

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11135

研究課題名(和文) 尿路上皮におけるDNAメチル化の蓄積による膀胱癌再発メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of bladder cancer recurrence mechanism by accumulation of DNA methylation in urothelium

研究代表者

永原 啓 (Nagahara, Akira)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・泌尿器科副部長

研究者番号：90588774

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)：膀胱癌の再発メカニズムの解明を目指し、膀胱癌症例における非癌粘膜のホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPE)検体を用い特定の遺伝子のDNAメチル化と再発の関連を検討する予定であったが、FFPEから十分量のDNAを回収することが困難であった。上記より少量のDNAでも検討可能な次世代シーケンス技術を用いる方針へ変更し、癌遺伝子のターゲットシーケンスにより膀胱癌症例の非癌粘膜における複数の遺伝子変異を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は膀胱癌が初発時に癌が存在しない他部位よりしばしば再発することから、非癌粘膜の遺伝子のメチル化などの生物学的変化が再発に関与すると仮説を立て、非癌粘膜に注目して研究を施行した。その結果、膀胱癌患者の非癌粘膜より発がんに関与すると予測される複数の遺伝子変異を見いだした。更なる検討が必要ではあるが、これらの結果より膀胱癌再発に関連するDNAメチル化による遺伝子変異を証明することができれば、有効な再発予防治療の開発の一助となりうる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the recurrence mechanism of bladder cancer, we planned to investigate the relationship between DNA methylation of specific genes and recurrence using formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPE) specimens of non-cancerous mucosa in bladder cancer cases. However, it was difficult to extract a sufficient amount of DNA from FFPE. We changed to a policy of using next-generation sequencing technology that can be examined even with a smaller amount of DNA than the above, and identified multiple gene mutations in the non-cancer mucosa of bladder cancer cases by target sequencing of oncogenes.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：膀胱癌 メチル化 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

筋層非浸潤性膀胱癌は、経尿道的膀胱腫瘍切除術(Transurethral resection of bladder tumor; TUR-BT)術後の再発率が 60-70%と高く、異なる部位での再発が多いことが特徴的である。

術後再発予防治療として、抗がん剤や BCG の膀胱内注入療法がなされている。しかしながら抗がん剤の再発予防効果は単回では低リスク群の症例に限られており、維持膀胱注についてはガイドラインで推奨されているものの、質の高いエビデンスが乏しいのが現状である。BCG の膀胱内注入療法は高リスク膀胱癌において有効性も高くガイドラインでも推奨されているものの、重篤な有害事象を生じる可能性があるのが臨床的課題である。また近年全世界的に BCG 製剤の供給不足が問題となっている。

現状の膀胱癌の再発予防治療は不十分であり依然再発率も高いため、膀胱鏡検査を中心とした頻回の検査が術後経過観察中に必要となり、再発が指摘された症例については再度の TUR-BT が必要となり、同一症例において複数回の TUR-BT が施行されていることも珍しくなく、このことが医療経済を圧迫している大きな原因となっている。

上記理由により、膀胱癌の再発を予測する因子の解明及び再発予防治療として新規膀胱内注入療法の開発などが望まれる。

2. 研究の目的

筋層非浸潤性膀胱癌は術後腔内再発を高率に来ることが特徴である。その予防としての抗がん剤膀胱内注入の効果は限定的で、BCG 膀胱内注入は有害事象が多いのが問題である。

膀胱癌再発のメカニズムのひとつとして発癌物質や促進物質が発生母地の癌化を来し、それぞれに独立したクローンが増殖し新規に癌化することで再発巣を形成するとする field cancerization hypothesis が提唱されている。一方で近年発癌と DNA のメチル化についての検討が様々な癌腫で報告されており、膀胱癌においても病理形態学的に正常な粘膜において epigenetic な変化や遺伝子変異・染色体異常が検出され、特に非癌粘膜における DNA メチル化が存在するとの報告があることから epigenetic field defect の存在が提唱されており、field cancerization hypothesis による再発様式を示唆するものと我々は考えている。

この epigenetic field defect は消化器癌でも報告されており、中でも胃癌においては発癌と CDKN2A, CDH1, MLH1, RUNX3 などのがん抑制遺伝子のメチル化による不活化が報告されており、メチル化の強力な誘発因子としてヘリコバクターピロリ(HP) の感染が知られている。非担癌患者において、HP 感染者は非感染者と比較してがん抑制遺伝子を含めた多くの DNA メチル化異常が存在し、HP の除菌を行う事で、同一患者において除菌後に DNA メチル化レベルが一定レベルにまで低下するといった報告がなされている。

膀胱癌においても、ヒ素や職業性膀胱癌の原因として知られている芳香族アミンなどの発癌物質への暴露や喫煙がリスクファクターであり、これらと関連する DNA のメチル化が報告されており、胃癌と同様に特定の DNA のメチル化が発癌に関与しているものと考えられる。

そこで本研究では非癌粘膜のメチル化に着目し、膀胱癌の再発メカニズムを解明する。

具体的には初発時の非癌粘膜において DNA メチル化による epigenetic field defect が既に存在しており、DNA メチル化が蓄積することで徐々に癌の再発を来していると考え、まず網羅的解析により癌特異的メチル化の増加を認める遺伝子を同定し、次に非癌粘膜における DNA メチル化と再発様式との関連を検討する。また、同一患者の再発時の非癌粘膜検体における経時的な DNA メチル化の蓄積の有無も検討する。

膀胱癌とメチル化との関連を示唆されている報告は過去に報告があるが、メチレーションアレイのような網羅的手法を用いた遺伝子探索の報告は少数であり、非癌部粘膜と比較した網羅的な解析は過去にほとんどない。

また、本研究は再発に注目した臨床研究であることから、既に再発した症例及び依然再発していない症例の確保が検証においては早道であり、昨今の技術革新により純度の高い DNA が抽出可能となったホルマリン固定パラフィン包埋組織(Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded; FFPE)を検体として用いる。

本研究により特定の DNA メチル化と膀胱癌再発との関連が明らかになれば、将来的に TUR-BT 時の非癌部粘膜にその特定の DNA メチル化を認める症例に対し、膀胱内抗がん剤即時注入に加え、近年米国食品医薬品局(FDA: Food and Drug Administration)により認可された 5-azacytidine や 5-aza-2'-deoxycytidine などの脱メチル化剤を臨床応用し膀胱内注入することで再発を予防する、といった個別化医療の実現に向けた臨床試験をデザインすることも可能と考えられ、その臨床的意義は計り知れず、医療経済の観点からも大きな社会貢献が期待できると考えられる。

3. 研究の方法

癌特異的 DNA メチル化の網羅的探索

- (1) 過去に当科で TUR-BT を施行し術後再発を認めない膀胱癌患者の FFPE を用い、癌部及び非癌部より DNA を抽出する。
- (2) 複数の癌部及び非癌部検体について、DNA メチレーションアレイ (Illumina 社, Human Methylation 450 Bead Chip を使用) を施行し、癌特異的な DNA メチル化の増加を網羅的に探索する。
- (3) 膀胱癌患者の非癌部粘膜における特定の遺伝子のメチル化の増加については、本研究と同様の網羅的探索を含む報告例が過去に少数あり、これらの報告と申請者のメチレーションアレイの結果より膀胱癌における発癌に関与すると予測される候補遺伝子を選定する。

多数検体を用いたメチル化特異的 PCR 法 (MSP) による癌特異的 DNA メチル化の確認

- (4) 前述の網羅的探索に用いた症例とは別の患者群の FFPE を用い、癌部及び非癌部より DNA を抽出する。
- (5) 抽出した DNA にバイサルファイト処理 (ZYMO 社, EZ DNA Methylation-Gold Kit 使用) を行い、選定した候補遺伝子について MSP を施行。癌特異的なメチル化の増加を確認する。

非癌部粘膜における DNA メチル化と再発との関連の検討

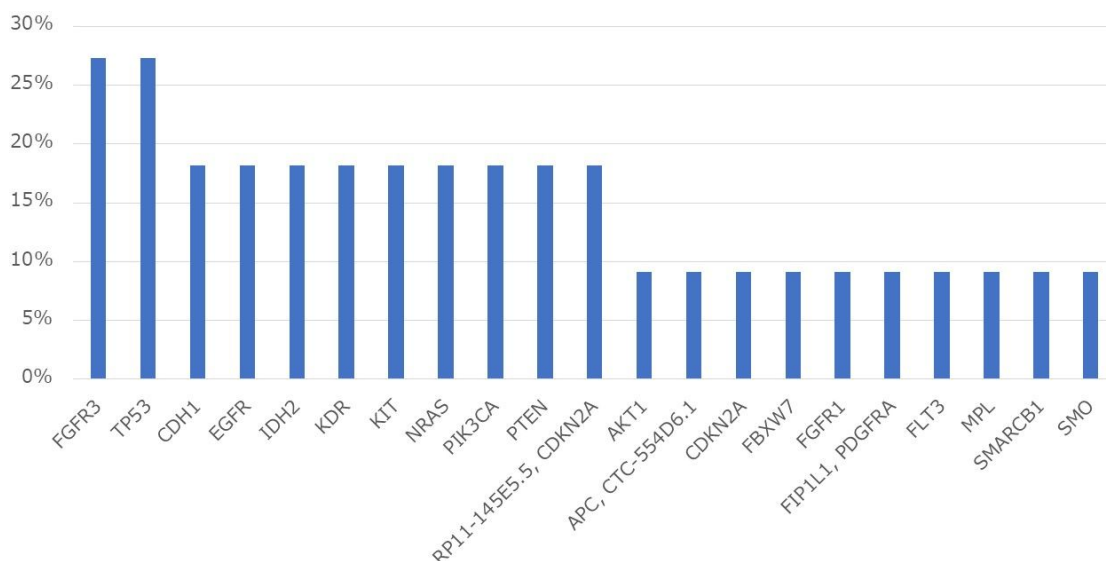
- (6) 2013 年以降当科で前向き臨床研究に参加した患者の膀胱癌手術時に生検を行った非癌部粘膜の臨床検体を用い、非癌部の FFPE より DNA を抽出する。これらの検体に対し、選定した癌特異的に DNA メチル化の増加を認める候補遺伝子について MSP を施行する。
- (7) 候補遺伝子の DNA メチル化の増加と再発の有無について検討し、再発と関連する特定の遺伝子における DNA メチル化を同定する。
- (8) 過去に当科で膀胱癌に対し複数回非癌部粘膜生検を施行した患者の臨床検体を用い、非癌部の FFPE より DNA を抽出する。これらの検体に対し、選定した癌特異的に DNA メチル化の増加を認める候補遺伝子について MSP を施行し、候補遺伝子の DNA メチル化の経時的な増加を確認する。

上記に当初の研究方法を記載したが、FFPE から抽出可能であった DNA 量は 500ug 以下であり、安定してメチレーションアレイに必要な十分量の DNA の抽出を行うことが手技的に困難であった。そこで解析に必要な DNA 量が比較的少ない癌特異的遺伝子変異パネルを用いたターゲットシーケンス (Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2) により候補遺伝子を抽出し、選択した候補遺伝子に対してそれぞれメチル化解析を行う方針に変更した。

4. 研究成果

- (1) 当科で TUR-BT を施行した膀胱癌患者 11 例の FFPE を用い、病理学的に悪性所見がないと確認された非癌部より DNA を抽出した。GeneRead DNA FFPE Kit (QIAGEN) を使用しプロトコールに沿って DNA を抽出した。1 サンプルあたり 81.6ng (32-320ng) の DNA の抽出が可能でこれらサンプルをターゲットシーケンスにより解析を行った。
- (2) 抽出した DNA を Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 (Thermo-Fisher) により解析した。シーケンス深度は 221 (30-58177) であった。各遺伝子変異の検出頻度を図 1 に示す。11 例の内、FGFR3 変異と TP53 変異を最も多い 3 例で認めた。

図1 膀胱非癌部における遺伝子変異の頻度



- (3) FGFR3 及び TP53 の変異は膀胱癌組織においても高頻度に認められることが報告されており膀胱癌の腫瘍形成に深く関与していることが示唆される。また CDH1 については過去に膀胱癌症例の非癌粘膜での DNA メチル化の存在が報告されている。本研究で得られた成果をもとに、次研究としてこれら遺伝子の DNA メチル化の有無を検討し非癌粘膜における DNA メチル化と再発についての検討を進めていく予定とした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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	植村 元秀 (Uemura Motohide) (40631015)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	
研究分担者	藤田 和利 (Fujita Kazutoshi) (50636181)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	

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