

論文内容の要旨

Postoperative recurrence detection using individualized circulating tumor DNA in upper tract urothelial carcinoma

(上部尿路上皮癌における個別化腫瘍循環 DNA を用いた術後再発検出)

(田村大地, 阿部正和, 開勇人, 佐々木教之, 阿保亜紀子, 五十嵐大樹, 加藤廉平, 加藤陽一郎, 前川滋克, 兼平貢, 高田亮, 前嶋和紘, 笹川翔太, 藤田征志, 鈴木穰, 中川英刀, 岩谷岳, 西塚哲, 小原航)

(Cancer Science 115 巻, 2 号 令和6年2月掲載)

I. 研究目的

上部尿路上皮癌は全尿路上皮癌の約5%と比較的稀な癌であるが、術後再発、進行しやすく予後が悪いと言われている。しかし、バイオマーカーに乏しく、術後フォローアップはCTや膀胱鏡、尿細胞診等の感度が低いもしくは侵襲性の高い検査を行っており、有用なバイオマーカーが望まれている。

腫瘍循環 DNA (circulating tumor DNA; ctDNA) は体液中に存在する腫瘍細胞由来の DNA であり、近年癌に対するバイオマーカーとしての有用性が報告されている。ctDNA 解析のためのサンプルは血液を用いることが多いが、尿路上皮癌は尿に接するため、尿もサンプルとして有用と考えられ、膀胱癌においては尿中 ctDNA の有用性を報告した研究が散見される。しかし上部尿路上皮癌における ctDNA に関する研究は少なく、血液、尿の両方を解析した研究はこれまでにない。

本研究の目的は、上部尿路上皮癌の術後経過における血中及び尿中 ctDNA の変異遺伝子量の変化が術後再発を検出しうるかを検証することである。

II. 研究対象ならび方法

上部尿路上皮癌に対して手術を施行した症例 23 例を対象とし、手術検体の新鮮凍結標本から DNA を抽出し、次世代シーケンサー (next generation sequencing; NGS) により全エクソームシーケンスと TERT プロモーターに対するシーケンスを行った。なお、術前の血液より末梢血単核細胞を採取し、腫瘍と共にシーケンスを行い、生殖細胞系列変異は除外した。

手術前後に血漿及び尿上清を採取し、DNA を抽出した。腫瘍の遺伝子変異解析結果をもとに、症例毎に追跡する腫瘍特異的遺伝子変異を選択し、デジタル PCR (digital polymerase chain reaction; dPCR) を用いて変異遺伝子量 (variant allele frequency: VAF) をモニタリングした。dPCR で解析するためのプライマープロブセットは主に本学が所有するライブラリーから選択した。既存の検査法 (CT, 膀胱鏡, 尿細胞診) と比較し術後モニタリングにおけるバイオマーカーとしての妥当性を検証した。また、ctDNA の VAF やその変化が術後再発と関連するかを検証した。

III. 研究結果

1. NGSによる腫瘍DNAの遺伝子変異解析の結果、頻度の高い遺伝子はTERT (43%), KMT2D (35%), TTN (30%), FGFR3 (26%), TP53 (26%)であった。
2. 遺伝子変異解析の結果、TP53, FGFR3, RASにおいて相互排他性を認めた。
3. 各症例において追跡する腫瘍特異的遺伝子変異を選択した結果、最も頻度の高い変異はFGFR3 p. S249C (26%)であり、83%の症例で本学が所有するプライマープローブライブラリーに含まれる変異を有していた。
4. 術前血液、尿に対してdPCRを行い、96%の症例で腫瘍特異的変異が検出された。
5. 術後再発した症例全例で再発時に血液もしくは尿で腫瘍特異的変異が検出された。
6. 術後再発症例と非再発症例において、手術前後の採取時期ごとのVAFや、手術前後のVAFの変化率を比較したところ、尿における術前と術後2日目のVAF変化率が再発症例において有意に低かった(0.00% vs 99.29%, $p=0.017$)。
7. 術後再発におけるリスク因子を検討した結果、尿における術前と術後2日目のVAF変化率($p=0.020$)が独立したリスク因子であった。

IV. 結 語

本学が所有するプライマープローブライブラリーにより、83%の症例で術後モニタリングが可能であった。残りの症例も新規のプライマープローブセットを合成することでモニタリングが可能となり、ほぼすべての症例でdPCRを用いたctDNAによる術後モニタリングが可能であると考えられた。

術後モニタリングの結果、再発症例全例で再発時に腫瘍特異的変異が検出可能であり、バイオマーカーとして妥当であると考えられた。膀胱再発において全例尿上清の変異検出が可能であったことから、特に膀胱再発においては尿上清がバイオマーカーとして妥当であると考えられた。

尿におけるVAF変化率が術後再発のリスク因子として同定され、ctDNAは術後予後予測に有用である可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 阿部 貴弥 (泌尿器科学講座)

副査 教授 板持 広明 (臨床腫瘍学講座)

副査 特任講師 前川 滋克 (泌尿器科学講座)

上部尿路上皮癌は術後再発が多く、また進行しやすいため予後が悪い。術後再発の予期のためCT、尿細胞診、膀胱鏡等が行われるが、感度が低くまた侵襲が高い。そのため有用な早期術後再発バイオマーカーの開発が望まれている。近年癌に対するバイオマーカーとして腫瘍循環DNA (ctDNA) の有用性が報告されている。本論文は、尿は尿路上皮癌と接するため尿もサンプルとして注目した。手術検体の新鮮凍結標本および末梢血単核細胞からDNAを抽出し、次世代シーケンサー (NGS) により全エクソームシーケンスとTERTプロモータに対するシーケンスを行い、追跡する腫瘍特異的遺伝子変異を特定した。手術前後に血漿および尿上清を採取し、追跡する腫瘍特異的遺伝子変異においてデジタルPCR (dPCR) を用いて変異遺伝子量 (VAF) をモニタリングした。これらの結果と既存の検査法と比較することにより、上部尿路上皮癌の術後経過における血中及び尿中 ctDNA の VAF の変化が術後再発を検出できるかについて検証した。術後再発におけるリスク因子として、腫瘍組織での TP53 変異および尿における術前、術後2日目の VAF 変化率であることを初めて示した論文である。

本論文は、上部尿路上皮癌の術後再発の予測や今後の治療指針の開発など今後の臨床において役立つ有益な知見を示した研究といえる。学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

上部尿路腫瘍の再発様式、腫瘍発生部位により差、腎機能の影響など臨床的な質問と血液及び尿の検体についてその取扱い、両者の測定意義、今後の発展性など研究本質に関することについて試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した。

参考論文

- 1) Prognostic outcomes and safety in patients treated with pembrolizumab for advanced urothelial carcinoma: experience in real-world clinical practice (Daichi Tamura, 他 10 名と共著) International Journal of Clinical Oncology, 25 巻, 5 号 (2020) : p899-905.
- 2) 岩手県で初めての血液透析患者における COVID-19 発症例 (田村大地, 他 5 名と共著) 岩手県立病院医学会雑誌, 61 巻, 2 号 (2021) : p119-122.