

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号： 1 2 1 0 2

研究種目： 若手研究

研究期間： 2021 ~ 2023

課題番号： 2 1 K 1 6 7 2 6

研究課題名 (和文) 筋層非浸潤性膀胱癌の自然史におけるがんゲノム病理と癌免疫微小環境の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of Cancer Genomic Pathology in the Natural History of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer

研究代表者

河原 貴史 (Kawahara, Takashi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号： 5 0 7 5 8 9 1 9

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) : 筋層非浸潤性膀胱癌はBCG膀胱内注入療法を行っても、再発・進展を繰り返すという問題があり、その機序を解明するには同一患者におけるがんゲノム病理の経時的な変化をとらえた縦断的な解析が重要である。我々は経尿道的膀胱腫瘍切除で得られたホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体から腫瘍サイズや腫瘍切除の時期によらず一定のクオリティーでDNA、RNAが抽出できることを明らかとし、過去の検体を用いて縦断的な網羅的解析が可能であることを見出した。そして得られた検体の網羅的解析を行い、筋層非浸潤性膀胱癌の同一患者におけるがんゲノム病理の経時的な変化を明らかとし報告予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体からDNA、RNAを抽出する技術が向上したが、経尿道的膀胱腫瘍切除で採取された様々なサイズの検体からどの程度DNA、RNAが抽出できるか明らかとなっていなかった。本研究で経尿道的膀胱腫瘍切除で採取された過去の小さな検体であっても網羅的解析が可能であることが明らかとなり、筋層非浸潤性膀胱癌の同一患者におけるがんゲノム病理の変化の解明の一助となると考えられる。また本研究で行った縦断的な網羅的解析により筋層非浸潤性膀胱癌のBCG抵抗性や早期再発/早期進展の分子学的機序を明らかとなることが期待される。

研究成果の概要 (英文) : Non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) often recurs and progresses even after BCG intravesical therapy. To understand the mechanisms behind this, it is crucial to conduct longitudinal analyses that track changes in the cancer genome pathology within the same patient over time. We have demonstrated that DNA and RNA of consistent quality can be extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples obtained through transurethral resection of bladder tumors, regardless of tumor size or timing of resection. This finding allows for comprehensive analyses using historical samples. We plan to report on the longitudinal, comprehensive analyses of these samples, to elucidate the temporal changes in cancer genome pathology in the same patients with NMIBC.

研究分野： 膀胱癌

キーワード： 筋層非浸潤性膀胱癌 BCG

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は、尿路上皮粘膜から発生する悪性腫瘍であり、泌尿器科領域の悪性腫瘍の中でも頻度が高い疾患の一つである。膀胱癌の発生には、喫煙等の発がん物質の暴露が関係しており、遺伝子変異が蓄積することにより発癌・進展が進み、同時に宿主の免疫監視機構からの逃避機構を獲得していく。膀胱癌の70%を占める筋層非浸潤性癌(NMIBC)に対しては経尿道的膀胱腫瘍切除(TURBT)後にBCG膀胱内注入療法という免疫療法が古くから行われ、転移性膀胱癌に対しても免疫チェックポイント阻害剤が標準治療として用いられるようになり、膀胱癌治療における免疫療法は重要な位置づけとなっている。一方、NMIBCに対してBCG療法を行っても30%の症例は再発をきたし、そのようなBCG抵抗性NMIBCは筋層浸潤性癌(MIBC)への進展リスクが高い。

分子生物学的研究から腫瘍にはheterogeneityがある事および遺伝子変異/発現プロファイル/病理像(がんゲノム病理)とがん免疫微小環境が関連する事が分かっているが、NMIBCの再発・進展・治療抵抗性獲得という自然史の過程で腫瘍のがんゲノム病理とがん免疫微小環境との関係性がどのように変化するかは分かっていない。昨今の膀胱癌における解析は横断的なもので、同一患者における経時的な変化を捉えた縦断的な解析は行われていない。今までの横断的研究とは異なり、同一患者における経時的な変化を捉えた縦断的な解析を行うことで、癌細胞がどのように治療抵抗性を獲得し再発、進展をしていくかを明らかとすることが可能と考えられる。

近年、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)検体からDNA、RNAを抽出する技術が向上したことから、多くのがん領域で様々な網羅的解析が可能となった。一方でNMIBC検体は基本的にTURBTで採取された検体であるため、採取される検体サイズが様々であり、FFPEサンプルからどの程度DNA、RNAが抽出できるか明らかとなっていない。

2. 研究の目的

- (1) NMIBCのFFPE検体からDNA、RNA抽出の実現性を明らかにする。
- (2) NMIBCの同一症例におけるがんゲノム病理の経時的変化を明らかにする。
- (3) BCG抵抗性や早期再発/早期進展の分子学的機序を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 解析対象となる検体の抽出

同一症例の経時的ながんゲノム病理の変化を解析するために、筑波大学附属病院でTURBTを施行した症例から、初発、再発のペアサンプルが揃うNMIBC症例を抽出する。

- (2) 対象となった症例の検体からDNAを抽出

対象となった症例のFFPEからDNAを抽出しクオリティーチェックを行う。

- (3) 対象となった症例の検体からRNAを抽出

対象となった症例の FFPE から RNA を抽出しクオリティーチェックを行う。

(4) 対象となった症例の DNA-seq ならびに RNA-seq を行う。

4. 研究成果

(1) 筑波大学附属病院で 2017 年 4 月以降に TURBT を施行した NMIBC 症例のうち、2023 年 9 月までの再発し、再度 TURBT を施行した症例を対象とした。対象となった症例の 77 例 (BCG 非施行 44 例、BCG 施行 33 例) のうち、FFPE から DNA・RNA を抽出が困難と考えられる腫瘍サイズの小さい症例を除外した 44 症例 (BCG 非施行 27 例、BCG 施行 17 例) を対象とした。対象となった症例の患者背景を表 1 に示す。BCG 非施行群の初回 TURBT の T 分類は全例 Ta、Grade 分類は High grade が 10 例 (37%) であり、再発 TURBT の病理結果も同様の傾向であった。BCG 施行群の初回 TURBT の T 分類は T1 が 6 例 (35%)、Grade 分類は High grade が 13 例 (76%) であり、再発 TURBT も病理結果では CIS を随伴する症例が増加する傾向であった。

Variables	BCG (-) n=27	BCG (+) n=17
Gender		
Male	24	15
Female	3	2
Age, median (range), years	69.0(48-86)	74.0(52-87)
T category of primary tumor		
Ta	27	11
T1	0	6
CIS of primary tumor		
Yes	2	3
No	25	14
Grade of primary tumor		
Low grade	17	4
High grade	10	13
T category of recurrent tumor		
Ta	26	13
T1	1	4
CIS of recurrent tumor		
Yes	2	5
No	25	12
Grade of recurrent tumor		
Low grade	16	4
High grade	11	13

表1. 対象症例の患者背景

(2) 対象となった 88 例を FFPE から DNA を抽出し、その結果を図 1 に示す。DNA 収量は初回 TURBT 時の検体の方が再発 TURBT 時の検体と比較して有意に多い結果であった。一方で抽出した DNA の損傷のレベルを示す指標となる DNA Integrity Number (DIN) については初回 TURBT 時の検体、再発 TURBT 時の検体において違いはなかった。DNA-seq で十分な解析結果が得られないと予想される DNA 収量、DIN 値を示した検体は 7 例であった。次いで検体の腫瘍サイズに応じて検体を腫瘍サイズごと Tiny 21 例 (<2mm × 2mm)、Small 35 例 (2mm × 2mm ~ 5mm × 5mm)、Regular 16 例 (5mm × 5mm ~ 8mm × 8mm)、Large 16 例 (≥8mm × 8mm) の 4 段階に分類し検証した (図 2)、DNA 収量については腫瘍サイズが大きくなるにつれて有意に増加する結果であったが、DIN については差異を認めなかった (図 3)、DNA-seq が不適とされた症例は Tiny 4 例 / 21 例、Small 3 例 / 35 例であった。最後に抽出した年代ごとに DIN について検証を行うと、TURBT 施行日から

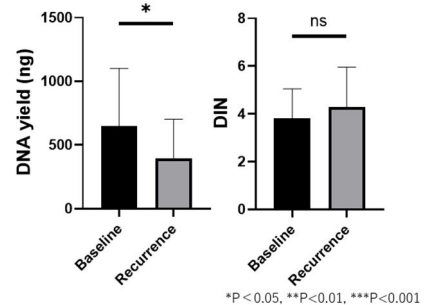


図1. 初発・再発検体のDNA収量とDIN

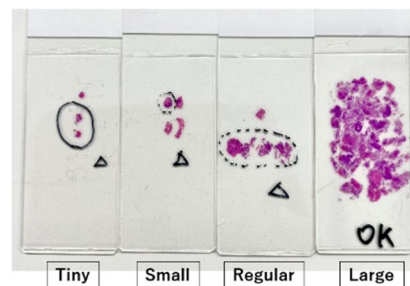


図2. 腫瘍サイズ分類

DNA 抽出までの期間が短い検体ほど有意に DIN が高い結果であった（図 4）。以上の結果から FFPE から抽出する DNA について、DNA の収量は腫瘍サイズに依存し、DNA のクオリティーについては DNA 抽出までの期間に依存することが明らかとなった。

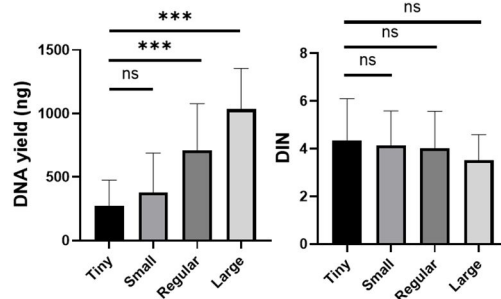


図3. 腫瘍サイズごとのDNA収量とDIN

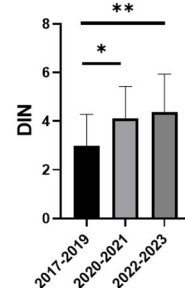


図4. TURBT期間ごとのDIN

(3) 対象となった 88 例の FFPE から RNA を抽出し、

その結果を図 5 に示す。RNA 収量ならびに抽出した RNA の分解の進行度合いを示す RNA Integrity Number (RIN) は初回 TURBT 時の検体、再発 TURBT 時の検体において違いはなかった。RNA-seq で十分な解析結果が得られないと予想される RNA 収量、RIN 値を示した検体は 8 例であった。先に分類した腫瘍サンプルサイズごとに検証すると、RNA 収量についてはサンプルサイズが増加するごとに有意に増加するが、RIN については差異をほとんど認めなかった（図 6）。

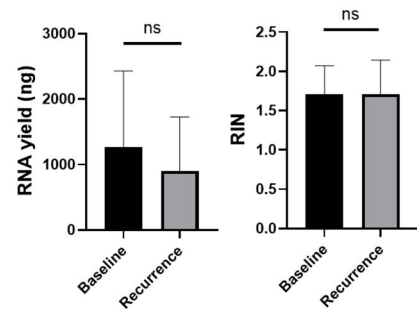


図5. 初発・再発検体のRNA収量とRIN

RNA-seq が不適とされた症例は Tiny 6 例/21 例、Small 2 例/35 例であった。抽出した年代ごとに RIN について検証すると TURBT 施行日から RNA 抽出までの期間において RIN に差異を認めなかった（図 7）。以上の結果から FFPE から抽出する RNA について、RNA 収量は腫瘍サイズに依存するが、RNA のクオリティーについては腫瘍サイズ、RNA 抽出までの期間によらないことが明らかとなった。

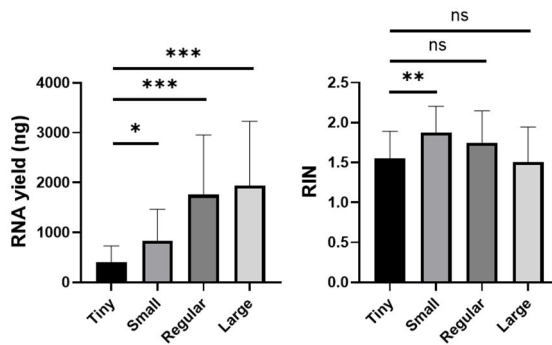


図6. 腫瘍サイズごとのRNA収量とRIN

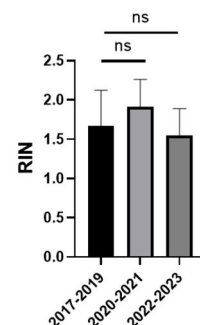


図7. TURBT期間ごとのRIN

(4) 対象症例のうち、DNA、RNA 収量が十分であった、BCG 施行群の 10 症例、BCG 非施行群 10 症例についてそれぞれ DNA-seq、RNA-seq を提出した。最終報告作成時点でシーケンス結果が得られていないが、今後データ解析の上、論文投稿予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kimura Tomokazu, Okita Yukari, Nagumo Yoshiyuki, Chin Jas Min, Fikry Muhammad Ali, Shiga Masanobu, Kandori Shuya, Kawahara Takashi, Suzuki Hiroyuki, Nishiyama Hiroyuki, Kato Mitsuyasu	4. 巻 74
2. 論文標題 Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B impacts the malignant potential of bladder cancer cells through its hem immunoreceptor tyrosine based activation motif	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 262 ~ 273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13419	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 Suzuki Shuhei, Nagumo Yoshiyuki, Ikeda Atsushi, Kojo Kosuke, Nitta Satoshi, Chihara Ichiro, Shiga Masanobu, Kawahara Takashi, Kandori Shuya, Hoshi Akio, Negoro Hiromitsu, Mathis Bryan J., Nishiyama Hiroyuki	4. 巻 46
2. 論文標題 Patient characteristics correlate with diagnostic performance of photodynamic diagnostic assisted transurethral resection of bladder tumors: A retrospective, single-center study	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Photodiagnosis and Photodynamic Therapy	6. 最初と最後の頁 104052 ~ 104052
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pdpdt.2024.104052	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 -

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

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