

尿中メチル化DNAマーカーによる 膀胱がん診断法開発のための前向き研究

札幌医科大学医学部 分子生物学講座

教授 鈴木 拓

(共同研究者)

札幌医科大学医学部 泌尿器科学講座 教授 舩森 直哉

札幌医科大学医学部 泌尿器科学講座 大学院生 進藤 哲哉

はじめに

膀胱がんの70%は初診時において筋層非浸潤性膀胱がん (non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC)、残りの30%は筋層浸潤性膀胱がん (muscle invasive bladder cancer, MIBC) として診断される。NMIBCは主に、内視鏡手術 (経尿道的膀胱切除術, transurethral resection of bladder tumor, TURBT) および抗がん剤/BCG膀胱内注入によって治療され、MIBCと比較して予後良好であるが、高い膀胱内再発率が重大な問題であり、治療後の慎重なフォローアップが必要である。頻回の膀胱鏡検査は患者にとって身体的負担となるため、非侵襲的なバイオマーカーの開発が望まれている。

膀胱がんは遺伝子変異などのgeneticな異常と、DNAメチル化異常などのepigeneticな異常の蓄積によって発生・進展することが知られている。近年、膀胱がん細胞由来のDNAメチル化異常を尿中から検出することで、非侵襲的な膀胱がん診断に応用できることが複数の研究から示されている。例えば、GDF15、TMFEE2、VIMという3種類の遺伝子のDNAメチル化を尿中から検出することで、感度94%、特異度100%という高精度で膀胱がんを検出できることが報告された⁽¹⁾。また別の研究からは、TWIST、NID2という2つの遺伝子のDNAメチル化が、尿中バイオマーカーとして優れた成績を示したとされている⁽²⁾。尿中DNAメチル化は、予後予測マーカーとしても応用が期待されており、CACNA1A、PRDM2、BNIP3の3遺伝子のメチル化が再発および予後予測に優れているという結果や⁽³⁾、SOX1、L1-MET、IRAK3のメチル化が予後と強く相関するという結果が報告されている⁽⁴⁾。

マイクロRNA (以下miRNA) は、タンパクをコードしない短いRNAであり、発生・分化・ホメオスタシスの維持などに重要な役割を担うとともに、その異常が様々な疾患につながるということが明らかにされつつある。我々は膀胱がんにおけるmiRNA異常に着目した研究を行い、4種類のmiRNA遺伝子、miR-137、miR-124-2、miR-124-3、miR-9-3が膀胱がんにおいてDNAメチル化異常によって発現抑制されることを明らかにした⁽⁵⁾。また機能解析の結果、これらのmiRNAが膀胱がんの増殖や浸潤を抑制することを明らかにした⁽⁵⁾。さらに膀胱がん細胞由来のDNAメチル化異常を尿中から検出することで、膀胱がん診断に応用できることを示した⁽⁵⁾。

今回我々は、尿中DNAメチル化の膀胱がん再発診断マーカーとしての有用性を、前向き研究によって明らかにすることを目的とした。

結 果

札幌医科大学泌尿器科学講座および関連施設において、内視鏡切除（TURBT）を受けたNMIBC患者から、治療後の外来通院時における自排尿を採取した。これらの患者は同時に膀胱鏡検査を受けており、膀胱鏡検査結果と尿中DNAメチル化の解析結果を比較検証した。本研究は札幌医科大学および関連施設のIRBの承認を受けており、患者からの同意を得て検体を採取した。2013年から2016年の間に、137名の患者より217検体の尿を採取した。このうち、解析に必要な量のDNAを抽出できなかった10検体を除外した。残る207検体のうち、25名から採取した26検体は、採取された日に行った膀胱鏡検査から再発が検出された。よってこれら26検体は、膀胱がん再発検出能を評価するための陽性検体として用いた。一方、12名から採取した14検体は、検体採取日より後（0～632日、平均342.2日）に再発が診断された。よって、これら14検体は、膀胱がん再発予測能を評価するための陽性検体として用いた。なお、これらの患者は尿中細胞診検査も受けているが、採尿と同日に再発が検出された26検体のうち、細胞診が陽性であったのは、わずか2例であった（感度7.7%、特異度100%）。

我々は次に尿沈渣からゲノムDNAを抽出し、バイサルファイト・パイロシーケンス法によって、4遺伝子（miR-137、miR-124-2、miR-124-3、miR-9-3）のDNAメチル化を定量的に解析した。前回の研究で決定したカットオフ値を用いて、それぞれの遺伝子メチル化の陽性・陰性を判定し、それぞれの尿検体においてメチル化陽性と判定された遺伝子数をMスコアとして算出した（0～4点）。Mスコアの膀胱がん再発検出能を、Receiver operating characteristics（ROC）曲線解析した結果、感度61.5%、特異度74.0%、Area under curve（AUC）が0.71という結果を得た（図1A）。Mスコア高値群（3点以上）の膀胱がん再発可能性は単変量解析においてオッズ比4.560、ロジスティック回帰分析においてオッズ比2.848であった。

また、Mスコアの膀胱がん再発予測能を解析した結果、Mスコア高値群（3点以上）の膀胱がん再発リスクは単変量解析においてハザード比3.861、コックス比例ハザードモデルにおいてハザード比3.353であった。またKaplan-Meier曲線からも、Mスコア高値が膀胱がん再発リスクと相関することが明らかとなった（図1B）。

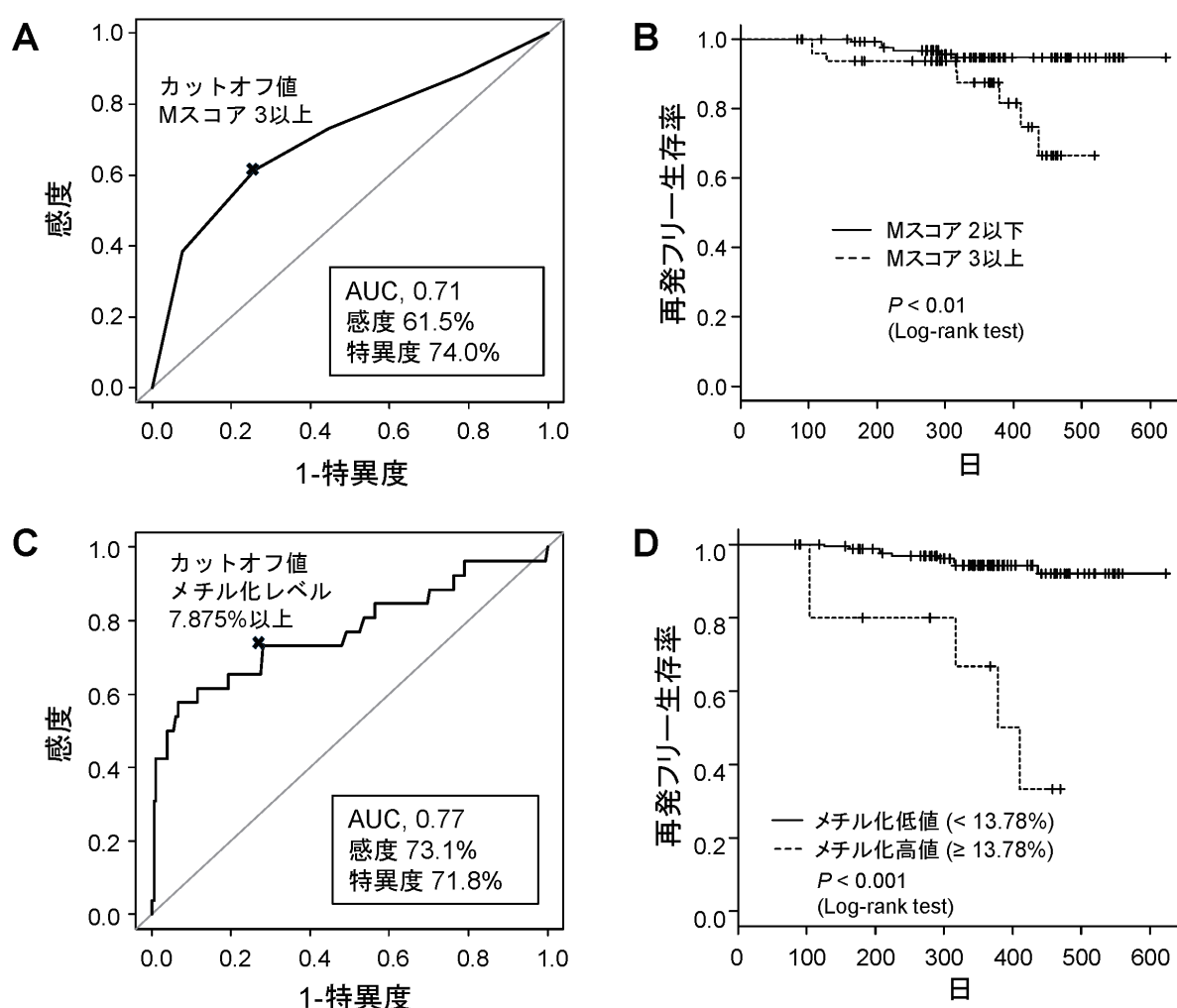
次に我々は、4遺伝子のメチル化定量値の平均値を算出し、膀胱がん再発診断・予測能を解析した。平均メチル化レベルの膀胱がん再発検出能をROC曲線解析した結果、感度73.1%、特異度71.8%、AUCが0.77という結果を得た（図1C）。メチル化高値群の膀胱がん再発可能性は、単変量解析においてオッズ比6.920、ロジスティック回帰分析においてオッズ比4.956であった。

また、メチル化定量値の膀胱がん再発予測能を解析した結果、メチル化高値群の膀胱がん

再発リスクは単変量解析においてハザード比10.290、コックス比例ハザードモデルにおいてハザード比8.030であった。またKaplan-Meier曲線からも、メチル化高値が膀胱がん再発リスクと相関することが明らかとなった(図1D)。

また、132例のNMIBC症例のうち、観察期間中に膀胱がん全摘術を施行するに至ったのは5症例であったが、これらはいずれも尿中DNAメチル化高値を示した。全症例を尿中DNAメチル化高値群・低値群に分け、1年後の膀胱温存率を解析した結果、高値群および低値群の膀胱温存率はそれぞれ73.4%、100%であった。このことから尿中DNAメチル化高値は、NMIBCにおいて膀胱全摘術の必要性を判定する因子の一つになりうる可能性が示された。

図1. 尿中DNAメチル化と膀胱がん再発の相関



考 察

前回の研究において我々は、miRNA遺伝子のDNAメチル化が、尿中膀胱がん診断マーカーとなりうることを提示した。今回我々は、それらの膀胱がん再発予測マーカーとしての有用

性を前向き研究によって検証した。その結果、尿中DNAメチル化は膀胱がんの再発と強く相関し、再発検出および再発リスク予測に有用であることが示された。

近年、尿中DNAが膀胱がん再発マーカーとして有用であることが、他のグループからも報告されている。例えば、6遺伝子（EOMES、HOXA9、POU4F2、TWIST1、VIM、ZNF154）のメチル化を組み合わせることで、感度88～94%、特異度43～67%で再発診断が可能であったとする結果や⁽⁶⁾、3遺伝子（OTX1、ONECUT2、OSR1）のメチル化とFGFR遺伝子変異を組み合わせることで感度79%、特異度77%を達成したという結果が報告されている⁽⁷⁾。

我々の研究結果はさらに、尿中DNAメチル化が膀胱がんの治療選択マーカーとなり得る可能性も示した。NMIBCのうちおよそ3割はMIBCに進行することが知られており、高リスク群のNMIBCを的確に同定して根治手術を行うことが必要である。今回我々は、膀胱がん全摘術が施行された症例において、非常に早い段階（全摘術の平均266日前）から、尿中DNAメチル化レベルがすでに上昇していることを見いだした。

本研究にはいくつかの限界がある。まず、独立した別コホートで結果を検証することが必要である。次に、再発症例数が比較的少ないため、詳細な臨床病理学的所見と尿中DNAメチル化との相関を十分に解析することができなかった。また、今回解析した4遺伝子以外にも多数のマーカー候補が報告されていることから、それらを併せて解析することで、さらに診断精度を向上させうる可能性がある。実用化に向けて、今後さらに研究を進める必要がある。

要 約

今回我々は、尿中DNAメチル化マーカーの膀胱がん再発診断・再発リスク予測への有用性を検証した。経尿道的膀胱腫瘍切除術（TURBT）を受けた筋層非浸潤性膀胱がん（NMIBC）患者132名から、術後の外来フォローアップ期間中に延べ207検体の尿検体を採取した。尿沈渣からDNAを抽出し、4遺伝子（miR-137、miR-124-2、miR-124-3、miR-9-3）のDNAメチル化をバイサルファイト・パイロシークエンス法にて定量的に解析した。207検体中26検体は、採取と同日に行った膀胱鏡検査で膀胱がん再発が検出された。一方14検体は、採取日より以降（0～632日、平均342.2日）に膀胱がん再発が診断された。これらのデータを統合し、尿中DNAメチル化の膀胱がん再発診断能・予測能を解析した。尿中からメチル化が検出された遺伝子数（Mスコア）の膀胱がん再発検出能は、感度61.5%、特異度74.0%、Receiver operating characteristics（ROC）曲線解析においてArea under curve（AUC）が0.71であった。また、Mスコア高値群（3以上）は、有意に膀胱がん再発フリー生存率が低かった（ $P < 0.01$ ）。多変量解析の結果、Mスコア高値は、現在および将来の膀胱がん再発と有意に相関した。これらの結果から、尿中DNAメチル化は膀胱がん再発検出および予測に有用であることが示された。

文 献

1. Costa VL, Henrique R, Danielsen SA, et al. Three epigenetic biomarkers, GDF15, TMEFF2, and VIM, accurately predict bladder cancer from DNA-based analyses of urine samples. *Clin Cancer Res.* 16:5842-5851, 2010.
2. Renard I, Joniau S, van Cleynenbreugel B, et al. Identification and validation of the methylated TWIST1 and NID2 genes through real-time methylation-specific polymerase chain reaction assays for the noninvasive detection of primary bladder cancer in urine samples. *Eur Urol.* 58:96-104, 2010.
3. Garcia-Baquero R, Puerta P, Beltran M, et al. Methylation of a novel panel of tumor suppressor genes in urine moves forward noninvasive diagnosis and prognosis of bladder cancer: a 2-center prospective study. *J Urol.* 190:723-730, 2013.
4. Su SF, de Castro Abreu AL, Chihara Y, et al. A panel of three markers hyper- and hypomethylated in urine sediments accurately predicts bladder cancer recurrence. *Clin Cancer Res.* 20:1978-1989, 2014.
5. Shimizu T, Suzuki H, Nojima M, et al. Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer. *Eur Urol.* 63:1091-1100, 2013.
6. Reinert T, Borre M, Christiansen A, et al. Diagnosis of bladder cancer recurrence based on urinary levels of EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM, and ZNF154 hypermethylation. *PLoS One.* 7:e46297, 2012.
7. Kandimalla R, Masius R, Beukers W, et al. A 3-plex methylation assay combined with the FGFR3 mutation assay sensitively detects recurrent bladder cancer in voided urine. *Clin Cancer Res.* 19:4760-4769, 2013.