

学位論文

「DJ-1 Expression Might Serve as a Biologic Marker in

Patients with Bladder Cancer

(膀胱癌における生物学的マーカーとしての

DJ-1 発現の検討)」

指導教授名 岩村 正嗣

申請者氏名 平野 修平

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

論文要旨

【緒言】DJ-1 蛋白の発現増加は肺癌、乳癌などで発現亢進が報告され、肺癌、膵臓癌、乳癌では血清中への分泌も報告されている。癌遺伝子の一つである DJ-1 に着目し、膀胱癌患者における血清 DJ-1 濃度の測定と膀胱癌組織中における DJ-1 発現を検討した。

【方法】血清 DJ-1 濃度の測定は北里大学病院において採取された 192 例の膀胱癌患者血清と 20 例の尿管結石患者、100 例の健常者血清を比較し、検証した。膀胱癌患者、尿路結石患者、健常者の血清をそれぞれ Reverse-phase protein array (RPPA) 法を用いてシグナルの検出および数値化を行った。RARP 法では 4 重測定した各サンプルをコムギ胚芽無細胞系で作成した DJ-1 蛋白質で標準化した値を用いて統計解析を行った。血中抗原との関連は Mann-Whitney U 検定により算出し、診断的有用性の評価には Receiver Operating Characteristic (ROC) 解析を用い、Area Under the Curve (AUC) を指標とした。さらに、1990 年から 2006 年の間に北里大学病院で根治的膀胱全摘除術を行なった 92 例の症例を対象とし、組織中の DJ-1 発現を細胞内局在にて評価し、臨床病理学因子と予後との関連を統計学的に解析した。腫瘍細胞核染色の発現が保持されている群 (核+)、低染色性もしくは染色性消失群 (核-) に分け、細胞質染色は腫瘍部分と染色強度からスコアリングした細胞質スコアが平均以上の症例 (細胞質+) と平均値未満の症例 (細胞質-) に分け、計 4 群に分類し評価した。組織における臨床病理因子との関連性は χ^2 検定、生存時間分析は Kaplan-Meier 法を用いてログランク検定で評価し Overall survival (OS), Recurrence-free survival (RFS), Cancer-specific survival (CSS) を比較した。多変量解析は Cox 比例ハザード回帰モデルを用い、予後予測因子の検討を行なった。本研究は、北里大学医学部・病院倫理委員会で承認された (B17-010, B18-149)。

【結果】血清中の DJ-1 抗原量測定において、健常者・結石患者に比して膀胱癌患者血清で有意な発現亢進を認めた ($p < 0.001$)。ROC 解析の結果、健常者は AUC = 0.88、カットオフ値 10.5 ng/ μ l の時、感度 83.1%、特異度 83.0%、尿路結石患者は AUC = 0.83、カットオフ値 12.3 ng/ μ l の時、感度 79.7%、特異度 75.0% で膀胱癌患者との鑑別が可能であった。DJ-1 の発現様式で、核発現の低下 (核-)、かつ細胞質発現の亢進 (細胞質+) の群が、その他の発現様式症例と比較し、病理病期に相関を認めた ($p < 0.025$)。また、核-細胞質+群では OS、CSS、RFS においてその他の群と比較して優位に予後不良であった ($p < 0.05$)。多変量解析では DJ-1 発現が OS、RFS、CSS とそれぞれ関連しており ($p < 0.001$, $p = 0.01$, $p = 0.001$)、リンパ節転移においても独立した予後因子であった ($p = 0.008$, $p = 0.006$, $p = 0.001$)。

【結語】本研究により血清 DJ-1 蛋白は膀胱癌の早期診断に有用であり、免疫組織学的に DJ-1 核発現の低下および、細胞質発現が亢進している膀胱癌症例では、予後不良である可能性が示唆された。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 対象と方法	
2-1. 患者	2
2-2. 血清 DJ-1 測定	2
2-3. 免疫組織学的評価	3
2-4. 統計解析	4
3. 結果	
3-1. 血清 DJ-1 について	4
3-2. DJ-1 の免疫組織学的発現と臨床病理学的転帰について	4
4. 考察	5
5. 総括	7
6. 今後の課題	7
7. 謝辞	7
8. 引用文献	8
9. 業績目録	10
10. 図表	12

1. 序論

膀胱癌は世界で 10 番目に多い癌であり、膀胱癌の 80%は非筋層浸潤性膀胱癌患者である[1]。約 50%の非筋層浸潤性膀胱癌患者は bacillus Calmette-Guérin (BCG) 注入療法を併用した経尿道的切除術を行なっても再発を繰り返し、約 30%の患者は筋層浸潤性膀胱癌へと進行する[2]。膀胱癌診断のゴールドスタンダードは尿細胞診と膀胱鏡であるが[3]、膀胱鏡は患者にとって苦痛を伴い、医療経済的にもコストを要し[4]、尿細胞診は膀胱癌の診断や経過観察の最も一般的な手法であるが low grade の膀胱癌では感度が 27%しかない[5]。したがって、膀胱鏡の必要性を減らし、マーカーの精度を改善させるため、現在も多くの研究が行われている。

米国食品医薬品局 (FDA ; The US Food and Drug Administration) は膀胱鏡と組み合わせた臨床的使用のために 6 つの尿中アッセイを承認した。NMP22 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)、NMP22 BladderChek (Alere, Waltham, MA, USA)、UroVysion kit (Vysis, Abbott Molecular Inc., Chicago, IL, USA) は FDA から診断、観察目的で承認されている。一方で ImmunoCyt/uCyt+ (Scimedx Inc., Denville, NJ, USA)、BTA-TRAK、BTA-STAT (Polymedco Inc., Cortlandt, NY, USA) は全て、診断後の経過観察目的で承認されているが、FDA で承認されたマーカーは臨床的な尿中バイオマーカーとして偽陽性率が高く、特異度が低い課題を抱えている[6]。

非筋層浸潤性膀胱癌患者を follow-up するためのいくつかの尿中バイオマーカーが研究されているが[7, 8]、利用可能な尿中バイオマーカーの多くは、陽性的中率が低いため実臨床に適応できておらず[7]、残念ながら臨床応用に至った血清マーカーも報告されていない[4, 9, 10]。今回、私はプロテオミクス解析において報告したいくつかの膀胱癌関連蛋白質の中から、DJ-1 に着目した[11-13]。

DJ-1 は活性化された RAS と協力して N1H3T3 細胞を形質変換できる癌遺伝子として初めて報告された[14]。DJ-1 (*PARK7*) は細胞の形質転換、蛋白質と RNA の相互作用の制御、酸化ストレスによるアポトーシスの防止など、さまざまな細胞プロセスに関与している[15]。DJ-1 の発現亢進は様々な癌種における診断、進行について報告されており[16, 17]、血清 DJ-1 は既に肺癌、乳癌、膵臓癌の診断マーカーとして報告されている[16-18]。いくつかの報告では膀胱癌診断のための尿中バイオマーカーとして DJ-1 濃度上昇を示したが[19, 20]、尿中マーカーは grade や stage によって変化し、low grade や low stage の膀胱癌では感度が低い。さらに腎機能や尿量が、尿検査結果に影響する可能性があると考えられる。私が調べ得た限りでは、膀胱癌診断のための血清マーカーとして DJ-1 を検討した報告はなく、本研究では DJ-1 の尿路上皮癌診断における血清マーカーとして有用性と、膀胱全摘標本での DJ-1 蛋白質の免疫組織学的発現と術後予後評価の関連を検討した。

2. 対象と方法

2-1. 患者

北里大学病院において2009年から2015年の間に経尿道的膀胱腫瘍切除術を施行された293名から採取した血清データを後方視的に検討した。尿路上皮癌以外の癌、病理学的異型、上皮内癌 (CIS) を除外した172名の膀胱癌患者と20名の尿路結石患者、100名の健常者を対象とした (表1)。尿路結石患者は膀胱結石、腎結石、尿管結石のいずれか、もしくは全て診断された症例を対象とした。健常者は過去もしくは現在において、尿路結石や自己免疫性疾患、炎症性疾患、代謝疾患を含む基礎疾患がない人を対象とした。血清検体は全て施設内で-80°Cで管理された。

DJ-1の免疫組織学的検討は、血清群とは異なる、北里大学病院で1990年から2011年の間に骨盤リンパ節郭清を含む根治的膀胱全摘術を受けた92名の膀胱癌患者 (男性:72名、女性:20名、年齢:40-81歳 [中央値:65歳 平均値:63.5歳]) を対象に検討した。全ての患者に標準リンパ節郭清を伴う開腹もしくは腹腔鏡手術を施行し[21]、術前化学療法や術前放射線療法を受けた患者はいなかった。膀胱内注入療法抵抗の非筋層浸潤性膀胱癌や筋層性浸潤性膀胱癌を膀胱全摘の適応とした。病理ステージには2002年TMN分類を用い、病理 grade は1973年WHO分類を用いて評価した。癌細胞が内皮細胞内に存在する場合、脈管侵襲 (LVI)陽性と判断し、癌細胞が血管内腔に侵入しただけの場合、LVI陰性と評価した。各腫瘍の最も浸潤性の高い領域を表すホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを収集して調査した。術後経過観察は、1年目は3ヶ月毎、2年目は半年毎、3年目以降は1年毎に行った。臨床的に必要な場合は検査を追加した。術後16人 (17.4%) の患者に対してリンパ節転移などの病理ステージを考慮し術後化学療法 (MVAC療法: methotrexate, vinblastine, doxorubicin, cisplatin もしくはGC療法: gemcitabine, cisplatin) を施行した。13人 (14.1%) の患者は再発に対して同様のレジメンの化学療法を行った。

この研究プロトコールはヘルシンキ宣言のガイドラインに従って実施され、北里大学医学部病院の倫理委員会の承認を受けた (承認番号: B17-010, B18-149)。血清分析についてのインフォームドコンセントは、すべての研究参加者から得られ、免疫組織学的分析に関してはWebサイトおよびポスターを使用してオプトアウトを提示し、いつでも研究への参加を拒否・中止可能とした。

2-2. 血清DJ-1測定

血清DJ-1はKobayashiらが報告したReverse-phase protein array (RPPA)法を用いて測定した[22]。Reverse-phase protein arrayはELISAなどの臨床検査よりも検体の必要量が少ない利点があり[23]、我々はマイクロプロットを用いたreverse-phase protein array analysis法を報告してきた[22, 24]。血清検体をそれぞれ、0.01% Triton X-100/D-PBS(-)を用いて15倍希釈後、1症例につき4スポットずつ専用の装置 (VP478A, V&P Scientific, San Diego, CA, USA)を用いてRPPA用のスライドガラス (SDM0011 [Matsunami Glass, Osaka, Japan])にドットした。グルタチオンS-トランスフェラーゼ

でタグ付けされた組換え DJ-1 はコムギ胚芽無細胞系で作製した[25]。また、コムギ胚芽無細胞系で作製した DJ-1 蛋白質を段階希釈し、同様にドットし内部標準とした。血清のスライドガラスへの固相化のため、シリカゲルを入れたプラスチックトレイ中で室温、48 時間乾燥させた。その後、0.5% casein/0.01% Triton X-100/D-PBS(-)を用いて 37°C で 1 時間ブロッキングを行った。続いて、ブロッキング液で 100 倍希釈したマウス抗 DJ-1 抗体 (Clone 3E8 (MBL, Nagoya, Japan)) を一次抗体として 4°C、16~18 時間で反応させた。その後、Wash Buffer [0.01% Triton X-100/D-PBS(-)] で 5 分間、3 回洗浄を行った後、スライドガラスは二次抗体としてブロッキング剤で 100 倍希釈したビオチン標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) を 37°C で 1 時間反応させた。Wash Buffer で 5 分間、3 回洗浄を行った後、スライドガラスはブロッキング剤で 1,000 倍希釈した Horseradish peroxidase 標識 streptavidin (GE Healthcare) を 37°C で 30 分間反応させた。その後、Wash Buffer で 5 分間、3 回洗浄を行った後、200 倍希釈した Cy5 標識 Tyramide (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) を 37°C で 20 分間反応させた。同様に、Wash Buffer で 5 分間、3 回洗浄を行った後、スライドガラスはブロッキング剤で 2,000 倍希釈した Alexa 546 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (Life Technologies) を 37°C で 5 分間反応させた。最終的にスライドガラスは、Wash Buffer で 5 分間、3 回洗浄を行い、さらに超純水中で 5 分間、2 回洗浄した後、700 rpm、10 分間遠心し乾燥させ、アレイ用スキャナー GenePix 4000B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) にてシグナルの検出および数値化を行った。

2-3. 免疫組織学的評価

10%ホルマリン固定、パラフィン包埋された膀胱癌組織で 3 μ m に薄切した切片を用いて免疫染色を行った。切片はキシレンで脱パラフィン後、下降エタノール系列で脱キシレンを行い、流水水洗した。切片は 3%過酸化水素水で室温、10 分間内因性ペルオキシダーゼ処理を行った後、抗原性の賦活化のため Tris・EDTA 溶液 (pH9.0) [0.01mol/L Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 1mM EDTA・2Na] に浸漬し、オートクレーブ中で 121°C、10 分間処理を行った。その後、切片はトリス緩衝生食液 [TBS, 100mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl] で 5 分間洗浄、0.5% casein 溶液 [1M Tris-HCl (pH7.5), 300mM NaCl, 0.5% casein] で室温、10 分間の処理を行い、一次抗体として 4,000 倍希釈した抗 DJ-1 抗体 (Clone 3E8 (MBL)) を 37°C で 2 時間反応させた。切片は TBS で 5 分ずつ 3 回の洗浄を行った後、二次抗体として HRP 標識ポリマー試薬 (ChemMate ENVISION, DAKO, Glostrup, Denmark) を室温で 30 分間反応させた。再度、TBS で 5 分ずつ 3 回の洗浄を行った切片は、Stable DAB 溶液 (Life Technologies Corp, Carlsbad, CA, USA) を用いて可視化を行い、マイヤーのヘマトキシリンで核染色を行った。

全ての免疫染色は 2 人の判定者 (S.H., Y.S.) によって臨床情報や病理データが伏せられた状況で評価された。結果が合致しない場合は、意見が一致するまで議論を行った。

腫瘍細胞の核染色においては、同一症例内における腫瘍組織内における血管内皮細胞の核発現程度をインターナルコントロールとし、腫瘍細胞における核発現は

コントロールと同等もしくは強い染色性を示した症例を陽性、発現が認められない、もしくはコントロールより染色性が低下している症例を陰性に分類した[26]。非腫瘍性尿路上皮では明らかな細胞質発現が認められずインターナルコントロールを取ることが出来なかったため、細胞質の発現は免疫染色法における半定量的評価法である Histo-score 法を用いた。染色性は 0~3 にスコア化した (0:染色なし, 1:弱陽性, 2:中等度陽性, 3:強陽性)。染色性の最も高かった 3 つの領域の腫瘍細胞 100 個ずつの DJ-1 発現のスコアと割合を掛け算し、3 つの領域の平均値を半定量的 H スコア (最大値: 300, 腫瘍細胞内の DJ-1 陽性割合が 100%で染色性が 3 だった場合)として評価した。DJ-1 細胞質発現 H スコアは検索した 92 例の平均値が 170 であったことから、陽性 (≥ 170)と陰性 (< 170)に分類した。

2-4. 統計解析

健常者と膀胱癌患者、尿路結石患者の血清 DJ-1 濃度は Mann-Whitney U 検定を用いて比較した。ROC 曲線は感度に対して偽陽性率 (1-特異度)をプロットして検出した。血清 DJ-1 の感度、特異度をもとに最適なカットオフ値は Youden index を用いて評価した[27]。免疫組織学的解析において年齢 (<65 対 ≥ 65 歳)、病理ステージ ($\leq T1$ 対 $\geq T2$)、グレード (1, 2 対 3)、リンパ節転移 (N0 対 N1, N2)は 2 値変数で評価した。性別、年齢、病理ステージ、病理グレード、CIS、リンパ節転移、リンパ脈管浸潤に関して χ^2 検定を用いて評価した。生存解析には Kaplan-Meier 法を用い、有意差はログランク検定で評価した。多変量解析は Cox 比例ハザード回帰モデルを用いて DJ-1 発現、病理ステージ、病理グレード、リンパ脈管浸潤、リンパ節転移において調整した。統計学的有意差は $p < 0.05$ で設定した。全ての解析は Stata software application (version 15 for Mac: StataCorp LLC, College Station, TX, USA)を用いて行った。

3. 結果

3-1. 血清 DJ-1 について

図 1 にそれぞれの群の血清 DJ-1 濃度を示した。膀胱癌症例群の DJ-1 濃度 (中央値: 21.93 ng/mL [範囲: 0.00-235.06 ng/mL])であり、尿路結石群 (中央値: 9.67 ng/mL [範囲: 4.04-20.37 ng/mL], $p < 0.001$)、健常群 (中央値: 6.58 ng/mL [範囲: 0.75-30.39 ng/mL], $p < 0.001$)と比較して有意に高かった。

pTa/1 膀胱癌患者での血清 DJ-1 濃度 (中央値: 23.5 ng/mL [範囲: 2.3-235.1 ng/mL])は pT2 以上の膀胱癌患者での濃度 (中央値: 15.2 ng/mL [範囲: 0.00-207.00 ng/mL], $p = 0.009$)より有意に高かった。さらに pTa/1 と pT2 患者の血清濃度を健常群と尿路結石群に直接比較しても同様の結果が得られた (図 S1)。

ROC 分析では、膀胱癌患者の血清 DJ-1 値は尿管結石患者 (AUC: 0.83, $p < 0.001$, 図 2A)や健常者 (AUC: 0.88, $p < 0.001$; 図 2B)よりも有意に高かった。さらに血清 DJ-1 は健常者よりも非筋層浸潤膀胱癌患者において有意に高かった (AUC: 0.92, $p < 0.001$; 図 2C)。

3-2. DJ-1 の免疫組織学的発現と臨床病理学的転帰について

今回の研究において DJ-1 染色を腫瘍細胞核染色の発現が保持されている群 (核+)、低染色性もしくは染色性消失群 (核-)、細胞質染色は腫瘍部分と染色強度からスコアリングした細胞質スコアが平均以上の症例 (細胞質+) と平均値未満の症例 (細胞質-) に分け、核-細胞質+群 (group 1, n = 28, 図 3B)、核+細胞質+群 (group 2, n = 26, 図 3C)、核+細胞質-群 (group 3, n = 12, 図 3D)、核-細胞質-群 (group 4, n = 26, 図 3E) の 4 群に分類し、全生存期間 (overall survival: OS) が最も短かった group 1 とその他の群を比較した ($p < 0.001$, 図 4)。

今回の結果で、細胞内局在にかかわらず、腫瘍内における DJ-1 発現の有無は OS や癌特異的生存期間 (Cancer-specific survival: CSS) に関連していなかった ($p = 0.51$, $p = 0.53$, 図 S2)。細胞質内の DJ-1 発現単独では OS や CSS に関連は認められなかった ($p = 0.15$, $p = 0.19$, 図 S3A, S3B)。一方で核内 DJ-1 発現は OS に関連していたが ($p = 0.029$, 図 S4A)、CSS に関連は認められなかった ($p = 0.11$, 図 S4B)。これらの結果をもとにして group 1 と groups 2-4 の 2 群に分け、比較検討した。

表 2 に DJ-1 発現と臨床組織学的特徴の関連を示した。年齢 ($p = 0.011$), 病期 ($p = 0.025$)、リンパ節転移 ($p = 0.039$) で統計学的有意差を認め、性別、病理グレード、CIS、リンパ脈管浸潤は group 1 と group 2-4 において有意差は認められなかった。

観察期間中央値は 33.7 ヶ月で、47 名 (51.1%) は腫瘍再発を認め、42 名 (45.7%) は膀胱癌による死亡で、11 名 (12.0%) は膀胱癌以外で死亡した。図 5 では DJ-1 発現と転帰の関連を示した。group 1 は group 2-4 と比較して OS、無再発生存期間 (Recurrence-free survival: RFS)、CSS において統計学的有意差を認めた ($p < 0.001$, $p = 0.03$, $p = 0.009$)。group 1 と group 2-4 の累積全生存率は 1 年で 64.1% と 83.9%、2 年で 34.4% と 75.6%、5 年で 25.8% と 60.7% であった。

Cox 比例ハザード回帰モデルでは DJ-1 発現とリンパ節転移は OS、RFS、CSS との関連を認めた (表 3)。

4. 考察

本研究は膀胱癌患者における血清 DJ-1 値の上昇と、膀胱癌の細胞内局在が予後不良因子であったことを証明した。DJ-1 は 19.8 kDa の蛋白質で核と細胞質両方に存在する。DJ-1 は、PTEN を抑制することによってプロテインキナーゼ B (PKB/Akt) シグナル伝達を活性化し、さまざまな癌の進行をもたらすと考えられているが [17, 28]、DJ-1 蛋白質の局在化のメカニズムは未だ明らかになっていない。

膀胱癌の検出方法やモニタリングに関してはまだ課題が残っており、膀胱癌の診断のためのバイオマーカーとして尿中蛋白質の研究が進められている。Rosser らは膀胱癌診断において 7 つのバイオマーカー (interleukin 8, matrix metalloproteinase 9, PAI, angiogenin, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 10 and apolipoprotein E) が有用であった (AUC 0.88、感度 74%、特異度 90%) と報告している [29]。Kumar らは Ta/T1 の膀胱癌診断において、5 つの尿中バイオマーカー (coronin-1A,

apolipoprotein A4, semenogelin-2, gamma-synuclein, DJ-1)を用いたELISAでAUC 0.92 (感度 79.2%、特異度 100%)と良好な成績を示したことを報告している[30]。Soukupらは尿中DJ-1のみだと診断精度は低かったことを示した(感度 61.1%、特異度 87.7%、AUC 0.64)[19]。このことから尿中DJ-1単独では膀胱癌診断マーカーとしては不十分であると考えられた。

一方、血清DJ-1の上昇は肺癌、乳癌、膵臓癌などの患者で確認されている。Hanらは血清DJ-1が早期肺癌と良性疾患を鑑別に有用であったことを示し[16]、Kawateらは乳癌診断において癌特異的DJ-1アイソフォームが有用であったことを報告した[17]。Heらは膵臓癌患者においてCA19-9よりも血清DJ-1の方がAUC、感度、特異度が高かったことを報告した[18]。しかしながら膀胱癌でのDJ-1を含んだ血清マーカーの研究の報告は少なく、私が調べ得た限りでは、本研究が膀胱癌における血清DJ-1検討の初めての報告である。

本研究で膀胱癌患者での血清DJ-1濃度が、尿路結石患者や健常者のDJ-1濃度よりも有意に高かったことを証明した。さらに、非筋層浸潤性膀胱癌患者の血清DJ-1濃度が筋層浸潤性膀胱癌患者の濃度よりも高かったことを確認した。Hanらは肺癌において遠隔転移を有する患者の血清DJ-1濃度が限局性肺癌の患者よりも低かったことを示し、転移によってDJ-1 (*PARK7*)のダウンレギュレーションが起きた可能性を示唆し[16]、DJ-1が肺癌転移の診断や経過観察のためのバイオマーカーになり得ることを報告した。正確なメカニズムは明らかではないが、本研究でも非筋層浸潤膀胱癌患者の血清DJ-1濃度が筋層浸潤膀胱癌患者よりも高く、DJ-1のダウンレギュレーションが腫瘍進行に関与している可能性が考えられた。

免疫組織学的には、多くの癌種においてDJ-1蛋白質の発現亢進が報告されており、予後バイオマーカーとして提案されている[16-18]。進行性尿路上皮癌でもDJ-1の発現亢進が報告されているものの、尿路上皮癌での細胞内局在はほとんど報告されていない[31]。Miyajimaらは神経膠腫での核内DJ-1発現は非腫瘍性星状膠細胞と比較して減少していることと、悪性グレードとともに上昇すること、非腫瘍性神経膠細胞では認められなかったDJ-1の細胞質内発現が認められることを示した[26]。この報告は今回の研究結果と一致しており、尿路上皮癌細胞でのDJ-1の細胞内局在は症例により様々ではあったが、細胞質内発現陽性で核内発現が陰性とした症例は病理ステージと生存期間の短縮に関連していた。

DJ-1は血管新生、糖代謝の調節、及びアポトーシスの阻害に関連しており[32]、浸潤性乳癌では、細胞質DJ-1の発現が認められたが、10番染色体上のPTENの欠損が見られた[28]。PTENは様々な癌種で最も頻繁に変異する癌抑制遺伝子の一つで、LeeらはDJ-1の発現亢進とPTENの欠損が進行性尿路上皮癌に関連していたと報告している[31]。これらの結果に基づいて、細胞質内DJ-1の発現亢進はPTENの欠失または発現低下と相関している可能性が考えられ、膀胱癌組織での細胞質内の発現亢進と核内の発現低下はLINC00641やDUXAP8などのlong non-coding RNAsによるPTENのダウンレギュレーションに起因するアポトーシスでの結果である可能性も示唆された[33]。これらのDJ-1と

PTEN の役割が細胞質内の発現亢進と核内の発現低下が膀胱癌予後不良との関連の根拠になることが考えられた。このことから DJ-1 発現が術後化学療法や免疫チェックポイント阻害薬の適応評価のための因子として利用できる可能性も示唆された。

血清と免疫組織での DJ-1 発現は臨床病理学的転帰との関連を認めたが、いくつか本研究で問題点が存在した。

一つ目は、血清 DJ-1 症例で生存分析を行えなかったことである。二つ目は 血清 DJ-1 の濃度上昇が他の癌種でも認められるため、評価に注意が必要であることである [16, 18]。三つ目は後方視的研究デザインで、サンプル数も少ないため統計解析に限界があったことで、膀胱癌の検出及び転帰予測のための DJ-1 の役割や有用性を明らかにするには更なる大規模な前向き試験が必要となる。四つ目は血清 DJ-1 濃度を reverse-phase protein array 法のみで計測しており、臨床応用を考慮する場合はウェスタンブロットや ELISA などの別の方法での計測と比較する必要があることである。五つ目は血清と免疫組織学的評価のコホート集団が異なっており、血清 DJ-1 と免疫組織学的所見との関連性を確認するには同一集団での検討が必要である。最後に、根治的膀胱全摘や術後化学療法などの膀胱癌治療戦略が臨床医個人の判断となっていることも転帰に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

5. 総括

血清 DJ-1 濃度は尿路結石患者や健常者と比較して膀胱癌患者で有意に高かった。加えて膀胱癌組織において DJ-1 の局在は、膀胱癌リンパ節転移などの病勢進行と関連しており、DJ-1 の発現は follow-up や追加治療の決定に役立つ可能性が示唆された。

6. 今後の課題

より大規模な症例の検討を行い、本研究の検証が必要である。今後、膀胱癌における DJ-1 の役割を明らかにするために更なるゲノム解析やプロテオミクス解析が必要である。

7. 謝辞

本研究を行うにあたり、御指導を下さいました北里大学院医学部泌尿器科学 岩村正嗣教授に深く感謝いたします。また、本臨床研究を主導して頂き、研究方法から校正まで懇切なご指導を頂いた北里大学院医学部泌尿器科学 松本和将診療教授、佐藤雄一先生に深く感謝いたします。

8. 参考文献

1. Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, Abbastabar H, Abd-Allah F, Abdel-Rahman O, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2017: A systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol* 2019;5:1749-1768.
2. Cambier S, Sylvester RJ, Collette L, Gontero P, Brausi MA, van Andel G, et al. EORTC nomograms and risk groups for predicting recurrence, progression, and disease-specific and overall survival in non-muscle-invasive stage Ta-T1 urothelial bladder cancer patients treated with 1-3 years of maintenance Bacillus Calmette-Guerin. *Eur Urol* 2016; 69:60-9.
3. Nakamura K, Kasraeian A, Iczkowski KA, Chang M, Pendleton J, Anai S, et al. Utility of serial urinary cytology in the initial evaluation of the patient with microscopic hematuria. *BMC Urol* 2009;9:12.
4. van der Aa MN, Steyerberg EW, Sen EF, Zwarthoff EC, Kirkels WJ, van der Kwast TH, et al. Patients' perceived burden of cystoscopic and urinary surveillance of bladder cancer: a randomized comparison. *BJU Int* 2008;101:1106-10.
5. Mowatt G, Zhu S, Kilonzo M, Boachie C, Fraser C, Griffiths TRL, et al. Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of photodynamic diagnosis and urine biomarkers (FISH, ImmunoCyt, NMP22) and cytology for the detection and follow-up of bladder cancer. *Health Technol Assess* 2010;14:1-331.
6. Ng K, Stenzl A, Sharma A, Vasdev N. Urinary biomarkers in bladder cancer: A review of the current landscape and future directions. *Urol Oncol* 2021;39:41-51.
7. Soria F, Droller MJ, Lotan Y, Gontero P, D'Andrea D, Gust KM, et al. An up-to-date catalog of available urinary biomarkers for the surveillance of non-muscle invasive bladder cancer. *World J Urol* 2018;36:1981-95.
8. Goodison S, Rosser CJ, Urquidi V. Bladder cancer detection and monitoring: assessment of urine- and blood-based marker tests. *Mol Diagn Ther* 2013;17:71-84.
9. Washino S, Hirai M, Matsuzaki A, Kobayashi Y. Clinical usefulness of CEA, CA19-9, and CYFRA 21-1 as tumor markers for urothelial bladder carcinoma. *Urol Int* 2011;87:420-8.
10. Gakis G, Todenhofer T, Stenzl A. The prognostic value of hematological and systemic inflammatory disorders in invasive bladder cancer. *Curr Opin Urol* 2011;21: 428-33.
11. Okusa H, Kodera Y, Oh-Ishi M, Minamida Y, Tsuchida M, Kavoussi N, et al. Searching for new biomarkers of bladder cancer based on proteomic analysis. *Journal of Electrophoresis* 2008;52:19-24.
12. Shimura S, Matsumoto K, Shimizu Y, Mochizuki K, Shiono Y, Hirano S, et al. Serum epiplakin might be a potential serodiagnostic biomarker for bladder cancer. *Cancers* 2021;13:5150.
13. Koguchi D, Matsumoto K, Shimizu Y, Kobayashi M, Hirano S, Ikeda M, et al. Prognostic impact of AHNAK2 expression in patients treated with radical cystectomy. *Cancers (Basel)* 2021;13:1748.
14. Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM, et al. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231:509-13.
15. Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Takahashi K, Ariga H. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* 2004;5:213-8.
16. Han B, Wang J, Gao J, Feng S, Zhu Y, Li X, et al. DJ-1 as a potential biomarker for the early diagnosis in lung cancer patients. *Tumour Biol* 2017;39:1010428317714625.

17. Kawate T, Iwaya K, Koshikawa K, Moriya T, Yamasaki T, Hasegawa S, et al. High levels of DJ-1 protein and isoelectric point 6.3 isoform in sera of breast cancer patients. *Cancer Sci* 2015;106:938-43.
18. He XY, Liu BY, Yao WY, Zhao XJ, Zheng Z, Li JF, et al. Serum DJ-1 as a diagnostic marker and prognostic factor for pancreatic cancer. *J Dig Dis* 2011;12:131-7.
19. Soukup V, Capoun O, Pesl M, Vavrova L, Sobotka R, Levova K, et al. The significance of calprotectin, CD147, APOA4 and DJ-1 in non-invasive detection of urinary bladder carcinoma. *Neoplasma* 2019;66:1019-23.
20. Srougi V, Reis ST, Viana N, Gallucci FP, Leite KR, Srougi M, et al. Prospective evaluation of a urinary biomarker panel to detect and predict recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer. *World J Urol* 2021;39:453-9.
21. Matsumoto K, Tabata K, Hirayama T, Shimura S, Nishi M, Ishii D, et al. Robot-assisted laparoscopic radical cystectomy is a safe and effective procedure for patients with bladder cancer compared to laparoscopic and open surgery: Perioperative outcomes of a single-center experience. *Asian J Surg* 2019;42:189-96.
22. Kobayashi M, Nagashio R, Jiang SX, Saito K, Tsuchiya B, Ryuge S, et al. Calnexin is a novel sero-diagnostic marker for lung cancer. *Lung Cancer* 2015;90:342-5.
23. Matsubara J, Ono M, Honda K, Negishi A, Ueno H, Okusaka T, et al. Survival prediction for pancreatic cancer patients receiving gemcitabine treatment. *Mol Cell Proteomics* 2010;9: 695–704.
24. Yanagita K, Nagashio R, Jiang SX, Kuchitsu Y, Hachimura K, Ichinoe M, et al. Cytoskeleton-Associated Protein 4 Is a Novel Serodiagnostic Marker for Lung Cancer. *Am J Pathol* 2018;188:1328-33.
25. Goshima N, Kawamura Y, Fukumoto A, Miura A, Honma R, Satoh R, et al. Human protein factory for converting the transcriptome into an in vitro-expressed proteome. *Nat Methods* 2008;5:1011-17.
26. Miyajima Y, Sato Y, Oka H, Utsuki S, Kondo K, Tanizaki Y, et al. Prognostic significance of nuclear DJ-1 expression in astrocytoma. *Anticancer Res* 2010;30:265-9.
27. Fluss R, Faraggi D, Reiser B. Estimation of the Youden Index and its associated cutoff point. *Biom J* 2005;47:458-72.
28. Kim RH, Peters M, Jang Y, Shi W, Pintilie M, Fletcher GC, et al. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell* 2005;7:263-273.
29. Rosser CJ, Ross S, Chang M, Dai Y, Mengual L, Zhang G, et al. Multiplex protein signature for the detection of bladder cancer in voided urine samples. *J Urol* 2013;190: 2257-62.
30. Kumar P, Nandi S, Tan TZ, Ler SG, Chia KS, Lim WY, et al. Highly sensitive and specific novel biomarkers for the diagnosis of transitional bladder carcinoma. *Oncotarget* 2015;6: 13539-49.
31. Lee H, Choi SK, Ro JY. Overexpression of DJ-1 and HSP90alpha, and loss of PTEN associated with invasive urothelial carcinoma of urinary bladder: Possible prognostic markers. *Oncol Lett* 2012;3:507-12.
32. Vasseur S, Afzal S, Tardivel-Lacombe J, Park DS, Iovanna JL, Mak TW. DJ-1/PARK7 is an important mediator of hypoxia-induced cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106: 1111-6.
33. Mirzaei S, Paskeh MDA, Hashemi F, Zabolian A, Hashemi M, Entezari M, et al. Long non-coding RNAs as new players in bladder cancer: Lessons from pre-clinical and clinical studies. *Life Sci* 2022;288:119948.

9. 業績目録

(I) 原著

1. Hirano S, Matsumoto K, Tanaka K, Amano N, Koguchi D, Ikeda M, Shimizu Y, Tsuchiya B, Nagashio R, Sato Y, Iwamura M: DJ-1 Expression Might Serve as a Biologic Marker in Patients with Bladder Cancer. *Cancers (Basel)*, 14:2535, 2022.
2. Koguchi D, Matsumoto K, Shiba I, Harano T, Okuda S, Mori K, Hirano S, Kitajima K, Ikeda M, Iwamura M: Diagnostic Potential of Circulating Tumor Cells, Urinary MicroRNA, and Urinary Cell-Free DNA for Bladder Cancer; A Review. *Int. J. Mol. Sci*, 23:9148, 2022.
3. 平野修平、松本和将、塩野裕、中村真利江、勝又洋樹、小林桃子、池田勝臣、津村秀康、岩村正嗣: 35歳未満に発生した膀胱癌の臨床的特徴の検討. *泌尿器科紀要*, 67:221-224, 2021.
4. 森亘平, 西盛宏, 平野修平, 北島和樹, 池田勝臣, 石井大輔, 岩村正嗣: 当院におけるロボット支援腎盂形成術の初期成績と腹腔鏡下手術との比較検討, *Japanese Journal of Endourology*, 34: 323-327, 2021.
5. Shimura S, Matsumoto K, Shimizu Y, Mochizuki K, Shiono Y, Hirano S, Koguchi D, Ikeda M, Sato Y, Iwamura M: Serum epiplakin might be a potential serodiagnostic biomarker for bladder cancer. *Cancers*, 13:5150, 2021.
6. Koguchi D, Matsumoto K, Shimizu Y, Kobayashi M, Hirano S, Ikeda M, Sato Y, Iwamura M: Prognostic impact of AHNK2 expression in patients treated with radical cystectomy. *Cancers (Basel)*, 13: 1748. 2021.
7. Matsumoto K, Hirayama T, Kobayashi K, Hirano S, Nishi M, Ishii D, Tabata K, Fujita T, Iwamura M: Laparoscopic Retroperitoneal Nephroureterectomy is a Safe and Adherent Modality for Obese Patients with Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma: *Asian Pac J Cancer Prev* 16: 3223-3227, 2015.
8. Tsumura H, Matsumoto K, Ikeda M, Yanagita K, Hirano S, Hagiwara M, Nagashio R, Fujita T, Sato Y, Iwamura M; High Expression Level of Preoperative Serum Uroplakin III is Associated with Biologically Aggressive Bladder Cancer, *Asian Pac J Cancer Prev*, 16:1539-1543, 2015.
9. Tsumura H, Satoh T, Ishiyama H, Hirano S, Tabata K, Kurosaka S, Matsumoto K, Fujita T, Kitano M, Baba S, Hayakawa K, Iwamura M: Recovery of serum testosterone following neoadjuvant and adjuvant androgen deprivation therapy in men treated with prostate brachytherapy. *World J Radiol*, 7(12):494-500, 2015.

(II) 著書

1. 平野修平、石井大輔、小林健太郎、池田成江、若井陽希、吉田一成、岩村正嗣: 2型糖尿病による末期腎不全患者に対する腎移植. *今日の移植* 28(6), 696-697. 2015
2. 平野修平, 佐藤威文, 石山博條, 北野雅史, 津村秀康, 田畑健一, 小林健太郎, 望月康平, 金子志保, 関口茜衣, 川上正悟, 竹中浩二, 早川和重, 岩村正嗣, 馬場志郎: HDR ブラキセラピーの意義. *泌尿器外科* 28(8), 1433-1435. 2015

(Ⅲ) 総説・講座

なし

(Ⅳ) 症例・臨床治験・その他

1. 平野修平、入江啓、嶺井定嗣、石井淳一郎、高嶋力弥、高橋裕一郎、門脇和臣：超音波検査により早期診断・治療が可能であった気腫性膀胱炎の一例。泌尿器外科、26(12):1829-1832, 2013
2. 平田恵理、田中淳一、田畑尚吾、小田友理子、平野修平、立花貴史、入江啓、森永正二郎、竹下啓：発熱と有痛性陰腫大で発症した結節性多発動脈炎の一例。北里医学、45: 95-101, 2015
3. 平野修平、藤田哲夫、大山哲平、名木渉人、金子志保、高口大、田畑健一、松本和将、岩村正嗣：下大静脈内腫瘍塞栓を伴った副腎原発悪性リンパ腫の1例。泌尿器科紀要 62(8):403-406, 2016
4. 平野修平、藤田哲夫、野村恵、望月康平、西盛宏、津村秀康、松本和将、吉田一成、岩村正嗣：腹腔鏡下副腎摘除術にて摘除しえた後腹膜成熟奇形腫の1例。泌尿器科紀要 66(1):5-8, 2020

10. 図表

表 1. 血清 DJ-1 濃度と臨床組織学的特性の関連

	症例 (n)	血清 DJ-1 (ng/ μ L)		p値 ^a
		中央値	範囲	
性別				
男性	135	21.5	0-235.1	0.37
女性	37	27.2	0.8-207.0	
年齢群				
<65 歳	137	20.6	0-235.1	0.50
\geq 65 歳	35	22.0	0-188.9	
病理ステージ				
pTa, pT1	129	23.5	2.3-235.1	0.009
pT2-4	43	15.2	0-207.0	
病理グレード				
1, 2	122	22.4	1.8-235.1	0.49
3	50	20.2	0-188.9	
リンパ節転移				
N0	166	22.0	0-235.1	0.34
N1,2	6	16.1	7.6-29.9	

^a Mann-Whitney *U*-test で分析し, 0.05 未満を有意差とした。

表 2. 根治的膀胱全摘術後の膀胱癌患者における DJ-1 発現と臨床組織学的特徴の関連

	症例 (n)	DJ-1 発現 (n [%])		P値 ^b
		Group 1 ^a	Groups 2-4 ^a	
合計	92	28 (30.4)	64 (69.6)	
性別				
男性	72 (78.3)	22 (30.6)	50 (69.4)	0.96
女性	20 (21.7)	6 (30.0)	14 (70.0)	
年齢				
<65	44 (47.8)	19 (43.2)	25 (56.8)	0.011
\geq 65	48 (52.2)	9 (18.8)	39 (81.2)	
病理ステージ				
pTa, pTis, pT1	20 (21.7)	2 (10.0)	18 (90.0)	0.025
pT2-4	72 (78.3)	26 (36.1)	46 (63.9)	
病理グレード				
1, 2	36 (39.1)	10 (27.8)	26 (72.2)	0.66
3	56 (60.9)	18 (32.1)	38 (67.9)	
Carcinoma in situ				
陰性	80 (87.0)	24 (30.0)	56 (70.0)	0.89
陽性	12 (13.0)	4 (33.3)	8 (66.6)	
リンパ節転移 ^c				
N0	65 (70.7)	17 (26.1)	48 (73.9)	0.039
N1, N2	22 (23.9)	11 (50.0)	11 (50.0)	
リンパ脈管浸潤 ^d				
陰性	32(37.6)	8(25.0)	24(75.0)	0.30
陽性	53(62.4)	19(35.8)	34(64.2)	

^a Group 1 = 核-, 細胞質+; Group 2 = 核+, 細胞質+; Group 3 = 核+ 細胞質-; Group 4 = 核-, 細胞質-. ^b χ^2 検定、0.05 未満を有意 ^c 5 例は判定不能。 ^d 7 例は判別困難。

表 3. Cox 比例ハザード回帰モデルによる根治的膀胱全摘術後の臨床転帰予測のための DJ-1 発現と臨床病理学的因子における多変量解析

Variable	単変量解析			多変量解析		
	ハザード比	95% 信頼区間	P 値	ハザード比	95% 信頼区間	P 値
(A) 全生存期間						
DJ-1 核-, 細胞質+	2.60	1.48 to 4.59	0.001	4.2	2.14 to 8.49	<0.001
年齢 (<65, ≥65)	1.11	0.64 to 1.92	0.72	1.83	0.94 to 3.55	0.075
病理ステージ	3.62	1.56 to 8.40	0.003	2.79	0.96 to 8.12	0.06
病理グレード	1.84	1.01 to 3.35	0.046	1.29	0.66 to 2.55	0.46
リンパ脈管浸潤	2.27	1.19 to 4.32	0.012	1.65	0.79 to 3.45	0.18
リンパ節転移	2.95	1.59 to 5.48	0.001	2.55	1.28 to 5.08	0.008
(B) 無再発生存期間						
DJ-1 核-, 細胞質+	1.94	1.06 to 3.58	0.03	2.43	1.20 to 4.95	0.01
年齢 (<65, ≥65)	0.85	0.48 to 1.51	0.58	1.05	0.53 to 2.08	0.89
病理ステージ	2.64	1.12 to 6.25	0.027	2.03	0.67 to 6.14	0.21
病理グレード	1.28	0.70 to 2.35	0.42	0.94	0.47 to 1.88	0.86
リンパ脈管浸潤	2.66	1.31 to 5.43	0.007	1.87	0.83 to 4.22	0.13
リンパ節転移	3.21	1.73 to 5.98	<0.001	2.60	1.31 to 5.16	0.006
(C) 癌特異的生存期間						
DJ-1 核-, 細胞質+	2.28	1.21 to 4.30	0.01	3.53	1.61 to 7.57	0.001
年齢 (<65, ≥65)	0.90	0.49 to 1.67	0.75	1.25	0.60 to 2.63	0.55
病理ステージ	2.37	0.99 to 5.66	0.052	1.55	0.50 to 4.84	0.45
病理グレード	1.39	0.73 to 2.65	0.32	1.02	0.48 to 2.14	0.96
リンパ脈管浸潤	2.50	1.18 to 5.32	0.017	1.68	0.70 to 4.07	0.25
リンパ節転移	3.70	1.92 to 7.13	<0.001	3.45	1.63 to 7.29	0.001

HR = ハザード比; CI = 信頼区間

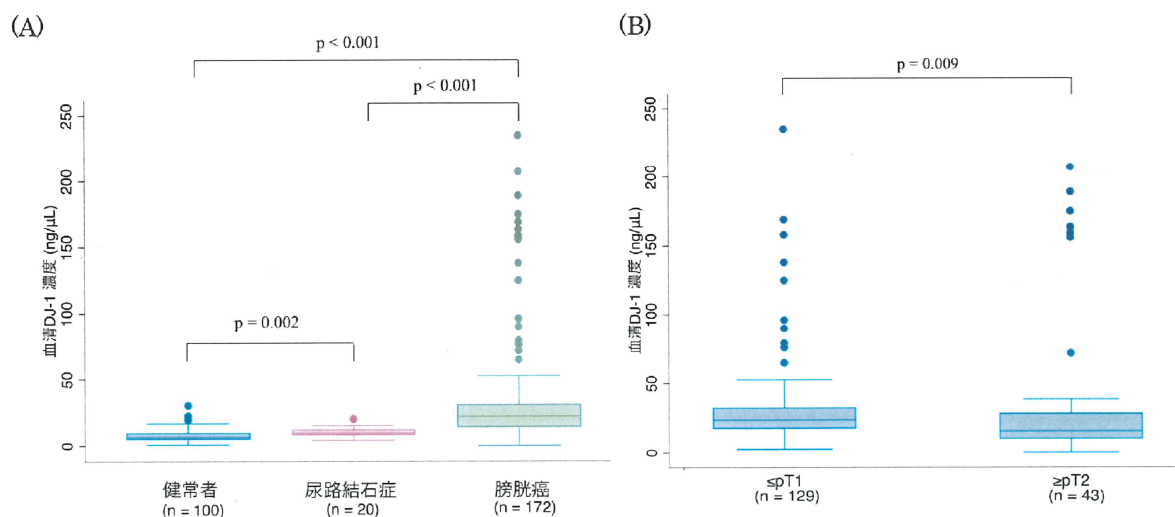


図 1. RPPA 法で計測した血清 DJ-1 濃度 : (A)膀胱癌、健常者、尿路結石の比較 (B)非筋層浸潤膀胱癌と筋層浸潤膀胱癌の比較

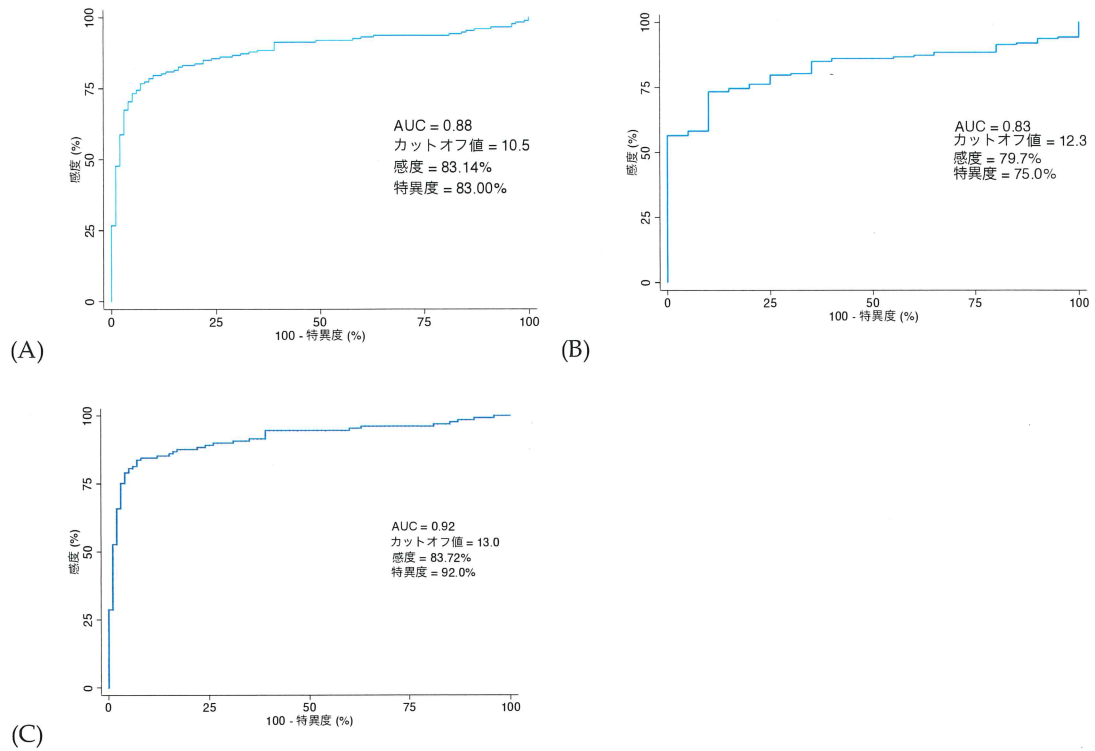


図 2. 膀胱癌術前血清 DJ-1 濃度における ROC 分析 (A) 膀胱癌対健常者 (B) 膀胱癌対尿路結石 (C) Ta/1 膀胱癌対健常者. AUC = area under the curve.

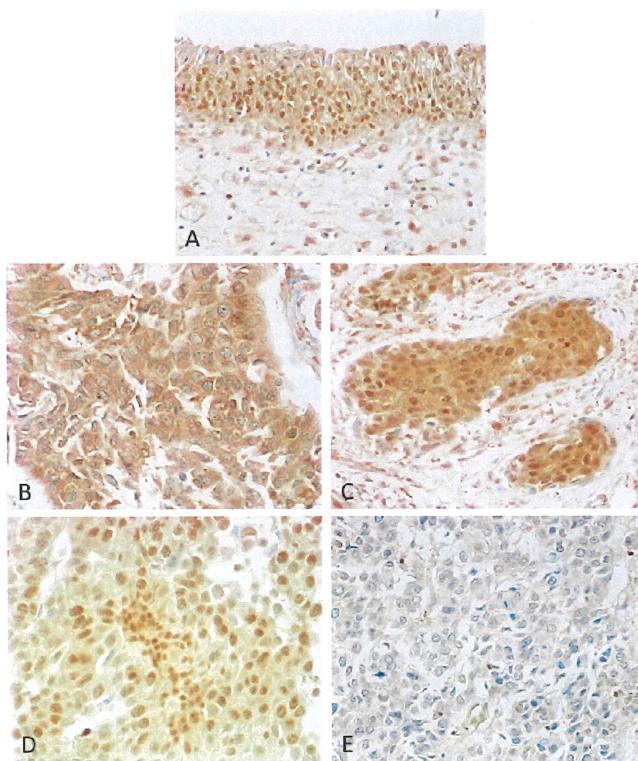


図 3. 正常尿路上皮細胞と尿路上皮癌での DJ-1 発現パターン. (A) 正常尿路上皮細胞の核内染色陽性標本. (B) 細胞質+, 核-: group 1. (C) 細胞質+, 核-: group 2. (D) 細胞質-, 核+: group 3. (E) 細胞質-, 核-: group 4. 400 倍視野.

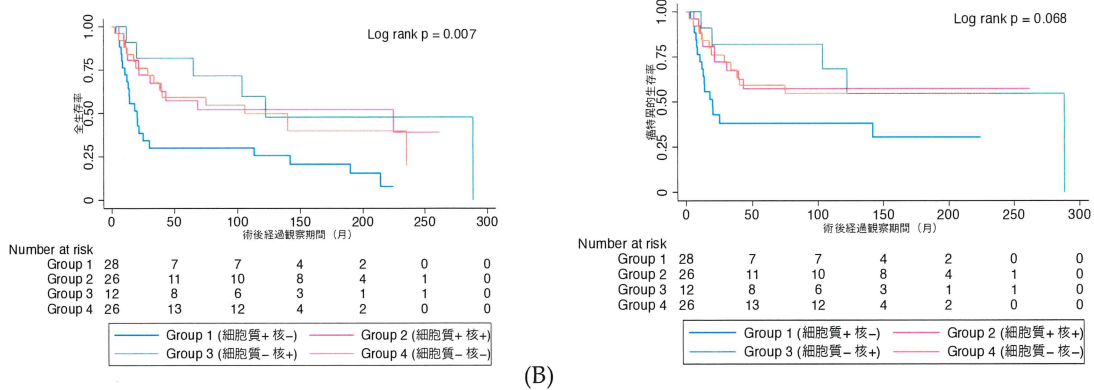


図 4. 根治的膀胱全摘術後患者における DJ-1 発現パターンごとの生存解析 (A) 全生存期間 (B) 癌特異的生存期間 Group 1 = 細胞質+核-; Group 2 = 細胞質+核+; Group 3 = 細胞質-核+; Group 4 = 細胞質-核-

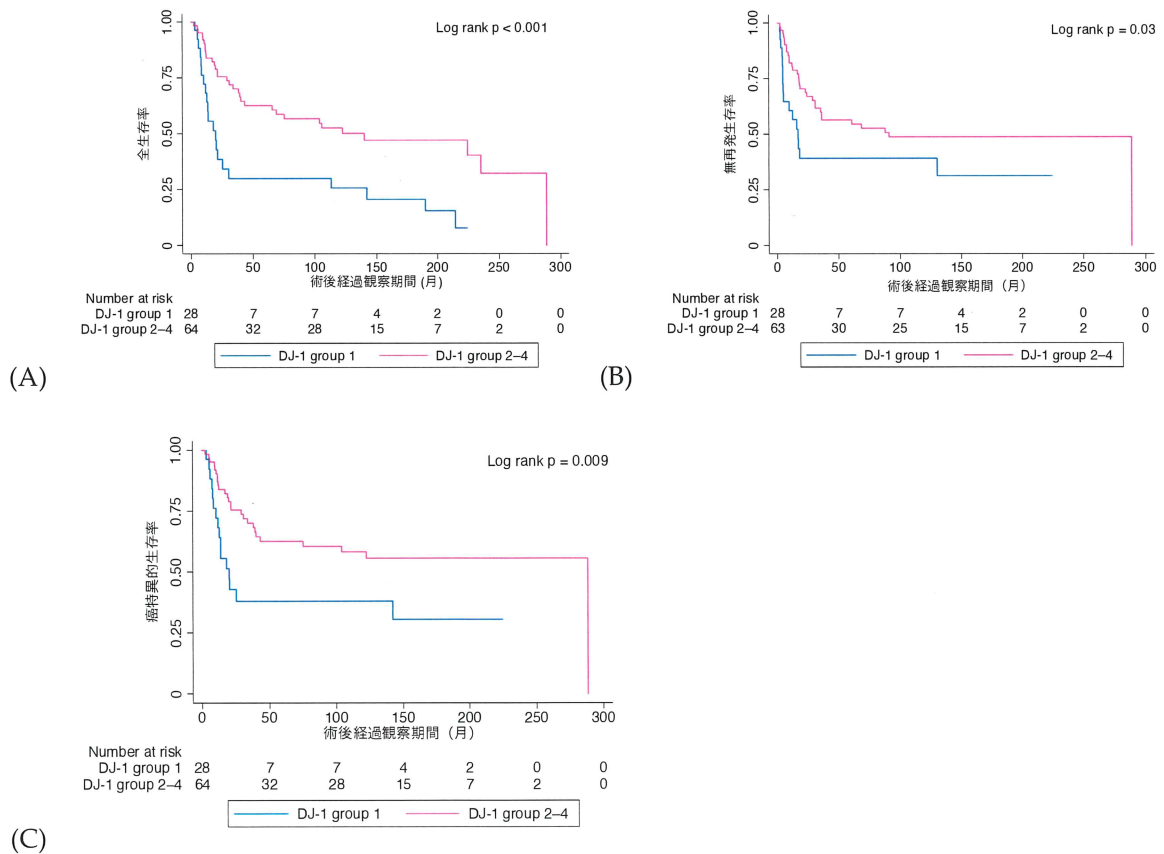


図 5. 根治的膀胱全摘術後患者における DJ-1 発現パターンの Group1 及び Group2-4 の生存解析 (A) 全生存期間 (B) 無再発生存期間 (C) 癌特異的生存期間 Group 1 = 細胞質+核-; Group 2 = 細胞質+核+; Group 3 = 細胞質-核+; Group 4 = 細胞質-核-

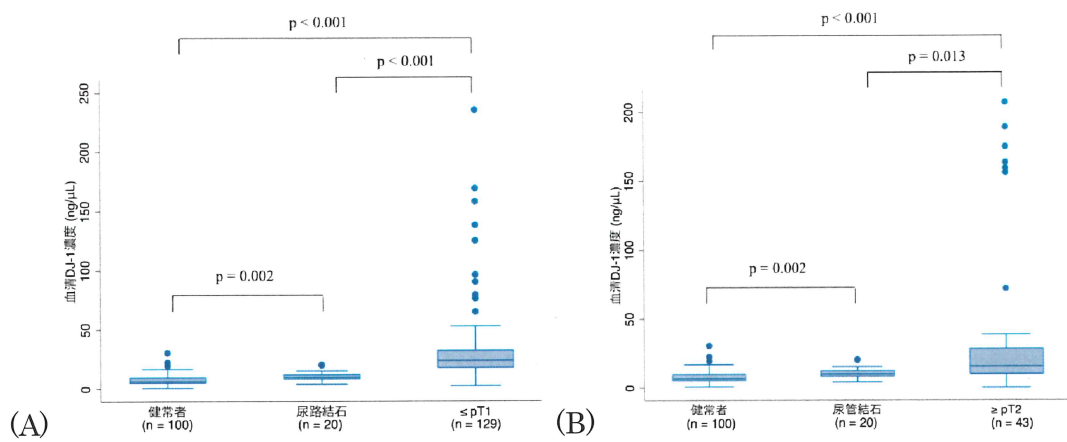


図 S1. RPPA 法で計測した血清 DJ-1 濃度： (A) 非筋層浸潤性膀胱癌、健常者、尿路結石の比較 (B) 筋層浸潤性膀胱癌、健常者、尿路結石の比較

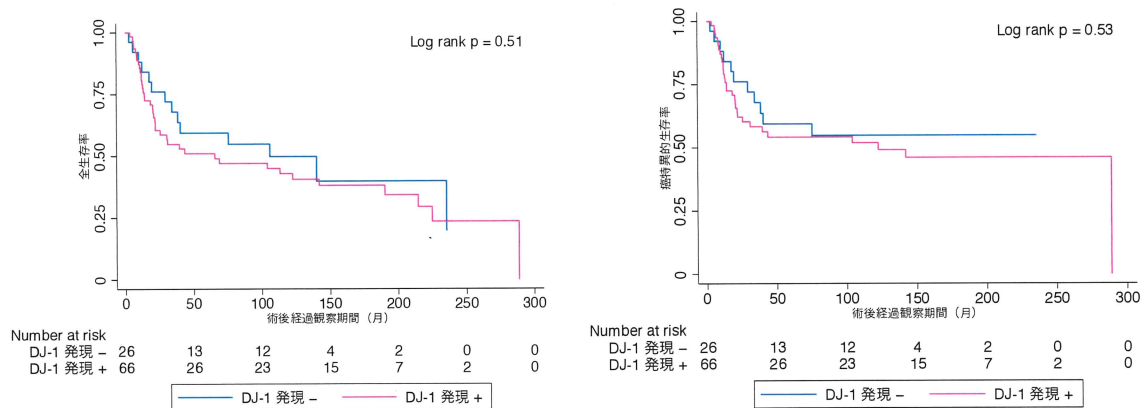
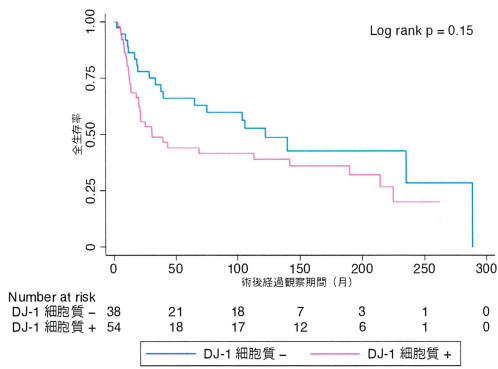
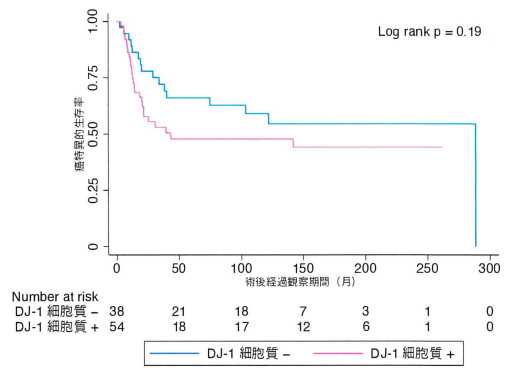


図 S2. 根治的膀胱全摘術後患者における DJ-1 発現の全生存期間と癌特異的生存期間

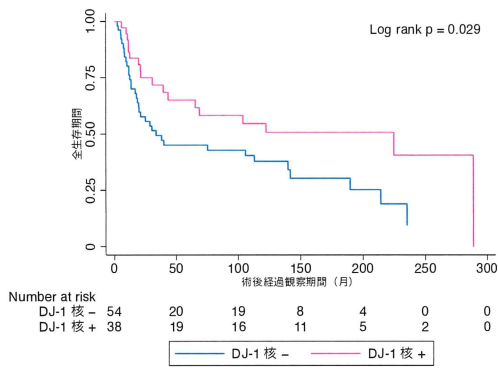


(A)

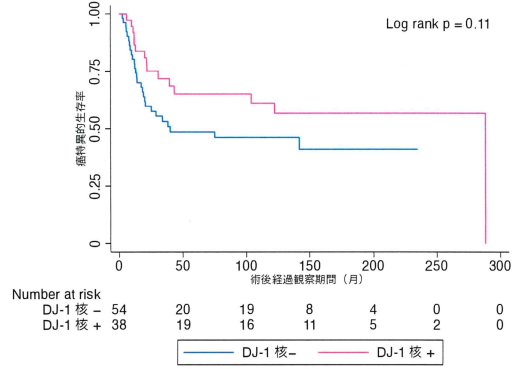


(B)

図 S3. 根治的膀胱全摘術後患者における細胞質内DJ-1発現の生存解析 (A) 全生存期間 (B) 癌特異的生存期間



(A)



(B)

図 S4. 根治的膀胱全摘術後患者における核内DJ-1発現の生存解析 (A) 全生存期間 (B) 癌特異的生存期間