

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：24701
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K07466
研究課題名(和文)細胞異型形成の分子学的機序からみた尿路上皮癌前駆病変の病理学的特徴と遺伝子異常

研究課題名(英文)Clinicopathological and molecular analyses of precursor lesions of urothelial carcinoma

研究代表者
村田 晋一(Murata, Shin-ichi)
和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20229991
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：平坦状尿路上皮病変(異型尿路上皮、異形成、上皮内癌)について、免疫組織染色による細胞極性因子の解析、NGSによる網羅的遺伝子解析、AIを応用した新しい病理形態解析を行った。その結果、上皮内癌ではMTOC関連因子(γ -tubulinやMAP7)の発現異常を認めた。NGS解析は、上皮内癌のみならず、異型尿路上皮や異形成においても、様々な遺伝子異常を検出した。また、新たに開発した「Pathological-criteria based deep learning」を用いて、平坦状尿路上皮病変の客観的組織評価と遺伝子異常と関連させて行うことが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路上皮癌は、泌尿器領域では最も頻度の高い悪性腫瘍で、多発や再発を特徴とする。5年生存率は、早期癌であれば90%以上であるが、進行癌では20-50%と予後の悪い腫瘍である。尿路上皮癌の予後向上には、早期に尿路上皮癌を捉えること、すなわちその病理学的特徴を把握することが重要である。本研究では、発癌の前駆段階の尿路上皮や早期の尿路上皮癌を対象に、病理組織形態異常や遺伝子異常について、核極性因子解析や網羅的遺伝子解析およびAIを使った形態解析を行った研究である。研究の結果、発癌の前駆段階の尿路上皮においても、形態異常と関連して、様々な核極性因子や遺伝子の異常が発生していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed flat urothelial lesions including atypical urothelium (AU), dysplasia (DP), and urothelial carcinoma in situ (CIS) by immunohistochemical analysis for cell polarity factors, comprehensive genetic analysis using NGS, and novel AI-based histomorphological analysis. As results, abnormal expression of MTOC-related factors (γ -tubulin and MAP7) were detected in CIS. NGS analysis detected various gene abnormalities not only in CIS but also in AU and DP. In addition, the newly developed "pathological-criteria based deep learning" method was useful for correlated analysis with genetic abnormalities and objective histological evaluation of flattened urothelial lesions.

研究分野：病理学

キーワード：尿路上皮癌 尿路上皮異形成 核極性 MTOC 異型尿路上皮 前駆病変 人工知能 網羅的遺伝子解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

尿路上皮癌の特徴の1つとして、異所性および異時性の多発がある。すなわち、尿路上皮癌は膀胱あるいは腎盂尿管の異なった部位に複数の腫瘍が発生したり、再発を来したりすることが多い。このことは、尿路上皮癌の周囲粘膜に尿路上皮癌の前駆病変が高頻度に存在することを示唆する。尿路上皮の前駆病変として、尿路上皮過形成や異形成の存在が報告されているが、その病理形態的特徴や分子病理学的機構はほとんど明らかにされていない。

一方、我々は、培養細胞やヒト腫瘍組織を使った解析から、悪性腫瘍における構造異型や細胞異型の形成に関わる分子病理学的機構を明らかにしてきた。具体的には、癌細胞に特有の核の切れ込み(核溝)の形成にMTOCが関与していること(Virchows Arch. 2009)、大型核や強い核型不整は染色体不安定性とともに起こること(Am J Clin Pathol 2010, ACHC. 2012)、癌細胞のクロマチン分布の異常にはchromosome territoryが関与していること(Thyroid 2007)、間期細胞内のMTOCの位置が、正常腺管や高分化型腺癌においては管腔側の一定位置に存在しているのに対して、低分化型腺癌においては細胞内に無秩序に分布していること(Virchows Arch. 2015)、高異型度型尿路上皮癌の核異型形成にはMTOCや染色体不安定性が中心的役割を果たしていること(文科省科研費(16K08653)2015-2018年)などを報告してきた。さらにはこれらを解析するための新しい手法を開発してきた(PLoS One. 2016, Acta Histochem Cytochem. 2017)。

以上の尿路上皮癌の特徴と我々の過去の研究成果を基に、ヒト膀胱尿路上皮癌の初期発生における遺伝子異常や細胞異型の形成の分子機構を明らかにすることによって、尿路上皮癌の初期病変の臨床病理学的特徴を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、尿路上皮癌の周囲粘膜における“癌とは判断できない程度の軽度異型を示す平坦状尿路上皮”、すなわち反応性異型、異型尿路上皮や異形成を解析の対象とし、我々が過去の研究で明らかにしてきた悪性腫瘍における構造異型や細胞異型の形成に関わるMTOC(microtubule organizing center)を中心とした分子病理学的機構を基に、膀胱尿路上皮癌の初期発生における遺伝子異常や細胞異型の形成の分子機構を解析する。さらに分子病理学的機構や遺伝子異常を元に、尿路上皮癌の初期病変の病理組織学的診断基準を定義し、臨床病理学的特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 材料:

生検材料・TUR材料より得られた平坦状尿路上皮病変(反応性異型、異型尿路上皮、異形成、上皮内癌)の約100症例を対象とした。コントロールとして、正常尿路上皮、非浸潤性乳頭状尿路上皮癌、浸潤性尿路上皮癌の約200症例を用いた。診断基準は、現行のWHO分類に従った。

(2) 方法:

細胞異型や核極性を規定する組織構造因子の解析;

我々が明らかにしてきた細胞異型形成に関わるMTOC(microtubule organizing center)およびその関連因子の異常を前駆病変や上皮内癌、非浸潤性乳頭状尿路上皮癌および浸潤性尿路上皮癌において解析した。すなわち、免疫組織染色によりMTOC関連因子である α -tubulinおよびMAP7の発現異常(数的および細胞内位置の異常)を解析した。

網羅的遺伝子解析;

前駆病変や上皮内癌に対して、早期の尿路上皮癌において検出されることが多い17個の遺伝子群(ARID1A, CDKN2A-AS1, CREBBP, EGFR, EP300, ERBB2, ERBB3, ERCC2, FGFR3, HRAS, KDM6A, KRAS, NRAS, PIK3CA, RB1, TERT promoter, TP53)の点変異や欠失等の遺伝子異常についてNGS(Next-Generation Sequencing)を用いて解析した。

点突然変異のin situでの視覚化手法の開発;

in situ clamp RCA(rolling circle amplification)法の開発やBaseScope法の応用により、点突然変異をin situで視覚化する手法の開発を行った。

Multiple immuno-ISH stain with WSIによるp16遺伝子の解析;

p16蛋白およびMTAP蛋白の免疫組織染色とCDKN2A遺伝子のISH染色を同時に行うMultiple immuno-ISH stain with WSIを用いて、尿路上皮癌におけるp16およびMTAPの発現とCDKN2A遺伝子欠失の相互関係を解析した。

人工知能(artificial intelligence: AI)

人工知能を利用した定量的画像解析を行うために、新たな手法「Pathological-criteria based deep learning」を開発し、平坦状尿路上皮病変の客観的形態解析を行った。

ヒト膀胱尿路上皮癌の前駆病変の臨床病理学的解析；

上記の組織形成因子解析や網羅的遺伝子解析に人工的知能解析の結果と合わせて、尿路上皮癌に進展する可能性の高い尿路上皮癌前駆病変を抽出するための病理組織学的診断基準の確立を試みた。

4. 研究成果

(1) 細胞異型や核極性を規定する組織構造因子の解析；

-tubulin の数的小および局在的異常が尿路上皮癌の高異型度化に関与していることを明らかにした (Virchows Arch. 478: 327-334, 2021)。具体的には低異型度病変では -tubulin は核と上皮表面の間に位置するのに対して、高異型度病変では -tubulin は核の側方や基底膜側に位置する細胞が増加した。さらに、-tubulin 関連の蛋白である MAP7 の発現は、非浸潤病変では核と上皮表面の間で核に被さるように発現するのに対して、浸潤癌、特に筋層浸潤癌では発現の局在が不明瞭化したり発現が減弱化したりしていた。よって、-tubulin や MAP7 を含む MTOC 関連因子は、核極性の乱れに示される高異型度化および癌浸潤と関連していることが示された (英文誌に投稿準備中)。

(2) 網羅的遺伝子解析；

NGS を用いた正常尿路上皮および平坦状尿路上皮内病変に対する網羅的遺伝子解析では、上皮内癌のみならず、反応性異型、異型尿路上皮、異形成においても、様々な遺伝子異常が発生していることが示された。遺伝子異常が高頻度に認められた遺伝子としては、TERT promoter (70%)、TP53 (19%)、FGFR3 (13%)、PIK3CA (12%)、ARID1A (9%)、ERBB2 (9%) および KRAS (9%) が検出された。また、4 つの chromatin-modifying genes (CMG ; ARID1A, KDM6A, EP300, CREBBP) のいずれかの異常も高頻度に検出された。特に、TERT promoter 遺伝子異常は、正常尿路上皮で約 30% の症例に、反応性異型、異型尿路上皮、異形成および上皮内癌では、それぞれ約 60-80% に検出された。また、驚くべきことに、正常尿路上皮においても遺伝子異常は少なくなく、TERT promoter 以外の遺伝子では、PIK3CA, FGFR3, RB1 の異常が高頻度 (約 30%) に認められた。尿路上皮病変が存在するその背景の正常粘膜では、病変を伴わない正常粘膜と比較して、TERT promoter の遺伝子異常が低頻度であり、CMG 遺伝子異常が高頻度に認められた。反応性異型においては、TERT promoter の異常は高頻度に認められるものの、それ以外の遺伝子異常はほとんど認められなかった。異型尿路上皮では、TERT promoter, TP53, FGFR3, ARID1A, KDM6A 遺伝子の異常が高頻度 (約 10-20%) に認められた。異形成では、TERT promoter, FGFR3, PIK3CA, TP53, ARID1A, CMG 遺伝子の異常が高頻度 (約 20-60%) に認められた。上皮内癌では、TERT promoter, TP53, ERBB2, KRAS 遺伝子の異常が高頻度 (約 10-80%) に認められた。各病変間の比較では、異型尿路上皮と異形成に認められた遺伝子異常には有意な差なかったが、異型尿路上皮 / 異形成と上皮内癌の間には有意な違いが認められた。すなわち、異型尿路上皮 / 異形成では上皮内癌よりも FGFR3 や CMG の遺伝子異常が高頻度に認められた。同一患者における複数の病変の解析では、ほとんどの症例において、複数の平坦状病変に共通した遺伝子異常が認められた。平坦状尿路上皮を 2 つの群、上皮内癌を伴う群と高異型度乳頭状尿路上皮癌を伴う群に分けて解析した結果、2 つの発癌分子機構、すなわち、異形成-上皮内癌経路と異形成 / 過形成経路の存在が示唆された。また、BCG 治療後の再発率を遺伝子異常の観点から解析した結果、ERBB2 と KRAS 遺伝子の異常は腫瘍再発と相関が見られた。

(3) 点突然変異の in situ での視覚化手法の開発；

in situ clamp RCA (rolling circle amplification) 法や BaseScope 法の応用により、点突然変異を in situ で視覚化する手法の開発を試みて来たが、良好な結果が得られていない。引き続き、検討を行う予定である。

(4) Multiple immuno-ISH stain with WSI による p16 遺伝子の解析；

Multiple immuno-ISH stain with WSI による尿路上皮癌における p16 および MTAP の発現は CDKN2A 遺伝子のヘテロ欠失とホモ欠失に相関が見られた。現在、平坦状尿路上皮および浸潤癌における p16 および MTAP の発現を検討中である。

(5) 人工知能 (artificial intelligence: AI)

人工知能を利用した新たな定量的画像解析法「Pathological-criteria based deep learning」を開発した (現在 2 編を英文誌に投稿中)。本手法は、細胞生物学的現象を根拠にした診断パラメータ、すなわち、細胞密度、核分布、核極性、核腫大、核形不整、クロマチン増量等のパラメータを元に、AI の技術を応用して解析する手法である。また、この手法をさらに改変し、病理組織画像より、上皮成分や核成分を自動的に抽出することを可能とする過程も開発しており、上記パラメータの定量化にも成功している。平坦状尿路上皮病変に応用した結果、正常、尿路上皮、異形成、上皮内癌の分類が可能であった。また、従来の deep learning では、画像分類がどの様な所見を重視して行われたかの解析が困難 (画像分類の black-box 問題) であったが、本手法では、上記のパラメータのどの因子が画像分類に影響を与えたかを解析することが可能であり、画像分類の black-box 問題を解決できることが示された。さらに、本手法から計算された異常度と

遺伝子異常の相関について解析した結果、ARID1A, CDKNA-AS1, ERCC2, KRAS, KRAS, TP53 等の遺伝子異常は核分布、核極性、クロマチン増量、核の大きさをパラメータと有意な相関を示した。以上、本法は、どの遺伝子異常がどのような形態異常に直結するかが明らかにすることを可能とし、病理形態異常の分子病理学的背景の解明に繋がる有用な解析法であることが示された。

(6) ヒト膀胱尿路上皮癌の前駆病変の臨床病理学的解析；

上記の組織形成因子解析や網羅的遺伝子解析に人工的知能解析の結果と合わせて、尿路上皮癌に進展する可能性の高い尿路上皮癌前駆病変を抽出するための病理組織学的診断基準の確立を今後行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sato Hirotsu, Sonomura Tetsuo, Onishi Saeko, Koike Masataka, Tanaka Ryota, Ueda Shota, Okuhira Ryuta, Kamisako Atsufumi, Koyama Takao, Shima Nozomu, Yamamoto Shoko, Sakai Yasuo, Murata Shin-ichi, Ikoma Akira	4. 巻 44
2. 論文標題 Comparison of Uterine Necrosis After Uterine Artery Embolization with Soluble Gelatin Sponge Particles or Tris-acryl Gelatin Microspheres in Swine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CardioVascular and Interventional Radiology	6. 最初と最後の頁 1780 ~ 1789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00270-021-02905-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Musangile Fidele Y., Matsuzaki Ibu, Okodo Mitsuaki, Shirasaki Ayaka, Mikasa Yurina, Iwamoto Ryuta, Takahashi Yuichi, Kojima Fumiyoshi, Murata Shin ichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Detection of HPV infection in urothelial carcinoma using RNAscope: Clinicopathological characterization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 5534 ~ 5544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.4091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kojima Fumiyoshi, Alaghehbandan Reza, Kuroda Naoto, Matsuzaki Ibu, Mikasa Yurina, Musangile Fidele Y., Iwamoto Ryuta, Takahashi Yuichi, Iwahashi Yoshifumi, Warigaya Kenji, Iba Akinori, Hara Isao, Murata Shin-ichi, Hes Ondrej	4. 巻 51
2. 論文標題 Paneth-like cells in renal cell carcinomas and in cysts associated with acquired cystic kidney disease: Clinicopathologic analysis, comparative study and description of precursor lesions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Diagnostic Pathology	6. 最初と最後の頁 151707 ~ 151707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anndiagpath.2021.151707	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itonaga Masahiro, Ashida Reiko, Murata Shin-Ichi, Yamashita Yasunobu, Hatamaru Keiichi, Tamura Takashi, Kawaji Yuki, Kayama Yuudai, Emori Tomoya, Kawai Manabu, Yamaue Hiroki, Matsuzaki Ibu, Nagai Hirokazu, Kinoshita Yuichi, Wan Ke, Shimokawa Toshio, Kitano Masayuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Kras Gene Analysis Using Liquid-Based Cytology Specimens Predicts Therapeutic Responses and Prognosis in Patients with Pancreatic Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 551 ~ 551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14030551	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Daisuke, Matsuda Kenji, Iwamoto Hiromitsu, Mitani Yasuyuki, Mizumoto Yuki, Nakamura Yuki, Matsuzaki Ibu, Iwamoto Ryuta, Takahashi Yuichi, Kojima Fumiyoshi, Murata Shin-ichi, Yamaue Hiroki	4. 巻 17
2. 論文標題 Prognostic value of CD155/TIGIT expression in patients with colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0265908 ~ 0265908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0265908	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 -

1. 著者名 Murata SI, Kuroda M, Kawamura N, Warigaya K, Musangile FY, Matsuzaki I, Kojima F.	4. 巻 478
2. 論文標題 Microtubule-organizing center-mediated structural atypia in low- and high-grade urothelial carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virchows Arch	6. 最初と最後の頁 327-334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-020-02895-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishino M, Matsuzaki I, Musangile FY, Takahashi Y, Iwahashi Y, Warigaya K, Kinoshita Y, Kojima F, Murata SI.	4. 巻 23;15(7)
2. 論文標題 Measurement and visualization of cell membrane surface charge in fixed cultured cells related with cell morphology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0236373.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0236373	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5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村田 晋一
2. 発表標題 尿細胞診あれこれ. 2021.
3. 学会等名 第35回長崎県臨床細胞学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村田 晋一
2. 発表標題 泌尿器科医に知って欲しい尿路上皮癌の病理診断の真実.
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村田 晋一
2. 発表標題 尿細胞診における尿路上皮癌の異型度判定を考える.
3. 学会等名 第37回日本臨床細胞学会北陸連合会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎 生笛
2. 発表標題 ThinPrep法による尿細胞診の標準化と利点.
3. 学会等名 第62回日本臨床細胞学会春期大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下 勇一
2. 発表標題 尿細胞診における異型細胞の亜分類.
3. 学会等名 第62回日本臨床細胞学会春期大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 北川昌伸 仁木利郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 -
3. 書名 標準病理学 (第7版)	

〔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
研究 分担 者	松崎 生笛 (Matsuzaki Ibu) (60647428)	和歌山県立医科大学・医学部・助教 (24701)	

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
---------	---------