

## 膀胱がん患者尿中に含まれるがん細胞由来 DNA 検出による

### 早期再発診断

令和6年1月31日

岩手医科大学

岩手県立中央病院

札幌医科大学

Genius 社

岩手医科大学医歯薬総合研究所医療開発研究部門の阿部正和大学院生と西塚哲特任教授、岩手医科大学泌尿器科学講座の小原航教授、岩手県立中央病院の小野貞英病理診断科科長と藤澤宏光泌尿器科科長、札幌医科大学医学部附属がん研究所ゲノム医科学部門の時野隆至教授と井戸川雅史准教授、および Genius 社（韓国）の Woong-Yang Park 博士らの研究グループは、膀胱がん患者尿中に存在するがん細胞由来の DNA を高感度核酸定量技術であるデジタル PCR(dPCR)を用いた独自の技術（特許出願中）モニタリングすることで、膀胱がんの早期の再発予測や治療効果の評価が可能であることを明らかにしました。

#### 【研究成果のポイント】

- 膀胱がん再発診断に有用なバイオマーカー（診断の指標）を開発するため、本研究では膀胱がん患者尿中のがん細胞由来 DNA を追跡し、膀胱がんの再発診断バイオマーカーとなりうるか検証しました。
- 本研究は、膀胱がん患者尿中がん細胞由来 DNA 検査が術後再発を高感度に検出可能であることを示した世界初めての研究です。
- 採尿で膀胱がん再発を予測することで、現在行われている膀胱鏡など負担の大きい検査を減らすことができる可能性があります。

#### 【背景】

従来の膀胱がんの再発診断に用いられる膀胱鏡検査は患者の負担が大きく、尿細胞診検査は感度が低い事が指摘されています。また、膀胱がんの再発診断や治療効果判定に有用な血液や尿中バイオマーカーに乏しく、患者負担が少なくかつ高感度なバイオマーカーの開発が求められています。近年、膀胱がん患者の尿中に含まれる DNA を調べるとがん細胞由来の遺伝子変異が検出されることが知られ、診断バイオマーカーとして期待されていました。一方、膀胱がん患者尿中 DNA の遺伝子変異を治療経過に合わせて繰り返しモニタリングし、“再発診断バイオマーカー”としての妥当性を検証した報告はまだありませんでした。

本研究は、膀胱がん患者治療前後の尿沈渣（尿中の細胞などを遠心分離して集めたもの、以下尿中）から抽出した DNA 中の遺伝子変異を、高感度核酸定量技術であるデジタル PCR（dPCR）を用いてモニタリングし、その早期再発診断バイオマーカーとしての妥当性を検討しました。尿中には正常細胞も大量に含まれるため、膀胱がん細胞由来の遺伝子変異の割合は極めて少なくなっています。岩手医科大学では、このような尿中での低頻度遺伝子変異を測定する技術を開発してきたことで（特許出願中）、今回の研究の立案に至りました。膀胱がん患者では尿中と同様に血液中でもがん細胞由来 DNA が検出されることがあります。今回、尿中の遺伝子変異とともに血中でも膀胱がん細胞由来 DNA を測定しました。

### 【方法】

本研究は膀胱がんに対して、過去に手術を行なった症例 15 例と、新規に治療を行った 17 例の計 32 例を対象としました。転移のない膀胱がんに対して初期治療として行われる経尿道的膀胱腫瘍切除術（TURBT）で得られたがん組織から DNA を抽出しました。このがん組織 DNA に対して、パネルシーケンス解析と *TERT* プロモーター領域に対する変異解析を行い、症例毎に検出された遺伝子変異を尿中および血中のバイオマーカーとして用いました。各種治療前後やその後の定期診察に合わせて採血・採尿を行い、尿中および血中 DNA に含まれる遺伝子変異の変異アレル頻度（VAF）を dPCR 解析で登録後 2 年間モニタリングしました（図 1 参照）。dPCR 解析のためのプライマープローブセットは主に岩手医科大学医歯薬総合研究所医療開発研究部門で開発したライブラリーから選択しました。最終的に、既存の検査法（膀胱鏡、尿細胞診、CT）と比較して尿中および血中 VAF のモニタリングが、“再発を早期に検出できるか”、“治療効果を評価できるか”について検証しました。

### 【結果】

がん組織 DNA の遺伝子変異解析により 32 例中 30 例（93.8%）でモニタリング可能な遺伝子変異を検出しました。1 例あたりのモニタリングした変異数は平均 2.3 個（1-4）で、約 90%の症例は岩手医科大学医歯薬総合研究所医療開発研究部門で開発したプローブライブラリーを用いて解析可能でした。

観察期間中に再発を生じた 7 例のうち 5 例では、既存の検査における再発診断よりも 7 ヶ月以上先行して尿中 DNA で変異を VAF1%以上で検出しました。残りの再発した 7 例中 2 例では尿中遺伝子変異の VAF は 1%より低く微量で推移しましたが、これらの症例の尿は炎症により混濁しており、尿に含まれる白血球由来の正常 DNA によりがん細胞由来の DNA が希釈されていたことが原因と考えられました。また、再発を生じなかった残りの 23 例はいずれも尿中 DNA の VAF は 1%以下とごく低値で推移しました。

観察期間中に TURBT を施行した 19 例のうち、術後再発を生じた 4 例中 2 例は治療後の尿中 DNA の VAF は 1%以上で持続的に検出・上昇傾向を示したのに対し（図 2A）、残りの 2 例は VAF が 1%以下でしたが、この 2 例は炎症で尿が混濁していた症例でした。このこ

とから尿が混濁している場合は尿中 DNA の遺伝子変異検出には注意が必要と思われました。一方、TURBT 術後無再発で経過した 15 例の VAF は全例 1%以下で推移していました。(図 2B)

また、観察期間中に BCG 療法を施行した 13 例のうち、BCG 療法後に再発した 3 例はいずれも尿中 VAF は 1%以上で持続的に検出・上昇したのに対し(図 2C)、BCG 後無再発で経過した 10 例はいずれも尿中 VAF は 1%以下で推移しました。(図 2D)。

本研究で対象とした膀胱がん患者において、“再発を早期に検出できるか”、“治療効果を評価できるか”についての評価において、尿中 DNA は有用なバイオマーカーとして期待されることがわかりました。一方、今後さらなる検証が必要ですが、血中 DNA はより進行した患者を対象としたバイオマーカーとして優れていることが想定されました。

### 【結論】

尿中 DNA の遺伝子変異モニタリングにより、既存の検査（膀胱鏡や尿細胞診）よりも早期に再発を検出かつ治療効果を評価可能であることが示されました。このことから、尿中 DNA は膀胱がんのバイオマーカーとして妥当であることが示唆されました。

### 【今後の展望】

- 尿中 DNA モニタリング検査は、再発がないことを確認できるので、負担の大きい検査である膀胱鏡検査の回数を減少させることができる可能性があります。
- 治療効果を評価することで再発を予測できる可能性があり、初回治療後の追加治療の適応判断に役立つ可能性があります。
- がんに対する血液を用いた DNA モニタリングは現在岩手医科大学で「OTS-アッセイ」として自由診療を開始しておりますが、今後は尿中 DNA を用いて同アッセイを行えるよう研究開発を継続します。

### 【研究資金】

本研究は文部科学省科学研究費助成事業、圭陵会研究助成、いわて戦略的研究開発推進事業ほかの支援を受けて行われました。

### 【用語解説】

1. デジタルPCR(dPCR)：デジタルPCRはサンプル中に含まれる個々の分子の数をカウントして定量を行う技術で、従来のPCR法に比べ正常サンプル中に0.01%程度などのわずかに含まれる希少な分子を同定・定量することが可能な手法。
2. バイオマーカー：血液や尿などの体液や組織に含まれる、たんぱく質や遺伝子などの生体内の物質で、病態の指標となるもの。
3. 膀胱鏡検査：膀胱癌の診断や術後の定期検査として行われる検査。尿道から 7mm 程度

の細かいカメラを挿入し、水を入れて膀胱を膨らませながら膀胱内の腫瘍の有無を観察する検査。

4. 尿細胞診検査：尿の中に含まれる細胞を抽出・顕微鏡で観察し、がん細胞が含まれないか調べる検査。
5. 経尿道的膀胱腫瘍切除術（TURBT）：転移のない局所の膀胱がんに対して行われる標準的な手術方法。膀胱内に 7mm 径のカメラを挿入し、膀胱内にある腫瘍組織を電気メスで切除、除去する治療。
6. パネルシーケンス：DNA の塩基配列の中で、特定の遺伝子領域をシーケンスする方法。がんパネルを用いると、がんに関連する遺伝子変異を見つけられる可能性がある。
7. *TERT* プロモーター：テロメアという遺伝子末端領域の伸長に関わる遺伝子配列。膀胱がんでは約 70% の症例で *TERT* プロモーター領域に遺伝子変異を生じることが知られている。
8. 変異アリル頻度（VAF）：同じ位置にある遺伝子に複数の種類がある場合、その個々の遺伝子をアリルと呼び、遺伝子変異をもつアリルを変異アリルと呼ぶ。組織全体の中での変異アリルの頻度を変異アリル頻度（VAF）と呼び、ctDNA における VAF は体内の腫瘍量と関連することが知られている。
9. プライマープローブ：デジタル PCR を行う際に用いられる試薬。1 変異に 1 種類のプローブが必要となる。岩手医大では様々ながんで高頻度に検出される遺伝子変異に対するプローブを 1000 種類以上設計・ライブラリー化し、この技術の特許化している。
10. BCG 療法：膀胱内に結核菌のワクチンを注入する膀胱がんの治療方法。悪性度の高い癌や、再発を繰り返す癌などに対して行われます。

#### 【原著論文】

発表雑誌名：The Journal of Molecular Diagnostics

論文タイトル：The clinical validity of urinary pellet DNA monitoring for the diagnosis of recurrent bladder cancer（膀胱癌の再発診断における尿沈渣 DNA モニタリングにおける臨床的妥当性）

著者：Masakazu Abe<sup>1,2</sup>, Hayato Hiraki<sup>1</sup>, Takashi Tsuyukubo<sup>3</sup>, Sadahide Ono<sup>4</sup>, Shigekatsu Maekawa<sup>2</sup>, Daichi Tamura<sup>2</sup>, Akiko Yashima-Abo<sup>1</sup>, Renpei Kato<sup>2</sup>, Hiromitsu Fujisawa<sup>3</sup>, Takeshi Iwaya<sup>5</sup>, Woong-Yang Park<sup>6,7</sup>, Masashi Idogawa<sup>8</sup>, Takashi Tokino<sup>8</sup>, Wataru Obara<sup>2</sup>, Satoshi S. Nishizuka<sup>1</sup>

所属

- 1) Division of Biomedical Research and Development, Iwate Medical University Institute for Biomedical Sciences, Yahaba, Japan  
岩手医科大学 医歯薬総合研究所 医療開発研究部門
- 2) Department of Urology, Iwate Medical University School of Medicine, Yahaba, Japan  
岩手医科大学 泌尿器科学講座
- 3) Department of Urology, Iwate Prefectural Central Hospital, Morioka, Japan  
岩手県立中央病院 泌尿器科
- 4) Department of Diagnostic Pathology, Iwate Prefectural Central Hospital, Morioka, Japan  
岩手県立中央病院 病理診断科
- 5) Department of Clinical Oncology, Iwate Medical University School of Medicine, Yahaba, Japan  
岩手医科大学 臨床腫瘍学講座
- 6) Geninus Inc., Seoul, South Korea  
ジニナス社
- 7) Samsung Genome Institute, Samsung Medical Center, Seoul, South Korea  
サムスンメディカルセンター サムスンゲノム研究所
- 8) Department of Medical Genome Sciences, Cancer Research Institute, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan  
札幌医科大学ゲノム医科学部門

Corresponding Author: Satoshi S. Nishizuka

責任著者：西塚 哲

**【研究に関する問い合わせ先】**

岩手医科大学医歯薬総合研究所医療開発研究部門 特任教授 西塚 哲（にしづか さとし）  
電話 019-651-5111 メール snishizu@iwate-med.ac.jp

札幌医科大学医学部附属がん研究所ゲノム医科学部門

准教授 井戸川 雅史（いどがわ まさし）

電話 011-611-2111（内線 23870） メール idogawa@sapmed.ac.jp

**【広報に関する問い合わせ先】**

岩手医科大学法人事務部総務課広報係

電話 019-651-5111 メール kouhou@j.iwate-med.ac.jp

北海道公立大学法人 札幌医科大学 事務局経営企画課企画広報係  
電話 (011)-611-2111 (内線 21650・21640) Mail:kouhou@sapmed.ac.jp

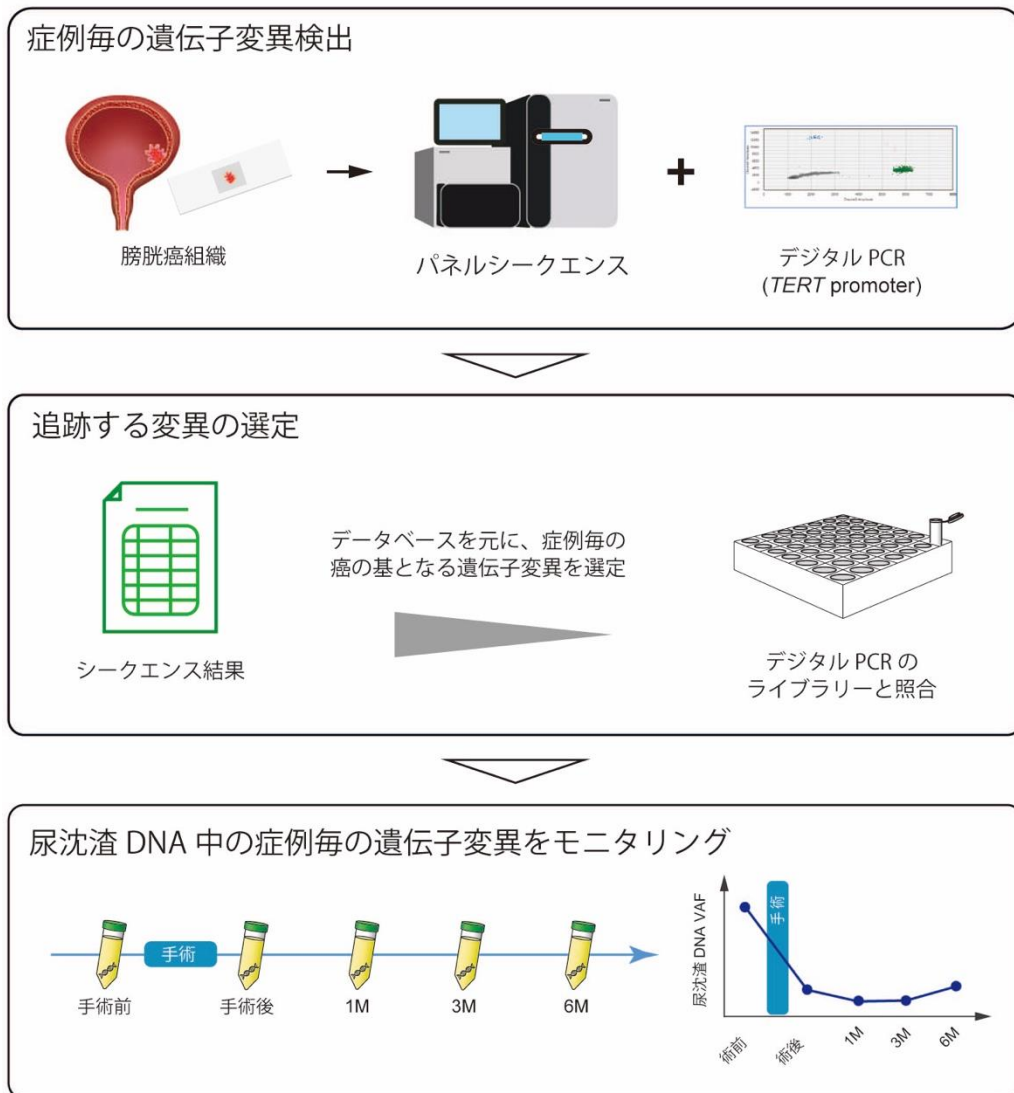
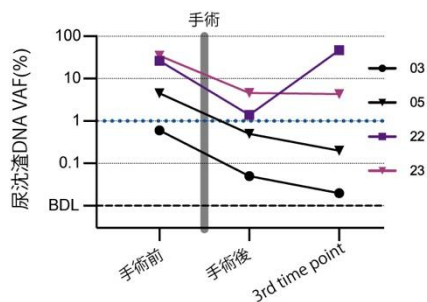


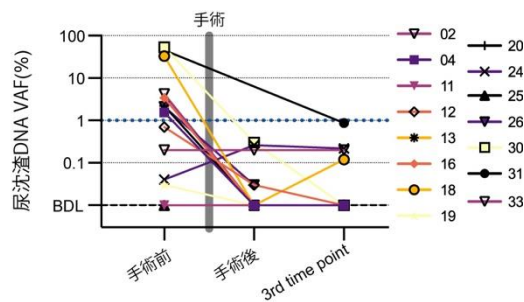
図 1：遺伝子変異検出及び尿中 DNA 変異アレル頻度(VAF)モニタリング方法

- ① 遺伝子変異検出：膀胱がん手術で得られたがん組織の DNA を抽出し、パネルシーケンスによる解析と膀胱がんの約 7 割の症例で見つかる *TERT* promoter 領域の変異のデジタル PCR 解析により、症例毎の遺伝子変異を測定しました。
- ② 追跡する遺伝子変異の選定：シーケンス結果のうち、追跡対象とすべき癌の元となる遺伝子変異を各種データベースに基づき選定しました。その変異について、我々の施設で保有する汎がんに対応するデジタル PCR のライブラリーとの照合を行いました。
- ③ 尿中 DNA の遺伝子変異をモニタリング：手術前後やその後の定期検査に合わせて尿検体を採取し、尿中 DNA の遺伝子変異の VAF をデジタル PCR により 2 年間モニタリングしました。

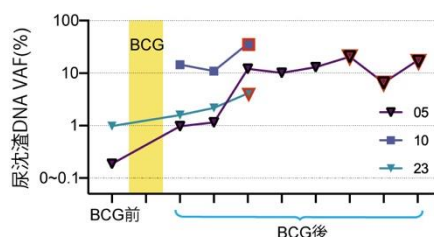
**A** 術後 再発症例



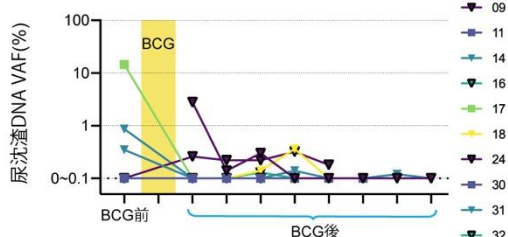
**B** 術後 無再発症例



**C** BCG膀胱注療法後 再発症例



**D** BCG膀胱注療法後 無再発症例



**図 2 : TURBT および BCG 治療前後の尿中 DNA の VAF 動態**

(A,B)VAF の動態を TURBT 前後と TURBT 後からの最も近い経過観察時点の 3 ポイントで評価しました。(A)TURBT 後に再発した 4 例のうち 2 例は TURBT 後の VAF は 1%以上が継続または上昇、残りの 2 例は 1%以下に低下しました。(B)TURBT 後に無再発で経過した 15 例はいずれも 1%以下に低下していました。

(C,D)BCG 治療前後およびその後の経過観察中の尿中 DNA の VAF の動態を示しました。

(C) BCG 治療後の再発例 3 例は全例 VAF が 1%以上かつ上昇傾向を示しました。(D) BCG 治療後の再発しなかった 10 例は全例 BCG 後 VAF は 1%以下に低下しその後継続していました。