



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	乙第1875号
学位記番号	論 第1647号
氏名	金本 一洋
授与年月日	平成 29年 3月 24日
学位論文の題名	<p>Genomic landscape of experimental bladder cancer in rodents and its application to human bladder cancer: gene amplification and potential overexpression of Cyp2a5/CYP2A6 are associated with the invasive phenotype (齧歯動物モデルにおける膀胱がんのゲノム全体像とヒトへの応用 : Cyp2a5/CYP2A6 遺伝子の増幅と潜在的過剰発現は浸潤型と関連する) PLoS One. 11(11):e0167374, 2016</p>
論文審査担当者	主査 : 高橋 智 副査 : 近藤 豊, 安井 孝周

【背景と目的】

膀胱がんは、約 20%の筋層浸潤がん（浸潤性がん）と、約 80%の筋層非浸潤乳頭状がん（非浸潤性がん）に分類される。浸潤性がんは予後不良であり、有用な早期診断法はいまだ確立していない。一方、予後良好な非浸潤性がんも、再発時には 10~30%は浸潤性がんとなるため、確実な浸潤性がんの早期診断が、膀胱がん患者にとっては不可欠である。これまでに、膀胱癌がんでは、DNA コピー数が増減（copy number aberrations: CNAs）するゲノム不安定性は報告されてきた。しかし、浸潤早期に特異的な CNAs はいまだ発見されていない。そこで本研究では、浸潤性がんのゲノム不安定性に着目し、動物モデルにおける、発がん早期から CNAs をきたす遺伝子の同定と、そのヒト相同遺伝子を用いたヒト浸潤性がんの早期診断バイオマーカーへの応用を目的とした。

【方法】

研究①：ニトロソアミンである *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) を飲水投与すると、ラットでは非浸潤性膀胱がんが、マウスでは浸潤性がんが生じる。これらの組織から抽出した DNA を用いて、Comparative Genomic Hybridization (CGH)-アレイによる CNAs のゲノム網羅的な解析を行った。さらに、定量 PCR により CNAs を検証し、ヒトとの相同性について、データベースを用いて検討した。

研究②：ヒト候補遺伝子の CNAs につき、8 種類のヒト膀胱がん細胞株および非浸潤性がん 9 例、浸潤性がん 9 例における経尿道的膀胱腫瘍切除 (TUR) 組織のホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本から、がん病変部を同定し、そこから抽出した DNA を用いて、定量 PCR 解析を行った。

研究③：ヒト候補遺伝子の蛋白発現につき、14 症例のヒト膀胱全摘組織を用いて、免疫組織学的検討を行った。さらに、膀胱がんにおいては、同一個体組織内の不均一性がみられるため、104 症例の TUR による組織型を、悪性度に基づきそれぞれ非浸潤性乳頭状病変 (n=53)、浸潤性がん塊状病変 (n=108)、浸潤性がん散在性病変 (n=132) の 3 つに分類し、免疫染色によるスコアリングから統計学的解析を行った。

【結果】

研究①：CGH-アレイ解析では、BBN 誘発ラット非浸潤性がん組織において、有意な CNAs は認められなかった。一方、マウス浸潤性がん組織においては、異なる 4 つの染色体領域で、コピー数の増幅が認められた。さらに、その 4 か所の領域に含まれる遺伝子の定量 PCR 解析では、染色体 2D-E1 にある *Olf1184* と、7qA3 にある *Cyp2a5* および *Cyp2a22* のコピー数増幅が、浸潤性がん組織から認められた。データベースを用いた検討より、マウス *Cyp2a5* のヒト相同遺伝子である *CYP2A6* を、浸潤性発がん早期の、ゲノム不安定性によるコピー数変化に基づいたバイオマーカー探索のための候補遺伝子として同定した。

研究②：ヒト膀胱がん細胞株を用いた定量 PCR 解析では、*CYP2A6* のコピー数増幅は、1 種類の細胞株のみで認められた。しかし、TUR 組織では、非浸潤性がんの 1 例と浸潤性がんの 5 例で増幅が認められ、コピー数増幅の平均値は、浸潤性がん有意に高かった ($p = 0.0085$)。

研究③：ヒト膀胱全摘組織を用いた免疫組織学的検討では、正常膀胱粘膜の表層上皮細胞で *CYP2A6* の蛋白発現が確認され、浸潤性がん病変での発現増強が認められた。104 症例の TUR

組織を用いた免疫染色によるスコアリングでは、CYP2A6 強発現を示す細胞数の割合は、非浸潤性乳頭状病変で 0.3%、浸潤性がん塊状病変で 9.3%、浸潤性がん散在性病変で 27.3%であり、それぞれ悪性度が上がるほど有意な増加を認めた ($p < 0.01$)。

【結論・考察】

BBN 誘発膀胱がんモデル動物では、浸潤性がんでのみ CNAs が認められることを発見した。さらに、定量 PCR を用いた解析により、*Cyp2a5* は、浸潤性がん早期からコピー数が増幅していることを確認した。CYP2A6 の遺伝子増幅と過剰発現は、ヒト非浸潤性がんではほとんどみられず、浸潤性がんと有意に関連することから、浸潤性への移行を早期に発見するバイオマーカーとなる可能性が示された。臨床的には、CYP2A6 が、浸潤型マーカー候補の一つとして、膀胱がんの治療選別に役立つと考えられる。

論文審査の結果の要旨

【目的】膀胱がんは、約 20%の筋層浸潤がん（浸潤性がん）と、約 80%の筋層非浸潤乳頭状がん（非浸潤性がん）に分類される。浸潤性がんは予後不良であり、有用な早期診断法はいまだ確立していない。一方、予後良好な非浸潤性がんも、再発時には 10~30%は浸潤性がんとなるため、確実な浸潤性がんの早期診断が、膀胱がん患者にとっては不可欠である。これまでに、浸潤性がんでは、DNA コピー数が増減（copy number aberrations: CNAs）するゲノム不安定性は報告されてきた。しかし、浸潤早期に特異的な CNAs はいまだ発見されていない。そこで申請者らは、浸潤性がんのゲノム不安定性に着目し、浸潤性がんの特異的な CNAs を同定することを試みた。

【対象と方法】研究①：ニトロソアミンである *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) を飲水投与すると、ラットでは非浸潤性膀胱がんが、マウスでは浸潤性がんが生じる。これらの組織から抽出した DNA を用いて、Comparative Genomic Hybridization (CGH)-アレイによる CNAs のゲノム網羅的な解析を行った。さらに、CNAs を検証し、ヒトとの相同性をデータベースで検討した。研究②：ヒト候補遺伝子の CNAs につき、8 種類のヒト膀胱がん細胞株および非浸潤性がん 9 例、浸潤性がん 9 例における経尿道的膀胱腫瘍切除（TUR）組織のホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本から、がん病変部を同定し、そこから抽出した DNA を用いて、定量 PCR 解析を行った。研究③：ヒト候補遺伝子の蛋白発現につき、14 症例のヒト膀胱全摘組織を用いて、免疫組織学的検討を行った。さらに、膀胱がんにおいては、同一個体組織内の不均一性がみられるため、104 例の TUR による組織型を、悪性度に基づきそれぞれ非浸潤性乳頭状病変、浸潤性がん塊状病変、浸潤性がん散在性病変に分類し、免疫染色によるスコアリングから統計学的解析を行った。

【結果】研究①：CGH-アレイ解析では、BBN 誘発ラット非浸潤性がん組織において、有意な CNAs は認められなかった。一方、マウス浸潤性がん組織においては、異なる 4 つの染色体領域で、コピー数の増幅を認めた。さらに、その 4 か所の領域に含まれる遺伝子の定量 PCR 解析では、染色体 2D-E1 にある *Olf1184* と、7qA3 にある *Cyp2a5* および *Cyp2a22* のコピー数増幅を認めた。データベースを用いた検討より、マウス *Cyp2a5* のヒト相同遺伝子である *CYP2A6* を、浸潤性発がん早期の、ゲノム不安定性によるコピー数変化に基づいたバイオマーカー探索のための候補遺伝子として同定した。研究②：ヒト膀胱がん細胞株を用いた定量 PCR 解析では、*CYP2A6* のコピー数増幅は、1 種類の細胞株のみで認められた。しかし、TUR 組織では、非浸潤性がんの 1 例と浸潤性がんの 5 例で増幅が認められ、コピー数増幅の平均値は、浸潤性がん有意に高かった ($P=0.0085$)。研究③：ヒト膀胱全摘組織を用いた免疫組織学的検討では、正常膀胱粘膜の表層上皮細胞で *CYP2A6* の蛋白発現が確認され、浸潤性がん病変での発現増強が認められた。104 症例の TUR 組織を用いた免疫染色によるスコアリングでは、*CYP2A6* 強発現を示す細胞数の割合は、非浸潤性乳頭状病変で 0.3%、浸潤性がん塊状病変で 9.3%、浸潤性がん散在性病変で 27.3%であり、それぞれ悪性度が上がるほど有意な増加を認めた ($P<0.01$)。

【結論】膀胱がんでは、非浸潤性がんに比べて浸潤性がんの *CYP2A6* 遺伝子コピー数の増幅と免疫染色での強発現が有意であるため、浸潤性がんへの移行における早期診断につながる可能性があることを見出した。また、臨床的には TUR 組織における腫瘍先進部の免疫染色により、*CYP2A6* の強発現が浸潤型マーカーとして高リスク群の選別に有用であると考えられた。

【審査内容】主査の高橋から、検索対象としたヒト膀胱がん症例における喫煙歴の有無、BBN 以外の発がん物質により作成されるラット浸潤性がんの検討、膀胱がん細胞株における *CYP2A6* 強制発現による形質変化の検討など 14 項目、第一副査の近藤教授からは、膀胱がんの遺伝子発現による分類法、CGH アレイの方法、マウス 7qA3 における遺伝子増幅の再現性など 18 項目、さらに第二副査の安井教授からは浸潤性膀胱癌の治療法、個別化医療、臨床応用など主科目を中心に 6 項目の質問があった。これらの質問に対して申請者から概ね適切な回答が得られ、本論文の内容について十分に理解するとともに、専攻分野（腎・泌尿器科学）に関する知識を習得しているものと判断された。本研究は、動物を用いた膀胱がんモデルから見出した *Cyp2a5* 遺伝子増幅がヒト膀胱がんにおいても相同遺伝子である *CYP2A6* の高発現として認められ、その発現量は悪性度に相関することを明らかにした。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士（医学）の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 高橋 智 副査 近藤 豊, 安井 孝周