

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18139

研究課題名(和文) Field changeの網羅的遺伝子発現解析による膀胱癌再発メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of mechanism of bladder cancer formation by molecular analysis of field change bladder urothelium.

研究代表者

林 裕次郎 (Hayashi, Yujiro)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：20804412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌では病理学的に悪性所見のない粘膜にfield changeとしてdriver変異が存在し、腫瘍再発や膀胱癌発生と関連する可能性が高いと報告されているが、field changeの分子生物学的メカニズムは解明されていない。そこで本研究では膀胱正常粘膜の網羅的遺伝子変異解析を行い、膀胱癌再発メカニズムの解明を目指した。

膀胱癌患者から採取した膀胱正常粘膜を遺伝子変異解析を行うと、TERT promoter、FGFR3、CDKN2A変異を認め、正常尿路上皮で同定されたこれらの変異はすべて、膀胱癌のゲノム進化におけるドライバー変異である可能性が高いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで明らかになっていなかった筋層非浸潤性膀胱癌の腫瘍形成に関わる遺伝子変異を同定できた。筋層非浸潤性膀胱癌と筋層浸潤性膀胱癌では異なる遺伝子プロファイルを持つ可能性が示唆され、治療法を考える上で異なるアプローチが必要となる可能性が示唆され、社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In bladder cancer, driver mutations are reported to exist as field changes in the mucosa without pathological evidence of malignancy, and are likely to be associated with tumor recurrence and bladder cancer development, but the molecular biological mechanism of field changes has not been elucidated. In this study, we performed a comprehensive gene mutation analysis of the normal bladder mucosa to elucidate the mechanism of bladder cancer recurrence.

Mutational analysis of bladder normal mucosa collected from bladder cancer patients revealed TERT promoter, FGFR3, and CDKN2A mutations, all of which were identified in normal urothelium and are likely to be driver mutations in the genome evolution of bladder cancer.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：遺伝子変異 膀胱癌 発癌 field change

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の筋層非浸潤性膀胱癌(NMIBC)患者数は年々増加している。生命予後は比較的良好であるが、再発率が高く、原発腫瘍と異なる部位で再発する空間的多発性という特徴を持つ。そのため膀胱癌患者は膀胱鏡など侵襲的で費用のかかる検査を繰り返し必要とする。再発率低減のために各種ガイドラインにおいて腫瘍悪性度などの臨床因子から再発リスクを層別化した上で、抗癌剤や BCG の膀胱内注入療法施行を推奨しているものの、BCG 注入療法は有害事象が多く、時として重篤化する問題がある。そのため膀胱癌再発や BCG 反応性をより正確に予測するバイオマーカーの開発は急務である。膀胱癌再発のメカニズムとして発癌物質などにより癌発生母地 “field change” が形成され、それぞれの母地から独立したクローンが増殖し新規に癌化するという field change 仮説が提唱されている。我々はこれまでの研究で尿路上皮癌治療後、肉眼的に病変を認めない状態でも尿中 cell free DNA に癌の driver mutation の一つである *TERT* promoter 変異が検出可能で腫瘍再発と関連することを報告してきた。これらより病理学的に悪性所見のない粘膜に field change として *TERT* promoter 変異を始めとした driver mutation が存在し、腫瘍再発や膀胱癌発生と関連する可能性が高いものの、NMIBC においては field change の分子生物学的メカニズムは解明されていない。つまり、膀胱癌再発メカニズムを検討する上では切除した腫瘍の解析だけではなく、その後の腫瘍発生母地となる field change の網羅的遺伝子発現解析が、膀胱癌再発メカニズムの解明へつながる可能性が高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では病理学的に悪性所見のない field change に注目した網羅的遺伝子解析による筋層非浸潤性膀胱癌の再発、発生メカニズムを解明することを目的とする。また、筋層非浸潤性膀胱癌(NMIBC)と筋層浸潤性膀胱癌(MIBC)は遺伝子変異プロファイルが大きく異なることが知られており、両者は癌の発生において大きく異なる可能性が示唆されている。Field change に注目した癌の進化ゲノミクス解析により、この両者の違いを field change の観点から評価を行う。

## 3. 研究の方法

関連施設で経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TURBT) および系統的膀胱生検を受けた NMIBC 患者を対象として、膀胱生検のうち、病理学的に正常な検体を選択し、正常尿路上皮の解析に使用した。経尿道的切除により得られた腫瘍検体 (pTa、pTis、または pT1) を使用した。*TERT* promoter 変異は droplet digital PCR を用いて解析を行った。そのほかの癌遺伝子は 50 遺伝子をターゲットにした Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 を使用し解析を行った。

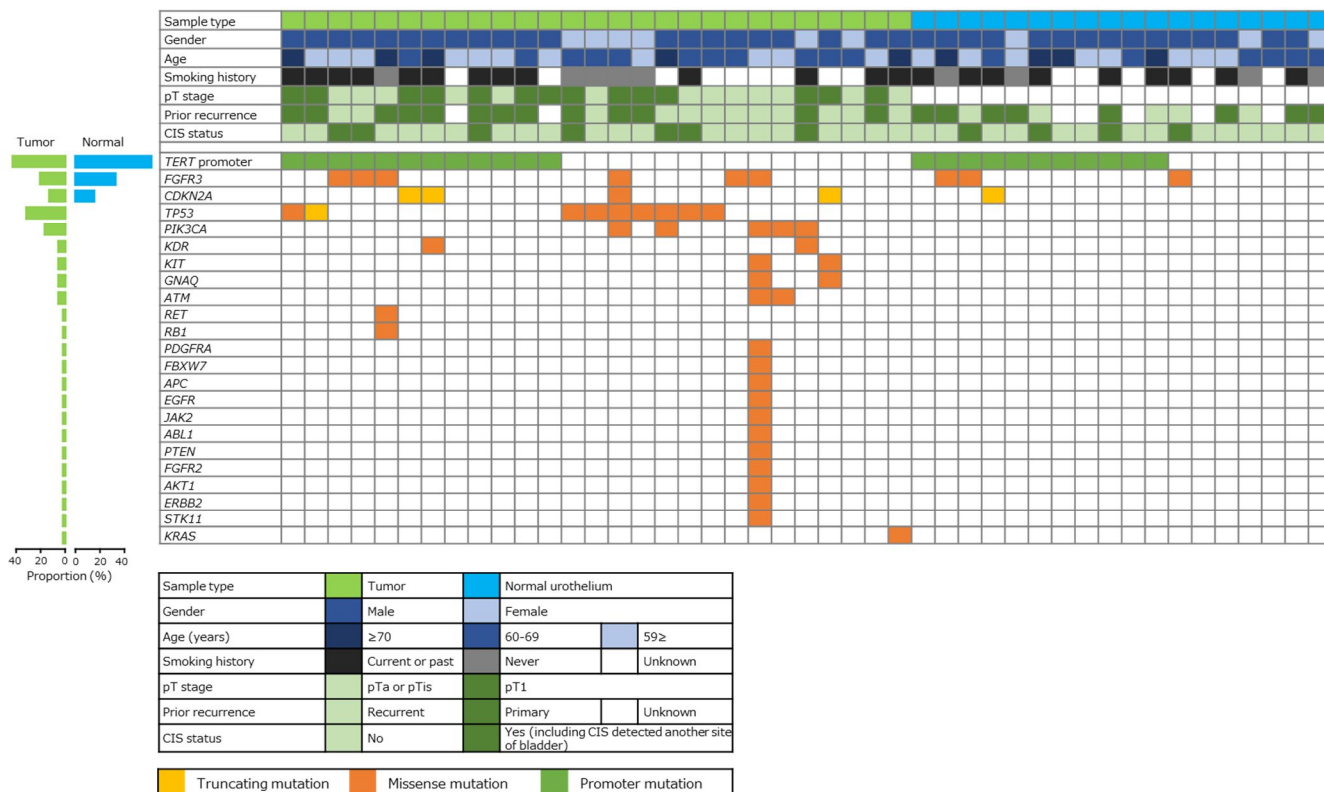
## 4. 研究成果

NMIBC 患者 22 名の腫瘍 27 検体、正常 18 検体を解析対象とした。患者の特徴を表に示す。腫瘍 27 検体のうち、13 検体 (48%) が pTa、14 検体 (52%) が pT1、7 検体 (26%) が同時性非浸潤癌 (CIS) と診断された。病理学的に正常な 18 検体のうち、4 検体 (22%) が CIS を併発した患者から採取された検体であった。各検体の標的領域のカバー深度は平均 29911 倍であった。腫瘍と正常尿路上皮の体細胞突然変異の状況を図に示す。腫瘍 27 検体のうち、25 検体 (93%) が少なくとも 1 つの体細胞変異を有していた。一方、正常尿路上皮では 12 例 (67%) に少なくとも 1 つの体細胞変異が見られた。*TERT* プロモーター領域の体細胞変異は、腫瘍 (44%) および正常検体 (61%) の両方で最も頻繁に確認された。*FGFR3*、*CDKN2A* 変異も腫瘍と正常尿路上皮の両方で同定されたが、

TP53 と PIK3CA 変異は腫瘍検体でのみ検出された。正常尿路上皮で同定されたこれらの変異はすべて、The Cancer Genome Atlas (TCGA) により腫瘍組織で頻度の高い変異として報告されていることから、TERT promoter、FGFR3、CDKN2A 変異は NMIBC のゲノム進化におけるドライバー変異である可能性が高いと考えられた。

本研究を通して NMIBC では正常粘膜にも癌遺伝子変異が存在し、癌発生と深く関与していることが示唆された。今後は MIBC と NMIBC を比較することで両者のプロファイル、癌発生の違いを検討していく予定としている。本研究成果は膀胱癌診療の発展に寄与し、社会的意義が大きいと考えられる。今後もさらなる検討を積み重ね、膀胱癌診療の発展が大きく期待される。

☒ Somatic mutation landscape of tumor and normal samples from patients with NMIBC



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayashi Yujiro, Fujita Kazutoshi, Nojima Satoshi, Tomiyama Eisuke, Matsushita Makoto, Koh Yoko, Nakano Kosuke, Wang Cong, Ishizuya Yu, Kato Taigo, Hatano Koji, Kawashima Atsunari, Ujike Takeshi, Uemura Motohide, Imamura Ryoichi, Morii Eiichi, Nonomura Norio	4. 巻 14
2. 論文標題 TERT C228T mutation in non malignant bladder urothelium is associated with intravesical recurrence for patients with non muscle invasive bladder cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 2375 ~ 2383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12746	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yujiro Hayashi*, Kazutoshi Fujita, Kyosuke Matsuzaki, Makoto Matsushita, Yoko Koh, Kosuke Nakano, Cong Wang, Yu Ishizuya, Yoshiyuki Yamamoto, Taigo Kato, Koji Hatano, Atsunari Kawashima, Takeshi Ujike, Motohide Uemura, George Netto, Norio Nonomura
2. 発表標題 TERT PROMOTER MUTATION IN NON-MALIGNANT UROTHELIUM OF BLADDER IS ASSOCIATED WITH RECURRENCE IN PATIENTS WITH NON-MUSCLE INVASIVE BLADDER CARCINOMA
3. 学会等名 American Urological Association annual meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林裕次郎、藤田和利、富山栄輔、松下慎、加藤大悟、波多野浩士、河嶋厚成、高尾徹也、高田晋吾、植村元秀、今村亮一、野々村祝夫
2. 発表標題 尿路上皮癌における尿中cell-free DNAの臨床的有用性
3. 学会等名 日本分子腫瘍マーカー研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yujiro Hayashi, Kazutoshi Fujita, Masatoshi Konishi, Yoko Maegawa, Masaru Tani, Toshihisa Asakura, Yoichi Kakuta, Koichi Tsutahara, Tetsuya Takao, Norio Nonomura
2. 発表標題 Clinical potential of TERT promoter mutation in non-malignant urothelium; towards precision BCG instillation therapy
3. 学会等名 癌治療学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------