

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462423

研究課題名(和文)膀胱内環境に生じるがん幹細胞シグナル異常の解明と膀胱癌診断マーカーの開発

研究課題名(英文) Aberrant DNA methylation of cancer stem cell genes correlate with bladder carcinogenesis

研究代表者

千原 良友 (Chihara, Yoshitomo)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：40405395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌患者、膀胱癌切除後患者、健常者の尿を対象とした網羅的DNAメチル化解析の結果、これら3群のDNAメチル化異常は癌幹細胞シグナル伝達経路である可能性が示唆された。エピジェネティック制御剤を用いた検証では、癌幹細胞経路は悪性度と関連したが、尿中には反映されなかった。上記3群を分ける遺伝子群のメチル化異常を指標とすると、尿から感度87.59%、特異度78.96%の精度で膀胱癌診断が可能であった。

研究成果の概要(英文)：High throughput DNA methylation analysis from the urine, revealed that aberrant DNA methylations of cancer stem cell genes were clearly classified between bladder cancer patients' (T), after resection of bladder cancer patients' (F), and healthy urines (H). In vitro study using epigenetic control agents study, aberrant DNA methylation of these cancer stem cell signal pathway genes significantly higher in higher malignant cancer cell line. However these aberrant DNA methylation were not detected with urine sediments. Then, we selected several aberrant DNA methylation loci from the analysis that showed quite significance between there groups. The validation cohort analysis, a total of 239 urine samples (T: 65, F:134, N:40), revealed that combined 5 genes aberrant DNA methylations could diagnose bladder cancer as 87.59% of sensitivity, and 78.96% of specificity.

研究分野：膀胱癌

キーワード：膀胱癌 診断マーカー 癌幹細胞 メチル化

## 1. 研究開始当初の背景

非筋層浸潤尿路上皮癌は膀胱癌の約 70% を占め、経尿道的膀胱腫瘍切除術(TUR-BT)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。現状での膀胱癌診断の標準は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癌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。尿路上皮癌に生じる遺伝子変化やタンパク等を指標とした分子マーカーの開発の試みは国内外で数多く行われているが、未だ臨床的有用性が確立された尿中マーカーの開発に成功していない。近年、癌における抗癌剤・放射線治療に対する抵抗性や、癌の再発には、がん幹細胞の関与が注目を浴びている。がん幹細胞は癌の階層性を説明する仮説として提唱され、組織幹細胞と同様に自己複製能と多分化能を有する。がん幹細胞の形成や維持には、個体発生に関わる経路や、ポリコム蛋白群などのエピジェネティックな遺伝子発現制御に関わる分子が必須であることが明らかにされている。

尿路上皮癌発癌の原因は主として化学発癌であり、尿中に存在する発癌物質に暴露した尿路上皮に遺伝子変化が段階的に生じ、前癌病変や種々のステージの癌が発生する多段階発癌モデルが提唱されている。また、非筋層浸潤癌の高頻度の再発はフィールド効果と播種の両面から捉えられており、膀胱癌患者における「膀胱内環境」を分子生物学的に明らかにすることで診断および治療の飛躍的進歩が期待できる。エピジェネティクスは遺伝子発現制御機構の一つであり、種々の癌で遺伝子変化に先立ちエピジェネティクス異常が生じることが報告されている。さらに、エピジェネティクスは病理学的、遺伝子的に癌と診断できない「前癌状態」を検出するツールとして注目されている。

申請者らは、筋層浸潤癌と非浸潤癌で DNA メチル化プロファイルが異なること、また担癌正常上皮にも DNA メチル化異常が生じていること(エピジェネティックフィールド効果)を明らかにした (Wolff E and Chihara Y et al. Cancer Res. 2010)。さらに、これらの DNA メチル化異常を指標とすると 13 遺伝子の組み合わせが必要であったものの、感度、特異度ともに 100%の精度で尿試料から膀胱癌診断が可能であった。(業績 表 1)。しかし 13 個もの遺伝子の組み合わせが必要となるのは個々の遺伝子のマーカーとしての精度が十分でない為であり、この理由として、(1)DNA メチル化は喫煙等の環境因子や尿自体による細胞変性の影響を受ける。(2)組織特異的に DNA メチル化状態が異なる上に、尿中には炎症細胞、円柱上皮等 様々な組織由来の細胞の混入がある。(3)尿中の癌細胞は微

量であり、他の細胞の混入によりがん細胞の占める割合がさらに低下することが挙げられる。

申請者らは先行研究として、個々のマーカーの精度を上昇させる為にまず尿試料の網羅的解析を行った。この方法により癌細胞特異的でないメチル化異常を棄却する。すなわち、健常者尿(n=20)、膀胱癌切除後患者尿(n=20)および膀胱癌患者尿(n=33)を対象とし、全ゲノム領域 45 万カ所の CpG サイトにおける DNA メチル化プロファイリング解析を行った(Illumina HM450 assay)(図 1)。

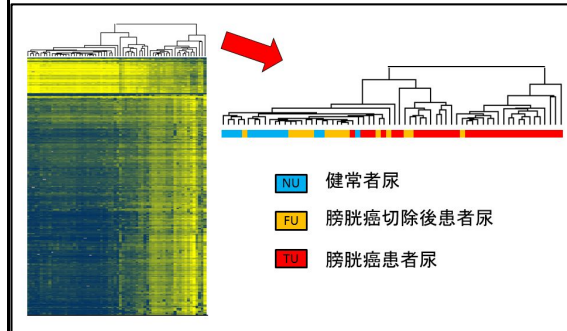


図 1 尿試料を対象とした網羅的 DNA メチル化解析

Unsupervised クラスタリング解析の結果、上記 3 群に特異的な DNA メチル化プロファイルが作成可能であり、尿中剥離細胞特異的な DNA メチル化異常が多段階発癌過程を反映する結果を得た。さらに、これらの遺伝子群のうち、上記 3 群間で段階的に DNA メチル化頻度が増加、または減少する約 1000 遺伝子を選出し、パスウェイ解析を行なった (Ingenuity IPA)。この結果、OCT4/SOX2 複合体を介するシグナル経路において、3 群の尿試料で DNA メチル化異常が段階的に増加することが明らかになった。OCT4/SOX2 シグナルは幹細胞およびがん幹細胞の維持に必須であり、エピジェネティックな遺伝子発現制御を受ける。また、膀胱癌術後尿は発癌のポテンシャルが高まった「膀胱内環境」を反映しており、この段階でがん幹細胞関連遺伝子群のメチル化異常が生じていることは興味深い。以上より、がん幹細胞関連遺伝子群のメチル化異常とその発癌過程への関与を明確にできたので、このメチル化異常を指標とした膀胱癌診断のマーカーを開発しようという着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では先行研究の結果に基づき、膀胱癌発癌に関与する、膀胱内環境でのがん幹細胞シグナル異常を明らかにし、これを指標とした膀胱癌診断に有用となる尿中分子マーカーを開発することを目的とする。研究項目は、培養細胞を用いた、がん幹細胞シグナル遺伝子群におけるエピジェネティック遺伝子

発現制御機構の解明、尿試料を用いた、がん幹細胞シグナル遺伝子群の DNA メチル化異常を指標とした膀胱癌診断精度の検証の両者を平行して行う。

### 3. 研究の方法

本研究は、先行の網羅的 DNA メチル化解析で得たがん幹細胞シグナル遺伝子群を対象とし、発癌に関与するがん幹細胞シグナル異常とメチル化異常の意義を明らかにする。また、これらの遺伝子のメチル化異常を指標とし、膀胱癌診断、再発診断に有用となる尿中 DNA メチル化マーカーの開発を目的とする。研究計画は以下のとおりに進める。

#### 各種膀胱癌細胞株におけるがん幹細胞シグナルとエピジェネティクス遺伝子発現制御の検討

解析対象の細胞株は T24(高悪性癌)、J112(低悪性癌)、UMUC3(上皮間葉転換膀胱癌由来)、HB/EpC(尿路上皮)とする。各細胞株における OCT4/SOX2 シグナル経路の遺伝子群(LRH1, SF1, FOXD3, IGF2BP1 など)の発現をリアルタイム PCR 法で定量する。また、各遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化頻度をパイロシーケンス法で定量する。さらに各遺伝子のヒストン修飾状態(H3K27 モノ・ジ・トリメチル化、アセチル化、H3K9 トリメチル化、アセチル化)をクロマチン免疫沈降法で定量する。これらの検討より、正常尿路上皮と各種膀胱癌細胞における、がん幹細胞関連遺伝子群の発現と DNA メチル化、ヒストン修飾のエピジェネティック遺伝子発現制御の相違が明らかにできる。

#### エピジェネティクス制御化合物による癌細胞株増殖能とがん幹細胞関連遺伝子発現の検討

エピジェネティクス異常により引き起こされるがん幹細胞シグナル異常に対し、エピジェネティクス制御化合物を用いてがん幹細胞シグナル異常の回復を検討する。すなわち、上記細胞株を DNA メチル基転移酵素阻害剤(5-aza-2-deoxycytidine)およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(4-phenylbutyric acid: PBA)で処理し、がん幹細胞関連遺伝子群の発現とエピジェネティクス変化と同様の方法で評価する。またこれらの処理により癌細胞増殖能が低下することを確認する。

#### 尿試料を用いた DNA メチル化マーカーの臨床的有用性の検討

In vitro の検討で候補とした DNA メチル化マーカーの臨床的有用性を臨床試料(尿)を用いて検討する。上述の如く、エピジェネティクスによる遺伝子発現制御は DNA メチル化によるものだけではないが、本研究では DNA メチル化異常のみをターゲットとする。

この理由は、微量な尿中剥離細胞から安定した解析が可能であること、パイロシーケンス法による簡便、迅速、低コストな解析が可能であり、実際の臨床応用に最も適しているからである。選出するマーカーは 3~5 個に限定する。

#### 1) 臨床試料のサンプリング

本学泌尿器科では尿路上皮癌の診断で手術(TUR-BT および膀胱全摘除術)を施行された症例を対象とし、手術時の血液、尿、がん組織の採取を行っている。TUR を施行された症例は術後外来受診時に経時的に尿試料を採取し、再発時には手術時と同様に採取する。

#### 2) 診断的有用性の検討

後ろ向き研究および前向き研究によって行う。健常者尿と、膀胱癌患者の診断時尿を対象として、尿中から膀胱癌診断精度を検討する。健常者尿試料は前立腺肥大症、悪性疾患を有さない血尿、あるいは尿路感染症の症例が含まれているため、泌尿器科疾患全体からのスクリーニングの有用性が検討できる。とくに術後経過観察中尿に生じているエピジェネティックフィールド効果を詳細に検討し、膀胱鏡の必要性を減じることが可能かどうかの検討に重点を置く。

### 4. 研究成果

<平成 26 年度>

膀胱癌細胞株 T24(高悪性癌)、J112(低悪性癌)、UMUC3(上皮間葉転換膀胱癌)および、尿路上皮細胞株 HB/EpC を用いて、各細胞株における OCT4/SOX2 シグナル経路に位置する遺伝子群の遺伝子発現と、エピジェネティクス制御の関係を検討した。HB/EpC と比較し、膀胱癌細胞株で発現の上昇を認めた遺伝子は PHC3、FOXA2、LRH1、SF1 であった。一方、IGF2BP、BRCA1、FoxD3 は発現が低下していた。これらの遺伝子のうち、DNA メチル化頻度と遺伝子発現が一致した遺伝子は FoxD3 と BRCA1 であった。とくに膀胱癌細胞においては BRCA1 の H3K9m3 の頻度が高く、エピジェネティクスによる遺伝子発現がもっとも顕著である結果となった。また膀胱癌細胞株での比較では、BRCA1 の発現が T24 でもっとも低く、FoxD3 の発現は UMUC3 で高かった。これらの遺伝子発現は DNA メチル化頻度と相関した。5'Aza 処理により膀胱癌細胞における BRCA1 の発現は上昇したが、増殖能に変化は見られなかった。また、siRNA を用いた FoxD3 のノックダウン処理でも、3 種類の膀胱癌細胞の増殖能に変化は見られなかった。これらの結果から、OCT4/SOX2 シグナル経路上の遺伝子発現と、エピジェネティクス異常は膀胱癌の悪性度を示す指標となり得ることが示唆されたが、これらの遺伝子は治療標的分子となり得る可能性は低いと考えられる。

<平成 27 年度>



診で再発無しと判定された尿試料から上記 3 個以上の DNA メチル化異常が検出可能であり、これらの DNA メチル化異常は予後予測マーカーとしても有用である可能性が示唆された。

5．主な発表論文等  
該当事項なし

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・医学部付属病院・研究員  
研究者番号：40405395

(2)研究分担者  
藤本清秀 (Fujimoto Kiyohide)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50264867