

論文要旨

MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology

尿路上皮癌の有用な腫瘍マーカーとしての尿中 miR-96 と miR-183 の検出：ステージ、グレードとの相関および尿細胞診との比較

山田 保俊

【序論および目的】

尿路上皮癌（膀胱癌および腎盂・尿管癌）の信頼される腫瘍マーカーは尿細胞診であるが感度が低いため（約 30%）、新しい分子マーカーの開発が望まれている。我々は以前、臨床尿路上皮癌組織において有意に発現が変動している microRNA のプロファイルを構築した。そのリストの上位にある microRNA (miR-96, miR-183, miR-190) の腫瘍マーカーとしての有用性を臨床組織検体および尿検体で検討した。

【材料および方法】

組織検体は尿路上皮癌 (UC) 104 検体、正常膀胱粘膜 (NBE) 34 検体を用いた。尿検体は UC 患者の尿 100 検体、健常人 (HC) 尿 49 検体、尿路感染症 (UTI) 患者尿 25 検体を用いた。これらの検体から total RNA を抽出し、各 microRNA の発現を stem-loop RT-PCR 法により定量的に測定した。ROC 曲線解析により、これら microRNA の腫瘍マーカーとしての有用性を検討するとともに、臨床病理学的パラメーターとの関連を統計学的に解析した。またマイクロアレイ解析により miR-96, miR-183 の発現導入膀胱癌細胞株における遺伝子発現プロファイリングを行った。

【結 果】

臨床組織検体において miR-96、miR-183 の発現は NBE に比べて UC において有意に高かったが ($P < 0.001$)、miR-190 の発現に有意差はなかった。尿検体においては、UC の miR-96、miR-183 の発現は、HC に比べて有意に高く ($P=0.0059$ 、 $P=0.0044$)、UTI に比べると高い傾向にあった ($P=0.0344$ 、 $P=0.0320$) (Bonferroni 解析)。ROC 曲線分析では miR-96、miR-183 の発現は UC と non-UC (HC+UTI) を優れた感度 (71.0%、74.0%)・特異度 (89.2%、77.3%) にて区別することが可能であった。尿細胞診が施行されていた UC 患者 78 名においては 34 例 (43.6%) で尿細胞診陽性であったが、miR-96 は 54 例 (69.2%) で陽性と判定された。さらに尿細胞診と miR-96 を組み合わせた診断では 61 例 (78.2%) で癌の診断が可能であった。さらに miR-96、miR-183 の発現は、組織学的異型度の進展 (G1, G2, G3)、深達度 (pTa, pT1) と有意に相関した。また根治的手術後の miR-96、miR-183 発現レベルは、手術前に比べて有意に低下していた。miR-96 と miR-193 の遺伝子導入膀胱癌細胞株において、アポトーシスを活性化する 9 個の遺伝子の発現が抑制されていることが判明した。

【結論及び考察】

尿路上皮癌においては miR-96 と miR-183 は有望な腫瘍マーカーとなりうる可能性が示唆された。特に miR-96 は尿細胞診検査と組み合わせることで高感度・高特異度を達成して有用な診断マーカーとなりうると思われた。

論文審査の要旨

報告番号	医論第 1477 号	氏名	山田 保俊
審査委員	主査	古川 龍彦	
	副査	有馬 直道	夏越 祥次

MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology

(尿路上皮癌の有用な腫瘍マーカーとしての尿中 miR-96 と miR-183 の検出：ステージ、グレードとの相関および尿細胞診との比較)

尿路上皮癌（膀胱癌および腎盂・尿管癌）の診断は現在、膀胱鏡検査、腎盂尿管鏡検査により行われるが患者への侵襲は大きい、また尿細胞診検査も汎用されているが感度が低いため、新しい分子マーカーの開発が望まれている。microRNAはタンパクをコードしない22塩基対ほどの小さなRNAであり、ヒトの癌において異常な発現パターンを示す事がわかっている。このことはmicroRNAが癌遺伝子の機能や癌抑制的機能を持つ可能性を示唆している。近年、乳癌や消化器癌においてmicroRNAが血液から検出されるという報告があった。我々は「組織検体で発現が上昇しているmicroRNAは、尿中でも検出され、腫瘍マーカーとして有用である」という仮説を立てた。臨床尿路上皮癌組織におけるmicroRNA発現プロファイルの中で有意に発現が上昇していた上位3つのmicroRNA (miR-96, miR-183, miR-190) について、腫瘍マーカーとしての有用性を臨床組織検体および尿検体で検討した。組織検体は尿路上皮癌104検体、正常膀胱粘膜34検体を用いた。尿検体は尿路上皮癌患者100検体、健常人49検体、尿路感染症患者25検体を用いた。これらの検体から各microRNAの発現をstem-loop RT-PCR法により定量的に測定した。候補microRNAの標的遺伝子については、トランスフェクタントを用いてオリゴマイクロアレイで解析した。

本研究により以下の知見が得られた。

- 1) 組織における miR-96、miR-183 の発現は正常膀胱粘膜に比べて尿路上皮癌において有意に高かった。
- 2) 尿路上皮癌患者の尿中 miR-96、miR-183 の発現は、健常人のそれに比べて有意に高かった。
- 3) ROC 曲線分析では、miR-96 の検出は感度 71.0%、特異度 89.2%をもって尿路上皮癌と非尿路上皮癌を区別することが可能であった。
- 4) 尿中 miR-96 検出と尿細胞診とを組み合わせることにより、感度 78.2%を達成できた。
- 5) 尿中 miR-96、miR-183 の発現は、組織学的異型度 (G1, G2, G3)、深達度 (pTa, pT1) と有意に相関した。
- 6) 根治的手術後の miR-96、miR-183 発現レベルは、手術前に比べて有意に低下した。
- 7) miR-96 と miR-183 遺伝子導入膀胱癌細胞株において、アポトーシスを活性化する 9 個の遺伝子の発現が抑制されていることが判明した。

本研究では尿中miR-96検出が有用な腫瘍マーカーになりうることを証明した。細胞診結果で陰性の症例でも検出可能な点や、臨床尿路上皮癌の異型度や深達度と相関する点で興味深く今後の研究の進展が期待される。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1477 号	氏名	山田 保俊
審査委員	主査	古川 龍彦	
	副査	有馬 直道	夏越 祥次

主査および副査の3名は、平成 23年 7月 29日、学位請求者 山田 保俊君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) miR-96, miR-183 の origin となる遺伝子は解っているのか。

(回答) 共に 7 番染色体の q32 に存在し、両者はわずか 212bp の近い距離にコードされている。このことから、これらの microRNA の発現は同期していることが考えられる。

質問 2) 他の microRNA にも miR-96, miR-183 のように同じ染色体上の近い領域に由来するものであるのか。

(回答) 13 番染色体 q31.3 にコードされる miR-17-92 cluster には 7 つの microRNA があり肺癌や脳腫瘍で癌遺伝子的作用を有することが知られている。また 1 番染色体 p36.3 と 12 番染色体 p13.3 にコードされる miR-200 cluster には 6 つの microRNA があり癌抑制的作用を有することが卵巣癌において報告されている。

質問 3) 今回の実験では、対象となる尿路上皮癌患者、健常者、尿路感染症患者の年齢、性別に差があるが影響はないか。

(回答) Supplement Fig1 に提示しているが、年齢に関しては当初の解析ではコントロール群が若かったので、さらに高齢健常者(n=34)を対象に追加検討したが、miR-96, miR-183 の発現への影響はみられなかった。また性別による影響もみられなかった。

質問 4) 尿から抽出される microRNA の由来は、尿中にフリーの形で存在しているのか、または尿中に細胞が剥離したものを沈渣で回収し検出しているのか。

(回答) 可能性としては、両方考えられる。今回の測定法は、尿沈渣を含む 1ml の尿から測定しているので、剥離癌細胞からの microRNA を検出している可能性が高いと考えられる。但し、癌細胞が壊れて尿中に溶出した microRNA を検出している可能性もある。現在、尿を遠心した上清からの microRNA の抽出の実験が進行中であり、上清からの microRNA の検出も可能であることが判明している。

質問 5) もし尿中に剥離した細胞数に由来するのであれば、Fig. 3 における各 microRNA の発現量が、尿路上皮癌、尿路感染症、健常者の順に高いのは含まれる細胞成分の数による違いと考えられないか。

(回答) miR-96, miR-183 は組織から得たプロファイルにより癌細胞で発現している microRNA なので、正常組織の沈渣成分からはほとんど検出できないと考えられる。即ち癌細胞の沈渣量に microRNA の発現量は比例すると思われるが、尿路感染症患者の尿に含まれる白血球数や赤血球数には比例しないと思われる。

質問 6) 手術前後で microRNA の発現量を比較しているが、手術前後で変化がない、または手術後に発現が増加している症例がみられるがどのように説明できるか。

(回答) 術後何日目に尿を採取したかという点でばらつきがある。特に miR-183 は炎症でも発現が上昇すると思われる。術後早期に取られた尿は炎症の影響が残っており、microRNA の発現が高値に検出される可能性がある。他方では、手術後にも腫瘍が残存して miR-96, miR-183 が検出されている可能性もあり、このような症例は再発の可能性があるので注意深い観察が必要であると思われる。

質問7)腎盂尿管癌と膀胱癌は全く一緒と考えてよいか。また発現上昇する microRNA も一緒と考えてよいか。

(回答)病理組織学的にも尿路上皮を発生母地とし、臨床的にも全く同じ性質でありほぼ同一と考えられる。

質問8)消化器癌では血中 microRNA の測定を行っている報告があるが、尿路上皮癌において血中の測定は行っていないのか。

(回答)血中でも検出は可能ではあるが、検出感度は低く尿中の約10分の1しか検出できなかった。マーカーとしての有用性は低いと考えられたため、実験を継続しなかった。

(質問9)血液中のデータと尿中のデータの相関がないとすると、やはり尿中に剥がれおちた癌細胞を沈渣で回収して測定していることになるのか。

(回答)microRNA は、尿中に溶けているものと尿中に剥がれている癌細胞、どちらにも由来する可能性はありと思われる。組織から得ているプロファイルなので、進行癌や転移を有する症例では、流血中の癌細胞由来の microRNA を検出できる可能性はある。今回は解析対象が根治的手術症例で早期癌が多く、血中での検出は困難であったと思われる。

(質問10)早期発見のスクリーニングとして将来どれくらい役に立つのか。

(回答)尿細胞診で検出不可能でも miR-96 は検出可能であった症例があったことは、血尿を主訴とする患者のスクリーニングとして有用である可能性があり、今後プロスペクティブスタディを検討している。

(質問11) False negative (偽陰性) の症例についての特徴があるか。

(回答)詳細には検討していないが、False negative の患者背景には一定の傾向はない。癌にはいろいろな phenotype があり、すべての尿路上皮癌が miR-96 を発現していない可能性がある。

(質問12)術後に miR-96 と miR-183 を組み合わせると、診断マーカーとしての精度は上がるか。

(回答)miR-183 は特異度が低いので、組み合わせても腫瘍マーカーとしての精度はあがらない。癌診断マーカーとしては miR-96 が優れており、ステージングや予後を予測するマーカーとして両者とも有用と考える。

(質問13)miR-96 と KRAS 遺伝子との関与はあるか。

(回答)膵癌においては miR-96 発現低下しており、KRAS の抑制により癌抑制的に働く可能性があるとする報告がある。臓器特異的な作用の違いがある可能性がある。

(質問14)miR-96 と miR-183 の発現に相関はみられるか。

(回答)正相関がみられている。これは同じクラスターに属するため、発現が同期していると考えられる。

(質問15)尿サンプルにおいて microRNA が確実に検出されていることをどのように確かめているのか。

(回答)内因性 microRNA とされる miR-16 が検出されているかを目安としている。この検出が不十分な症例は尿検体を取り直しているが、9割以上の検体では特に問題はなかった。

(質問16)重複する質問であるが、miR-96 における偽陰性の7例についてはステージ、グレードといった背景はどのようであったか。この7例については、miR-96 が上昇しない癌である可能性はないか。この7例において上昇するマーカーを検討するとよいと思われるが。

(回答)患者背景には一定の傾向はなかった。これらの症例で miR-96 が上昇しないサブグループの可能性はある。他に有効なマーカーとなりうる microRNA の候補についても現在検討中である。

(質問17)臨床応用すれば検査のコストはどれくらいかかるか。

(回答)原価で約1000円である。また検査にかかる時間は約3時間であり、臨床応用は可能と考えられる。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した