

学 位 論 文 要 旨

氏 名

志村 壮一郎



論 文 題 目

Serum epiplakin might be a potential serodiagnostic biomarker for bladder cancer

(膀胱癌における血清エピプラキンの診断マーカーとしての可能性)

指 導 教 授 承 認 印

志村 正一郎



Serum epiplakin might be a potential serodiagnostic biomarker for bladder cancer

〔膀胱癌における血清エピプラキンの
診断マーカーとしての可能性〕

北里大学医学部泌尿器科学

志村 壮一郎

【背景】

膀胱癌（BC）はほとんどの患者は筋層非浸潤性膀胱癌（NMIBC）であり、経尿道的膀胱腫瘍切除術（TURBT）により治療される。NMIBC患者の最大70%が最終的に再発し、10～20%が筋層浸潤性膀胱癌（MIBC）に病勢進行する。膀胱鏡検査と尿細胞診は、膀胱癌の診断と再発の管理のためのガイドラインに明記された方法である。しかしながら膀胱鏡検査は腫瘍病変の発見に役立つが苦痛を伴い、尿細胞診は侵襲性が低いものの、感度が低いことが問題点として挙げられる。したがって、診断の補助として腫瘍マーカーの開発が期待されており、本邦でもBTAやNMP22が測定可能だが、感度・特異度、擬陽性などの問題があり実臨床ではほとんど用いられていない。我々は以前に膀胱癌組織における高分子量（HMM）タンパク質の発現をアガロース二次元ゲル電気泳動で調べた後、液体クロマトグラフィータンデム質量分析計で解析し、包括的に検討した。タンパク質の発現と膀胱癌の転帰との関連について文献検索を行った結果、エピプラキンを含む8つのタンパク質が新たなバイオマーカーの報告を行った。その中の一つがエピプラキンである。エピプラキンは、最初は表皮下水疱症患者の血清中の自己抗原として同定された552kDaのタンパク質であり、エピプラキンは創傷治癒や皮膚の機械的強化に関与している。本研究は、血清エピプラキンを膀胱癌患者、結石症患者、健常人から測定し、比較することで有用性を検証した。また、血清エピプラキンおよび手術標本の免疫組織化学的染色が、臨床病理学的所見および患者の予後と関連するかどうかを評価した。

【対象と方法】

血清エピプラキンの測定は2010年3月から2014年9月までに北里大学病院で治療を受けた膀胱癌患者60例、結石症患者20例、健常人28例を対象とした。北里大学医学部・病院倫理委員会（B17-010, B18-149）の承認を得た。血清エピプラキンはマイクロドットアレイを用いた逆相プロテインアレイ（RPPA）分析で測定した。得られた蛍光値の中央値を値とした。免疫染色は血清とは異なる1995年10月から2015年6月までの北里大学病院における膀胱全摘除術を施行された127例を対象とした。血清と同じエピプラキン抗体を用いて染色し、免疫組織化学的検討を行った。免疫組織は、染色強度と陽性腫瘍細胞の割合をスコア化することで評価した。膀胱癌患者と結石症患者および健常人の血清エピプラキン値、および臨床病理学的所見を、分散分析およびMann-Whitney U検定により比較した。また、ROC（Receiver-Operating Characteristic）解析により、曲線下面積（AUC）と最適なカットオフ点を算出した。エピプラキン発現の免疫組織化学的検査と臨床病理学的所見の関連は、カテゴリー変数についてカイ二乗検定を用いて評価

した。無再発生存率および癌特異的生存率は、log-rank 検定を用いて推定した。単変量および多変量解析は、Cox 比例ハザード回帰モデルを用いて行った。

【結果】

血清エピプラキン値は、膀胱癌患者で結石症患者と健常人と比較して、有意に増加が認められた。 $(p = 0.0013, p < 0.0001)$ NMIBC と MIBC の間に差は認められなかった $(p = 0.63)$ 。NMIBC 患者はまた、結石症患者 $(p = 0.0016)$ および健常人 $(p < 0.0001)$ よりも有意に高い血清エピプラキンレベルを有していた。結石症患者と健常人との間に差は認められなかった $(p = 0.28)$ 。ROC 解析では AUC は 0.78 であった。感度 68.3%、特異度 79.2% であった。臨床病理学的因子との関連を検討したが、血清エピプラキン値は、性別、年齢、病理学的病期、グレード、尿細胞診との関連は認められなかった。膀胱癌の再発因子を単変量および多変量解析により検討したが、エピプラキンは再発因子ではなかった。免疫染色ではエピプラキンは主に腫瘍細胞膜と細胞質で様々なレベルで発現していた。単変量および多変量解析により、エピプラキンの発現 Score と臨床病理学的所見との関連および無再発生存期間、癌特異的生存率の検討を行ったが、エピプラキンは臨床病理学的因子との関連および予後因子とは認められなかった。

【考察】

本研究ではマイクロドットプロットアレイを用いて、膀胱癌患者の血清エピプラキン濃度が結石症患者や健常人よりも高いことを明らかにした。しかし、膀胱癌組織の染色 Score と臨床病理学的所見、患者の予後との関連は見出せなかった。また、血清エピプラキン値は NMIBC 患者と MIBC 患者の間で差がなく、膀胱癌の初期段階においても有用である可能性が示唆された。プラキンファミリーと癌との関連を報告した論文は散見されるが、エピプラキンと癌の関連性を報告した論文は少ない。吉田らは、膵管腺癌前駆病変におけるエピプラキンの免疫組織化学的所見を報告し、エピプラキンが前癌病変で発現しているが膵臓癌では発現していないことを明らかにした。Dong らは、KLF5 を介したエピプラキンの組織におけるアップレギュレーションが、p38 シグナル伝達経路を活性化して子宮頸部細胞の増殖を促進することを報告した。さらに、この結果は、エピプラキンが子宮頸癌の治療のための標的因子である可能性を示唆した。エピプラキンが癌と関連する作用機序は、エピプラキンが中間フィラメント (IF) を連結することが関与している可能性が考えられる IF は、細胞移動からアポトーシスや増殖まで、様々な細胞プロセスを制御している。ケラチンは、全ての上皮細胞に発現する IF タンパク質ファミリーに属し、機械的および非機械的ストレスに対して重要な構造的サポートを提供している。癌細胞は上皮細胞に由来するため、ケラチンは免疫学的に変化している。エピプラキン欠損マウスを用いた研究により、エピプラキンはストレスに応じたケラチンフィラメントの再配列に関与していることが示されている。これらを統合すると、エピプラキンと発癌の関連は、ケラチンを介している可能性が示唆される。本研究では免疫組織化学的には、エピプラキンの発現と臨床病理学的所見との間に関連は認められなかった。また我々の知る限り、血清エピプラキン値と癌の関係を報告した研究はない。膀胱癌における血清エピプラキン上昇のメカニズムや膀胱癌組織での免疫組織化学的発現との関連は不明であるが、本研究は血清エピプラキンが BC 診断のためのバイオマーカーとなる可能性を示した初めての研究である。膀胱癌の診断には、膀胱鏡検査と尿細胞診がゴールドス

タンダードである。軟性膀胱鏡検査により患者にとっては検査が容易になったが、依然として侵襲的な方法であることに変わりはない。本研究は、膀胱癌の診断マーカーとなりうる血清中のエピプラキンの循環レベルを調べるために行われ、その結果エピプラキンはNMIBCに対して十分な感度（64.7%）および特異度（81.3%）を示すことが判明した。Tilkiらは、BTAの感度と特異度はそれぞれ57～83%、60～92%、NMP22の感度と特異度はそれぞれ47～100%、60～90%と報告している。しかし、BTAとNMP22は尿路結石の偽陽性率が高いことが報告されている。エピプラキンはBTAやNMP22と同様の感度・特異性を示したが、膀胱癌患者と結石症患者で有意な差があった。したがって、血清エピプラキンは、確立された膀胱癌マーカーの問題点を克服している可能性があると考えています。

近年の研究では、次世代シーケンサー（NGS）を用いた無細胞DNA（cfDNA）の解析によるリキッドバイオプシーが有用であることが報告されている。また、UroseekのようなBCの遺伝子パネルアッセイも開発されている。Patriceらは、テロメラーゼ逆転写酵素遺伝子（TERT）のプロモーターの変異を検出するシングルプレックスアッセイUroMuTERTを用いたBCに対する検出の感度と特異性が非常に高いことを報告した。しかし、NGSは酵素結合免疫溶媒法（ELISA）よりも再現性が高く正確であるが、高価であり、高度な専門知識と実験設備が必要である。マイクロドットアレイは、その簡便な方法の一つであると考えられる。他のがん比べ、膀胱癌におけるバイオマーカーの分野はまだ不十分であり、エピプラキンは、現状では日常臨床で使用するには課題が多いが、有望なバイオマーカーとなり得る。

【本研究の限界】

第一に、エピプラキンは尿路上皮だけでなく、上皮や他の臓器にも存在しており、膀胱癌以外の要因が原因により上昇していた可能性が否定できません。第二に、血清エピプラキン発現は、尿路結石では測定しましたが、癌以外の炎症性疾患を含む他の疾患においての検証が必要です。第三に、膀胱癌組織の免疫組織化学的染色を行ったが、血清群と免疫組織化学群では患者コホートが異なっていることである。血清所見と免疫組織化学所見との間のエピプラキンの動態を明らかにする必要があります。第四に、エピプラキンの血清レベルはマイクロドットプロット分析で測定されただけである。エピプラキンの臨床応用に際しての安定した測定を考慮すると、Western blottingやELISAなどの他の測定方法との比較も必要と考えられます。

【結語】

膀胱癌患者は結石症患者や健常人と比較して、血清エピプラキンの発現が有意に増加していた。血清エピプラキン値は膀胱癌の診断において尿細胞診や膀胱鏡検査の補助として適切な非侵襲的診断法となる可能性がある。