

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15584

研究課題名(和文) 超高感度エピゲノム検出による尿路上皮がん診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a sensitive epigenomic biomarker for urothelial cancer

研究代表者

鈴木 拓 (Suzuki, Hiromu)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20381254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱がんにおいてDNAメチル化異常は代表的なエピジェネティック異常である。筋層非浸潤性膀胱がんは再発率が高く、非侵襲的な再発診断マーカーの開発が求められている。本研究ではmiRNA遺伝子のDNAメチル化を尿中から高感度に検出する手法を開発し、膀胱がん再発診断に有用であることを明らかにした。経尿道的膀胱切除を受けた後、フォローアップ中の膀胱がん症例より自排尿を採取し、miRNA遺伝子CpGアイランドのメチル化を解析した。尿検体採取日に判明した膀胱内再発およびその後の再発と、尿中DNAメチル化を比較した結果、膀胱がん再発検出および再発予測の両方に有用なマーカーとなりうる事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It is now apparent that BCa is a genetic and epigenetic disease, and that aberrant methylation of a number of tumor-related genes is involved in BCa. Moreover, several studies have shown that urinary DNA methylation may be a useful marker for BCa diagnosis. MicroRNAs (miRNAs), which are small noncoding RNAs that post-transcriptionally regulate gene expression, have also been strongly implicated in BCa. We identified a set of miRNA genes whose promoter CpG islands are prevalently hypermethylated in BCa cells. We prospectively collected self-voided urine samples from non-muscle invasive BCa (NMIBC) who had undergone transurethral resection of BCa. We found that the number of methylated genes (M-score) and quantitative levels of methylation in the urine specimens are strongly associated with current and late intravesical recurrence of BCa. Our data suggest that urinary methylation of miRNA genes may be a useful marker for detecting and predicting BCa recurrence.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：膀胱がん DNAメチル化 miRNA 診断マーカー 再発予測

1. 研究開始当初の背景

がんはゲノム・エピゲノム異常の蓄積より発生するとされており、膀胱がんにおいても遺伝子変異、染色体異常、DNAメチル化異常、そして遺伝子発現変化の重要性が The Cancer Genome Atlas (TCGA)による大規模ゲノム解析からも裏付けられている(Nature 2014)。がんにおけるDNAメチル化異常には、ゲノム全体のメチル化シトシン量の減少(ゲノムワイドな低メチル化)と、CpGアイランドの局所的な高メチル化という二面性があり、後者はしばしば、がん抑制遺伝子不活性化の原因となる。膀胱がんにおいても、p16、E-cadherinをはじめ多数のがん抑制遺伝子およびがん関連遺伝子がメチル化されている。また、がんにおいてDNAメチル化異常を来す遺伝子は数百以上にもおよぶことから、バイオマーカーとしての有用性が注目されている。

近年、タンパクをコードしない non-coding RNA の重要性が注目を集め、特に microRNA (以下 miRNA) に関する研究が急速に発展した。がんでは miRNA 発現プロファイルが大きく変化しているが、そのメカニズムのひとつとして miRNA 遺伝子の DNAメチル化異常があることを申請者らは明らかにした(Cancer Res 2008, Carcinogenesis 2010)。さらに膀胱がん患者の尿中DNAから miRNA 遺伝子の DNAメチル化を検出することで、膀胱がん診断に応用しうることを明らかにした(Eur Urol. 2013)。

膀胱がんの約 70%は診断時において筋層非浸潤性膀胱がん(non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC)、約 30%は筋層浸潤がん(MIBC)である。NMIBCの死亡リスクは比較的低い、治療後の膀胱内再発率の高さが問題であり、10年間の再発率は70%以上に上ると報告もある。NMIBC治療後のフォローアップ期間における再発スクリーニング法として膀胱鏡検査が重要であるが、患者への身体的負担の大きさから、非侵襲的なバイオマーカーの開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、尿中DNAメチル化の高感度な検出法を開発し、尿路上皮がんのリスク予測や超早期診断、浸潤・転移予測、再発スクリーニングなどに資するエピジェネティック診断技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 解析対象

札幌医科大学付属病院および関連施設にて、経尿路的膀胱切除術(TURBT)により治療を受けたNMIBC患者の外来フォローアップ期間における自排尿を採取した。この研究は札幌医科大学臨床研究審査委員会の承認を得ている。30mlの尿検体に対し15mlの保存液(ThinPrep, Hologic)を混合し、4にて保

管した。その後3000rpm、30分にて遠心分離し沈渣からフェノールクロロホルム法にてゲノムDNAを抽出した。

(2) DNAメチル化解析

尿中DNAを対象に、Infinium Human Methylation450 BeadChip (Illumina)により網羅的なDNAメチル化解析を行った。またマーカー候補遺伝子のDNAメチル化をバイサルファイト・パイロシークエンス法、MethyLight法、digital MethyLight法にて解析した。DNAメチル化マーカー候補として4種類のmiRNA遺伝子(miR-A, miR-B, miR-C, miR-D)のプロモーターCpGアイランドを選択した。メチル化が検出された遺伝子数をM-scoreとしてスコア化した。また個々のマーカーの定量DNAメチル化レベルを評価した。

(3) 統計解析

臨床病理学的因子と、DNAメチル化との相関をカイ二乗検定およびフィッシャー検定により検証した。また膀胱がん再発とDNAメチル化との相関をロジスティック解析分析およびCox比例ハザード解析、Receiver operating characteristics (ROC)曲線解析、カプランマイヤー解析により検証した。

4. 研究成果

(1) 尿検体および臨床情報

TURBT治療を受けたNMIBC患者137例から、治療後のフォローアップ期間において217検体の自排尿を採取した。このうち、10検体は抽出したDNA品質および量が不十分であったため、解析から除外した。この結果、132症例から採取した207検体の自排尿を解析対象とした。207検体のうち40検体は、38症例の膀胱内再発患者より採取された。このうち、26検体(25症例)は尿検体採取と同日に行われた膀胱鏡検査にて膀胱内再発が検出された(同時再発)。また14検体(12症例)は、その後のフォローアップ期間において再発が検出された(遅発再発)。従って、同時再発群の尿検体から尿中DNAメチル化マーカーの再発検出能を評価し、遅発再発群の尿検体から再発予測能を評価することとした。なお、同時再発を示した26検体の尿検体のうち、尿細胞診が陽性であったのはわずか2検体であった(感度7.7%、特異度100%)。

(2) M-scoreシステムによる膀胱がん再発検出・予測能の評価

尿中から検出されたマーカーの数をM-scoreとしてスコア化した(0点~4点)。ROC曲線解析から、カットオフ値をM-score 3と設定した場合の膀胱がん再発検出能は感度61.5%、特異度74.0%、area under curve (AUC) 0.71であった。またCox比例ハザード解析から、M-score高値(≥3)は膀胱がん再

発リスクと高く相関した（ハザード比 3.353）、高 M-score 群(≥3) と低 M-score 群(≤2) の 1 年後再発フリー率はそれぞれ 87.4%、94.6%であった。

(3) 定量 DNA メチル化値による膀胱がん再発検出・予測能の評価

次に各マーカー遺伝子の DNA メチル化定量値を用いた場合の膀胱がん再発診断能を検討した。カットオフ値を 7.875%と設定した場合、膀胱がん再発検出能は感度 73.1%、特異度 71.8%、AUC 0.77 と、M-score よりも良好な結果であった。Cox 比例ハザード解析の結果、高メチル化群の膀胱がん再発リスクはハザード比 8.030 であった。高メチル化群と低メチル化群の 1 年後再発フリー率はそれぞれ 66.7%、94.3%であった。

(4) 尿中 DNA メチル化マーカーの予後予測と治療法選択への応用

膀胱内再発を繰り返す NMIBC に対しては、膀胱全摘による根治手術が行われるが、そのような再発リスクの高さを尿中 DNA メチル化マーカーにより予測することができれば、早期の膀胱全摘術など治療方針決定に有用と考えられる。今回解析対象とした 132 症例のうち 5 例が、その後、膀胱全摘術の適応となった。尿中 DNA メチル化マーカーの定量メチル化値あるいは M-score と膀胱温存率との相関を解析した結果、1 年後膀胱温存率は高メチル化群において 73.4%、低メチル化群において 100%であった。このことから、尿中 DNA メチル化マーカーは早期膀胱全摘の必要性を検討するために有用な情報となる可能性が示唆された。

(5) 考察および結語

近年、尿中 DNA マーカーとして様々な遺伝子を用いた研究が報告されている。例として、OTX1、ONECUT2、OSR1 のメチル化と FGFR3 変異を組み合わせることで、膀胱がん再発診断が可能という報告や、SOX1、IRAK3、L1-MET のメチル化により膀胱がん再発リスク予測が可能という報告がある。今回我々は、miRNA 遺伝子の尿中 DNA メチル化が膀胱がん再発検出・再発予測に有用である事を初めて明らかにした。尿中 DNA メチル化を高感度かつ定量的に解析し、再発リスクを評価することで、膀胱鏡検査の必要性や、早期膀胱全摘の適応の判断などに応用しうることを示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Kai M, Yamamoto E, Sato A, Yamano HO, Niinuma T, Kitajima H, Harada T, Aoki H, Maruyama R, Toyota M,

Hatahira T, Nakase H, Sugai T, Yamashita T, Toyota M, Suzuki H. Epigenetic silencing of diacylglycerol kinase gamma in colorectal cancer. *Mol Carcinog* [Epub ahead of print] (査読有り)

Kai M, Niinuma T, Kitajima H, Yamamoto E, Harada T, Aoki H, Maruyama R, Toyota M, Sasaki Y, Sugai T, Tokino T, Nakase H, Suzuki H (corresponding author). TET1 Depletion Induces Aberrant CpG Methylation in Colorectal Cancer Cells. *PLoS One* 11:e0168281, 2016. (査読有り)

Kumegawa K, Maruyama R, Yamamoto E, Ashida M, Kitajima H, Tsuyada A, Niinuma T, Kai M, Yamano HO, Sugai T, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Suzuki H. A genomic screen for long noncoding RNA genes epigenetically silenced by aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Sci Rep* 6:26699, 2016. (査読有り)

Sawada T, Yamamoto E, Yamano HO, Nojima M, Harada T, Maruyama R, Ashida M, Aoki H, Matsushita HO, Yoshikawa K, Harada E, Tanaka Y, Wakita S, Niinuma T, Kai M, Eizuka M, Sugai T, Suzuki H. Assessment of epigenetic alterations in early colorectal lesions containing BRAF mutations. *Oncotarget* 7:35106-35118, 2016. (査読有り)

Kamimae S, Yamamoto E, Kai M, Niinuma T, Yamano HO, Nojima M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R, Harada E, Harada T, Maruyama R, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Sugai T, Imai K, Suzuki H (corresponding author). Epigenetic silencing of NTSR1 is associated with lateral and noninvasive growth of colorectal tumors. *Oncotarget* 6:29975-29990, 2015. (査読有り)

Isosaka M, Niinuma T, Nojima M, Kai M, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Nishida T, Kanda T, Taguchi T, Hasegawa T, Tokino T, Hirata K, Suzuki H (corresponding author), Shinomura Y. A screen for epigenetically silenced microRNA genes in gastrointestinal stromal tumors. *PLoS One* 10:e0133754, 2015. (査読有り)

[学会発表](計 2 件)

進藤哲哉、清水崇、西山直隆、新沼猛、北嶋洋志、甲斐正広、伊藤直樹、舩森

直哉、鈴木拓．尿中 DNA メチル化解析
による膀胱がん再発診断法の開発．第
36回日本分子腫瘍マーカー研究会．
2016年10月5日，パシフィコ横浜（神
奈川県横浜市）
進藤哲哉、西山直隆、丸山玲緒、新沼
猛、北嶋洋志、甲斐正広、時野隆至、
鈴木拓、舛森直哉．膀胱癌におけるシ
スプラチン耐性に関与するマイクロ
RNA の同定．第75回日本癌学会学術
総会．2016年10月6日～8日，パシフ
ィコ横浜（神奈川県横浜市）

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

鈴木拓（SUZUKI Hiromu）
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：20381254

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

舛森 直哉（MASUMORI, Naoya）
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：20295356