

令和元年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08045

研究課題名(和文)尿サンプルによる“Liquid Staging”の確立

研究課題名(英文) Establishment of "Liquid Staging" using urine samples

研究代表者

中川 貴之 (Nakagawa, Takayuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：40447363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：早期の確定診断が非常に困難である犬移行上皮癌を尿サンプルから診断かつその進展状況を確認できる“Liquid Biopsy”の確立を目的とし、診断については、犬移行上皮癌に高率に認められるBRAF遺伝子変異を高感度に検出できるDigital PCR法を確立し、その臨床応用に成功した。腫瘍の進展状況については、上皮間葉転換を標的として検討を進め、犬移行上皮癌において間葉系マーカーであるvimentinが有意に生存期間と関連することを明らかにした。これらの成果により尿サンプルにより腫瘍の診断と病態把握を行うLiquid biopsyの基盤データが形成されたものと考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの検査では犬移行上皮癌の早期診断は非常に困難であり、積極的な治療であっても生存期間は1年未満であった。本研究成果によって早期診断が実現したことで、犬移行上皮癌症例の生存予後は大きく改善することが期待されるだけでなく、尿サンプルを用いた“Liquid Biopsy”の成功例の先駆けとなったと考える。また犬移行上皮癌においてvimentinが有意な予後指標となることを初めて見出したが、これも臨床応用可能な予後マーカーとなるだけでなく、浸潤性の高い犬移行上皮癌の分子生物学的な性状の解析やより効果的な治療法開発に向けた基盤のデータとして意義ある成果と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish "Liquid Biopsy" that can diagnose and confirm the progress of transitional cell carcinoma of the dog, whose early definitive diagnosis is very difficult, from urine samples. For diagnosis, we established a Digital PCR method that can detect BRAF gene mutations, which are frequently found in canine transitional cell carcinoma, with high sensitivity, and succeeded in its clinical application. We investigated the development of the tumor by targeting epithelial-mesenchymal transition, and clarified that the mesenchymal marker vimentin is significantly associated with survival in canine transitional cell carcinoma. Based on these results, it was considered that the basic data of Liquid biopsy for tumor diagnosis and pathological condition grasping was formed by urine samples.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：Liquid-biopsy BRAF vimentin EMT TCC digital PCR

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

犬の膀胱移行上皮癌は全腫瘍の約 2% を占める非常に予後の悪い腫瘍であり、早期発見が非常に困難なためほとんどの症例で診断時には病期が進行していることが多く、そのため無治療での生存期間はわずか 3 ヶ月、最も積極的な外科的切除である膀胱全摘出術でも生存期間は約 1 年である。本腫瘍は浸潤性が非常に高く、腫瘍の治療指針の判断やその予後において非常に重要となる腫瘍の浸潤度 (= 臨床病期) の評価が画像診断では難しいため、診断時での的確な病期判定が困難であることも問題となっている。申請者らは膀胱全摘出術をはじめ積極的な外科治療等の検討を進めてきたが、こうした問題から予後の改善は未だ限定的である (Saeki *et al.*, 2015)。膀胱移行上皮癌は慢性膀胱炎と同じ臨床症状や画像所見を示し、尿中へ脱落する細胞も初期には鑑別できない。体外から細胞を採取する針生検は、浸潤性の高い移行上皮癌では針の刺入路に沿って腫瘍細胞が播種され病変が拡大するため適用できない。初期～中期では、開腹術や硬/軟性鏡による生検以外にこれらを鑑別する方法はなく、ほとんどが診断的治療への不応や尿中への腫瘍細胞塊の脱落など進行してはじめて診断される。また唯一の臨床的腫瘍マーカーである基底膜蛋白検出法 (V-BTA test) は尿検体から高感度で膀胱内の組織損傷を検出する有用な検査であるが、それが腫瘍浸潤によるものか炎症によるものかの鑑別は困難である。このように膀胱の変化に対する評価は可能であるが、癌であることを証明する非侵襲的診断法がない状況にあった。

しかし、2015 年に犬膀胱移行上皮癌における driver 変異 (BRAF) が同定され (Mochizuki *et al.*, 2015)、申請者らは高い浸透率を示す (80% 以上の症例で認められる) この遺伝子変異は、犬膀胱移行上皮癌に対する新しい非侵襲的検出法につながるものと考えた。犬の移行上皮癌樹立細胞株および腫瘍症例サンプル (組織、血液、尿)、健康犬サンプル (血液、尿) における BRAF 遺伝子変異検出を RFLP 法 (Knapp *et al.*, 2015) を用い予備的に行ったところ、健康犬のサンプルや腫瘍症例の血液からは検出されない BRAF 遺伝子変異が全ての細胞株と多くの腫瘍症例の尿および腫瘍組織から検出され、細胞診を上回る有用性を持つことが明らかとなった。一方で、腫瘍組織では BRAF 遺伝子変異陽性であっても尿検体での診断ができない症例も少数ながら存在し、これは尿中に含まれる正常細胞に対する腫瘍細胞の割合が少なく、報告された手法の感度の限界 (1/10 コピーレベルが必要) と考えられた。そこで、検出感度向上と臨床応用を視野に入れ digital PCR による検出法を構築し、予備的検討を進めた結果、プローブ作成にあたりその構築に障害となる SNP を新たに二つ同定し、変異型配列及び野生型配列に特異的なプローブが得られ、1/500 コピーレベル程度の感度を達成できることが証明された。

これらの背景と予備的検討から、申請者らは BRAF 遺伝子変異を標的とした尿サンプルからの犬移行上皮癌の検出は可能であり、さらにそれを基底膜蛋白検出法と組合せることによって尿サンプルから腫瘍の進展状況が確認できる、すなわち "Liquid Staging" という新しい診断法が確立できるのではないかと仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

犬の膀胱に発生する移行上皮癌は非常に悪性度が高く予後不良の腫瘍であり、早期発見や的確な治療計画の策定に有用な非侵襲的診断方法が求められている。本研究では、新しく同定された犬移行上皮癌において高い浸透率が認められるがん遺伝子変異 (BRAF) と従来法である基底膜蛋白検出法 (V-BTA test) に着目し、犬の膀胱移行上皮癌に対する以下の検討から、尿中に遊離した腫瘍細胞ないし腫瘍細胞由来の核酸からの BRAF 遺伝子変異検出法の確立、および、組織浸潤および病期分類判定における基底膜蛋白検出法の有用性の評価、これら 2 つの組合せによる尿サンプルを用いた新規腫瘍診断法 "Liquid Staging" の確立を目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では犬膀胱移行上皮癌における BRAF 遺伝子変異を標的とした digital PCR 法と基底膜蛋白検出法から尿サンプルによる腫瘍の確定診断および病期判定を行う "Liquid Staging" を構築することを目的とし、以下の研究計画を実行する。

digital PCR 法による BRAF 遺伝子変異の検出感度の評価 (尿検体モデル)

digital PCR 法による BRAF 遺伝子変異の検出感度の評価 (保存臨床尿検体)

基底膜蛋白検出法による組織損傷評価と腫瘍浸潤や病態との関連性 (保存臨床尿検体)

保存症例検体 (組織) における BRAF 遺伝子変異の有無と病態との関連性

"Liquid Staging" の前向き検討

(研究方法の詳細については次項にて結果と併せて記載する。)

### 4. 研究成果

平成 28 年度には、尿検体を用いた検出感度評価、臨床検体を用いた検出感度評価、組織における BRAF 遺伝子変異と病態の関連性に関して主に検討を行った。

尿サンプルからの BRAF 遺伝子変異検出感度に関して、これまで報告のある RFLP 法での検出感度では不十分と考え、予備的検討にて digital PCR 法での検出法の確立を進めてきたが、健康犬尿と BRAF 遺伝子変異陽性移行上皮癌症例の尿を階段希釈し、direct sequencing 法、制限酵素断片長多型法 (RFLP)、real-time PCR 法、digital PCR 法の検出感度を比較したところ、それぞれ 13.2、0.52、6.8、<0.14% まで検出可能であり、digital PCR 法がこれら利用可能な遺伝子変異

検出法の中で最も高感度であることを明らかにした(図1)。

また症例の尿検体を用いた検討では移行上皮癌症例 17 症例のうち 11 症例が陽性であり、尿中 BRAF 遺伝子変異の検出に関しては感度・特異度ともに 100%であった。

さらに悪性腫瘍を検出するという点においては細胞診検査と同等の検出感度(約 70%)であったが、細胞診検査と遺伝子検査が互いの欠点を補いあうような性質を持つため、互いを併用することで悪性腫瘍の検出感度は約 92%となった。

30 症例の膀胱移行上皮癌症例の組織を用いた検討では、20 症例が BRAF 遺伝子変異陽性であったが、変異の有無によって発生部位、臨床ステージ、生存期間(図2)等を含めた長期予後には違いを認めないことも明らかになった。

腫瘍の進行度を検出する方法として、基底膜蛋白検出法を当初検討としていたが、基底膜蛋白検出法は特に血尿で偽陽性のリスクが高いため、より病態との関連性が深い候補標的因子を検索するために、膀胱炎症例、膀胱移行上皮癌症例

(<T2) 膀胱移行上皮癌症例(>T3)の尿検体を用いてショットガン解析によるプロテオーム解析を実施することとした。その結果、それぞれのグループで特異的に増減しているタンパク質候補を複数抽出した。

平成 29 年度は昨年度からの継続として臨床検体における digital PCR 法による BRAF 遺伝子変異の検出感度の評価、ならびに前年度より前倒しで進めている BRAF 遺伝子変異の有無と病態との関連性について検討を重ねた。昨年度では BRAF 遺伝子変異検査を実施した臨床例は 17 症例にとどまったが、本年度は膀胱内腫瘍 / 膀胱粘膜肥厚 / 前立腺腫大を認め BRAF 遺伝子変異検査を行った症例は 94 症例となった。そのうち、病理組織診断にて移行上皮癌と確定診断がなされた 70 症例における BRAF 遺伝子変異による診断の感度、特異度、正診率はそれぞれ 83.3%、100%、87.1%となり、前年度における実績と比較し、感度と正診率において精度の向上が見られた。

また尿サンプルから得られる主要な情報の一つである細胞診との組合せた場合の診断の有用性を検討したところ、両者の組合せにより感度、特異度、正診率は 100%、92.3%、98.6%と BRAF 遺伝子変異、細胞診それぞれ単独による精度に比べ飛躍的な向上がみられた(表1)。

これは genotype を判定する BRAF 遺伝子変異検査と phenotype を評価する細胞診がそれぞれの長短所を補い合った結果と考えられた。

また尿サンプル中に含まれるタンパクの解析については昨年度実施したショットガン解析を基にプロテオーム解析を進め、膀胱炎症例や<T2 および T3 膀胱移行上皮癌症の間で特異的な増減を示す erbB-2 など複数のタンパクを同定した。

最終年度である平成 30 年度には、digital PCR 法を用いた BRAF 遺伝子変異検査による犬移行上皮癌の診断とその病理組織学的検査結果との比較から、本遺伝子変異検査法の診断精度について継続して評価を行った。本検査法単独および細胞診の併用による感度、特異度、正診率はそれぞれ前年度と同様に非常に高く、そして研究期間内において BRAF 遺伝子変異検査の特異度は 100%であった。すなわち、本検査法にて BRAF 遺伝子変異陽性と診断された症例は全て移行上皮癌であり、一方、移行上皮癌以外の良性疾患で変異陽性と診断された症例は 0 であり、digital PCR 法を用いた BRAF 遺伝子変異検査は、BRAF 遺伝子変異陽性の犬移行上皮癌に対する非侵襲的で高感度な検出法として確立されたと考えられた。

また犬移行上皮癌の病態進行の指標となる候補として、上皮間葉転換(Epithelial to mesenchymal transition; EMT)に着目しさらなる検討を進めた。犬移行上皮癌症例および非移行上皮癌症例や健常組織における EMT マーカー(上皮系: E-cadherin、ZO-1、間葉系: vimentin、

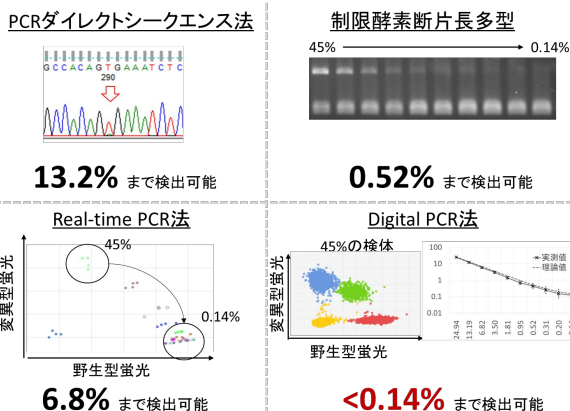


図1 各検出法における BRAF 遺伝子変異検出感度

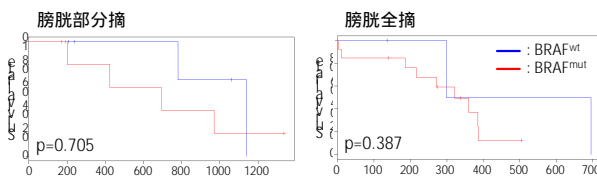


図2 BRAF 遺伝子変異と予後との関連

	感度	特異度	正診率
BRAF 遺伝子変異検査	83.3%	100%	87.1%
BRAF 遺伝子変異検査 + 細胞診	100%	92.3%	98.6%

表1 BRAF 遺伝子変異検査と細胞診による犬移行上皮癌の診断精度

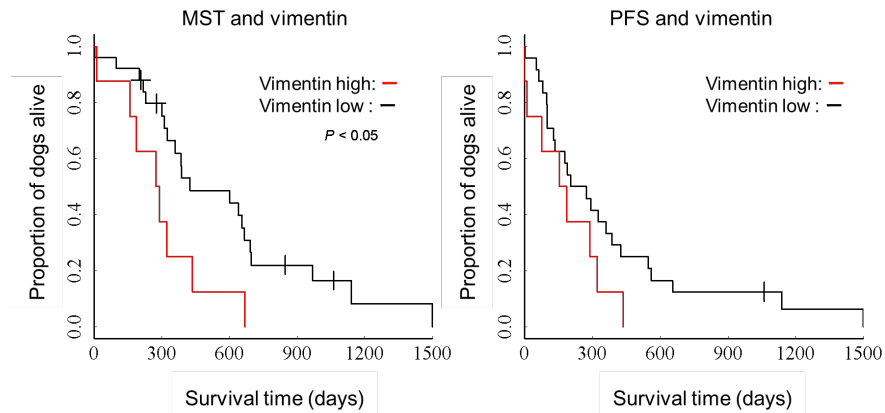
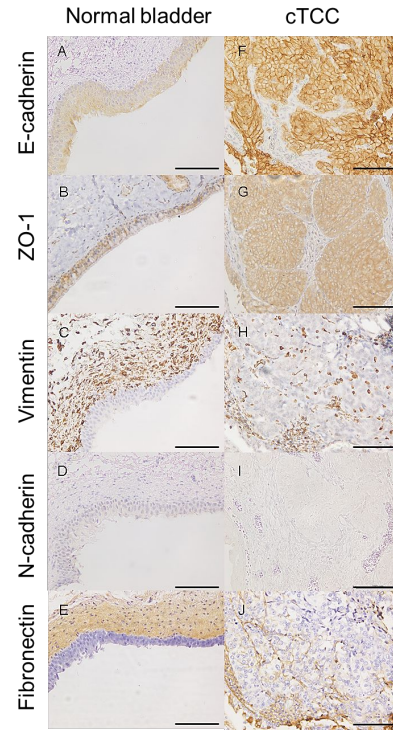
N-cadherin, fibronectin) の発現検索では、vimentin が犬移行上皮癌症例においてより高い発現率を示すなど、犬移行上皮癌症例において高率に EMT 様の変化が見られることが明らかとなった (表 2) (図 3)。犬移行上皮癌で高率に発現のみられた間葉系マーカーである vimentin、fibronectin については、その陽性率と発現強度から scoring を行い、予後との関連を比較検討した。

	健常組織	移行上皮癌
E-cadherin	5/5	32/32
ZO-1	5/5	27/27
vimentin	0/5	28/33
fibronectin	1/5	20/32
N-cadherin	0/5	0/29

(上) 表 2 膀胱健常組織と移行上皮癌症例における EMT マーカー発現

(右) 図 3 免疫組織学的染色像

(下) 図 4 vimentin 発現と予後との関連



その結果、vimentin の発現 score は犬移行上皮癌症例の生存期間中央値 (MST) と有意に相関を示し、腫瘍組織において vimentin 高発現を示す症例群では有意に生存期間が短いことが明らかとなった。また BRAF 遺伝子変異保有症例において vimentin の発現スコアが高い傾向も認められた。

これらの結果を踏まえ、犬移行上皮癌由来細胞株でのさらなる検討を進めた。EMT 様の形質を示す BRAF 遺伝子変異陽性株 2 株に対し、BRAF および Pan-RAF 阻害剤添加による EMT への影響や下流シグナル変動を評価した。結果、両阻害剤ともに ERK-MAPK 経路の阻害、間葉様から上皮様への細胞形態変化、EMT マーカーの上皮様変動がみられた。また Pan-RAF 阻害剤では移動・浸潤能にも変化が見られ、BRAF 遺伝子変異と ERK-MAPK 経路から EMT が誘導されている可能性が示唆された。

本研究では、早期の確定診断が非常に困難である犬移行上皮癌を尿サンプルから診断かつその進展状況を確認できる "Liquid Staging" の確立を目的とし、診断については、犬移行上皮癌に高率に認められる BRAF 遺伝子変異を高感度に検出できる digital PCR 法を確立し、その臨床応用に成功した。腫瘍の進展状況については、EMT を標的として検討を進め、犬移行上皮癌において間葉系マーカーである vimentin が有意に生存期間と関連することを明らかにした。また犬移行上皮癌において高率にみられる EMT が ERK-MAPK 経路を介した BRAF 遺伝子変異と関連がある可能性を示した。これらの成果から、尿サンプルにより腫瘍の診断と病態把握を行う "Liquid Staging" の基盤データが形成されたものと考えられた。

本研究成果によって早期診断が実現したことで、従来の検査法では早期診断は非常に困難であり、積極的な治療であっても生存期間は 1 年未満であった犬移行上皮癌症例の生存予後が大きく改善することが期待されるだけでなく、尿サンプルを用いた "Liquid Staging" の成功例の先駆けとなったと考える。また犬移行上皮癌における EMT の予後との関連や BRAF-ERK-MAPK 経路との関連を示唆するデータは、臨床応用可能な予後マーカーとなるだけでなく、浸潤性の高い犬移行上皮癌の分子生物学的な性状の解析やより効果的な治療法開発に向けた基盤的デー

タとして意義ある成果と考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計8件)

Masahiro SHINADA, Kohei SAEKI, Ryohei YOSHITAKE, Shotaro ETO, Masaya TSUBOI, James CEMBERS, Kazuyuki UCHIDA, Daiki KATO, Sho YOSHIMOTO, Namiko IKEDA, Satoshi KAMOTO, Ryohei NISHIMURA, Takayuki NAKAGAWA, The role of ERK/MAPK pathway for epithelial - mesenchymal transition induction in canine urinary bladder transitional cell carcinoma, 8<sup>th</sup> Annual Congress of Asian Society of Veterinary Surgery, 2018

吉竹 涼平、衛藤 翔太郎、品田 真央、佐伯 亘平、中野 令、杉谷 博士、西村 亮平、中川 貴之、ERK/MAPK 経路は犬尿路上皮癌における COX2/PGE2Axis を活性化する、第 77 回日本癌学会学術総会、2018

品田 真央、佐伯 亘平、吉竹 涼平、衛藤 翔太郎、加藤 大貴、吉本 翔、池田 凡子、嘉本 諭、坪井 誠也、James Chambers、藤田 直己、内田 和幸、西村 亮平、中川 貴之、犬尿路上皮癌における上皮間葉転換の評価とその予後との関連、第 161 回日本獣医学会学術集会、2018

品田 真央、佐伯 亘平、吉竹 涼平、衛藤 翔太郎、西村 亮平、中川 貴之、犬尿路上皮癌における上皮間葉転換の誘導の有無についての検討、第 18 回東京大学生命科学シンポジウム、2018

中川 貴之、イヌ膀胱・前立腺移行上皮癌と BRAF 遺伝子変異、大阪府立大学獣医学専攻第 10 回オープンセミナー、2018

吉竹 涼平、衛藤 翔太郎、佐伯 亘平、田中 由依子、加藤 大貴、吉本 翔、西村 亮平、中川 貴之、BRAFV595E 変異犬尿路上皮癌におけるプロスタグランジン E2 産生と細胞増殖を標的とした薬剤スクリーニング、先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会 2017、2018

Ryohei YOSHITAKE, Kohei SAEKI, Ryohei KINOSHITA, Kazuyuki UCHIDA, Takayuki NAKAGAWA, Ryohei NISHIMURA, Impact of BRAF genotype on prognosis after total cystectomy in canine urinary bladder transitional cell carcinoma, 6<sup>th</sup> Conference of Asian Society of Veterinary Surgery, 2016

Kohei SAEKI, Takayuki NAKAGAWA, Ryohei NISHIMURA, Digital PCR - based BRAFV450E urine biopsy for urothelial cell carcinoma and prostate carcinoma, 第 75 回日本癌学会学術集会、2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等(なし)

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。