Yamada, H., Ogawa, O., Kakehi, K., Ogura, K., Hamazaki, S., Toguchia, J., Ishizaki, K., Fujita, J., Sugiyama, T. and Yoshida, O.: Influence of cigarette smoking and scistosomiasis on p53 gene mutation in urothelial cancer. *Cancer Res.*, **53**, 3795—3799, 1993.
 - 120) Uchida, T., Wada, C., Ishida, H., Wang, C., Efawa, S., Yokoyama, E., Kameya, T. and Koshiba, K.: p53 mutations and prognosis in bladder tumors. *J. Urol.*, **153**, 1097—1104, 1995.
 - 121) Yoshimura, I., Kudoh, J., Saito, S., Tazaki, H. and Shimizu, N.: p53 gene mutation in recurrent superficial bladder cancer. *J. Urol.*, **151**, 1711—1715, 1995.
 - 122) Esrig, D., Spruck, C.H. III, Nichols, P.W., Chaiwun, B., Steven, K., Groshen, S., Vhen, S.-C., Skinner, D.G., Jones, P.A. and Cote, R.J.: p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am. J. Pathol.*, **143**, 1389—1397, 1993.