

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18558

研究課題名（和文）尿路上皮癌血中遊離DNA断片によるAIを活用した診断とその遺伝子変異の臨床応用

研究課題名（英文）AI-based diagnosis of urothelial carcinoma using plasma cell-free DNA fragments and clinical application of the genetic mutation

研究代表者

中野 剛佑（Nakano, Kosuke）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00804410

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）：進行性尿路上皮癌は予後不良な疾患であり、早期診断のためのバイオマーカーは不足している。尿路上皮癌の予後の改善のためにも早期診断マーカーの開発が急務であると考えられる。我々は以前より血中遊離DNA(cfDNA)に着目して研究を行っており、腎細胞癌や尿路上皮癌においてcfDNAの断片長の短小化が起きていることを報告してきた。本研究では尿路上皮癌においてcfDNAの断片長が診断マーカーとして有用であること、またcfDNAの断片長短小化に全身性炎症が関連することを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後不良である進行性尿路上皮癌に対し、免疫チェックポイント阻害剤の使用が承認された。しかしその効果は限定的であると言わざるを得ない。予後の改善のためにも早期診断マーカーや最適な薬剤選択を可能にするバイオマーカーの開発が求められている。我々は、血中のcfDNAの断片長が尿路上皮癌の診断マーカーとして有用であることを明らかにした。この結果は今後の個別化医療の実現に向けて社会的意義は大きいと考えられる。さらに、cfDNAの断片長と全身性炎症が関連していることを初めて明らかにし、学術的意義を有していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Advanced urothelial carcinoma is a disease with a poor prognosis, and biomarkers for early diagnosis are lacking. In order to improve the prognosis of urothelial carcinoma, it is urgent to develop early diagnostic markers. We have been focusing on cell-free DNA (cfDNA) in blood and have reported that the fragment size of cfDNA is shorter in renal cell carcinoma and urothelial carcinoma. In this study, we found that the fragment size of cfDNA is useful as a diagnostic marker in urothelial carcinoma, and that the decrease in cfDNA fragment size is associated with systemic inflammation.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：尿路上皮癌 cell-free DNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

予後不良である進行性尿路上皮癌に対し、免疫チェックポイント阻害剤の使用が承認された。しかし依然として薬剤選択のバイオマーカーは存在せず、効果も限定的である。さらなる予後の改善のためにも早期診断マーカーや最適な薬剤選択を可能にするバイオマーカーの開発が急務である。我々は以前より血中遊離 DNA(cfDNA)に着目して研究を行ってきた。腎癌では、cfDNA の濃度が早期診断バイオマーカーとして、断片長が予後予測マーカーとして有用であることを見出し、尿路上皮癌においても cfDNA の断片長の短小化が起きていることを報告してきた。

2. 研究の目的

本研究では尿路上皮癌の cfDNA の断片長に着目し、尿路上皮癌の診断マーカーとしての有用性を検討するとともに、cfDNA の短小化メカニズムの解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 血中 cfDNA の抽出および定量、断片長の測定

尿路上皮癌患者の血漿から cfDNA を抽出し、マイクロチップ型自動解析電気泳動装置(バイオアナライザ)で断片長の測定を行う。

血中 cfDNA 断片長の尿路上皮癌診断能を評価する。

尿路上皮癌患者における血中 cfDNA の断片長と臨床病理学的因子との関連を検討し、断片長の短小化に関連する因子を探索する。

(2) 血中 cfDNA 断片の短小化メカニズムの解明

細胞の培養上清中から cfDNA を抽出および断片長の測定を行う検証系を確立する。

培養細胞に(1) で同定した断片長の短小化と関連する因子を添加、または阻害することで短小化断片長の増減を評価する。

4. 研究成果

(1) 血中 cfDNA の抽出および断片長の測定

尿路上皮癌患者の血漿から cfDNA を抽出し、バイオアナライザで、cfDNA が抽出できていることの確認および断片長の測定を行った。(図 1)

これまで報告してきた通り、尿路上皮癌患者では健常者と比較して有意に cfDNA の断片長が短く、また、血中 cfDNA 断片長による尿路上皮癌の診断能は感度 63%、特異度 73%、AUC 0.72 という結果であった。(図 2)

尿路上皮癌患者における血中 cfDNA の断片長と病理学的深達度の関連を検討したところ、癌の進行に伴い断片長は短くなる傾向を認めた。(図 3)また、一般的な採血項目と比較を行ったところ、cfDNA の断片長は CRP や NLR、Alb と相関を示した。(図 4)

図 1

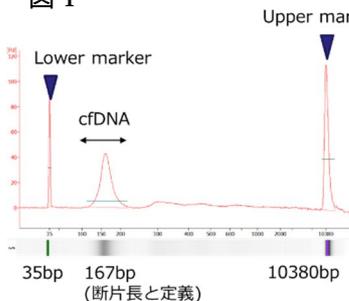


図 2

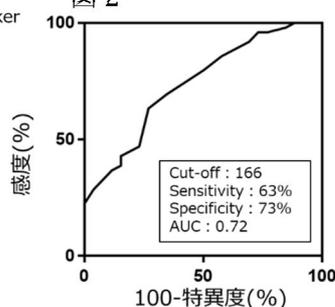


図 3

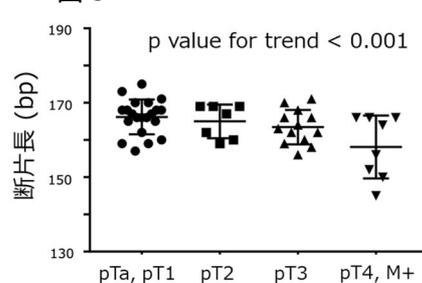
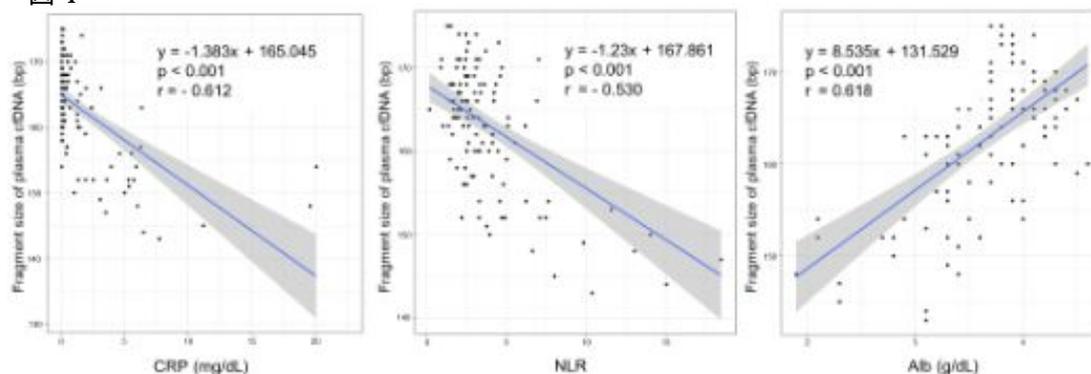


図 4



これらの結果から、cfDNA 断片長の短小化に全身性炎症が寄与していると考えられた。全身性炎症として炎症性サイトカインに着目し、患者血清中の TNF、IL-6、IL-1RA 濃度を ELISA 法で測

定したところ、いずれのサイトカインでも cfDNA の断片長が短い群で長い群と比較して有意に濃度が高いという結果が得られた。(図 5) また、cfDNA の断片長と血清サイトカインの間には強い負の相関を認めた。(図 6)

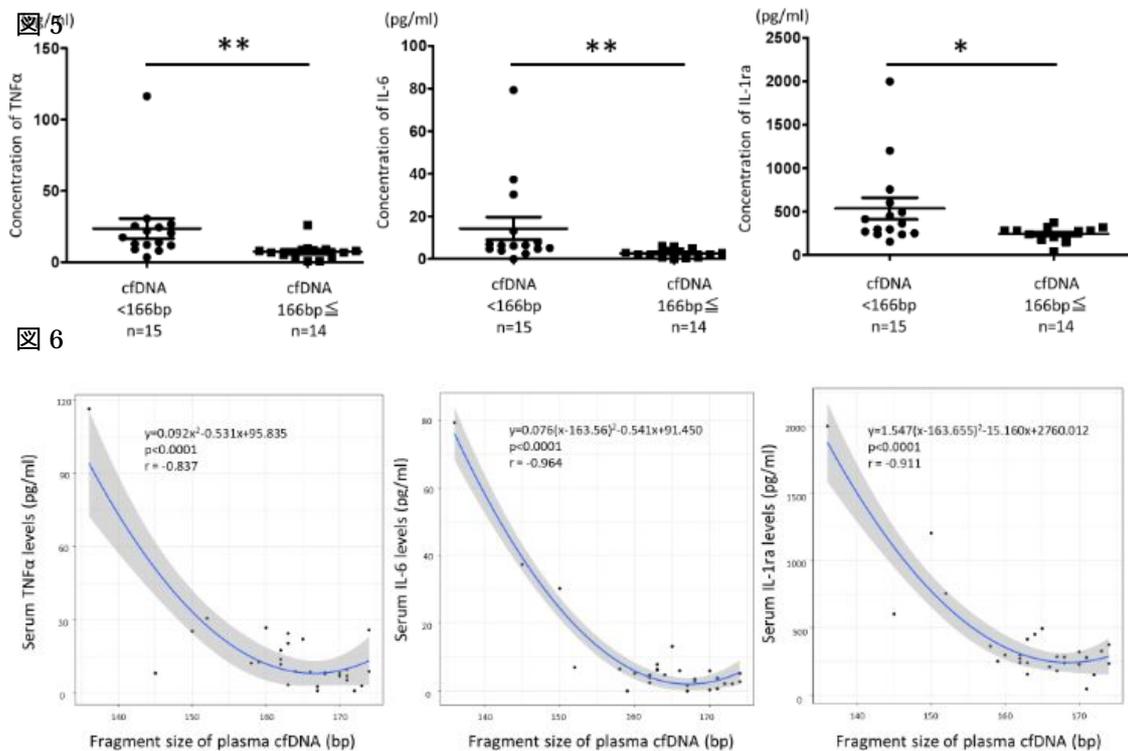


図 6

(2) 血中 cfDNA 断片の短小化メカニズムの解明

我々は、健康人の末梢血単核細胞(PBMC)の培養上清中から cfDNA を抽出および断片長の測定を行う検証系を確立した。培養液中に炎症性サイトカインを添加し、48 時間培養後、培養上清中から cfDNA を抽出し、バイオアナライザで 50-166bp の短い cfDNA の比率を算出した。(図 7) その結果、TNF を添加した培養上清中でのみ、50-166bp の短小化 cfDNA が有意に増加していた。

図 7

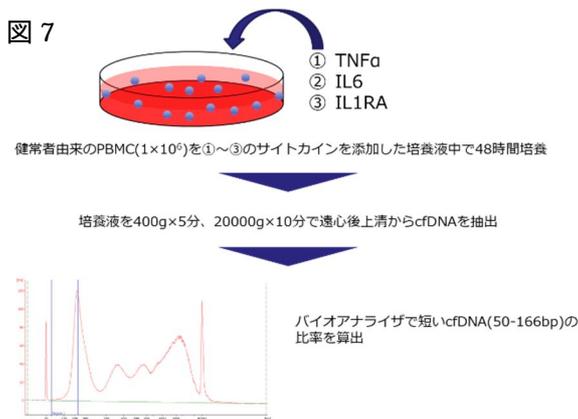
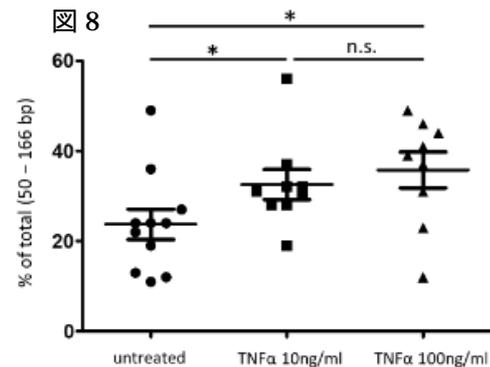


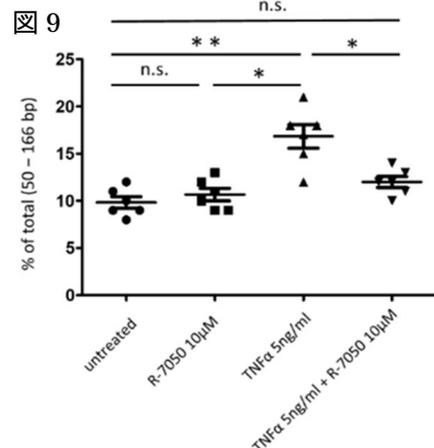
図 8



TNF 以外のサイトカインでは cfDNA の断片長に有意な変化は認めなかった。

また、TNF 阻害剤(R-7050)によって、TNF による短小化 cfDNA の増加が減弱することが明らかとなり(図 9)、短小化 cfDNA の増加は TNF の直接作用であると考えられた。

図 9



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakano Kosuke, Yamamoto Yoshiyuki, Yamamichi Gaku, Yumiba Satoru, Tomiyama Eisuke, Matsushita Makoto, Koh Yoko, Hayashi Yujiro, Wang Cong, Ishizuya Yu, Kato Taigo, Hatano Koji, Kawashima Atsunari, Ujike Takeshi, Fujita Kazutoshi, Nonomura Norio, Uemura Motohide	4. 巻 112
2. 論文標題 Fragmentation of cell free DNA is induced by upper tract urothelial carcinoma-associated systemic inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 168 ~ 177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14679	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kosuke Nakano
2. 発表標題 Clinical application of circulating cell free DNA in upper tract urothelial carcinoma patients plasma.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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