

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23791782
研究課題名（和文） 膀胱癌に特異的に発現する分子を用いた新規尿バイオマーカーの確立
研究課題名（英文） Identification of novel urine biomarkers using molecules which was Specifically expressed in bladder cancer.
研究代表者 高田 亮（TAKATA RYO） 岩手医科大学・医学部・講師 研究者番号：00438467

研究成果の概要（和文）：

近年増加傾向にある膀胱癌の新たな診断ツールとして、新規尿バイオマーカーの確立を目的に研究をおこなった。MPHOSPH1 と DEPDC1 について、リアルタイム PCR 法を用いて発現定量解析をおこなうと、尿沈渣中に含まれる白血球の混入が発現に影響していることが判明し、CD13 と CD31 の発現定量を行ってその補正を試みた。その結果、CD31 の発現を用いて補正を行うと、担癌患者において正常検体に比べ発現亢進している傾向が認められた。また、非浸潤性膀胱癌と浸潤性膀胱癌間の発現比較をおこなったところ、筋層浸潤性膀胱癌症例群において有意に 2 遺伝子の発現上昇を認めた。そこで、この 2 群で沈渣より蛋白を抽出し、ウエスタン法による比較を行うと、RNA と同様に進行例において蛋白発現の上昇傾向を確認した。

研究成果の概要（英文）：

As new diagnostic tools of bladder cancer, we attempted to establish novel urine biomarker for the bladder cancer. Although we analyzed gene expression levels of MPHOSPH1 and DEPDC1, contamination of white blood cells affected the results. Therefore we corrected contamination level using expression levels of CD13 and CD31. As a results, when we use CD31 expression as correction factor, Expression levels of MPHOSPH1 and DEPDC1 of bladder cancer patients were higher than that of normal controls. Protein expression level showed similar result.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：膀胱癌、バイオマーカー、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は、泌尿器科悪性腫瘍の死因の第 2 位を占める癌疾患であり、その罹患率は本邦において増加傾向にある。血尿を契機に発見されることが多く、確定診断としては膀胱鏡検査がおこなわれる。しかし本検査は侵襲的で苦痛を伴い、出血や感染のリスクも伴う。そこで対象患者の絞り込みとして、超音波検査や尿細胞診検査がおこなわれるが、超音波検査は微小病変の描出は困難であり、細胞診検

査においてはその感度の低さが指摘されている。

そこで、より簡便で感度の高い新たな診断ツールとして尿バイオマーカーが開発され、本邦においても尿中 BTA、尿中 NMP22 などが保険適応されているが、尿細胞診に比べ感度は高いものの、尿路感染症や結石などで偽陽性を呈し、特異度は低いのが問題である。また高悪性度・進行癌に比し、低悪性度・早期の癌の検出率は十分ではない。

一方、近年の分子生物学の進歩は、癌細胞特異的に発現する分子の同定を可能とした。これらの分子は正常細胞では発現しておらず、各種癌に対する新たなバイオマーカーとなることが期待される。

2. 研究の目的

われわれは以前、東京大学医科学研究所ヒトゲノム研究センターとの共同研究により、レーザーマイクロビームマイクロダイセクション法を用いて膀胱癌細胞のみを選択的に採取し、cDNA マイクロアレイをもちいて膀胱癌特異的な網羅的遺伝子発現プロファイルを構築した。この遺伝子情報より、膀胱癌において正常膀胱に比べ高発現しており、生命維持に重要な臓器での発現の低い分子を新規分子標的治療薬の候補遺伝子として抽出し、現在まで臨床応用に向けた検討をおこなっている。

今回、われわれが同定した、膀胱癌で特異的に発現しており正常膀胱で発現を認めない分子である MPHOSPH1 および DEPDC1 について、高精度の新たな尿バイオマーカーとしての可能性を検討すべく本研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) 検討症例

本学および関連病院において、膀胱癌（尿路上皮癌）と診断された症例を対象に研究をおこなった。非浸潤性膀胱癌 55 例、浸潤性膀胱癌 15 例を対象に尿検体を収集した。

尿検体は可能な限り早朝尿とし、得られた尿検体は RNA 解析用とタンパク解析用に速やかに分注。RNA 解析用検体については 1500rpm 5 分間遠心したのち、沈渣成分を RNA 安定化試薬とともに -80°C で凍結保存した。タンパク解析用に関しては、同様に遠心後、上清成分と沈渣成分を別々に採取し、これを -80°C で速やかに凍結保存した。なおこれら患者において、遺伝子解析のために書面によるインフォームドコンセントを得ている。

対象となる健常検体については、書面で同意の得られたボランティアより上記と同様の方法で尿の採取をおこなった。

(2) RNA の抽出と real-time PCR

-80°C で保存された尿沈渣より、RNA 抽出試薬を用いて RNA を抽出。ランダムプライマーを用いた逆転写反応により、各症例の cDNA を作成。

Real-time PCR については、MPHOSPH1 と DEPDC1 の各々について 3 か所以上のプライマーを作成し、もっとも効率よく再現性の高いシングルバンドが得られたプライマーセットを採用した。増幅領域に合わせて蛍光プローブを用意し、Standard curve 法をもちいて各検体の遺伝子発現量を定量した。

(3) 統計学的解析

得られた相対定量値を膀胱癌患者と健常人で統計解析。適切な癌診断のカットオフ値を ROC 曲線解析によって検討し、その感度と特異度を検討した。また、臨床情報と発現量の関連についても単変量・多変量解析で検討した。

(4) 抗体を用いた MPHOSPH1 および DEPDC1 の尿中タンパク質の定量

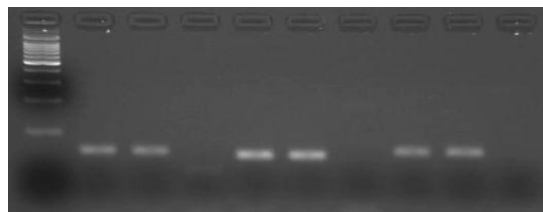
MPHOSPH1 および DEPDC1 の特異的抗体をもちいて、尿中に含まれる各々のタンパク質の定量を試みた。

4. 研究成果

(1) Real-time PCR による MPHOSPH1 と DEPDC1 の遺伝子発現検討

① プライマーの検討

MPHOSPH1 と DEPDC1 について 3' より 1000kb 以内の部位を対象としてプライマーおよびプローブを 3 か所ずつ設計した。MPHOSPH1 は Exon をまたいだプライマー設計ができなかったため、1 つのエクソン内にプライマーとプローブが局在する形となったが、DEPDC1 は第 2-3 エクソンをまたいだプライマー構築が可能で、より正確なアッセイが期待された。完成したプライマーを用いて膀胱癌細胞株 UMUC3 より抽出した mRNA で PCR をかけると、いずれもきれいなシングルバンドが得られた（図 1）。



（図 1）MPHOSPH1 におけるプライマーチェック
いずれもシングルバンドが得られている

そこで、これらのプライマーとプローブを用いて段階的に希釈した mRNA に対してリアルタイム PCR を行い、最も増幅効率の良い 1 プライマーセットを選択し、以後の検討に使用した。

② 検体の準備

まずは文章による同意が得られた筋層非浸潤性膀胱癌 30 例、筋層浸潤性膀胱癌 10 例を対象として尿検体を採取し、その尿沈渣より mRNA を採取した。また、膀胱癌の罹患歴のない健常人 5 名より尿検体を採取し、同様に RNA を抽出した。

抽出された RNA を oligo dT プライマーを用いて逆転写を行い、各検体の cDNA を作成。

-20°Cで保存した。

③Real-time PCR

続いてリアルタイム PCR による MPHOSPH1 と DEPDC1 の発現検討を行った。リアルタイム PCR は各々の cDNA の希釈前検体 (5 倍濃縮) を混合したものを 5 段階に 5 倍希釈し Standard curve 法で定量した。また、GAPDH をハウスキーピング遺伝子として発現の定量を行った。

④膀胱癌症例と正常症例での発現比較

(a) MPHOSPH1

各症例の MPHOSPH1 と GAPDH の発現を定量し 相対発現量を求めた (図 2)。

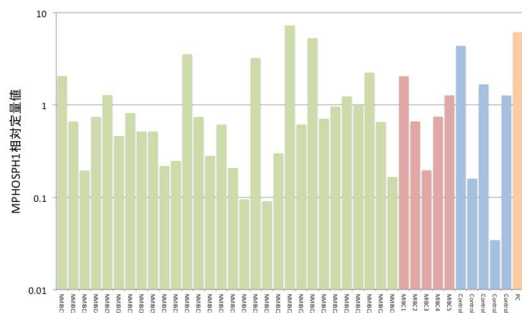


図 2 MPHOSPH1 の発現定量結果

緑が筋層非浸潤性膀胱癌、赤が筋層浸潤性膀胱癌、青が正常検体、オレンジが陽性コントロールを示す (筋層浸潤性膀胱癌は 5 例のみ検討)。

結果として筋層浸潤の有無にかかわらず正常コントロールと比べて癌検体での有意な発現上昇は認められなかった。

(b) DEPDC1

続いて DEPDC1 の発現を同様に検討した (図 3)。

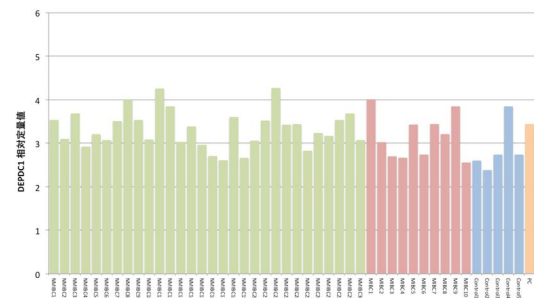


図 3 DEPDC1 の発現定量結果

緑が筋層非浸潤性膀胱癌、赤が筋層浸潤性膀胱癌、青が正常検体、オレンジが陽性コントロールを示す。

その結果、膀胱癌検体において正常検体に比べ発現が上昇する傾向が見られたが、統計学的な有意差は認められなかった ($p=0.0583$,

Student t test)。

⑤検討の問題点の抽出

結果として、発現上昇傾向は見られたものの、統計学的な有意差は得られなかった。その原因について各症例の尿沈渣を確認すると、特に発現が低い症例において白血球の混入が観察される傾向が示唆された (図 4)。

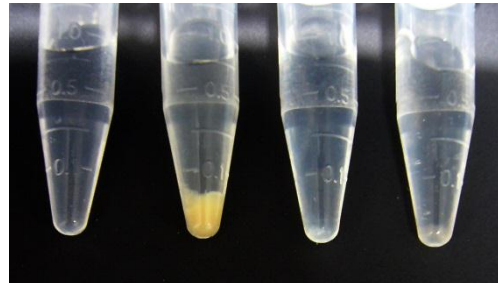


図 4 各症例の尿沈渣の相違

特に左から 2 つめの症例において白血球の混在を認める。

マイクロアレイの検討において末梢白血球中の MPHOSPH1 および DEPDC1 の発現は見られないため、この混在の原因は、白血球に含まれるハウスキーピング遺伝子 (GAPDH) が測定されるために、発現に強く影響することが示唆された。すなわち濃尿検体では、2 遺伝子の発現が見た目上低く検出される可能性が高いものと考えられた。

(2) 尿沈渣における白血球混入の補正

①白血球に特異的に発現している遺伝子

そこで本学血液内科の研究者に相談したところ、血球系で特異的に発現している遺伝子による補正を勧められたため、膀胱癌で発現が見られず血球で発現を認める CD13 および CD31 遺伝子の発現定量を行い、遺伝子の最低量を試みることにした。

②遺伝子発現解析

そこで CD13 と CD31 のプライマー、プローブセットを用意し (ABI 社 Gene expression assay を使用) 各々の遺伝子発現を定量したところ、各症例で遺伝子発現が得られたことより、白血球の補正は可能と考えられた。

(3) 白血球補正を用いた遺伝子発現検討

①白血球補正による遺伝子発現量の定量

そこで、MPHOSPH1、DEPDC1 遺伝子の各発現量を CD13 および CD31 の発現量で除することによって白血球混入の補正とすることとし、再度遺伝子発現を検討した。

②癌患者と正常人における発現比較

その結果、下記に示すとおり、CD31 で補正した場合、膀胱癌で正常検体に対して多型発現を示す傾向が示された。

CD13 での補正結果 (平均値)

	膀胱癌	正常人
MPHOSPH1	0.24	0.30

P = 0.52

DEPDC1	6.98	1.19
--------	------	------

P = 0.65

CD31 での補正結果 (平均値)

	膀胱癌	正常人
MPHOSPH1	5.45	1.88

P = 0.10

DEPDC1	18.51	3.04
--------	-------	------

P = 0.08

さらに、CD31 について膀胱癌ステージ別にその発現を検討すると、筋層浸潤性膀胱癌において有意に DEPDC1 の発現が上昇していることが明らかとなった(非筋層浸潤性膀胱癌 vs 正常 : P = 0.12、筋層浸潤性膀胱癌 vs 正常 : P = 0.019(図 5))。

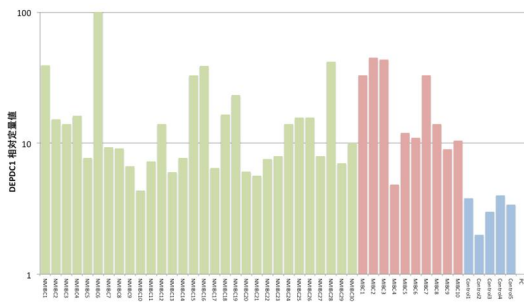


図 5 白血球補正を行った DEPDC1 の発現

また、筋層非浸潤性膀胱癌 25 例と浸潤性膀胱癌 5 例をもちいて追加検討を行うと、やはり同様の発現上昇を示した。

(4) 蛋白発現量の検討

Western blot に対応した 2 遺伝子の抗体 (Anti-M-Phase Phosphoprotein 1, Human, Mouse-Poly および Anti-DEPDC1, Mouse-Poly, Abnova Corporation 社) を用いて、蛋白レベルでも発現比較が可能か検討した。

mRNA の検討で強い発現の見られた膀胱癌 10 例と、正常人 5 例の尿沈渣より蛋白を抽出し、その蛋白溶解産物を用いてウエスタンアッセイを行うと、膀胱癌症例において弱いながらもその DEPDC1 の発現が確認され、蛋白レベルでも比較できる可能性が示された。

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)

[雑誌論文] (計 7 件)

(1) Iwasaki K, Obara W, Kato Y, Takata R, et al. Neoadjuvant gemcitabine plus carboplatin for locally advanced bladder cancer. Jpn J Clin Oncol. 2013 ;43(2):193-9. (査読あり)

(2) Takata R, Matsuda K, Sugimura J, et al. Impact of four loci on serum tamsulosin hydrochloride concentration. J Hum Genet. 2013 ;58(1):21-6. (査読あり)

(3) Obara W, Ohsawa R, Kanehira M, Takata R, et al. Cancer peptide vaccine therapy developed from oncoantigens identified through genome-wide expression profile analysis for bladder cancer. Jpn J Clin Oncol. 2012 ;42(7):591-600. (査読あり)

(4) Akamatsu S, Takahashi A, Takata R, et al. Reproducibility, performance, and clinical utility of a genetic risk prediction model for prostate cancer in Japanese. PLoS One. 2012;7(10):e46454. (査読あり)

(5) Akamatsu S, Takata R, Haiman CA, et al. Common variants at 11q12, 10q26 and 3p11.2 are associated with prostate cancer susceptibility in Japanese. Nat Genet. 2012 26;44(4):426-9 (査読あり)

(6) Nguyen HH, Takata R, Akamatsu S, et al. Common variants at 11q12, 10q26 and 3p11.2 are associated with prostate cancer susceptibility in Japanese. Hum Mol Genet. 2012 1;21(9):2076-85. (査読あり)

(7) Nakagawa H, Akamatsu S, Takata R, et al. Prostate cancer genomics, biology, and risk assessment through genome-wide association studies. Cancer Sci. 2012 ;103(4):607-13. (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

(1) 高田亮, Hai Ha Nguyen, 赤松秀輔, 他 前立腺癌発症関連領域 5p15 に局在する IRX4 はビタミン D レセプターに結合し前立腺癌の増殖を抑制する 第 22 回泌尿器科分子・細胞研究会 2013 年 3 月 9 日 高知

(2) Ryo Takata, Hai Ha Nguyen, Shusuke Akamatsu, et al. IRX4 at 5p15 suppress prostate cancer growth through the interaction with vitamin D receptor, conferring prostate cancer susceptibility. 15th international congress on hormonal steroids and hormones & cancer. 2012 年 11 月 16 日 金沢

(3) Ryo Takata, Wataru Obara, Hidewaki Nakagawa, et al. Identification of genetic polymorphism associated with response to docetaxel in prostate cancer patients. 第

71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日
札幌

(4) Ryo Takata, Shusuke Akamatsu, Hidewaki Nakagawa, et al. Risk estimation model with multiple common genetic variants for Japanese prostate cancer. AUA annual meetings 2012 年 5 月 20 日 アトランタ

(5) 高田亮、赤松秀輔、中川英刀、他 日本における全ゲノム関連解析 (GWAS) の現状と今後－前立腺癌－ 第 100 回日本泌尿器科総会 2012 年 4 月 24 日 横浜

(6) Ryo Takata, Shusuke Akamatsu, Hidewaki Nakagawa, et al. Risk estimation model with multiple common genetic variants for Japanese prostate cancer. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 4 日 名古屋

(7) Ryo Takata, Shusuke Akamatsu, Hideaki Nakagawa, et al. Genome-wide association study identifies multiple new susceptibility loci for prostate cancer in Japanese population. AUA annual meeting 2011 年 5 月 15 日、ワシントン

(8) 高田亮、赤松秀輔、中川英刀、他 日本人の前立腺癌に関連する遺伝子多型の同定とその臨床的意義 第 99 回日本泌尿器科学会総会 2011 年 4 月 22 日 名古屋

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 亮 (Takata Ryo)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：00438467