

## 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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012 ～ 2012

課題番号：24890206

研究課題名（和文） 尿路上皮がん診断における高感度尿中分子マーカーの開発

研究課題名（英文） Integrated Genetic Analysis of Allelic Imbalance and *FGFR3* Mutation by SNP-based Pyrosequencing in Urothelial Cancer

研究代表者

羅 弈 (LUO YI)

研究者番号：30633797

研究成果の概要（和文）：膀胱癌に高頻度に生じる遺伝子変化として、第9、17染色体の欠失および*FGFR3*遺伝子の点突然変異が挙げられる。本研究では膀胱癌患者尿から上記遺伝子変化の高感度な検出法を確立し、臨床的有用性を検討した。遺伝子変化はパイロシーケンス法を用いて定量した。膀胱癌組織116例を対象とした検討では、上記遺伝子変化は99症例に認められた。同症例尿では87例に遺伝子変化を認められた。一方、20症例の健常者尿にこれらの遺伝子変化を認めなかった。すなわち本定量系を用いることで感度75.0%、特異度100%の精度で尿からの膀胱癌診断が可能であった。尿細胞診では同症例尿での検出感度は44.0%であった。これらの結果より、本定量系は尿から膀胱癌を診断する優れたツールになり得ることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we refer to the rapid and quantitative analytical methods in urine samples, a SNP-based pyrosequencing (PSQ) targeting regions of LOHs on 9p, 9q, 17p, and also exon 7, 10 which are hotspots of *FGFR3* mutations. Material and Methods: A total of 7 markers were designed to amplify targeting SNP regions on 9p, 9q and 17p. And 2 markers were designed to validate *FGFR3* sequence including 2 point mutated hotspot in each marker in exon 7 and 10. Results: A total of 116 UC samples are analyzed. In the tissue analysis, 85.0% of UC showed either LOH or *FGFR3* mutation. In the analysis of urine sediments, 75.0% of urine obtained from UC patients' showed genetic alterations. Urine cytology could detect only 44.0% of UCs in the same cohort. No genetic alterations were detected in 20 healthy urine sediments. Conclusions: PSQ were the feasible assay for detect genetic alterations such as LOH and point mutation from small cancer cell populations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

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：尿路上皮がん・診断

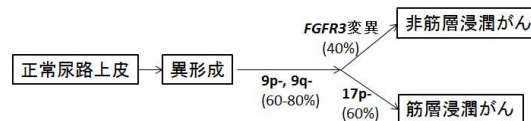
### 1. 研究開始当初の背景

(1) 非筋層浸潤尿路上皮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、高頻度に再発するため長期間の経過観察が必要である。現状での膀胱がん診断の gold standard は尿道膀胱鏡検査と尿細胞診であり、両者の組み合わせによって膀胱がんの大半は診断可能であるが、膀胱鏡は侵襲性と検査費用が高く、尿細胞診は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。尿は侵襲無しに採取可能であり、尿中にがん細胞が存在する為、診断においては有用性の高い試料である。したがって、尿を用いた尿路上皮がん診断、予後予測マーカーの開発が期待されている。

(2) これまで尿路上皮がんを生じる遺伝子変化やタンパク等を指標とした尿中分子マーカーの開発が行われてきたが、未だ臨床的有用性が確立された尿中マーカーは存在しない。尿中マーカーの確立が困難である理由として、①尿中剥離細胞には正常細胞も含まれ、とくに早期がんでは尿中に存在するがん細胞が微量である、②がん細胞が尿により変性を受ける、ことが挙げられる。

(3) 尿路上皮がんの多段階発がん過程の生じる遺伝子変化は比較的明らかにされている(図1)。第9染色体の欠失(LOH)は早期がんにおいても高頻度に生じる為、尿中マーカーとしての有用性が期待されている。これまでのLOH解析手法はPCR-SSCP法やシーケンサーを用いたPCR-SSCP法やシーケンサーを用いたフラグメント解析法が一般的であったが、これらの手法はヘテロ接合を示す遺伝子座の対立遺伝子が少なくとも50%

以上の欠失を生じないとLOHの判定ができない、すなわち、尿中剥離細胞中に占めるが



ん細胞の割合が50%以上必要であった。

図1 尿路上皮がんを生じる遺伝子変化

### 2. 研究の目的

本研究は、膀胱がん患者尿を対象とし、尿中剥離細胞から抽出したDNAを用いて、尿路上皮がん特異的に生じる遺伝子変化を指標とした高感度分子生物学的解析手法の確立を目指す。また、この解析腫瘍を用いて、尿試料から尿路上皮がんのスクリーニングと再発進展のリスクを評価する分子マーカーの臨床的有用性を検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究ではLOH解析にパイロシーケンス法を用いた。パイロシーケンス法の定量解析はDNA合成の過程でヌクレオチドが取り込まれる際の生じるピロリン酸をATPに変化させ、ルシフェラーゼ発光させ、取り込まれたヌクレオチドを定量する原理に基づく。PCR反応に必要なDNAは2ngであり、遺伝子コピー数は1%単位で定量可能である(図2)。本法を用いることにより、対立遺伝子のコピー数の変化に詳細なカットオフ値を設定し、微量のがん細胞の検出が可能となる。

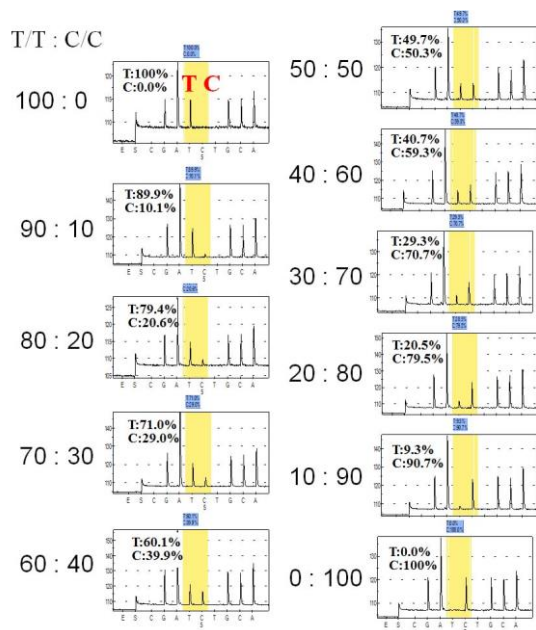


図 2 パイロシーケンス法による対立遺伝子定量性の検討

(1) パイロシーケンス法による遺伝子変化定量系の確立

①微量 DNA を用いた定量系における検出限界の検討

臨床試料の解析に先立ち、尿路上皮がん細胞株を用いた PCR および、パイロシーケンス法の検出に必要な DNA 量と細胞数を *in vitro* の系で検討した。

②LOH 解析

第 9 染色体短腕、長腕および第 17 染色体短腕に一塩基多型(SNP)を含むプライマーをそれぞれ数個作成した。LOH の判定は、症例の末梢血リンパ球の対立遺伝子(N1、N2)とがん組織における対立遺伝子を(T1、T2)とし、がん細胞の占める割合を  $\{N1/N2 \cdot (N1/N2) \cdot (T1/T2)\} / N1/N2 \times 100(\%)$  として算出した。それぞれの SNP におけるカットオフ値は健常者の末梢血リンパ球対立遺伝子比の 3SD とした。

③ *FGFR3* 遺伝子の点突然変異解析

標的とする突然変異は尿路上皮がんで高

頻度に変異を認めるエクソン 7 R248C(8.7%)、S249C(40.3%)とエクソン 10 G372C(4.0%)、Y375C(38.6%)とした。

(2) 尿路上皮がん患者尿、健常者尿を対象とした診断マーカーとしての有用性の検討

臨床試料を用いた解析を行い、尿試料を用いた診断精度の検討を行った。また、臨床病理学的因子と比較検討し、質的診断における有用性の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 検出限界

膀胱がん細胞を 5000 個から段階希釈し、DNA を抽出した。DNA はリアルタイム PCR 法で抽出量の絶対定量を行った。この DNA をテンプレートとし、PCR およびパイロシーケンス法による解析の可否を検討した。100 個の細胞から抽出した DNA は 3.6ng であり、パイロシーケンスで解析可能であった。一方 50 細胞から抽出した DNA は 0.86ng であり、PCR で増幅不可であった。したがって本定量系には少なくとも 100 個の尿中剥離細胞が必要であることが明らかになった。

(2) 遺伝子解析

LOH 解析は第 9、17 染色体上の SNP で対立遺伝子をヘテロ接合性で区別した。各染色体における SNP は以下の通りである。第 9 染色体短腕: rs10810945、rs10812234、第 9 染色体長腕:rs765769、rs13295634、rs883838、第 17 染色体短腕: rs2270341、rs 85821。また健常者血液より求めた各 SNP における LOH のカットオフはそれぞれ 27%、12%、14%、30%、27%、23%、18%であった。*FGFR3* の点突全変異はエクソン 7 は R248C(CGC → TGC) と S249C(TCC→TGC)、エクソン 10 は G372C(GGC → TGC)、Y345C(TAT→TGT)をそれぞれ同一ブ

ライマーで増幅し解析を行った。カットオフは2%とした(図3)。

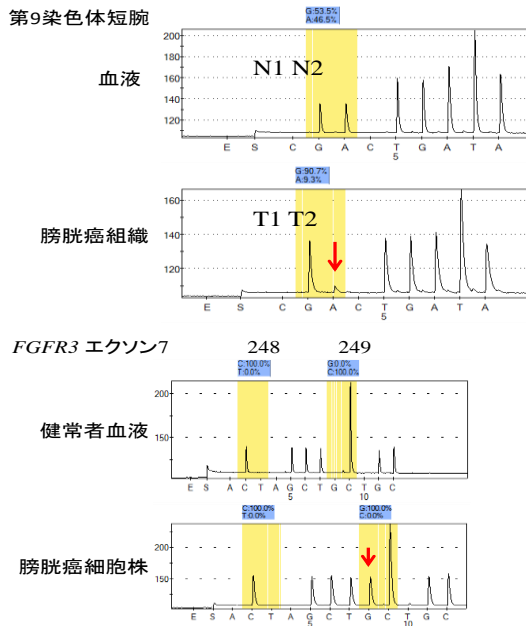


図3 遺伝子解析の例

LOH 解析(上):膀胱癌組織では矢印に示すように一方の対立遺伝子の欠失が生じる。*FGFR3* 点変異(下):膀胱癌細胞株では矢印のように健常者には認めない塩基置換を認める。

### (3) 臨床試料を用いた解析

#### ①膀胱癌組織における検討

116例の膀胱癌組織を対象とし、上記遺伝子変化の発生頻度を検討した(図4)。図1に示す如く、非筋層浸潤癌においては*FGFR3*変異の頻度が高く、筋層浸潤癌においては第17染色体の頻度が高かった。85.3%の症例で染色体欠失あるいは*FGFR3*変異のいずれかを認めた。遺伝子変化を生じる頻度は腫瘍の深達度、異型度とは相関を認めなかった。この結果より、これらの遺伝子変化を指標とすることで膀胱癌症例の80%以上は遺伝子診断が可能であり、遺伝子変化の種類から深達度の予測が可能であると考えられた。

	9p	9q	17p	<i>FGFR3</i>	Genetic Alteration
Tis (n=1)	100	100	0	0	100
Ta (n=52)	48.2	89.7	31.6	44.2	88.5
T1 (n=39)	86.7	87.0	42.9	23.1	82.1
T2≤ (n=24)	53.3	80.0	83.3	8.7	83.3
G1 (n=15)	55.6	100	30.8	46.7	93.3
G2 (n=34)	42.9	83.3	19.1	47.1	85.3
G3 (n=67)	56.4	85.7	57.8	16.4	83.6

The samples which at least one locus on each chromosomal arms showed heterozygosity were analyzed.

**Total 85.3%**

図4 膀胱癌組織における遺伝子変化

#### ②尿試料における検討

上述の116症例における腫瘍切除前に採取した尿を対象として同様の解析を行った(図5)。組織の結果と比較して染色体欠失、*FGFR3*変異ともに検出率は低い結果となった。とくに*FGFR3*変異の検出率は低下した。第17染色体の欠失は組織と同様に、進行癌においてたかかった。同一症例における尿細胞診(Cytology)の診断率44%であったが、遺伝子変化の検出率は75%であった。とくに深達度の低い腫瘍での検出率が尿細胞診に比し優れていた。健常者尿20例にはこれらの遺伝子変化はまったく検出されなかった。これらの結果より、遺伝子変化を指標とした尿からの膀胱癌診断精度は感度75.0%、特異度100%であった。

	9p	9q	17p	<i>FGFR3</i>	Genetic Alteration	Cytology
HC* (n=20)	0	0	0	0	0	NA
Tis (n=1)	0	100	0	100	100	0
Ta (n=52)	25.9	65.5	18.4	7.7	67.3	30.8
T1 (n=39)	62.5	78.3	44.4	5.1	82.1	56.4
T2≤ (n=24)	26.7	80.0	76.9	0	79.1	54.2
G1 (n=15)	33.3	85.7	7.7	6.7	73.3	26.7
G2 (n=34)	26.3	62.5	19.1	2.9	58.8	29.4
G3 (n=67)	46.2	78.6	53.3	7.5	77.6	55.2

HC: Healthy control  
The samples which at least one locus on each chromosomal arms showed heterozygosity were analyzed.

**Total  
75.0% vs. 44.0%**

図5 尿試料を用いた診断精度と尿細胞診との比較

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羅 弈 (LUO YI)

奈良県立医科大学・分子病理学・助教

研究者番号: 30633797