

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791508

研究課題名（和文） 膀胱がんにおける尿中 DNA メチル化マーカーの臨床的有用性に関する研究

研究課題名（英文） Diagnostic markers of urothelial cancer based on DNA methylation analysis

研究代表者

千原 良友 (CHIHARA YOSHITOMO)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40405395

研究成果の概要（和文）：網羅的DNAメチル化解析の結果より同定された膀胱がん特異的にDNAメチル化異常を生じる12遺伝子について膀胱がん患者尿を対象としたvalidation studyを行った。それぞれのマーカーにカットオフ値を設定し、6マーカー以上でDNAメチル化異常を認めた症例を異常と設定した。膀胱がん患者尿と健常者尿との比較検討では感度100%、特異度100%の正確さで膀胱がん診断が可能であった。同一症例における膀胱がん術後経時的尿の検証では、観察期間に再発を認めた7例中5例で再発時尿において6マーカー以上のDNAメチル化異常を認めた。観察期間に再発を認めなかった12例中10例では観察期間最終尿で6マーカー以上にDNAメチル化異常を認めなかった。これらの結果からわれわれが同定した遺伝子群のDNAメチル化異常は膀胱がん特異的に生じる変化であり、尿中剥離細胞に反映された。これらのマーカーは膀胱がん診断のスクリーニングのみならず、再発診断にも有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this multi-center study, three independent sample sets were prepared. First, DNA methylation levels at CpG loci were measured in the training sets using the Illumina GoldenGate methylation assay to identify differentially methylated loci. Next, these methylated loci were validated by quantitative DNA methylation by PSQ, using another cohort of tissue samples. Lastly, methylation of these markers was analyzed in the independent urine samples (Urine validation set). ROC analysis was performed to evaluate the diagnostic accuracy of 12 selected markers. In the panel analysis, 12 loci showed remarkable alterations between urine from cancer patients and healthy urine, with 100% sensitivity and 100% specificity. Similarly, these markers showed favorable diagnostic accuracy for recurrence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

非浸潤性膀胱がんは膀胱がんの約 70%を占め、経尿道的切除術(TUR)等の治療により膀胱機能の温存が可能であるが、浸潤がんでは膀胱全摘術の適応となり、多大な手術侵襲と QOL の低下を伴う。また非浸潤がんの約 80%は TUR 後再発し、約 10%は浸潤がんに進展する。したがって膀胱がんの治療方針や予後観察方針の決定には、浸潤性の有無と再発のリスク、特に悪性進展の予知が重要である。現状での膀胱がん診断の gold standard は膀胱鏡と尿細胞診であり、両者の組み合わせによって腫瘍の大半は診断可能であるが、膀胱鏡は侵襲性が高く、尿細胞診は尿中でのがん細胞の変性により困難な場合があり低悪性度の腫瘍に対しては感度が低いという欠点がある。したがって、尿資料を用いた低侵襲な診断、予後予測マーカーの開発が期待されている。

2. 研究の目的

尿中剥離細胞に生じる DNA メチル化異常を指標とした膀胱がん診断マーカーを確立する。

3. 研究の方法

本研究に先立ち、膀胱がん組織(n=91)、担がん正常尿路上皮 (n=34)、正常尿路上皮 (n=12)を対象とした網羅的メチル化解析を行い、膀胱がん特異的に DNA メチル化異常を示す 30 遺伝子を同定した。本研究ではこれらのマーカーの臨床的有用性を検討する為、下記に示す 3 段階の検討を行なった。

①膀胱がん組織を用いた検討

網羅的解析で対象とした症例とは別のコホート(腫瘍: n=53, 担がん正常尿路上皮: n=25, 正常尿路上皮: n=21)を用いたパイロシーケンス法による定量的 DNA メチル化解析を行なった。

②膀胱がん患者尿と健常者尿を用いた検討

①で対象とした患者と異なるコホート(膀胱がん患者尿: n=73, 健常者尿: n=18)を用いた定量的解析を行なった。

③同一患者の術後経時的尿を用いた検討

非浸潤膀胱がん患者(n=19)術後 3 ヶ月毎の経時的尿を対象とし定量解析を行い、観察期間における再発の有無と比較検討した。

4. 研究成果

網羅的解析より同定した 30 遺伝子の定量的メチル化解析の結果から、11 遺伝子より 12 箇所の CpG 部位をマーカーとして選択した。(高メチル化マーカー: *SOX1*, *TJP2*, *MYOD*, *HOXA9* 低メチル化マーカー: *VAMP8*, *CASP8*, *SPPI*, *IFNG*, *CAPG*, *HLADPI*, *RIPK3*) それぞれのマーカーのDNAメチル化頻度からROC解析によりカットオフ値を設定した。マーカーの組織および尿におけるAUC (Area under curve)はそれぞれ0.58-0.97、および0.67-0.93であった。さらにマーカーをパネル解析し、DNAメチル化異常が6マーカー以上に生じる場合を異常とした。膀胱がん組織を用いた検討では感度94.3%、特異度97.87%の正確さで膀胱がん診断が可能であった。また尿試料を用いた検討では感度、特異度ともに100%の正確さで膀胱がん診断が可能であった。19例の同一症例における膀胱がん術後経時的尿を対象とした検討では、観察期間に再発を認めた7例中5例で再発時尿において6マーカー以上のDNAメチル化異常を認めた。観察期間に再発を認めなかった12例中10例では観察期間最終尿で6マーカー以上にDNAメチル化異常を認めなかった。これらの結果からわれわれが同定した遺伝子群のDNAメチル化異常は膀胱がん特異的に生じる変化であり、尿中剥離細胞に反映された。これらのマーカーは膀胱がん診断のスクリーニングのみならず、再発診断にも有用であることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 3 件)

① 千原良友 Two molecular pathways to bladder cancer involve opposing roles of DNA methylation. 日本癌学会学術集会 (2010年9月23日、大阪)

② Chihara Y, Kuniyasu H, Liang G et al. Diagnostic indicator of urothelial cancer based on DNA methylation analysis. American Urological Association Annual meeting (2011年5月15日、ワシントンDC)

③ 千原良友、金井弥栄、藤本博行、尿中DNAメチル化異常を指標とした尿路上皮がん診断. 日本泌尿器科学会総会 (2011年4月21日、名古屋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千原 良友 (CHIHARA YOSHITOMO)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40405395