

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11010

研究課題名(和文) 上部尿路がん早期発見を目的とした新規検査法の開発

研究課題名(英文) Development of novel diagnostic procedure for detection of upper urinary tract urothelial cancer

研究代表者

猪口 淳一 (Inokuchi, Junichi)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：10403924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：上部尿路がん(腎盂・尿管がん)の発がん因子として注目されているアリストロキア酸が、本邦でも発がんの原因となっているか検討した。台湾の上部尿路がん患者では高頻度でアリストロキア酸との関連が報告されたが、本邦の症例では非常に稀であることがわかった。

また、尿路上皮がんの新たな診断法として尿中の活性化型リン酸化酵素Xの活性を測定したところ、尿路上皮がんの悪性度に関わらず高い感度、特異度を示し有望なバイオマーカーであることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上部尿路がんを含めて、様々ながん腫において人種差、地域差があることがわかっている。生薬成分の一つであるアリストロキア酸の摂取は上部尿路がんの発がんに関連が指摘されているが、今回の研究にて本邦においてはその頻度が稀であることが示された。また、尿路上皮がんの診断において、体の負担の軽い尿を用いたリン酸化酵素Xを標的とした新たな診断法が、高い感度、特異度を示し、有望な検査法となりうることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that a fraction of upper urinary tract urothelial carcinoma (UTUC) cases in Japan might result from past intake of aristolochic acid (AA), a powerful nephrotoxin and human carcinogen, which cause UTUC. In contrast to the high incidence of AA-associated UTUC in Taiwan cohort, our study indicated that confirmed AA-exposure in Japanese UTUC patients were rare.

We examined the efficacy of activated protein kinase X in urine sample to detect urothelial cancer. We found the high sensitivity and specificity of this assay, and suggested the activated protein kinase X as promising biomarker for detecting urothelial cancer.

研究分野：泌尿器科学、泌尿器科腫瘍学

キーワード：上部尿路癌 腎盂癌 尿管癌 アリストロキア酸 癌診断 腫瘍学 泌尿器科学 尿路上皮癌

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

1. 研究開始当初の背景

上部尿路がん(腎盂・尿管がん)は比較的稀な疾患で、尿路上皮から発生する尿路上皮がんのうち約5%を占める。一般的には、同じ尿路上皮がんである膀胱がんに比べて予後不良であり、特に浸潤がんでの予後は不良である。上部尿路がんを制御するためには、その発がん機構や生物学的特性を解明することは非常に重要であるが、前述のように稀な疾患であるため大規模疫学研究やマネジメントに関する無作為化試験などは十分に行われておらず、同じ尿路上皮がんである膀胱がんのマネジメントに沿って診断、治療がなされることが多い。上部尿路がんにおいて浸潤がんの予後は不良であるものの、非浸潤がんに対する根治治療後の予後は比較的良好であるため、他臓器がんと同様早期発見ががん制御の鍵であると考えられている。

(1) 上部尿路がんの発がん因子として、喫煙とフェナセチン含有鎮痛剤が確立されたリスク要因とされているものの、未だ不明な点も多い。近年、アリスロキア酸(aristolochic acid: AA)によるDNA障害と上部尿路がんの関連が指摘され注目されている。AAはアリスロキア属(Aristolochia属)の植物に含まれている成分で、Birthwortとよばれるハーブ、ならびに生薬に含まれていることが知られており、これまでにAAによる腎毒性、発がん性や変異原性が報告されている^{1,2)}。また、AAがDNAと共有結合しアリストロラクタム(AL)-DNA付加物を形成すること、P53を含む複数の遺伝子に特徴的なA>T変異を惹起することが明らかにされてきた。(図1)バルカン諸国や台湾の上部尿路がん症例では、これらのバイオマーカーが高頻度で見られることが報告されている。一方、本邦においてはAAによる上部尿路がんと推測される症例報告を認めるのみでまとまった報告はない。

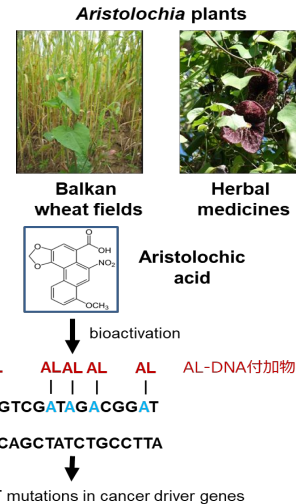


図1) アリスロキア酸によるDNA障害

(2) がんの早期発見は予後の改善において重要な役割を果たすが、特に上部尿路がんでは前述のように浸潤性がんが予後不良である一方、非浸潤性がんは標準的治療である腎尿管全摘除術後の予後が比較的良好であるため、早期発見が重要な課題であると考えられている。同じ尿路上皮がんである膀胱がんでは、その診断において尿検査、尿細胞診、腹部超音波検査などの非侵襲的検査に加え、膀胱鏡検査が行われ臨床診断に至る。現在のところ、上部尿路がんを含めて尿路上皮がんに対する有用な血液腫瘍マーカーは存在しない。非侵襲的検査である尿細胞診検査は検出特異度が95%以上と高く優れた検査法であるが、感度は40~60%と相対的に低く、特に高分化型がんの検出は困難であり診断上大きな問題となっている。これまでにNMP22、BTA、サイトケラチン8・18等いくつかの分子が膀胱がんに対するバイオマーカーとして開発されているが、いずれも感度が低いことが問題となっている。一方、上部尿路がんの診断においては、内視鏡検査である尿管鏡検査は侵襲度が高く、腹部超音波検査は感度が低く早期診断が難しいため、非侵襲的で感度、特異度の高い新たな検査法が期待されている。

<引用文献>

- 1), Vanherweghem JL, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. Lancet 341:387-91. 1993.
- 2), Nortier JL, et al. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (Aristolochia fangchi). N Engl J Med. 342:1686-92. 2000.

2. 研究の目的

上部尿路がんにおいて早期発見ががん制御の鍵である。そのため、発癌リスクの高い集団を同定することができれば、より集中的なスクリーニングを行うことで早期発見が可能になると考えられる。そこで、これまでに海外での研究により上部尿路がんの発がん因子であることが明らかになっているアリスロキア酸に注目し、本邦における発がんへの関与について検討を行う。また、同時に上部尿路がん早期発見へ向けた新たなスクリーニング法の開発を行う。

(1) 本邦では、AAによる上部尿路がんと推測される症例報告を認めるのみで、まとまった報告はない。しかしながら、日本人の上部尿路がん罹患率は、台湾ほどではないにしても西欧諸国より高く、その一部はAAを含む生薬等による発がんの可能性が考えられる。そこで、これまでに明らかとなっているAAによる障害特異的な複数のバイオマーカーを用いて、本邦でのAAに起因する上部尿路がんの有無、頻度を明らかにする。

(2) 上部尿路がん、あるいはすべての尿路上皮がんに対する非侵襲的で感度、特異度の高い検査法の開発を目的とし、がん細胞において過剰に発現・活性化されるリン酸化酵素Xに注目し

新たなバイオマーカーとしての可能性を検討する。これまでに、血液中に放出された X を検出できる応答ペプチドを開発している。原発性尿路上皮癌がんは尿路に露出していることから X が尿中に放出される可能性が高く、尿中活性型 X は尿路上皮がん診断における新たな標的になり得ると考えられた。そこで、X の同定、検査法の確立を行い、がん早期発見への応用可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 本邦での上部尿路癌におけるアリストロキア酸 (AA)の関与に関する検討

本邦における上部尿路癌の臨床的特徴に関する検討

これまでの報告では、AA による上部尿路がんは若年者、女性に多く、対側同時性がんの頻度も高いが、喫煙者の頻度はむしろ低いとの可能性が指摘されている。そこで、日本人における上部尿路がんの臨床的特徴を検討するため、大規模データベースを利用した解析を行った。今回、日本泌尿器科学会による癌登録情報、あるいは日本臨床腫瘍研究グループ(JCOG)の泌尿科腫瘍グループにて実施された大規模な後ろ向き研究(JCOG1110A)の登録情報を用いて、その臨床的特徴を解析した。

臨床検体における AA 特異的バイオマーカーを用いた AA による発がん頻度の解析

本解析は課題名「本邦での上部尿路がんにおけるアリストロキア酸の関与に関する多施設共同研究」として九州大学医系地区部局ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査専門委員会の承認を得て行った。(承認番号:465-00) 2011年8月以降、九州大学病院にて上部尿路癌の診断にて腎尿管全摘除術を予定された患者を対象とした。術前化学療法、術前放射線療法が施行された症例、肉眼的に腫瘍の確認、採取が困難な症例、文書による同意が得られなかった症例は除外した。同意の得られた患者の摘出組織より、正常腎実質、腫瘍の一部より DNA を抽出した。AA 障害によるバイオマーカーとして、正常腎実質から抽出した DNA より質量分析法を用いて AL-DNA 付加物を検出した。また、AA 関連上部尿路がん症例において高頻度で変異が報告されている 32 遺伝子について、腫瘍から抽出した DNA の A>T 変異の頻度を分析した。

(2) 尿中活性型 X を標的とした新規スクリーニング法の開発

本解析は九州大学医系地区部局臨床倫理審査委員会の承認を得て行った。(許可番号:28-110, 28-393) 九州大学病院にて手術予定の尿路上皮がん患者及び対照群として良性疾患患者から同意を得て尿を採取し、尿中の活性型 X を質量分析装置にて検出測定した。検体量、保存方法、保管期間等に関して条件設定を行った後に、実際に臨床検体において尿路上皮がん検出の感度、特異度を検討した。また、尿細胞診、尿中 BTA、尿中 NMP-22、尿中 CK18-8 など、その感度を比較した。

4. 研究成果

(1) 本邦における上部尿路癌の臨床的特徴に関する検討

日本泌尿器科学会の癌登録データベースにおける上部尿路癌と膀胱癌の比較では、臨床病期 T2 と T3 の比較において、T3 では有意に予後不良であり、この傾向が上部尿路癌でより顕著であったことを報告した。(Koie T, et al. Jpn J Clin Oncol. 2016) また、2つの大規模データベースにて腎尿管全摘除術を行った遠隔転移、臨床的リンパ節転移のない患者では、リンパ節郭清による明らかな予後の改善は認められないことを報告した。(Inokuchi J, et al. World J Urol. 2017; Inokuchi J, et al. Jpn J Clin Oncol. 2017)

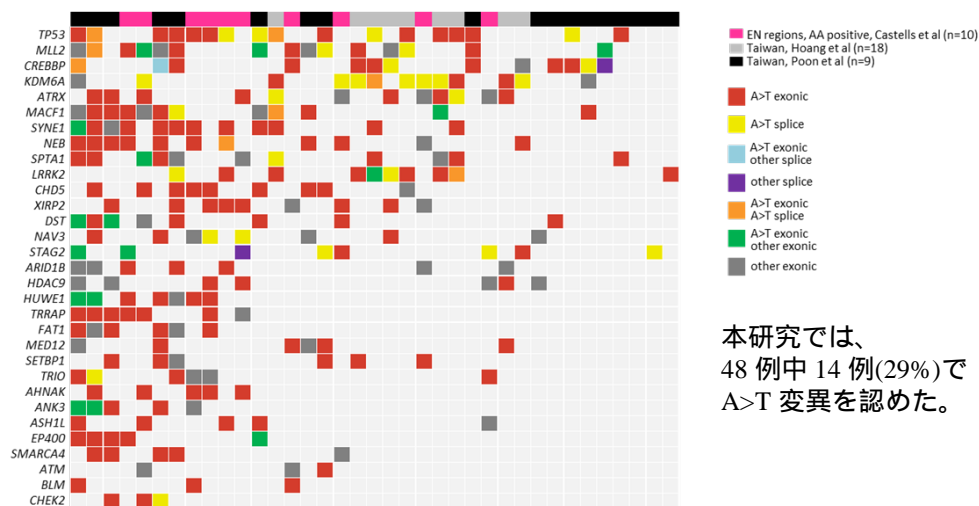
これら日本人の大規模データベースにて、AA による上部尿路がんが多いとされる若年者、女性、対側同時性がん、また頻度はむしろ低いとされる喫煙者の頻度に関して検討を行った。しかしながら、欧米からの大規模データベースと同様、高齢、男性に多く、対側同時性がんは稀で、本邦と欧米の比較(過去の報告との比較)では喫煙率はむしろ高かった。以上より、AA による上部尿路がんの臨床的特徴と本邦での上部尿路がん全体の臨床的特徴の比較において、その特徴は必ずしも一致しなかった。

(1)- 臨床検体における AA 特異的バイオマーカーを用いた発がん頻度の解析
 2016年3月までに同意を得て、かつ摘出した組織から DNA を抽出しえた 48 例を対象として解析した。

⑦ AL-DNA 付加物の検出 48 例中 2 例 (4%) のみで AL-DNA を検出した。

① AA 関連上部尿路がん特異的 A>T 変異頻度

図 2)AA 関連上部尿路がんにて高頻度で変異がみられる 32 遺伝子(本研究で解析した遺伝子)



本研究では、
 48 例中 14 例(29%)で
 A>T 変異を認めた。

AL-DNA 付加物、特徴的 A>T 変異の両方を示したのは 1 例(2%)のみであった。
 以上より、本邦では AA による上部尿路がんの頻度は、これまでに報告された台湾コホートと比較してかなり稀であることが示された。(第 107 回日本泌尿器科学会総会にて報告)

(2) 尿中活性型 X を標的とした新規スクリーニング法の開発

対象患者から同意を得て尿を採取し、尿中の活性型 X を特異的に反応する基質ペプチドを用いて質量分析装置にて検出を試みたところ、一部の検体にて活性型 X を検出しえた。同時に同一検体を凍結後に解凍し測定すると活性が極端に低下すること、活性は 48 時間までは冷蔵保存にて持続することも判明した。リン酸化率のカットオフを 2%と設定し、同測定条件のもと質量分析装置にて、尿路上皮がん(膀胱がん、上部尿路がん)患者及び対照群として良性疾患患者の尿検体にて活性型 X を測定した。感度に関しては、尿細胞診、NMP-22、尿中 BTA などの既存の臨床検査法との比較を行った。

その結果、良性疾患患者を対照群とした解析にて low grade、high grade とともに高い感度、特異度を示した。尿細胞診、尿中 BTA、尿中 NMP-22、尿中 CK18-8 などと比較したところ、尿中活性型 X のみが陽性であった症例が 16~24%存在していた。

以上より、尿路上皮がんを検出しえる有望なバイオマーカーであることが示された。特に、High grade 腫瘍だけでなく、尿細胞診では検出が難しい Low grade 腫瘍においても高い感度を示したことは特筆すべき点である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Akitake M, **Kiyoshima K**, Yokomizo A, Shiga K, Koga H, Takeuchi A, Shiota M, **Inokuchi J**, Tatsugami K, Yamaguchi A, Eto M. A rational risk assessment for intravesical recurrence in primary low-grade Ta bladder cancer: A retrospective analysis of 245 cases. *Mol Clin Oncol*. 2018 Jun;8(6):785-790. doi: 10.3892/mco.2018.1602. 査読あり

Yamaguchi K, Inoue T, Habuchi T, **Inokuchi J**, Yokomizo A, Eto M, Kanayama HO. An In Vitro Study of a New Device: Evaluation of Novel Wide-Angle Lens Flexible Cystoscope Using Phantom Bladder Model. *J Endourol*. 2017 Oct;31(10):1073-1078. doi: 10.1089/end.2017.0371. 査読あり

Inokuchi J, Kuroiwa K, Kakehi Y, et. al. Role of lymph node dissection during radical nephroureterectomy for upper urinary tract urothelial cancer: multi-institutional large retrospective study JCOG1110A. *World J Urol*. 2017 Nov;35(11):1737-1744. doi: 10.1007/s00345-017-2049-x. 査読あり

Inokuchi J, Eto M, Hara T, et. al. Impact of lymph node dissection on clinical outcomes during nephroureterectomy in patients with clinically node-negative upper urinary tract urothelial cancer: subanalysis of a multi-institutional nationwide case series of the Japanese Urological Association. *Jpn J Clin Oncol*. 2017 Jul 1;47(7):652-659. doi: 10.1093/jjco/hyx051. 査読あり

Koie T, Ohyama C, Fujimoto H, et. al. (9番目/22名中) Diversity in treatment modalities of Stage II/III urothelial cancer in Japan: sub-analysis of the multi-institutional national database of the Japanese Urological Association. *Jpn J Clin Oncol*. 2016 May;46(5):468-74. doi: 10.1093/jjco/hyw005. 査読あり

Kiyoshima K, Akitake M, Shiota M, Takeuchi A, Takahashi R, **Inokuchi J**, Tatsugami K, Yokomizo A, Eto M. Prognostic Significance of Preoperative Urine Cytology in Low-grade Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Anticancer Res*. 2016 Feb;36(2):799-802. 査読あり
<http://ar.iiarjournals.org/content/36/2/799.long>

Miyazaki J, Nishiyama H, Fujimoto H, Ohyama C, Koie T, Hinotsu S, Kikuchi E, Sakura M, **Inokuchi J**, Hara T. Laparoscopic Versus Open Nephroureterectomy in Muscle-Invasive Upper Tract Urothelial Carcinoma: Subanalysis of the Multi-Institutional National Database of the Japanese Urological Association. *J Endourol*. 2016 May;30(5):520-5. doi: 10.1089/end.2015.0757. 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

猪口淳一、本邦におけるアリストロキア酸に起因する上部尿路癌の実態

第107回日本泌尿器科学会総会、2019年

Inokuchi J, Regional distribution of lymph node metastasis in upper urinary tract urothelial cancer, sub-analysis of large multi-institutional study (JCOG1110A). The 34rd Annual EAU Congress, 2018.

猪口淳一、上部尿路癌におけるリンパ節転移の領域別分布 - JCOG1110A 研究より

第106回日本泌尿器科学会総会、2018年

Inokuchi J, Distribution of lymph node metastasis in upper urinary tract urothelial cancer, sub-analysis of JCOG1110A study. The American Urological Association's 2017 Annual Meeting, 2017.

猪口淳一、大規模多施設共同調査研究(JCOG1110A)にみる上部尿路癌の所属リンパ節転移分布、第55回日本癌治療学会学術集会、2017年

猪口淳一、上部尿路癌に対するリンパ節郭清の治療的意義

第105回日本泌尿器科学会総会、2017年

〔図書〕(計1件)

Jeong-Hun Kang, **Junichi Inokuchi**, Takahito Kawano and **Masaharu Murata**, Nova Science Publishers, PROTEIN KINASE C EMERGING ROLES AND THERAPEUTIC POTENTIAL, 2018, 25-47

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：村田 正治

ローマ字氏名：MURATA, masaharu

所属研究機関名：九州大学

部局名：先端医療イノベーションセンター

職名：特任教授

研究者番号（8桁）：30304744

研究分担者氏名：姜 貞勲

ローマ字氏名：KANG, jeong-hun

所属研究機関名：国立研究開発法人国立循環器病研究センター

部局名：研究所

職名：室長

研究者番号（8桁）：50423512

研究分担者氏名：片山 佳樹

ローマ字氏名：KATAYAMA, yoshiki

所属研究機関名：九州大学

部局名：工学研究院

職名：教授

研究者番号（8桁）：70284528

研究分担者氏名：清島 圭二郎

ローマ字氏名：KIYOSHIMA, keijiro

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：80444818

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Arthur P. Grollman (Laboratory of Chemical Biology, Stony Brook University)

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。