

213. 尿路上皮癌における多中心性多発のメカニズムの解明

佐藤 悠佑

東京大学 医学部附属病院 泌尿器科

Key words : 腎盂尿管癌, 膀胱癌, 尿路上皮癌, 多中心性多発

緒 言

腎盂尿管癌および膀胱癌は、病理組織学的にその 90%を尿路上皮癌が占め、多中心性に発生し同時性もしくは異時性に多発するという特徴を有する。なかには、両側の腎盂尿管に癌が発生し、全尿路全摘および術後の透析療法を余儀なくされる症例も存在する。

尿路上皮癌のうち浸潤性膀胱癌については、複数のグループによって全エクソン解析による網羅的なゲノム解析が行われており、高頻度に生じている遺伝子変異が明らかにされている [1~3]。一方、腎盂尿管癌は病理組織学的な類似性から膀胱癌と同様の治療戦略を当てはめているが、発生の起源や分子病態に関する検討はあまりなされていない。そこで著者らのグループでは、約 200 例の腎盂尿管癌を対象に網羅的ゲノム解析を行い、分子病態の解明を行った。その結果、生じている遺伝子異常により 3 群に分類できること (*TP53* 変異/*MDM2* 増幅、*FGFR3* 変異、*RAS* 変異)、各群の間に予後の違いが見られること、腎盂癌、尿管癌、膀胱癌それぞれにおいて、*KMT2D* や *RBI* 遺伝子の変異頻度に差が見られることを明らかにした。

これを踏まえ本研究では、尿路上皮癌の最大の特徴の 1 つである多中心性多発に着目し、その分子メカニズムの解明を試みた。

方 法

1. 検体の採取と保管

本研究は、京都大学大学院医学研究科・医の倫理委員会、ならびに東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の審査ならびに承認を受けて施行された。東京大学医学部附属病院泌尿器科にて診断・治療を行った腎盂尿管癌の 5 症例を対象とした。手術（腎尿管全摘除術）の際に腫瘍部分ならびに病理学的に癌の存在しない非腫瘍部の腎盂尿管粘膜から検体を採取し液体窒素中に保管した。正常検体として、腎皮質組織または末梢血中の白血球細胞を用いた。各患者からは、書面にて検体採取と遺伝子解析の同意を得た。

2. DNA 採取と遺伝子変異解析

採取した検体から、Gentra Puregene Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA は、SureSelect Human All Exon キット (Agilent Technologies) を用いて全エクソン領域を濃縮し、それを大量並列シーケンサー HiSeq2000/2500 (Illumina) を用いてシーケンシングを行った。得られた塩基配列情報は、ヒトゲノムのリファレンス配列 (hg19) にマッピングし、EBCall アルゴリズム [4] を用いて遺伝子変異を検出した。解析には東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピュータを使用した。

結果

1. 腫瘍部の遺伝子変異

解析した 5 症例のうちの 1 症例の結果を以下に示す。この症例では腎盂に 2.2×1.3 cm 大の乳頭状腫瘍を認めた (図 1)。病理組織学的な検査の結果、high grade な尿路上皮癌 (urothelial carcinoma, G2>G3, pT1) の診断であった。解析の結果、腫瘍 (T1 および T2 の 2 ケ所から採取) からは *TP53* 遺伝子、*KMT2D* 遺伝子、*ATRX* 遺伝子など、ドライバー変異と考えられる遺伝子変異のほか、パッセンジャー変異も含め 126 個 (T1) および 110 個 (T2) の体細胞性変異を検出した (図 2、3)。T1 と T2 はその大部分の変異を共有しており、同一のクローンに由来することが強く示唆された。

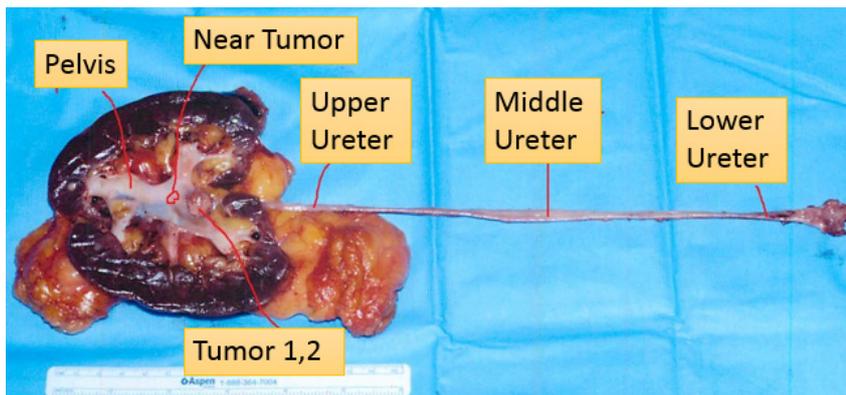


図 1. 症例の手術標本

腫瘍 (Tumor1、2) および非腫瘍粘膜 (その他の 5 ケ所) より検体を採取した。

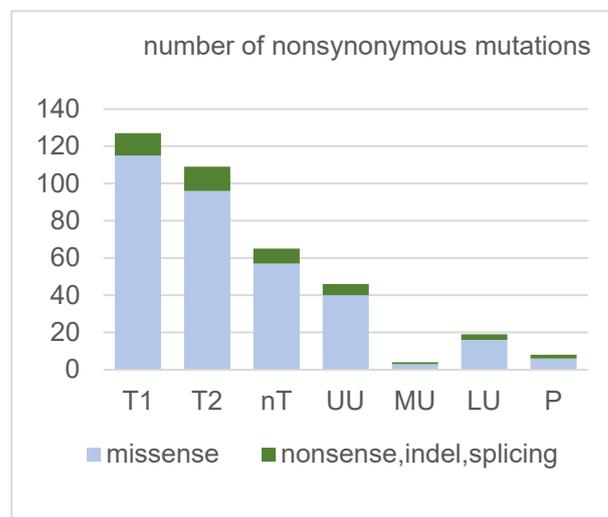


図 2. 症例における各部位の変異数

症例の各検体にて、全エクソンシーケンシングで検出された体細胞性変異の数を示す。

2. 非腫瘍部の遺伝子変異

非腫瘍部粘膜のうち腫瘍近傍および上部尿管粘膜より抽出した DNA を解析したところ、それぞれ 63 個、44 個の体細胞性変異を検出し (図 2)、*TP53*/*KMT2D* 遺伝子変異をはじめとして、その大部分は腫瘍部で見られた変異と同一のものであった (図 3)。このことは、非腫瘍部の粘膜に、病理組織学的に検出が困難な腫瘍細胞の播種が既に生じていることを示唆しており、尿路上皮癌が多発・再発しやすいことの分子メカニズムの一端を表すものと考えられた。

一方、中部尿管ならびに下部尿管の粘膜から抽出した DNA の解析では、それぞれ 4 個、19 個の体細胞性変異を検出した (図 2)。興味深いことに、それぞれの検体に *KMT2D* 遺伝子の変異を検出したが (図 3)、いずれも腫瘍検体から検出されたものとは異なる変異であった (腫瘍: Q4085fs, 中部尿管: Q2800X, 下部尿管: L3566P, Q3826X)。したがって、中部尿管や下部尿管の粘膜では、腫瘍部分とは独立して *KMT2D* 遺伝子の変異が生じたと考えられた。これにより、癌の多中心性多発の要因の 1 つである field cancerization が尿路上皮においても生じていることが示唆された。

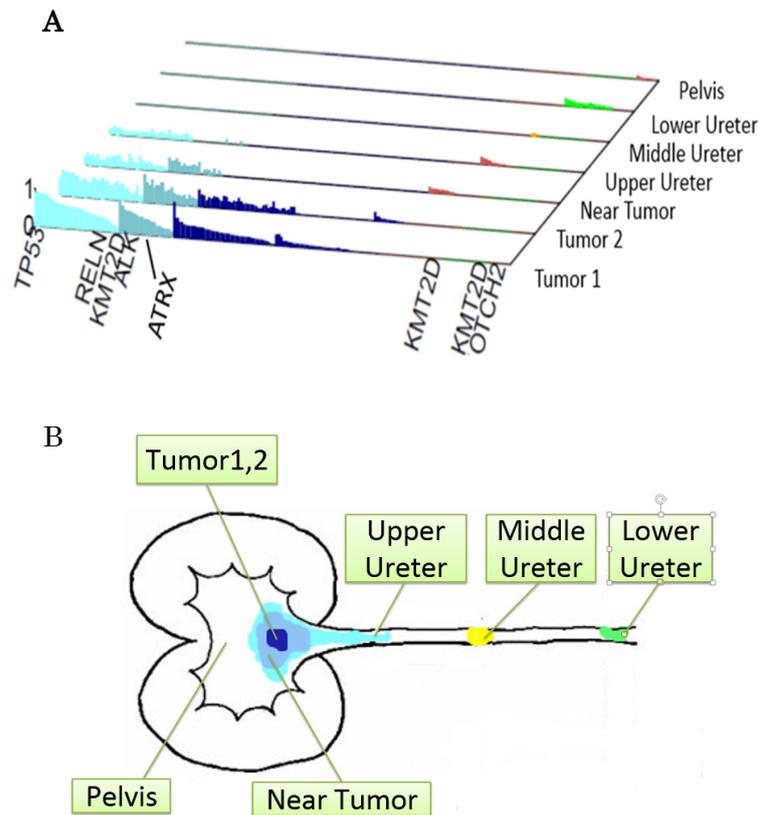


図 3. 各部位で検出された遺伝子変異

- A) x 軸は各変異遺伝子 (ドライバー変異と思われるものは遺伝子名を記載)、y 軸は検体採取部位、z 軸は variant allele frequency (変異のポジションにおいて総リードに占める変異リードの割合)。
- B) 変異を検出した範囲を模式図で示した。

考 察

尿路上皮癌が多中心性に多発するメカニズムとしては、主に 2 つの仮説が提唱されている。1 つは、primary な病変から腫瘍細胞が播種することにより再発・多発するといものである (drop metastasis)。この場合は、共通のクローンより発生した腫瘍細胞が、複数の領域で観察されることになる。もう 1 つは、尿中の発癌物質に尿路上皮が曝露されることにより、複数の領域にまたがって広く発癌するというものである (field cancerization)。これは口腔癌や食道癌などで知られている概念であり、共通の誘因によって広範囲に遺伝子異常が蓄積し、遺伝学的に様々な背景を持ったポリクローナルな腫瘍細胞が出現することになる。

これまでに尿路上皮癌では、多発する腫瘍に対してそれぞれから検体を採取し、X 染色体の不活化領域や *TP53* 遺伝子の変異、ゲノムコピー数異常が共通しているか否かの検討がなされており、その結果、drop metastasis が多発の原因であるという報告が多い。しかしながら、これらの報告ではゲノム上の特定の領域や遺伝子のみ解析に

とどまっているため、多発の分子メカニズムの詳細については未だ不明な点が多かった。また、これらの報告からは、必ずしも **field cancerization** の存在が否定するものではなかった。本研究ではこの点を詳細に検討するために、非腫瘍部の尿路上皮も含めた網羅的な遺伝子変異解析を行った。その結果、非常に興味深いことに、**drop metastasis** と **field cancerization** の双方を示唆する所見がえられた。現時点でそのような所見が見られたのは 5 例中 1 例のみであるが、今後は両側尿管癌の症例を含め詳細な解析を継続する予定である。

共同研究者・謝辞

本研究は京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座の小川誠司教授、藤井陽一氏との共同研究で行われました。シーケンスデータの解析は東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターの宮野悟教授、白石友一氏にご協力いただきました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Cancer Genome Atlas Research, N. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014 Mar 20;507(7492):315-22. doi: 10.1038/nature12965. Epub 2014 Jan 29.
- 2) Gui Y, Guo G, Huang Y, Hu X, Tang A, Gao S, Wu R, Chen C, Li X, Zhou L, He M, Li Z, Sun X, Jia W, Chen J, Yang S, Zhou F, Zhao X, Wan S, Ye R, Liang C, Liu Z, Huang P, Liu C, Jiang H, Wang Y, Zheng H, Sun L, Liu X, Jiang Z, Feng D, Chen J, Wu S, Zou J, Zhang Z, Yang R, Zhao J, Xu C, Yin W, Guan Z, Ye J, Zhang H, Li J, Kristiansen K, Nickerson ML, Theodorescu D, Li Y, Zhang X, Li S, Wang J, Yang H, Wang J, Cai Z.. Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nat Genet*. 2011 Aug 7;43(9):875-8. doi: 10.1038/ng.907.
- 3) Guo G, Sun X, Chen C, Wu S, Huang P, Li Z, Dean M, Huang Y, Jia W, Zhou Q, Tang A, Yang Z, Li X, Song P, Zhao X, Ye R, Zhang S, Lin Z, Qi M, Wan S, Xie L, Fan F, Nickerson ML, Zou X, Hu X, Xing L, Lv Z, Mei H, Gao S, Liang C, Gao Z, Lu J, Yu Y, Liu C, Li L, Fang X, Jiang Z, Yang J, Li C, Zhao X, Chen J, Zhang F, Lai Y, Lin Z, Zhou F, Chen H, Chan HC, Tsang S, Theodorescu D, Li Y, Zhang X, Wang J, Yang H, Gui Y, Wang J, Cai Z. Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. *Nat Genet*. 2013 Dec;45(12):1459-63. doi: 10.1038/ng.2798. Epub 2013 Oct 13
- 4) Shiraiishi Y, Sato Y, Chiba K, Okuno Y, Nagata Y, Yoshida K, Shiba N, Hayashi Y, Kume H, Homma Y, Sanada M, Ogawa S, Miyano S. An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2013 Apr;41(7):e89. doi: 10.1093/nar/gkt126. Epub 2013 Mar 6.