

博士論文

上部尿路癌における Stromal antigen 2 (STAG2) 発現喪失の
臨床病理学的意義と尿路上皮癌におけるその機能に関する研究

宮川 仁平

上部尿路癌における Stromal antigen 2 (STAG2) 発現喪失の
臨床病理学的意義と尿路上皮癌におけるその機能に関する研究

東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻

指導教員：久米 春喜

学位申請者：宮川 仁平

目次

要旨	1
序文	2
1・尿路上皮癌の疫学	2
2・Stromal antigen 2 (<i>STAG2</i>)変異と悪性腫瘍	5
3・尿路上皮癌における <i>STAG2</i> 変異	9
4・ <i>STAG2</i> 変異と <i>TP53</i> 変異の関連	11
目的	12
方法	12
1・病理組織検体	12
2・組織マイクロアレイの作成	13
3・免疫組織化学染色解析	13
4・公開データセット	15
5・細胞株および培地	16
6・遺伝子ノックダウン	17

7・リアルタイム Polymerase Chain Reaction (PCR)	17
8・ウェスタンブロット	20
9・細胞増殖曲線	23
10・細胞周期解析	23
11・統計解析	24
結果	25
1・上部尿路癌における STAG2 発現喪失の頻度と臨床病理学的特徴	25
2・STAG2 発現喪失と Ki-67 低値および p53 正常パターンとの関連	25
3・STAG2 の生存率への影響と Ki-67 の高低による差	29
4・STAG2 発現喪失の有無と p53 パターンによる Ki-67 陽性率	30
5・公開データセットの解析	37
6・STAG2 ノックダウンの確認と増殖能および細胞周期への影響	42
7・STAG2 ノックダウンによる p53 経路への影響	43
考察	53
結論	64

引用文献	65
謝 辞	79

要旨

本研究は尿路上皮癌において高頻度に変異を認める **Stromal antigen 2 (STAG2)** の発現喪失について着目した。上部尿路癌の組織マイクロアレイでは **STAG2** 発現喪失が低異型度・乳頭状・非浸潤癌に有意に高く認められた。しかし生存率への影響は一様ではなく、増殖能が低いあるいは **p53** 正常パターンの症例では予後良好因子であり、逆に増殖能が高いあるいは **p53** 変異パターンの症例では予後不良因子であった。また、**TP53** 正常の膀胱癌細胞株においては **STAG2** のノックダウンによる細胞増殖抑制および **G1** 期細胞の増加、さらには **p53** 経路が亢進していることが示された。以上から、**STAG2** 発現喪失に **p53** 経路が関与していることが示され、分子標的治療の標的になり得ると考えられた。

序文

1・尿路上皮癌の疫学

尿路系(腎盂・尿管・膀胱・尿道)の粘膜は尿路上皮 **urothelium** と呼ばれる細胞からなり、尿路系悪性腫瘍は主に尿路上皮から発生するため、組織型の 90%以上は尿路上皮癌(**urothelial carcinoma**)である。その大部分が膀胱に発生する膀胱癌であり、腎盂・尿管に発生する上部尿路癌(**upper urinary tract carcinoma**)は尿路上皮癌の中の 5%程度とされている[1]。

2017 年の厚生労働省の統計によると、2201 人が腎盂癌、2305 人が尿管癌、8780 人が膀胱癌により死亡しており、合計すると約 13000 人が腎盂・尿管・膀胱癌により死亡していることになる[2]。国立がん研究センターの発表した癌部位別生存率によると、膀胱癌の癌特異的 5 年生存率は全病期で 72.3%、Stage I で 87.8%、Stage II で 59.2%、Stage III で 45.1%、Stage IV で 19.2%と進行例では依然として低い生存率となっている。また、腎盂尿管癌の癌特異的 5 年生存率は全病期で 49.0%、Stage I で 83.9%、Stage II で 72.6%、Stage III で 58.2%、Stage IV で 10.6%となっている[3]。膀胱癌の半数以上がステージ I であるのに対し、腎盂尿管癌はステージ III 以上が約 7 割と進行した状態で診断される症例が多いため、全病期における生存率は膀胱癌よりも低くなっている。

膀胱癌については筋層非浸潤癌であれば内視鏡治療および **Bacillus Calmette-Guerin (BCG)**や抗がん剤の膀胱内注入療法が主体となるが、再発を繰り返すうちに筋層浸潤癌に進展し、膀胱全摘除術が必要となるケースも多い[4]。腎盂・尿管癌については浸潤・非浸潤に関わらず、遠隔転移がなければ腎臓から尿管・膀胱の一部を一塊に切除する腎尿管全摘除術が標準治療である。内視鏡治療や尿管部分切除術など腎温存治療についての検討が進められているが多くの課題を残しており、いまだに標準治療とはなっていない[5]。手術による根治が困難な進行癌あるいは術後に遠隔転移・再発を認めた症例に対してはプラチナ製剤を含む多剤併用化学療法が標準治療であるが、膀胱癌においては生存期間の中央値は 14 ヶ月程度というのが現状である[6]。上部尿路癌については膀胱癌と比較して症例数が少ないため科学的根拠の高い報告は乏しく、膀胱癌と同じ尿路上皮癌であることを根拠に膀胱癌と同じレジメンを適応しているのが現状である。

近年、プラチナ製剤併用化学療法後に再発または進行した尿路上皮癌に対して免疫チェックポイント阻害剤のうち **PD-1** 阻害剤であるペムブロリズマブ(**Pembrolizumab**)が日本でも承認され、二次治療として免疫療法が実臨床でも行われるようになったが、膀胱癌においては奏効率は 21.1%、二次治療開始時からの生存期間の中央値は 10.3 ヶ

月(二次化学療法群は 11.4%と 7.4 ヶ月)と有意差があるもののその効果は限定的である[7,8]。また、奏効が確定した症例においては奏効期間が明らかに延長する **durable response** が得られることが知られているが、その一方で免疫チェックポイント阻害剤の使用により逆に急速に病態が進行する **Hyperprogressive disease** の症例も多数報告されている[9,10]。奏効率には腫瘍における **PD-L1** の発現や腫瘍浸潤リンパ球といった腫瘍微小環境の因子、あるいは腫瘍細胞における変異の多寡などが関与すると言われているが、決定的なバイオマーカーはまだ不明であり、適応症例をいかに絞り込むかが免疫チェックポイント阻害剤の課題とされている[11-13]。

次世代シーケンサーの普及とともにゲノム解析コストが低下したことにより、多くのがん種について網羅的なゲノム解析が進んでいる[14]。その結果、現時点で 30 を超えるがん種についてゲノム・メチル化異常、遺伝子・タンパク質発現異常などと臨床病理学的データを関連付けたデータベースが公開されている。2017 年には次世代シーケンサーによる遺伝子パネル検査である **Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT)** [15]と **FoundationOne® CDx** がアメリカ食品医薬品局 (**Food and Drug Administration; FDA**)で相次いで認可された。それぞれ

468 と 324 のがん関連遺伝子の変異と増幅・欠失といった遺伝子変化の同定が可能であり、分子標的薬のコンパニオン診断としても使用されている。日本においても 2019 年 5 月に前述の FoundationOne® CDx および日本人の癌の変異データから作成された OncoGuide™ NCC オンコパネルが保険収載されるなど、がんゲノム医療が推進されている。その他、東大オンコパネルや Oncomine™ Target Test が先進医療として行われており、それ以外にも様々な遺伝子パネル検査が実施されている[16]。尿路上皮癌においても 2019 年 4 月には *FGFR3* 遺伝子変異または *FGFR2* もしくは *FGFR3* 遺伝子が関与する融合遺伝子を有する局所進行性または転移性尿路上皮癌に対して Erdafitinib が FDA で承認された[17,18]。日本における承認はまだであるが現在臨床試験が進行している最中であり、今後は尿路上皮癌においても個々の腫瘍の変異に応じた分子標的治療が期待されている。

2・Stromal antigen 2 (STAG2)変異と悪性腫瘍

細胞分裂の G2 期において DNA 複製が行われ M 期に分裂するまで、複製された DNA は一対の姉妹染色分体を形成する。姉妹染色分体の接着にはコヒーシン複合体(Cohesin complex)と呼ばれるタンパク複合体が主要な役割を果たしている [19-21]。コヒーシン複合体は

SMC1・SMC3・RAD21・STAG1/STAG2 という 4 つのサブユニットから構成され、染色体を取り巻くようにリング状の構造をとっている(図 1)。減数分裂では STAG1/STAG2 の代わりに STAG3 がサブユニットを構成する[22]。STAG1 は STAG2 のパラログであり、STAG2 と同様にコヒーシン複合体を形成する。STAG2 によるコヒーシン複合体はセントロメア領域の接着に関与し、STAG1 によるコヒーシン複合体はテロメア領域の接着に関与するとされ、STAG2 が変異・喪失した状態では STAG1 によるコヒーシン複合体のみで染色体の接着を行うことになる[23-25]。STAG2 をコードする遺伝子 *STAG2* は X 染色体上(Xq25)に位置しており、*STAG1* は 3 番染色体(3q22.3)、*STAG3* は 7 番染色体(7q22.1)に位置している。コヒーシン複合体は姉妹染色分体の接着以外に、染色体の組み換え、転写調節、および DNA 修復に関わっているとされている[26,27]。

コヒーシン変異と悪性疾患との関連については Barber らにより 2008 年に最初に報告された[28]。その中で *STAG2* 変異との関連が多く報告されており、2010 年に急性骨髄性白血病および慢性骨髄単球性白血病において RAD21 の喪失とともに報告され[29]、さらに 2011 年に Solomon らが結腸癌・神経膠芽腫・Ewing 肉腫・悪性黒色腫・頭頸部癌・血液腫瘍の細胞株および原発腫瘍において *STAG2* 変異と異数体(Aneuploidy)との関連を報告した[30]。その他の固形癌においても

STAG2 発現喪失が確認されている[31]。Lawrence らによると、STAG2 は TP53、RB1、KRAS、CDKN2A などと並んで 4 種以上の悪性腫瘍に関与する 12 の遺伝子のうちのひとつとされている[32]。Ewing 肉腫や血液悪性腫瘍および膵癌においては STAG2 はがん抑制遺伝子とされ、その変異は予後不良因子であると考えられているが、その機能については未だ不明瞭な部分が多い[33-36]。

STAG2 変異は治療標的としても期待されている。2016 年に急性骨髄性白血病と診断されたが抗癌剤の治療で奏功が得られなかった 66 歳女性に対して医療人工知能である Watson for Genomics がわずか 10 分で二次性白血病であることを突き止め、治療の変更により数カ月で回復した例が話題となった[37]。その際に原因となった遺伝子が STAG2 であり、それを標的とした治療が奏功した例であった。DNA 一本鎖切断後の塩基除去修復を阻害する Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 阻害剤が STAG2 に変異のある神経膠芽腫や骨髄異形成症候群で有効との報告があるが、Ewing 肉腫については感受性に差はないという報告もある。その他、STAG2 発現喪失状態がインターフェロンへの反応を向上させるという報告や、逆に悪性黒色腫においては BRAF 阻害剤への抵抗性を示すという報告もあり、治療標的としての意義は現時点では不明瞭の状態である[38-44]。

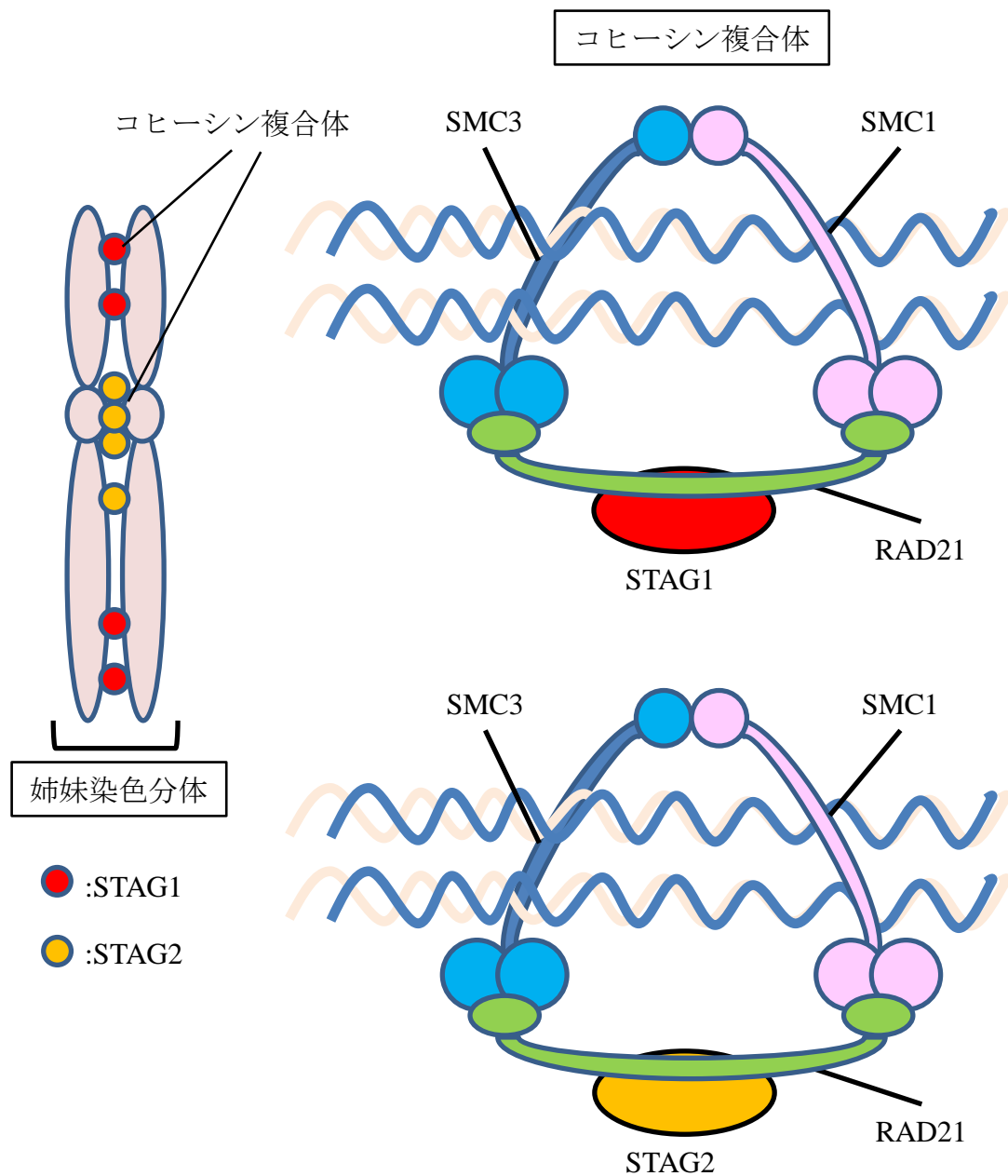


図1. コヒーシン複合体の構造(文献35より改変)

コヒーシン複合体はDNAを取り囲むようなリング状の構造をとり、姉妹染色分体の接着に関与する。コヒーシン複合体はSMC1, SMC3, RAD21, そしてSTAG1/STAG2から構成され、STAG2はセントロメア領域、STAG1はテロメア領域のコヒーシン複合体を構成する。

3・尿路上皮癌における *STAG2* 変異

膀胱癌における *STAG2* 変異については 2013 年に同時に 3 つの異なるグループが免疫組織化学染色、全エクソンシーケンスといった手段で *STAG2* 変異および *STAG2* 発現喪失を報告した[45-47]。結果として膀胱癌において 16-32%の *STAG2* 変異を同定し、*TP53*, *FGFR3* について頻度の高い変異として注目を浴びた。その 85%以上が短縮型変異(Truncating mutation)であり、最も頻用されている J-12 という *STAG2* タンパクの C 末端を認識する抗体による免疫組織化学染色では完全に発現喪失(Complete loss)として認められる[45,46]。浸潤癌に比べて非浸潤癌で変異の頻度が高い傾向を認め、それ以降の研究でも同様の傾向が確認されている[47-50]。生存率との関連については予後良好因子であるという報告と予後不良という報告とが混在しているが、おおむね予後良好因子としての報告が多い点が Ewing 肉腫や血液腫瘍の知見と異なる。筋層非浸潤膀胱癌について *STAG2* 発現喪失は再発率・進展率ともに有意な予後良好因子とされている[51]。

上部尿路癌については Sfakianos らが MSK-IMPACT による 83 例のゲノム解析を報告している[52]。22%にあたる 18 例で *STAG2* 変異を認め、うち 16 例(89%)は短縮型変異であった。低異型度非浸潤癌に有意に相関した。遠隔転移のリスクは有意に低かったが、癌特異的生

存率が高い傾向にあるものの有意差が認められなかったと報告されている[53]。変異率や変異の傾向、予後を含めて膀胱癌と同様の結果であり、*STAG2* 変異の機能的意義は膀胱癌と上部尿路癌で共通していると考えられる。

いままでに尿路上皮細胞および膀胱癌細胞株に対する *STAG2* のノックダウン・ノックインを行った研究はいくつか報告されており、正常尿路上皮細胞株である SV-HUC-1 に *STAG2* をノックダウンしたところ異数体が認められたことや、テロメラーゼ活性を欠く正常細胞の細胞株ではテロメアの組換えによる短縮の抑制や細胞老化の回避をもたらしたことから、発癌の初期段階に関与することが示唆されている[54,55]。また、*STAG2* 変異細胞株においてはテロメアの組換えの促進やテロメラーゼの活性化を介したテロメアの維持が行われる[55]。しかし、*STAG2* ががん抑制遺伝子として機能するという報告[56]もある一方で、他の癌腫における結果と異なり、多くの尿路上皮癌の細胞株については *STAG2* ノックダウンによる異数体の出現は認められず、さらに多くの文献では増殖能に影響はないという結果であった[45,47,54]。以上から、尿路上皮癌においてはコヒーシン変異による染色体不安定性から異数体が出現することではなく、コヒーシン変異による転写異常が関与しているのではないかと示唆されている[45]。

4・STAG2 変異と TP53 変異の関連

STAG2 変異と TP53 変異の関連については Ewing 肉腫においていくつか報告がある[33,57,58]。もともと Ewing 肉腫において STAG2 変異は予後不良因子とされているが、STAG2 変異と TP53 変異が併存した場合によりさらに予後不良となることが報告されている。Tirode の報告では 299 例の Ewing 肉腫の検討で 39 例(13%)に STAG2 変異、16 例(5%)に TP53 変異を認め、8 例(3%)で STAG2 変異と TP53 変異が併存していた。予後との関連では STAG2・TP53 とともに正常群が最も予後良好で、STAG2 変異と TP53 変異の併存群が最も予後不良という結果であった[33]。基礎研究に関しては Mondal らが、p53 経路が正常な網膜色素上皮・皮膚線維芽細胞および星状膠細胞の細胞株に対して STAG2 をノックダウンしたところ p53-p21 経路を介して細胞周期停止が生じ、さらに TP53 を同時にノックダウンしたところ増殖能が改善したことを報告した[59]。すなわち STAG2 発現喪失により分裂期の染色体に異常が生じた際に p53 経路を介した DNA 損傷に対する防御機構が働いて増殖が停止したという報告である。尿路上皮癌については STAG2 変異と TP53 変異または p53 経路との関連を示した報告は乏しく、尿路上皮癌細胞株を用いた報告はいまだない[47]。

目的

尿路上皮癌において *STAG2* は変異頻度が高く、発癌への関与も示唆され、分子標的治療の標的として期待されながらもその機能的意義は不明瞭な部分が多いという現状である。そこで本研究では、いまだ報告のない上部尿路癌における *STAG2* 発現喪失の臨床病理学的意義について Ki-67 と p53 の免疫組織化学染色と合わせて検討を行った。さらに、同じ尿路上皮癌である膀胱癌細胞株を用いて *STAG2* をノックダウンすることによる変化と *TP53* 変異または p53 経路との関連を評価することで *STAG2* 発現喪失の尿路上皮癌における機能的意義を検討した。

方法

1・病理組織検体

1996 年から 2012 年の間に東京大学医学部附属病院において腎尿管全摘術を施行した上部尿路上皮癌 171 例を対象とした。術前化学療法を受けた症例はなかった。すべての症例のヘマトキシリンーエオジン(H&E)染色を、臨床経過を知らない単独の病理専門医が見直し、2016 年 WHO 分類に従って腫瘍の組織型、異型度を判定し、TNM 分類に従ってステージ分類を行った[60]。2017 年 8 月まで予後を追跡し、

臨床病理学的情報を併せて解析を行った。

本研究については東京大学大学院医学系研究科・医学部研究倫理委員会によって承認を受けた(審査番号：3124)。

2・組織マイクロアレイの作成

手術検体から作成された H&E 染色スライドを確認して腫瘍の中心部と辺縁部の両方を含む標本を病理専門医が選択した。辺縁部は浸潤先進部もしくは非浸潤癌では粘膜固有層に最も近い部分とし、中心部は腫瘍組織の中心の代表的な部分とした。Tissue Microarrayer (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, USA)を使用してパラフィン包埋された標本からそれぞれ直径 2 mm の円柱形のコアを打ち抜き、24 症例から採取された計 48 個のコアを 1 個の新たなパラフィンプロックに移植し、組織マイクロアレイブロックを作成した。最終的に 8 個のブロックを作製し、薄切して未染色プレパラートを作製した。

3・免疫組織化学染色解析

上記の通り作製した組織マイクロアレイの未染色プレパラートを用いて STAG2・Ki-67・p53 の免疫組織化学染色を行った。STAG2 の C 末端に結合するマウスモノクローナル抗 STAG2 抗体(clone J-12,

1:20 dilution, Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, Dallas, TX, USA)を使用し、自動染色装置である Ventana Benchmark® XT Autostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA)の標準プロトコールを用いて免疫組織化学染色を行った。Cell Conditioning Solution (CC1-Tris-based EDTA buffer, pH 8.0; Ventana Medical Systems)を用いて抗原賦活化を行った。発色には I-VIEW DAB Universal Kit (Ventana Medical Systems)を使用し、対比染色としてヘマトキシリン染色を行った。Ki-67 の染色にはマウスモノクローナル抗 Ki-67 抗体(clone MIB-1; 1:200 dilution; Dako, Carpinteria, CA, USA)、p53 の染色にはマウスモノクローナル抗 p53 抗体(clone DO-7, 1:50 dilution; Leica Biosystems, Nussloch, Germany)を使用し、STAG2 と同様の手順で免疫組織化学染色を行った。

免疫組織化学染色の評価は 2 名の病理医がそれぞれ行い、一致しない評価については議論の上で判定を行った。検体内のリンパ球を陽性コントロールとし、STAG2 は腫瘍細胞の核が完全に染色されないものを発現喪失と判定した。リンパ球が染色されない検体については Whole section での染色で判定を行った。Ki-67 は細胞周期における G1 期・S 期・G2 期・M 期に核内に発現するタンパクであり、細胞分裂を止めている休止期の G0 細胞には発現しないことから細胞増殖のマー

カーとして使用されている[61]。Ki-67は核が染色される細胞を陽性細胞としてカウントし、全腫瘍細胞中の陽性率を測定した。陽性率の中央値で症例を半分に分け、陽性率が高い群を高値、低い群を低値に分類した[61-65]。p53に関しては腫瘍細胞の核が強く染色されるものを陽性細胞とし、腫瘍細胞中の陽性細胞が50%以上となるものまたは完全に染色されないものを変異パターン、それ以外のものを正常パターンと判定した[65-69]。

4・公開データセット

現在公開されている MSK-IMPACT によるシーケンスの公開データセット、Upper Tract Urothelial Cancer (MSK, Eur Urol 2015)を使用した[52]。上部尿路癌については85例のシーケンスデータが公開されており、各症例の *STAG2* 変異と p53 経路の異常を抽出し、性別・年齢・腫瘍の部位(腎盂癌か尿管癌か)・異型度・上皮内癌併存の有無・深達度・リンパ節転移の有無といった臨床病理学的因子と遠隔転移や癌死の有無と観察期間といった予後情報を併せて解析を行った。MDM2 タンパクは p53 を制御する主要なユビキチンリガーゼであり、MDM2 の過剰発現は p53 を著しく低下させることから、それをコードする遺伝子 *MDM2* の増幅が p53 経路の異常を意味する[70,71]。今回は

TP53 変異だけでなく *MDM2* 増幅を併せて *p53* 経路異常と判定した。

5・細胞株および培地

樹立された上部尿路癌の細胞株は一般に流通していないため、同じ尿路上皮癌であり *STAG2* 変異のない膀胱癌細胞株(T24, RT-112, 5637, SW800)を American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA)より購入した。いずれも 10% fetal bovine serum (FBS)および 1% 抗生物質(penicillin & streptomycin)を添加して Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)にて 5% CO₂ インキュベータで 37℃で培養を行った。細胞株の *TP53* 変異については International Agency for Research on Cancer (IARC) TP53 Database に公開されており、T24 は c.378 C>G というナンセンス変異、5637 は c.839 G>C というミスセンス変異、RT-112 は c.548 C>G と c.743 G>A という 2 つの変異が報告され、それぞれナンセンス変異とミスセンス変異であった。5637 と RT-112 のミスセンス変異はいずれも無機能(non-functional)と報告されている。SW800 については IARC TP53 Database には情報が掲載されていないが、Earl らにより *TP53* は Wild type であると報告されている[72]。細胞株の特性については表 1 にまとめる[73]。

6・遺伝子ノックダウン

STAG2 に対する small interfering RNA (siRNA) pool (siGENOME Human *STAG2* siRNA SMARTPool)を Dharmacon (Lafayette, CO, USA) より購入した(以下、*STAG2* siRNA)。陰性コントロールとして siGENOME Non-Targeting Control siRNA #2(#D-001210-01-50, Dharmacon)(以下、control siRNA)を使用した。トランスフェクション試薬として Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて $5\sim 20 \times 10^4$ 個/ml の細胞に対して 5nM の終濃度で siRNA をトランスフェクションした。RNAiMAX と siRNA の希釈には Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific)を使用した。ノックダウン効率はトランスフェクションの 48 時間後に定量的 RT-PCR 及びウエスタンブロットを用いて確認を行った。

7・リアルタイム Polymerase Chain Reaction (PCR)

Total RNA の抽出には ISOGEN II (Nippon Gene. Co, Toyama, Japan)を用いてプロトコールに従って行った。抽出した RNA 濃度は NanoDrop (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定し、純度は A260/280 が 1.8 以上、A260/230 が 1.0 以上であることにより確認した。

逆転写反応は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix(Toyobo Co.,

Tokyo, Japan)を用いて行った。RNA 量が 500ng/6 μ l となるよう RNase フリー水で調整し、65℃で 5 分間加熱した後に 4x DN Master Mix を 2 μ l 加えて 37℃で 5 分間、5x RT Master Mix II を 2 μ l 加えて 37℃で 15 分、50℃で 5 分、98℃で 5 分間加熱して逆転写反応を行い、相補的 DNA (cDNA)を合成した。

定量的 PCR には Thermal Cycler Dice (Takara Bio, Kusatsu, Japan) を使用し、KAPA SYBR FAST qPCR Kit (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan) を用いて検出した。PCR 条件として、95℃で 1 分加熱後、熱変性は 95℃で 5 秒間、アニーリングと DNA 伸長を 60℃で 30 秒間、サイクル数は 40 サイクル行った。増幅後に解離曲線解析を行い、プライマーダイマー副産物の有無を確認した。サンプル間の相補鎖 DNA 量の変動を補正するため glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を内部コントロールとして用い、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて相対的に定量化した。コントロール群の発現量を 100 %として発現比率を算出した。使用したプライマーの配列を以下の表 2 に示す。

表 1. 使用した細胞株の性質

細胞株	原発	組織型	深達度	異型度	年齢	性別	<i>TP53</i> 変異
T24	膀胱	UC	不明	G3	81	女性	ナンセンス
5637	膀胱	UC	不明	G2	68	男性	ミスセンス
RT-112	膀胱	UC	pTa	G2	不明	女性	ナンセンス&ミスセンス
SW800	膀胱	UC	不明	G1	不明	男性	なし

UC: 尿路上皮癌(urothelial carcinoma)

表 2. 使用したプライマーの配列

Primer	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
<i>GAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTCGGA	GAAGATGGTGATGGGA
<i>STAG2</i>	TCCTTCTGGTCCAAACCGAAT	ACCGACTGCATAGCACTCTTG
<i>STAG1</i>	GGAGTCCTGATTCGACAGTGT	AACCCGTCAAAAGGGAGATTAC
<i>CDKN1A</i>	TGTCCGTCAGAACCCATGC	AAAGTCGAAGTTCCATCGCTC
<i>BAX</i>	CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
<i>GADD45A</i>	GAGAGCAGAAGACCGAAAGGA	CACAACACCACGTTATCGGG

8・ウエスタンブロット

培養細胞に対して 4℃ に冷却した RIPA バッファー (50mmol/l-Tris-HCl pH7.6, 150mmol/l-NaCl, 1(w/v)%-Nonidet P-40 Substitute, 0.5(w/v)% Sodium - Deoxycholate, 0.1(w/v)% Sodium dodecyl sulfate(SDS)) (Nacalai tesque, Kyoto, Japan)に Protease inhibitor cocktail (AEBSF、アプロチニン、ベスタチン、E-64、ロイペプチンヘミ硫酸塩-水和物、ペプスタチン A) (Nacalai tesque)を 1%の濃度で加えた溶液で溶解し、超音波破碎装置で 1 分ほど超音波処理を行った後に 4℃・10,000 x G で 10 分間遠心し、上清を回収した。Pierce 660nm Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)によりタンパク量を定量した。SDS-PAGE 用試料緩衝液(Nacalai tesque)にメルカプトエタノールを添加して 95℃で 5 分間還元処理を行った。Any KD ミニプロテイン TGX プレキャストゲル(Bio-rad, Hercules, CA, USA)およびミニプロテイン Tetra セルシステム(Bio-rad)を使用してポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行い、タンパクを分子量により分離した。サンプルごとのロードするタンパク量を 5~7.5 μ g/lane に調整した。泳動後はセミドライ法で Pore size 0.2 μ m のポリフッ化ビニリデンメンブレンに 15V 40 分間で転写を行った。Blocking One (Nacalai tesque)に浸して 30 分間ブロッキングを行い、一次抗体反応および二次抗体反応

を行った。検出には ECL Select Western Blotting Detection System (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, England)を用い、ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare UK Ltd)により撮影を行った。Image Lab ソフトウェア(Bio-rad)を用いてシグナルの数値化を行い、各群の β -Actin の数値を用いてシグナルの標準化を行った。ポジティブコントロールには C32 Whole Cell Lysate (sc-2205, Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, Dallas, TX, USA)を使用した。

一次抗体反応にはそれぞれマウスモノクローナル抗 STAG2 抗体(clone J-12, 1:200 dilution, Santa Cruz Biotechnology)、マウスモノクローナル抗 STAG1 抗体(clone 2E9, 1:500 dilution, Abnova, Taipei City, Taiwan)、マウスモノクローナル抗 p53 抗体(clone DO-7, 1:200 dilution, Santa Cruz Biotechnology)、マウスモノクローナル抗 p21 抗体(clone DCS60, 1:2000 dilution, Cell Signaling Technology; CST, Danvers, MA, USA)、マウスモノクローナル抗 β -Actin 抗体(clone AC-74, 1:5000 dilution, Sigma-aldrich Japan, Tokyo, Japan)を使用した。二次抗体反応には HRP 標識マウス IgG 抗体(1:2000 dilution, Proteintech, Tokyo, Japan)を使用した。使用した抗体一覧を表 3 に示す。

表 3. 使用した抗体一覧

抗原	サイズ(kDa)	ホスト	抗体	供給元	希釈
β -Actin	42	マウス	AC-74	Sigma	1:5000
STAG2	141	マウス	J-12	SCBT	1:200
STAG1	144	マウス	2E9	Abnova	1:500
p53	53	マウス	DO-7	SCBT	1:200
p21	21	マウス	DCS60	CST	1:2000

Sigma: Sigma-Aldrich, SCBT: Santa Cruz Biotechnology, CST: Cell Signaling Technology

二次抗体	供給元	希釈
Goat anti-mouse IgG (H+L), HRP conjugate	Proteintech	1:2000

IgG: Immunoglobulin G , HRP: Horseradish peroxidase

9・細胞増殖曲線

6 ウェルプレートに T24, 5637 は 5×10^4 cells/ml, RT-112, SW800 は 10×10^4 cells/ml に調整して 2ml ずつ播種した。control siRNA, *STAG2* siRNA についてそれぞれトランスフェクションを行い、48 時間後、96 時間後の細胞の形態を観察し記録した。同時に各種細胞株の細胞数を血球計算盤を用いて計測した。血球計算盤の 4 隅にある 4 区画の細胞数を計 2 回計測し、その 2 回の平均値から細胞数を算出した。算出した細胞数から増殖曲線を作成した。

10・細胞周期解析

細胞周期は Propidium Iodide Flow Cytometry Kit (Abcam)を用いた Propidium Iodide (PI) による核染色を Fluorescence activated cell sorter (FACS) (BD Biosciences, San Jose, Canada)により検出して解析した。トランスフェクションして 72 時間経過した培養細胞を PBS で洗浄し、トリプシン処理を行って細胞を回収した。さらに PBS で洗浄した後に 300G で遠心して上清を破棄、PBS $400 \mu\text{l}$ に再懸濁して 100%エタノール $800 \mu\text{l}$ を追加し、最終的に 66%のエタノールで 2 時間以上細胞固定を行った。その後、遠心して上清を破棄、PBS で洗浄を行った。再度遠心して上清を破棄した後に、PBS に PI と RNase を加えた染色液

に浸して 37℃で 30 分静置した。静置後は解析まで 4℃に冷却して保存した。FACS では最低 10,000 細胞を解析できるように検出を行い、FCM Express 7 (De Novo Software, Pasadena, CA, USA)ソフトウェアにより G0/G1 期・S 期・G2 期の比率を解析した。

11・統計解析

統計解析は JMP Pro(version 14.2.0; SAS Institute Japan Ltd, Tokyo, Japan)ソフトウェアを使用した。カテゴリーデータの解析は Fisher の正確検定を用い、無転移生存率(Metastasis-free Survival: MFS)および癌特異的生存率(Cancer-specific Survival: CSS)は Kaplan-Meier 曲線および log-rank 検定を行って解析した。交絡因子の調整のため Cox 比例ハザードモデルを用いて単変量および多変量解析を行った。多変量解析では単変量解析で傾向の強い因子を説明変数として選択した。STAG2 発現喪失と他の因子の交互作用の P 値($P_{\text{interaction}}$)は Cox 比例ハザードモデルを用いて STAG2 発現喪失と各因子のクロス積の尤度比検定により算出した。Ki-67 値の群間比較および複数回のコントロールに対する比をとった値の群間の比較、細胞増殖能解析および細胞周期解析における群間の比較についてはいずれも Wilcoxon の順位和検定を用いて行った。 P 値は両側検定で 0.05 未満を有意と判断した。

結果

1・上部尿路癌における STAG2 発現喪失の頻度と臨床病理学的特徴

代表的な STAG2 の免疫組織化学染色像を図 2 に示す。171 例中 STAG2 発現喪失は 28 例(16%)で認められた。その他の臨床病理学的特徴については男性・腎盂腫瘍に多くみられ、乳頭状・低異型度・非浸潤性腫瘍で発現喪失の頻度が高かった。上皮内癌成分の併存は STAG2 発現喪失症例で有意に低かった。STAG2 発現喪失は Ki-67 低値と有意に相関し、p53 正常パターンと相関する傾向を認めた(表 4)。

2・STAG2 発現喪失と Ki-67 低値および p53 正常パターンとの関連

Ki-67 陽性率の中央値は 9% (0.02%-92%)であったため、9%以上を高値、9%未満を低値と分類した。STAG2 発現喪失群では有意に Ki-67 低値が多く ($P = 0.0001$)、p53 正常パターンが多い傾向にあった ($P = 0.051$)。

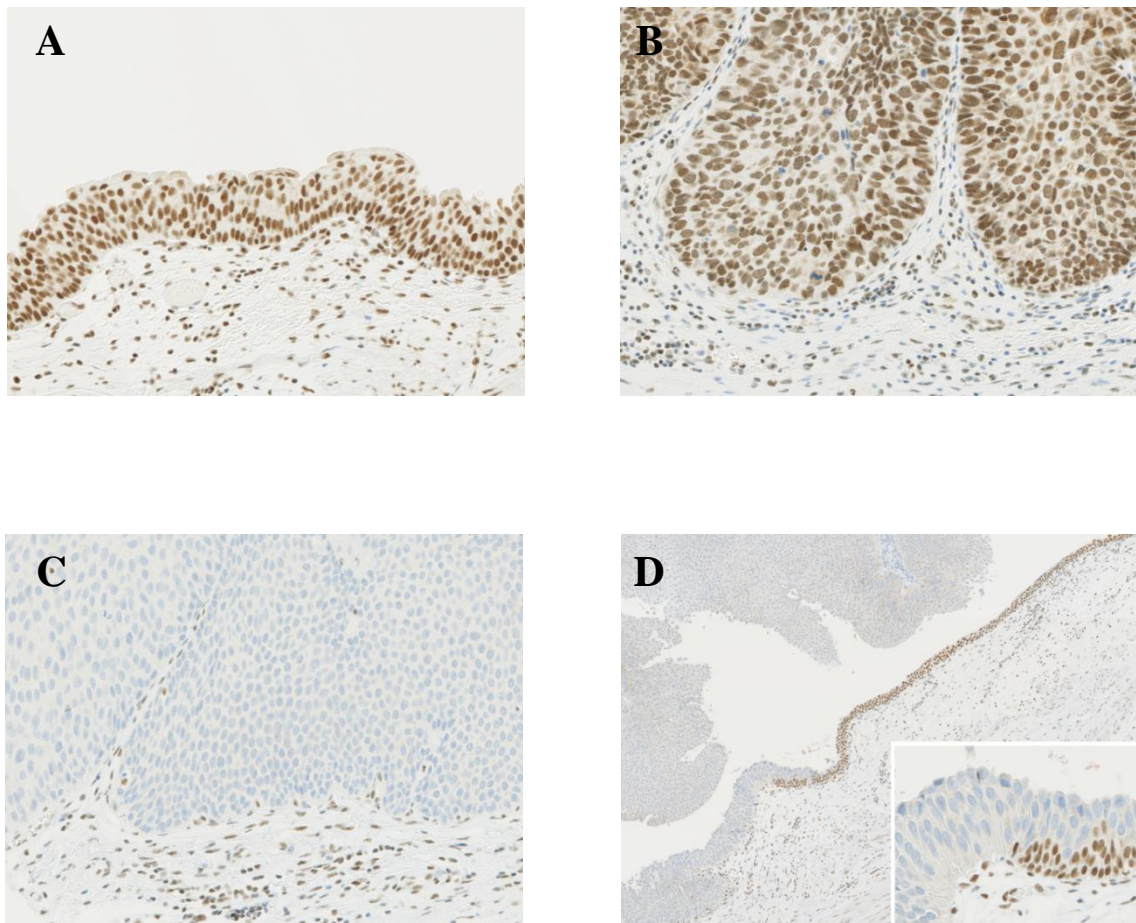


図2. STAG2免疫染色の代表図

正常尿路上皮はSTAG2が核内で陽性となる(A, 200倍)。STAG2陽性の非浸潤性乳頭状腫瘍の代表図(B, 200倍)。腫瘍細胞でSTAG2は陰性であるが、間質のリンパ球は陽性である(C, 200倍)。正常尿路上皮とSTAG2発現喪失腫瘍細胞との境界は明確に分かれている(D, 全体:40倍, 右下:400倍)。

表 4. 171 例の STAG2 発現喪失の有無と臨床病理学的特徴

臨床病理学的因子	症例数	STAG2		P 値
		正常	発現喪失	
全例	171	143 (84%)	28 (16%)	
性別				0.013
男性	119	94 (66%)	25 (89%)	
女性	52	49 (34%)	3 (11%)	
年齢				1.00
70 歳未満	93	78 (55%)	15 (54%)	
70 歳以上	78	65 (45%)	13 (46%)	
左右				0.42
左	86	74 (52%)	12 (43%)	
右	85	69 (48%)	16 (57%)	
膀胱癌の既往				0.79
なし	140	116 (81%)	24 (86%)	
あり	31	27 (19%)	4 (14%)	
腫瘍部位				0.035
腎盂	103	81 (57%)	22 (79%)	
尿管	68	62 (43%)	6 (21%)	
腫瘍形態				0.0099
乳頭状	126	100 (70%)	26 (93%)	
非乳頭状	45	43 (30%)	2 (7%)	
異型度				0.0042
低異型度	19	11 (8%)	8 (29%)	
高異型度	152	132 (92%)	20 (71%)	
脈管侵襲				0.41
なし	97	79 (55%)	18 (64%)	
あり	74	64 (45%)	10 (36%)	

表 4(続き)

臨床病理学的因子	症例数	STAG2		P 値
		正常	発現喪失	
上皮内癌の併存				0.0018
なし	88	66 (46%)	22 (79%)	
あり	83	77 (54%)	6 (21%)	
深達度				<0.0001
pTa	37	21 (15%)	16 (57%)	
pTis	7	7(5%)	0(0%)	
pT1	31	28 (20%)	3 (11%)	
pT2	18	18 (13%)	0 (0%)	
pT3	69	60 (42%)	9 (32%)	
pT4	9	9 (6%)	0 (0%)	
リンパ節転移				0.74
なし	152	126 (88%)	26 (93%)	
あり	19	17 (12%)	2 (7%)	
術後補助化学療法				1.000
なし	123	103 (72%)	20 (71%)	
あり	48	40 (28%)	8 (29%)	
喫煙歴				0.050
なし	68	62 (46%)	6 (24%)	
あり	93	74 (54%)	19 (76%)	
p53				0.051
正常パターン	112	89 (62%)	23 (82%)	
変異パターン	59	54 (38%)	5 (18%)	
Ki-67				0.0001
低値	83	60 (42%)	23 (82%)	
高値	88	83 (58%)	5 (18%)	

3・STAG2 の生存率への影響と Ki-67 の高低による差

STAG2 発現喪失の有無で生存曲線を作成したところ、STAG2 発現喪失群で MFS・CSS とともに生存率が高い傾向にあったが、log-rank 検定では有意差は認められなかった(それぞれ $P = 0.19$, $P = 0.46$)(図 3)。単変量解析および多変量解析では、MFS・CSS とともに STAG2 発現喪失は有意な予後規定因子とはならなかった(表 5, 6)。異型度については低異型度群には遠隔転移および癌死例がないためハザード比の算出ができず、術後補助化学療法については病理診断結果に大きく左右されることから、この両者は多変量解析の項目から除外した。

Ki-67 高値群と低値群とでそれぞれ生存曲線を作成したところ、Ki-67 低値群では STAG2 発現喪失で MFS については有意に生存率が高く、CSS については生存率が高い傾向を認めた (それぞれ $P = 0.049$, $P = 0.069$)。その一方で Ki-67 高値群では STAG2 発現喪失が MFS・CSS とともに有意に生存率が低い結果となった(それぞれ $P = 0.013$, $P = 0.0044$)(図 4)。STAG2 発現喪失と Ki-67 との間には有意な交互作用を認めた(MFS, CSS とともに $P_{\text{interaction}} < 0.01$)。STAG2 発現喪失と p53 パターンとの間にも同様の傾向を認めた。p53 正常パターンでは STAG2 発現喪失は MFS・CSS とともに生存率が高い傾向にあり、逆に p53 変異パターンでは MFS・CSS とともに生存率が低い傾向にあったが、log-rank

検定では有意差は認められなかった(図 5)。しかし、MFS・CSS とともに STAG2 発現喪失と p53 パターンとの間に統計学的には有意差は示されなかったものの、交互作用がある傾向を認めた(それぞれ $P_{\text{interaction}} = 0.058, 0.051$)。

4・STAG2 発現喪失の有無と p53 パターンによる Ki-67 陽性率

STAG2 発現喪失の有無および p53 のパターンによる Ki-67 陽性率を評価した。STAG2 正常群に対して STAG2 発現喪失群では Ki-67 陽性率が有意に低く (15.8% vs 5.5%, $P < 0.01$)、p53 正常パターン群に対して p53 変異パターン群では有意に高かった (8.8% vs 24.5%, $P < 0.01$)。また、STAG2 発現喪失の有無と p53 のパターンで 4 群に分けたところ、p53 正常パターンのなかでは STAG2 発現喪失群の Ki-67 陽性率が STAG2 正常群と比較して有意に低かった (3.1% vs 10.2%, $P < 0.01$) が、その一方で p53 変異パターンのなかでは STAG2 正常群と STAG2 発現喪失群の間に Ki-67 陽性率に有意差は認められなかった (26.2% vs 16.6%)。4 群の中で STAG2 発現喪失かつ p53 正常パターン群は他のどの群と比較しても有意に Ki-67 陽性率が低く、両者の併存により増殖能が抑制されている可能性が示唆された(図 6)。

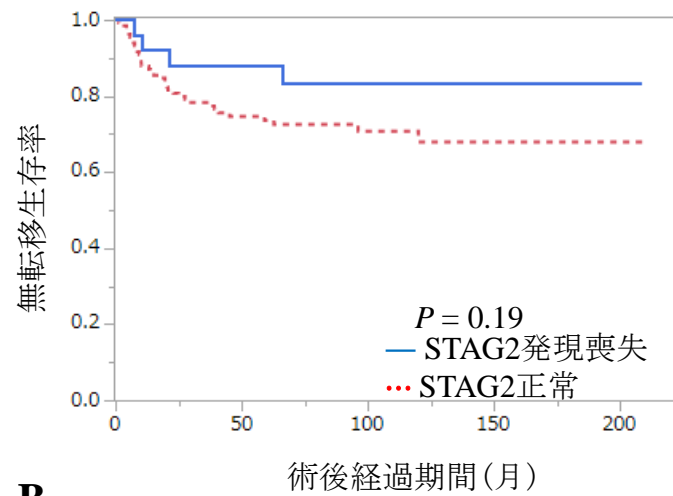
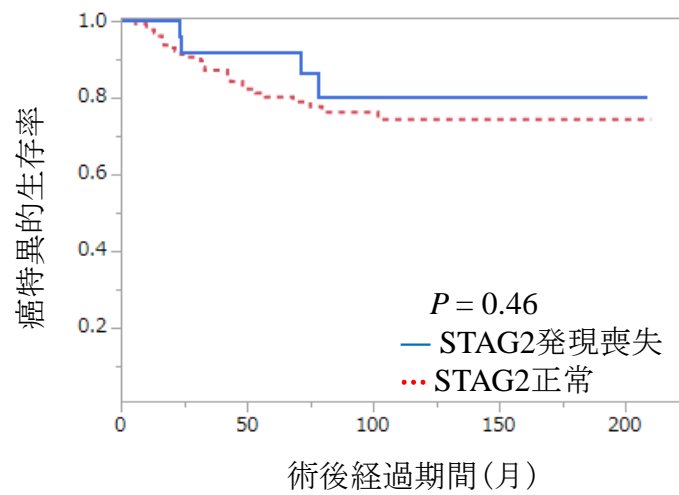
A**B**

図3. 当院症例におけるSTAG2発現喪失と予後との関係
STAG2発現喪失の有無による無転移生存率(A)と癌特異的生存率(B)のKaplan-Meier曲線。両者ともSTAG2発現喪失が生存率が高い傾向は認めたが統計学的な有意差は認めなかった。

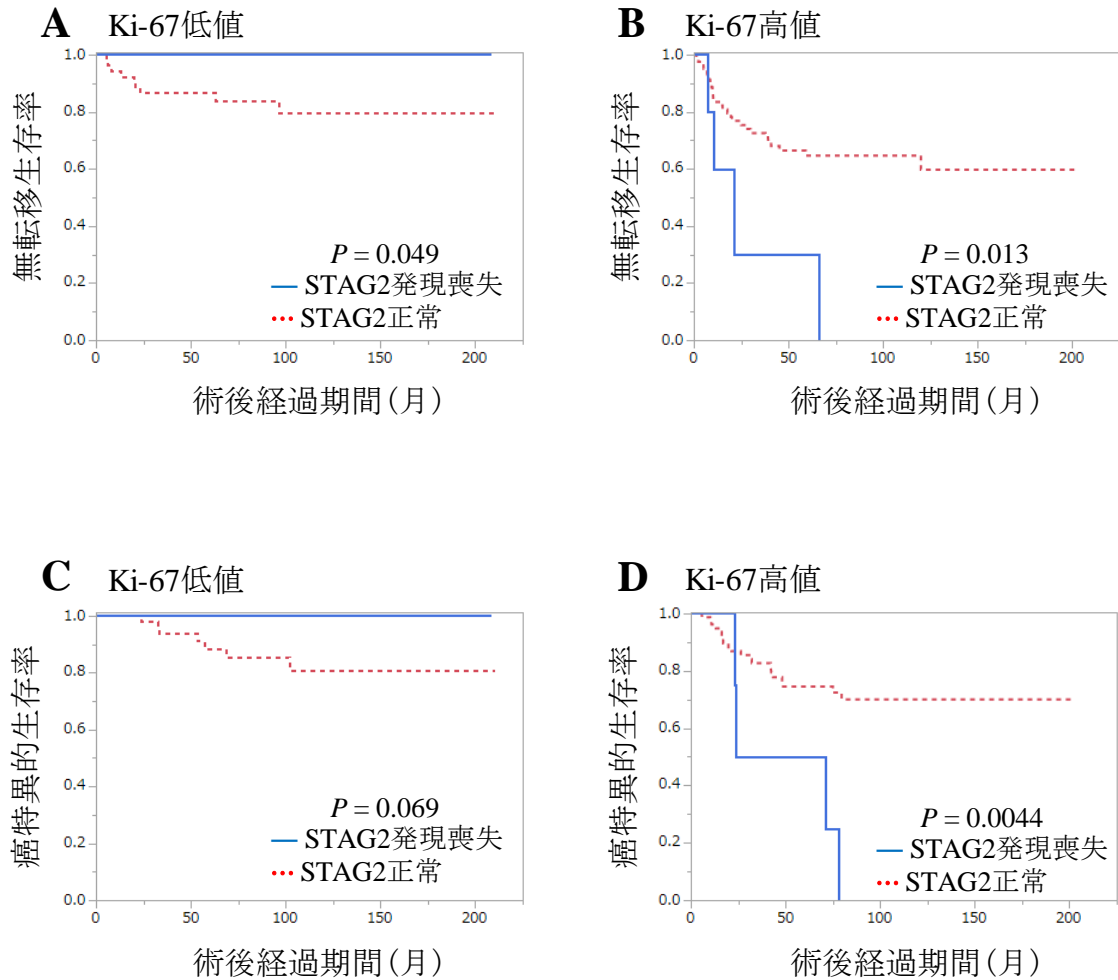


図4. Ki-67の高低によるSTAG2発現喪失と予後との関係

Ki-67の高低により低値群(A,C)と高値群(B,D)とに分け、それぞれの無転移生存率(A,B)と癌特異的生存率(C,D)のKaplan-Meier曲線。Ki-67低値群ではSTAG2発現喪失がMFSでは有意に生存率が高く、CSSでは有意ではないものの生存率が高い傾向を認めた。その一方でKi-67高値群ではMFS・CSSともにSTAG2発現喪失で有意に生存率が低かった。

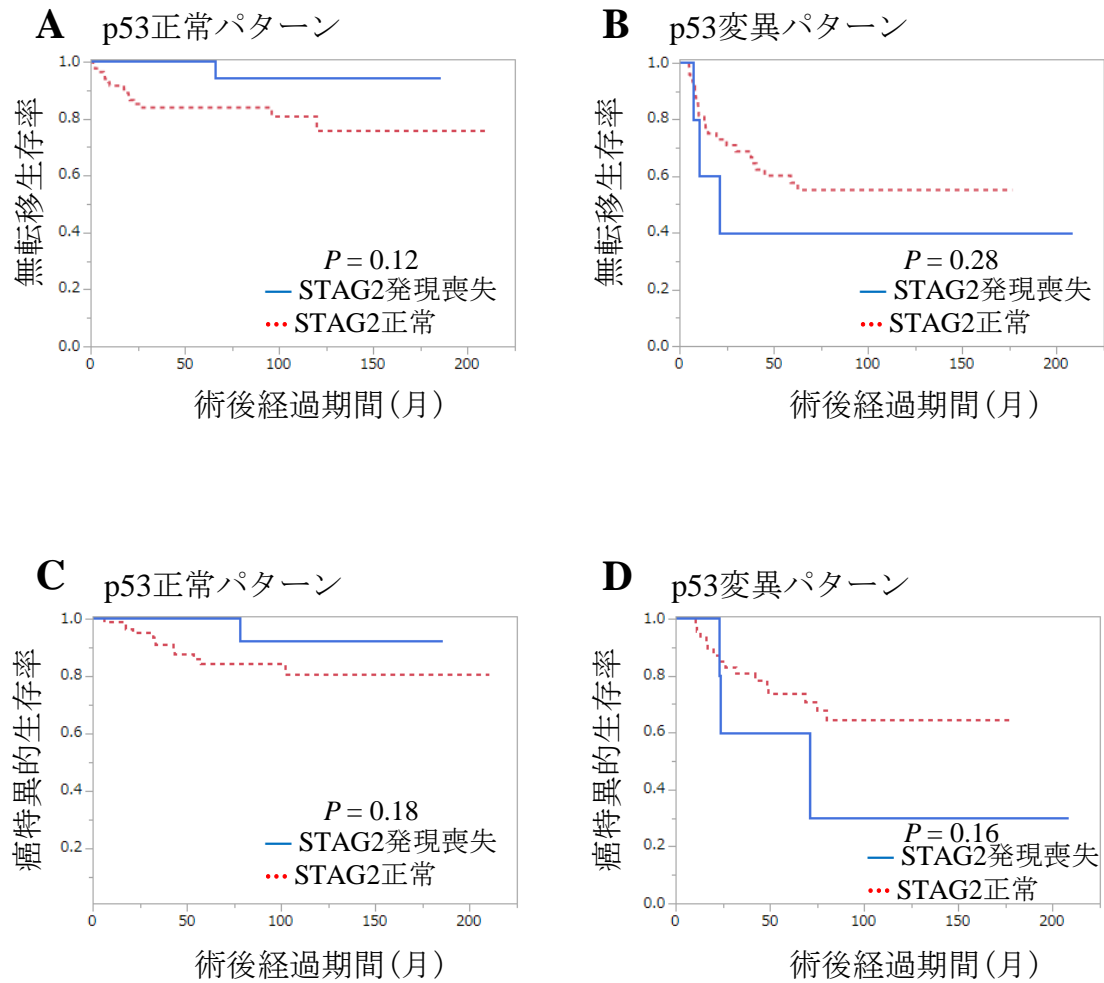


図5.p53のパターンによるSTAG2発現喪失と予後との関係

p53の免疫染色により正常パターン(A,C)と変異パターン(B,D)とに分け、それぞれの無転移生存率(A,B)と癌特異的生存率(C,D)のKaplan-Meier曲線。Ki-67と同様に、STAG2発現喪失がp53正常パターンでは統計学的に有意差は認められなかったものの生存率が高い傾向を認め、p53変異パターンでは生存率が低い傾向を認めた。

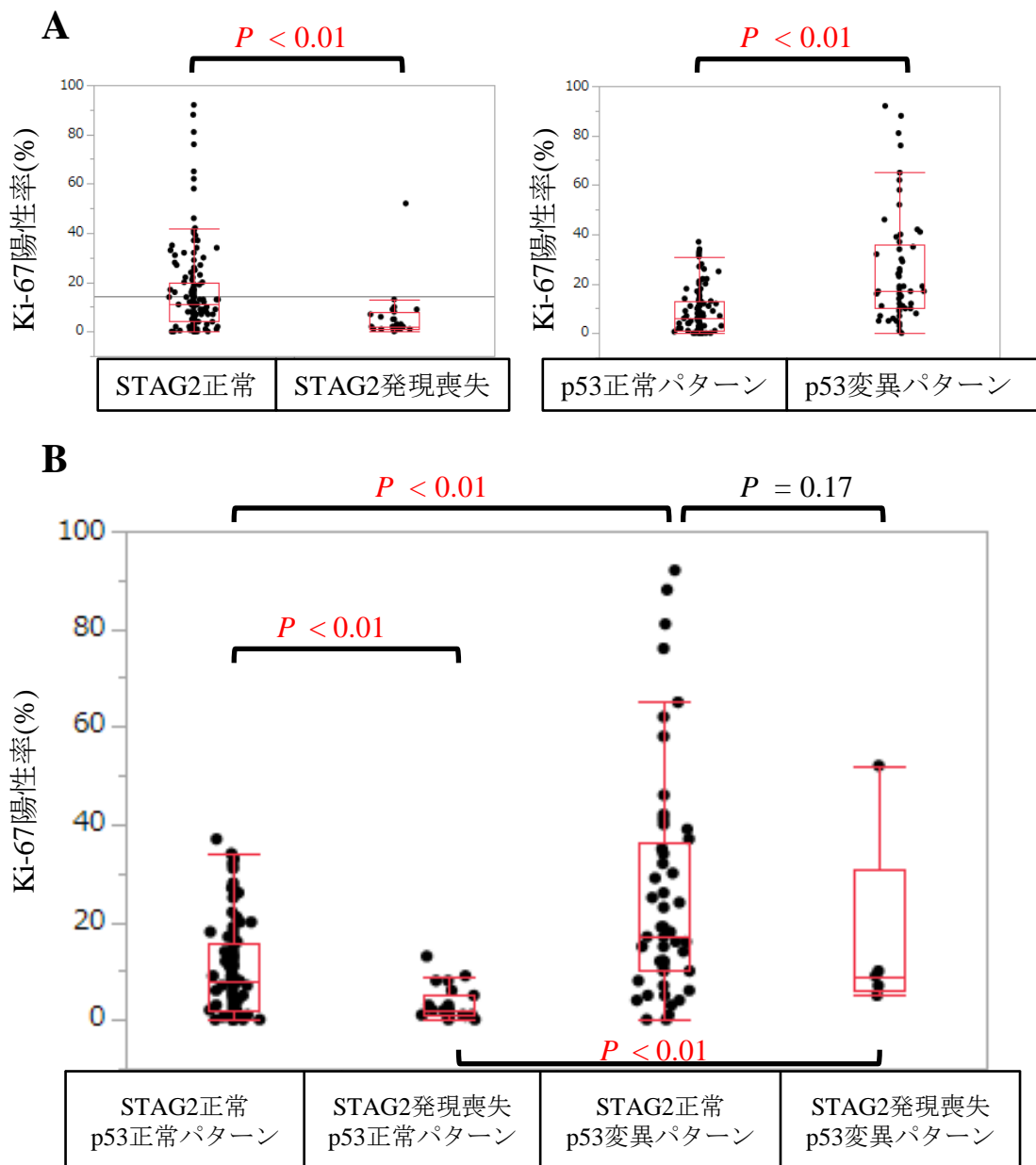


図6.STAG2とp53の染色パターンによるKi-67陽性率

STAG2発現喪失の有無およびp53のパターンによるKi-67陽性率の比較 (A)。さらにSTAG2発現喪失の有無により分けた4群間の比較(B)。STAG2発現喪失群でKi-67陽性率が有意に低く、p53変異群では有意に高かった。STAG2発現喪失かつp53正常パターン群では他のいずれの群と比較しても有意に低値であった。

表 5.単変量および多変量解析(無転移生存率)

		単変量解析			多変量解析		
		HR	95% CI	P 値	HR	95% CI	P 値
性別	男性	1					
	女性	1.04	0.50-1.87	0.92			
年齢	70 歳未満	1			1		
	70 歳以上	1.90	1.01-3.55	0.046	1.61	0.82-3.17	0.17
左右	左	1			1		
	右	0.61	0.32-1.16	0.13	0.81	0.39-1.69	0.58
膀胱癌の既往	なし	1			1		
	あり	1.68	0.82-3.44	0.16	4.00	1.57-10.21	0.0037
腫瘍部位	腎盂	1			1		
	尿管	1.86	0.99-3.46	0.052	0.91	0.38-2.16	0.83
腫瘍形態	乳頭状	1			1		
	非乳頭状	1.63	0.83-3.15	0.15	0.48	0.23-1.03	0.061
異型度	低異型度	NA					
	高異型度	NA					
脈管侵襲	なし	1			1		
	あり	5.48	2.73-11.01	<0.0001	1.71	0.65-4.47	0.27
上皮内癌	なし	1			1		
	あり	2.28	1.19-4.32	0.012	1.57	0.77-3.21	0.22
脂肪織浸潤	なし	1			1		
	あり	8.90	3.93-20.17	<0.0001	6.92	2.05-23.35	0.0018
リンパ節転移	なし	1			1		
	あり	5.84	2.95-11.52	<0.0001	3.04	1.34-6.91	0.0080
喫煙歴	なし	1					
	あり	0.68	0.37-1.27	0.22			
STAG2	正常	1			1		
	発現喪失	0.51	0.18-1.44	0.20	1.04	0.35-3.15	0.94
p53	正常パターン	1			1		
	変異パターン	3.31	1.76-6.23	0.0002	1.51	0.71-3.22	0.28
Ki-67	低値	1			1		
	高値	3.69	1.76-7.77	0.0006	2.56	1.11-5.93	0.028

HR : Hazard ratio, CI : confidential interval, NA : not applicable

表 6.単変量および多変量解析(癌特異的生存率)

		単変量解析			多変量解析		
		HR	95% CI	P 値	HR	95% CI	P 値
性別	男性	1					
	女性	0.59	0.25-1.36	0.22			
年齢	70 歳未満	1					
	70 歳以上	1.52	0.75-3.08	0.25			
左右	左	1					
	右	0.66	0.32-1.37	0.27			
膀胱癌の既往	なし	1			1		
	あり	1.70	0.76-3.80	0.20	4.50	1.64-12.38	0.0036
腫瘍部位	腎盂	1					
	尿管	1.21	0.59-2.45	0.60			
腫瘍形態	乳頭状	1					
	非乳頭状	1.42	0.65-3.08	0.38			
異型度	低異型度	NA					
	高異型度	NA					
脈管侵襲	なし	1			1		
	あり	6.11	2.72-13.72	<0.0001	2.07	0.75-5.69	0.16
上皮内癌	なし	1			1		
	あり	1.99	0.97-4.06	0.059	1.32	0.62-2.81	0.47
脂肪組織浸潤	なし	1			1		
	あり	7.63	3.12-18.65	<0.0001	5.21	1.52-17.84	0.0086
リンパ節転移	なし	1			1		
	あり	5.90	2.76-12.60	<0.0001	2.83	1.21-6.59	0.016
喫煙歴	なし	1					
	あり	0.95	0.47-1.93	0.89			
STAG2	正常	1			1		
	発現喪失	0.67	0.24-1.93	0.46	1.45	0.47-4.51	0.52
p53	正常パターン	1			1		
	変異パターン	2.88	1.41-5.89	0.0036	1.16	0.54-2.51	0.70
Ki-67	低値	1			1		
	高値	3.64	1.57-8.46	0.0026	3.13	1.24-7.91	0.016

HR : Hazard ratio, CI : confidential interval, NA : not applicable

5・公開データセットの解析

予後データが参照できた 82 例中 *STAG2* 変異を認めた症例は 19 例(23%)、*TP53* 変異を認めた症例は 15 例(18%)、*MDM2* 増幅を認めた症例は 6 例(7%)であった。*TP53* 変異と *MDM2* 増幅症例は排他的で重複はなく、両者を合わせた 21 例(26%)を p53 経路異常群とした。*STAG2* 変異と p53 経路異常群との間に有意な相関は認められなかった(表 7)。*STAG2* 変異が低異型度非浸潤癌に多いことについては当院のデータと同様であったが、性別や上皮内癌の併存では有意差がつかず、リンパ節転移は有意に少ないなど、背景因子の差を認めた。Kaplan-Meier 曲線を作成したところ、*STAG2* 変異群について MFS は生存率が高い傾向にあったが有意差は認められず($P = 0.058$)、CSS についても有意差を認めなかった($P = 0.30$) (図 7)。p53 経路正常群では MFS・CSS ともに *STAG2* 変異で有意に生存率が高く(それぞれ $P = 0.013, 0.039$)、p53 経路異常群ではともに生存率が低い傾向にあった(それぞれ $P = 0.094, 0.056$) (図 8)。*STAG2* 変異と p53 経路異常の間には MFS・CSS ともに有意な交互作用を認めた($P_{\text{interaction}} < 0.01$)。

以上の公開データセットの解析結果は、免疫組織化学染色による *STAG2* 発現喪失とシーケンスによる *STAG2* 変異という違いはあるものの、東大病院 171 例の解析結果と同様の傾向にあると考えられた。

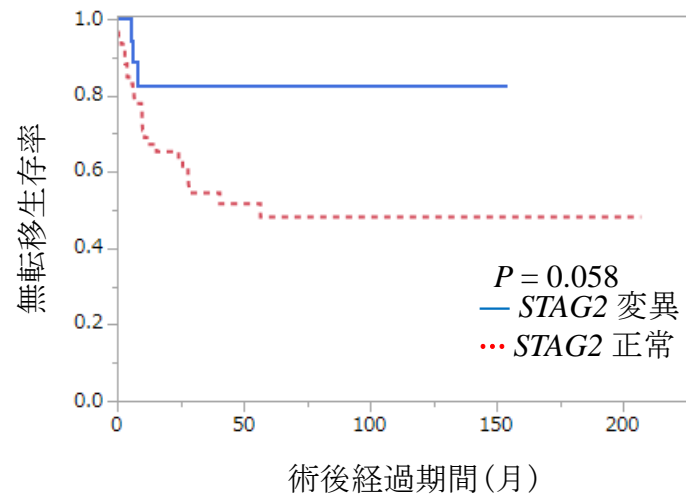
表 7.公開データセットにおける *STAG2* 変異の有無と臨床病理学的特徴

臨床病理学的因子	症例数	<i>STAG2</i>		<i>P</i> 値
		正常	変異	
全例	82	63 (77%)	19 (23%)	
性別				0.78
男性	55	43 (68%)	12 (63%)	
女性	27	20 (32%)	7 (37%)	
年齢				0.066
70 歳未満	44	30 (48%)	14 (74%)	
70 歳以上	38	33 (52%)	5 (26%)	
腫瘍部位				0.74
腎盂	67	52 (83%)	15 (79%)	
尿管	15	11 (17%)	4 (21%)	
異型度				0.0098
低異型度	23	13 (21%)	10 (53%)	
高異型度	59	50 (79%)	9 (47%)	
上皮内癌の併存				1.00
なし	67	51 (81%)	16 (84%)	
あり	15	12 (19%)	3 (16%)	
深達度				0.060
pTa	28	17 (27%)	11 (58%)	
pTis	1	1(2%)	0(0%)	
pT1	15	11 (17%)	4 (21%)	
pT2	8	7 (11%)	1 (5%)	
pT3	22	21 (33%)	1 (5%)	
pT4	8	6 (10%)	2 (11%)	
リンパ節転移				0.047
なし	44	30 (64%)	14 (93%)	
あり	18	17 (36%)	1 (7%)	

表 7(続き)

臨床病理学的因子		症例数	STAG2		P 値
			正常	変異	
<i>TP53</i>					1.00
	正常	67	51 (81%)	16 (84%)	
	変異	15	12 (19%)	3 (16%)	
<i>MDM2</i>					1.000
	正常	76	58 (92%)	18 (95%)	
	増幅	6	5 (8%)	1 (5%)	
p53 経路					0.77
	正常	61	46 (73%)	15 (79%)	
	異常	21	17 (27%)	4 (21%)	

A



B

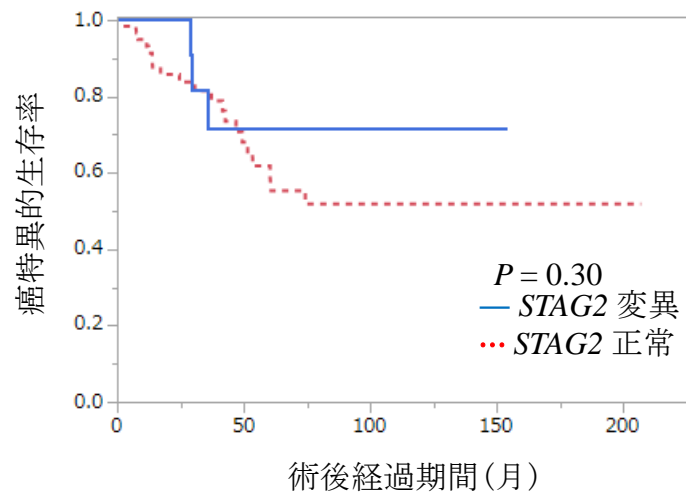
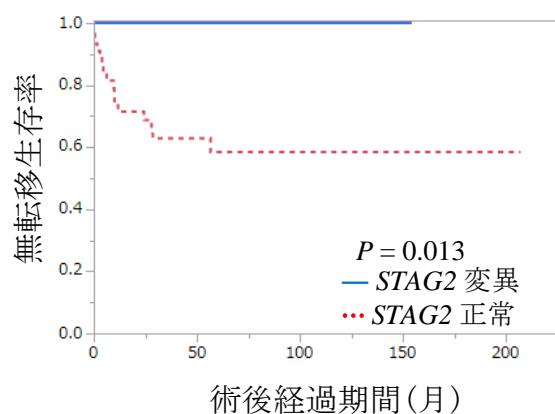
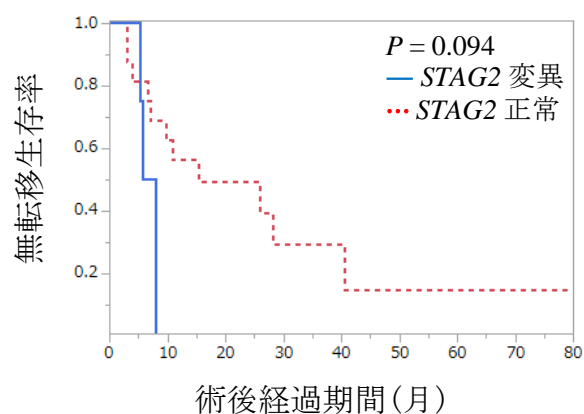


図7. 公開データセットにおけるSTAG2発現喪失と予後との関係
STAG2変異の有無で分けた無転移生存率(A)および特異的生存率(B)のKaplan-Meier曲線。STAG2変異は生存率が高い傾向にあったが有意差は認めなかった。

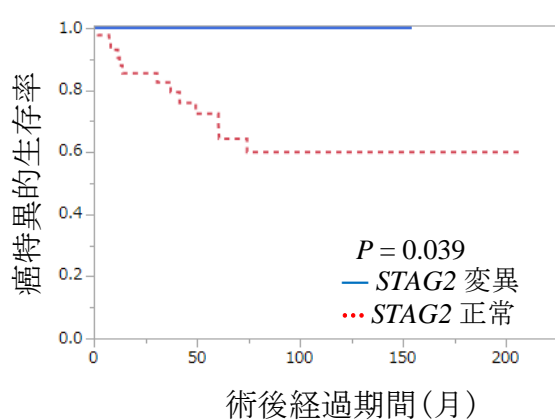
A p53 経路正常



B p53 経路異常



C p53 経路正常



D p53 経路異常

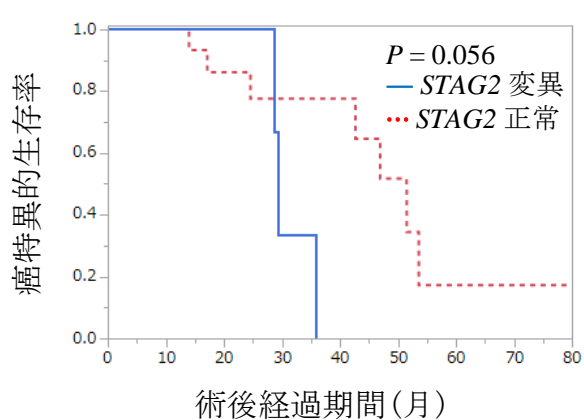


図8. 公開データセットにおけるp53経路異常の有無によるSTAG2変異の有無と予後との関係

p53経路正常 (A,C)とp53経路異常(B,D)とに分けたそれぞれの無転移生存率(A,B)と癌特異的生存率(C,D)のKaplan-Meier曲線。p53経路正常群においてはMFS・CSSともにSTAG2変異が有意に生存率が高かったが、その一方でp53経路異常群ではSTAG2変異はともに生存率が低い傾向を認めた。

6・STAG2 ノックダウンの確認と増殖能および細胞周期への影響

トランスフェクション後 48 時間の時点で STAG2 の mRNA およびタンパク発現を評価した。mRNA レベルではおおむね 80%以上の発現低下、タンパク質レベルでも 60~80%の発現低下を認め、ノックダウンが十分に行われていることが確認された。STAG2 のパラログである STAG1 については STAG2 ノックダウン状態でも mRNA およびタンパクの発現量に大きな変化を認めなかった(図 9,10)

STAG2 ノックダウンによる細胞株の形態には大きな変化は認めなかった(図 11)。TP53 正常株である SW800 については STAG2 ノックダウンにより有意な増殖抑制を認めたが、TP53 変異株である T24, RT-112 については STAG2 ノックダウンによる増殖能の変化は認められなかった。5637 については TP53 変異株であるが、STAG2 ノックダウンにより有意ではなかったが増殖抑制の傾向を認めた(図 12)。

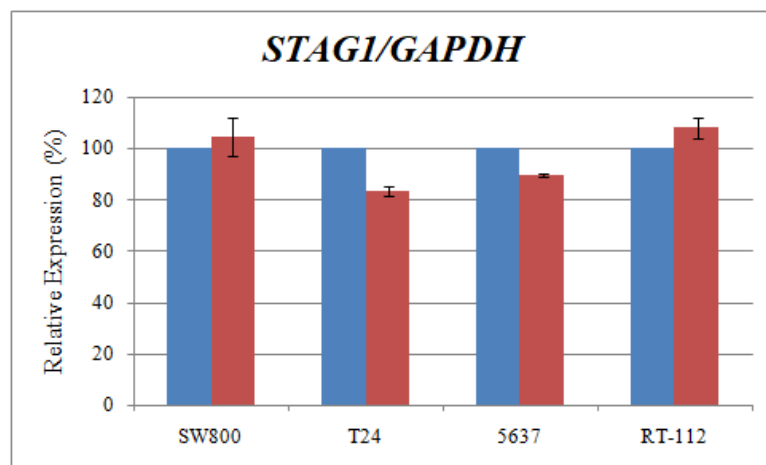
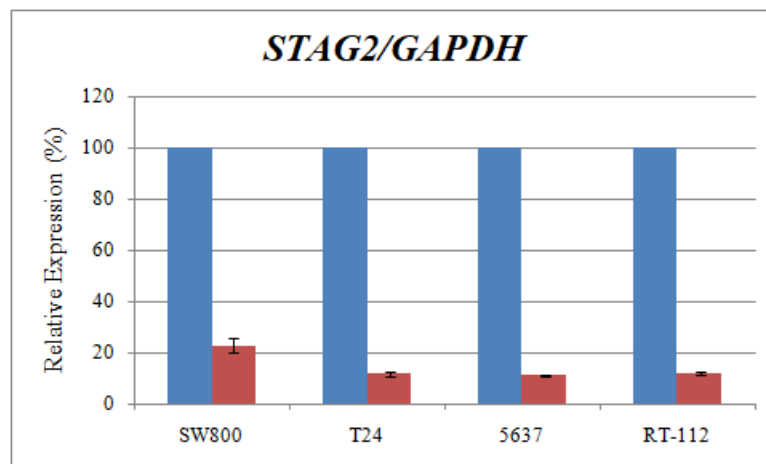
細胞周期解析では T24 と 5637 では STAG2 ノックダウンによる S 期および G2 期の細胞比率の上昇と G0/G1 期の細胞比率低下を認めたが、SW800 では逆に S 期および G2 期の細胞比率の低下と G0/G1 期の細胞比率の上昇を認め、G1 期細胞周期停止が誘導されている可能性が示唆された(図 13)。5637 における G2 期細胞比率の上昇は統計学的に有意な差であったが、その他については有意差を認めなかった。

RT-112 についてはもともと異数体の存在が報告されており[40]、正確な細胞周期解析が困難であり、今回の解析から除外した。

7・*STAG2* ノックダウンによる p53 経路への影響

各細胞株について p53 経路における *TP53* の下流因子としてアポトーシス関連因子である *BAX* や G2 期細胞周期停止に関与する *GADD45A*、G1 期細胞周期停止に関与する *CDKN1A* の mRNA レベルでの発現を確認した。5637, RT-112 では 3 因子とも有意な上昇は認められなかった。T24 と SW800 については *CDKN1A* のみ有意な上昇を認め、それぞれコントロールと比較して約 1.2 倍、1.4 倍であった(図 14)。

ウェスタンブロットにより p53 と p21 のタンパク発現を確認した。SW800 については *STAG2* ノックダウンによる p53 の有意な発現亢進を認めた。T24 は *TP53* のナンセンス変異と報告されており、コントロール群でも *STAG2* ノックダウン群でも p53 の発現は認められなかった。一方、*TP53* のミスセンス変異と報告されている 5637・RT-112 は p53 の過剰発現を認めたが、両者とも *STAG2* ノックダウンにより p53 の発現が亢進する傾向を認めた。p21 についてはポジティブコントロールでは発現が確認できたが、いずれの検体においても発現は検出することができなかった(図 15)。



■ : control siRNA
■ : STAG2 siRNA

図9. STAG2 siRNA導入後のmRNAの評価

導入後48時間におけるmRNA発現をRT-PCRで評価。STAG2 mRNAの発現は48時間後で80-90%の抑制を認める一方、STAG2のパラログであるSTAG1についてはmRNAの大きな変化を認めなかった。

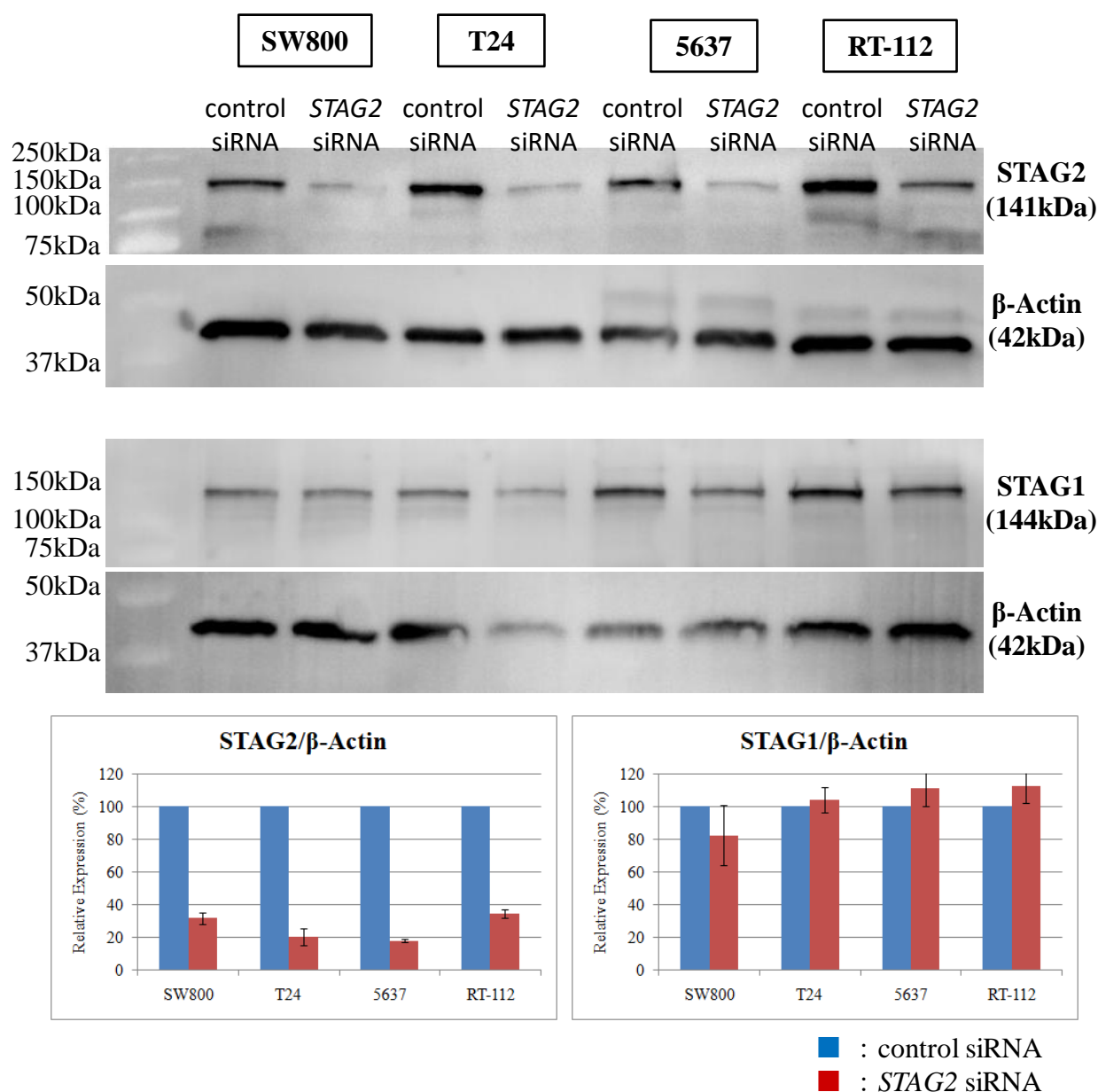


図10. STAG2 siRNA導入後のSTAG2・STAG1タンパク発現の評価

導入後48時間におけるタンパクの発現をウェスタンブロットで評価した。STAG2タンパクは60%～80%の発現低下を認めたが、STAG1は大きな変化を認めなかった。

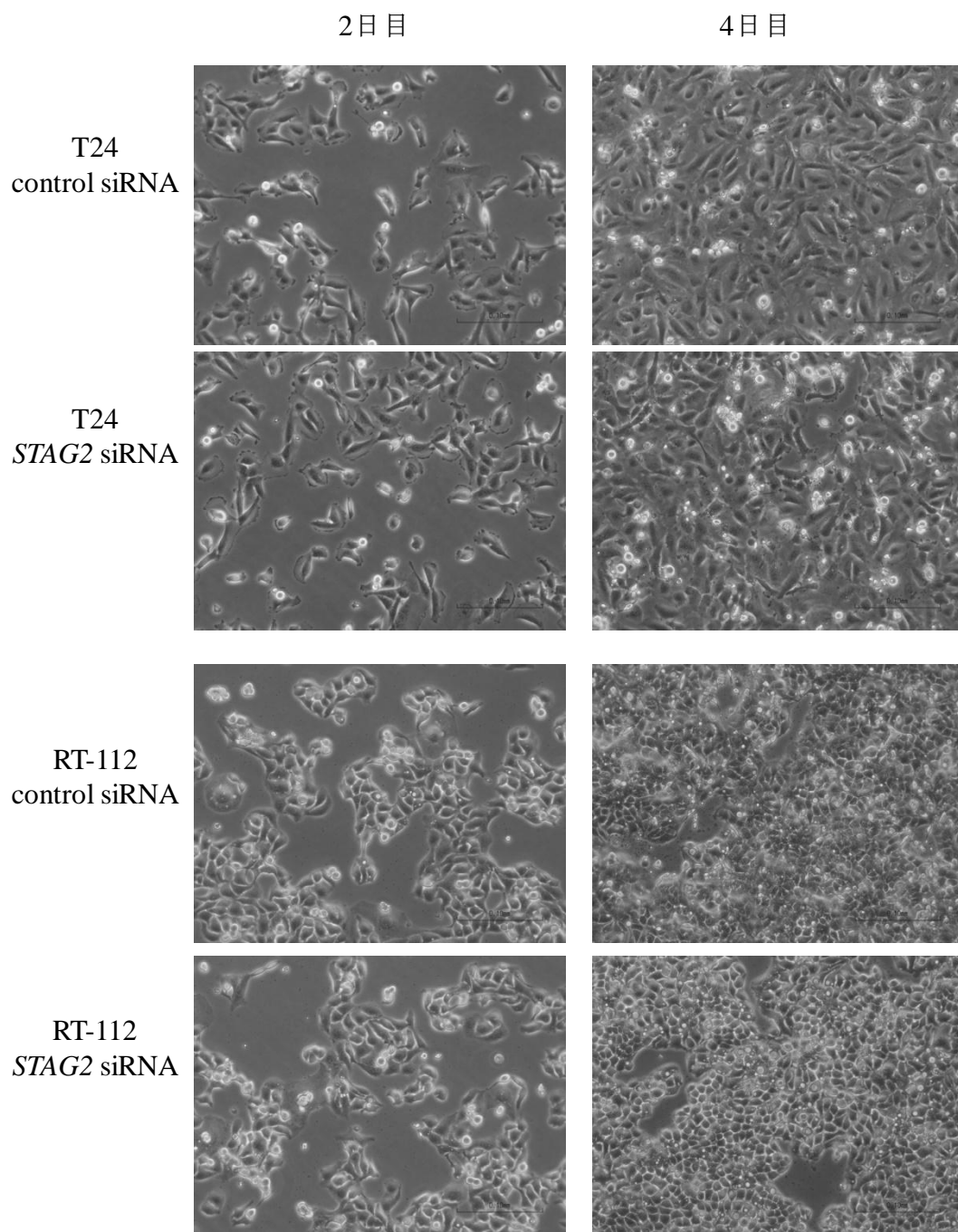


図11-1. *STAG2*ノックダウンの細胞形態への影響(T24, RT-112)

T24およびRT-112に対してcontrol siRNAと*STAG2* siRNAを導入し、2日目と4日目の細胞の状態。両者とも形態的な差は認めなかった。

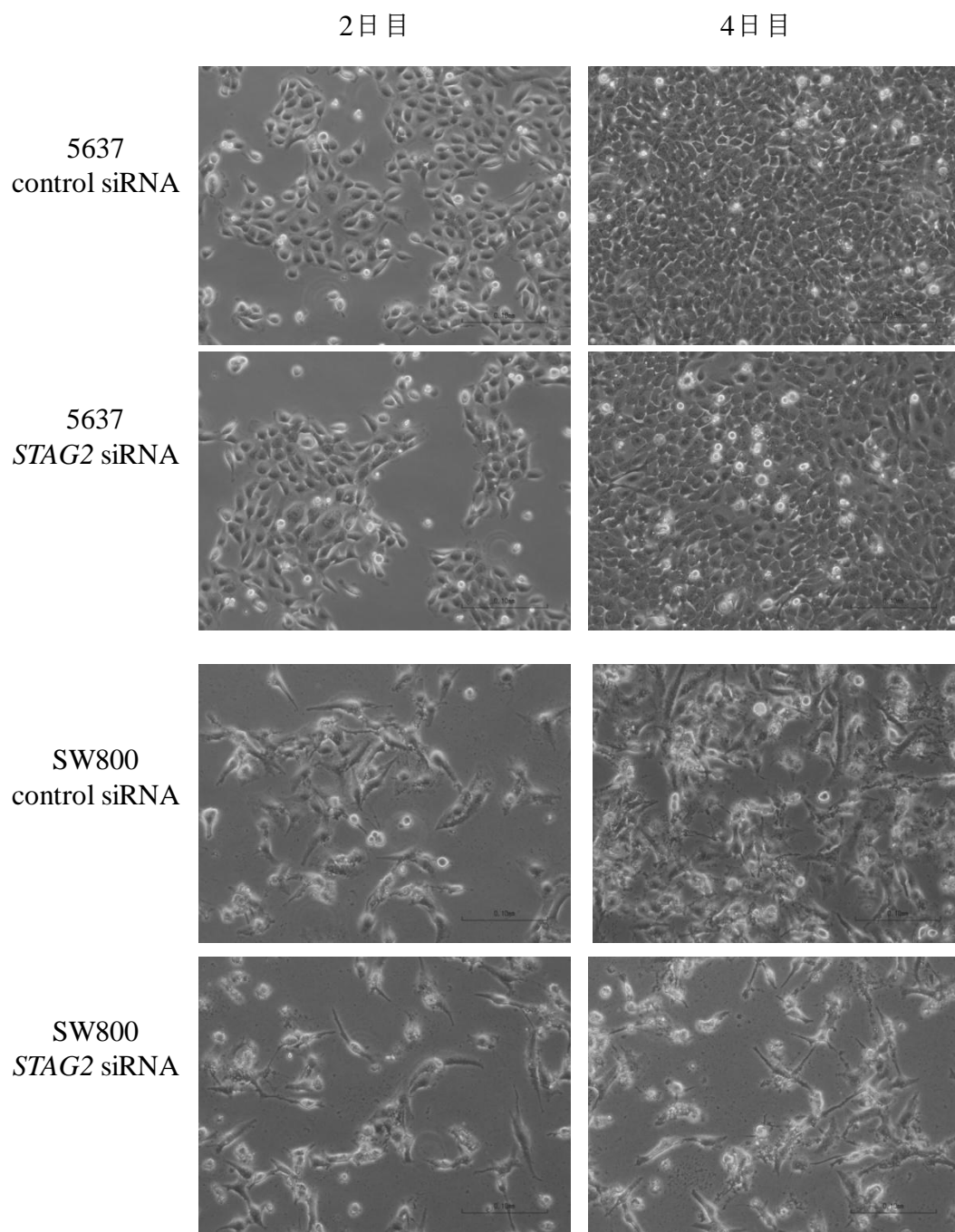
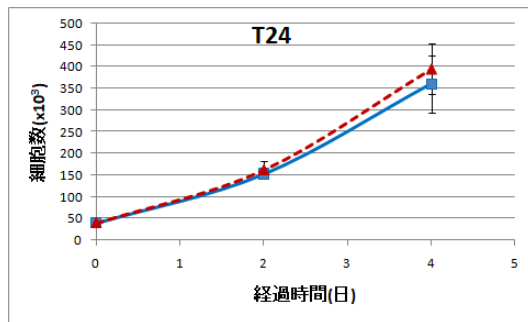


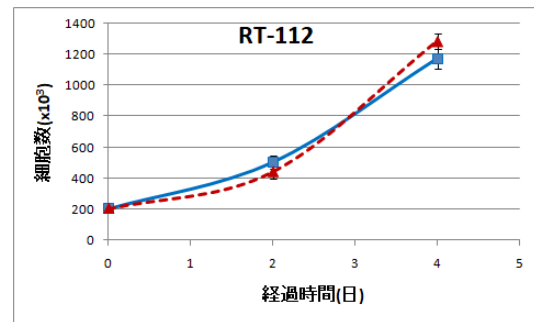
図11-2. STAG2ノックダウンの細胞形態への影響(5637, SW800)

5637およびSW800に対してcontrol siRNAとSTAG2 siRNAを導入し、2日目と4日目の細胞の状態。両者とも形態的な差は認めなかったが、SW800においては細胞密度の低下が目立った。

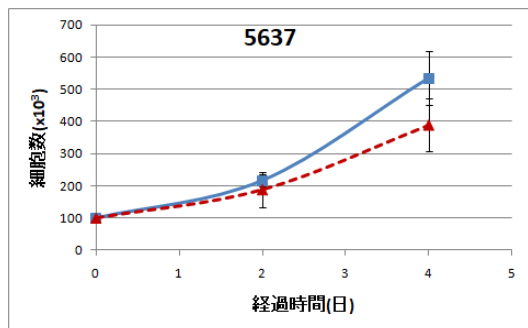
A



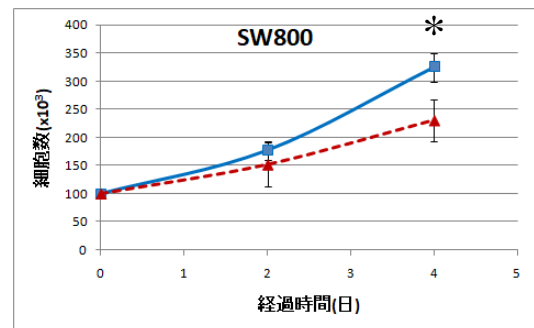
B



C



D



■:control siRNA * $P < 0.05$
 ▲:STAG2 siRNA

図12. STAG2ノックダウンによる細胞増殖曲線の変化

トランスフェクション後2日目と4日目で細胞数を計測して作成したT24(A), RT-112(B), 5637(C), SW800(D)の増殖曲線。SW800でのみ有意な増殖抑制を認め、5637においては有意ではないが増殖抑制の傾向を認めた。

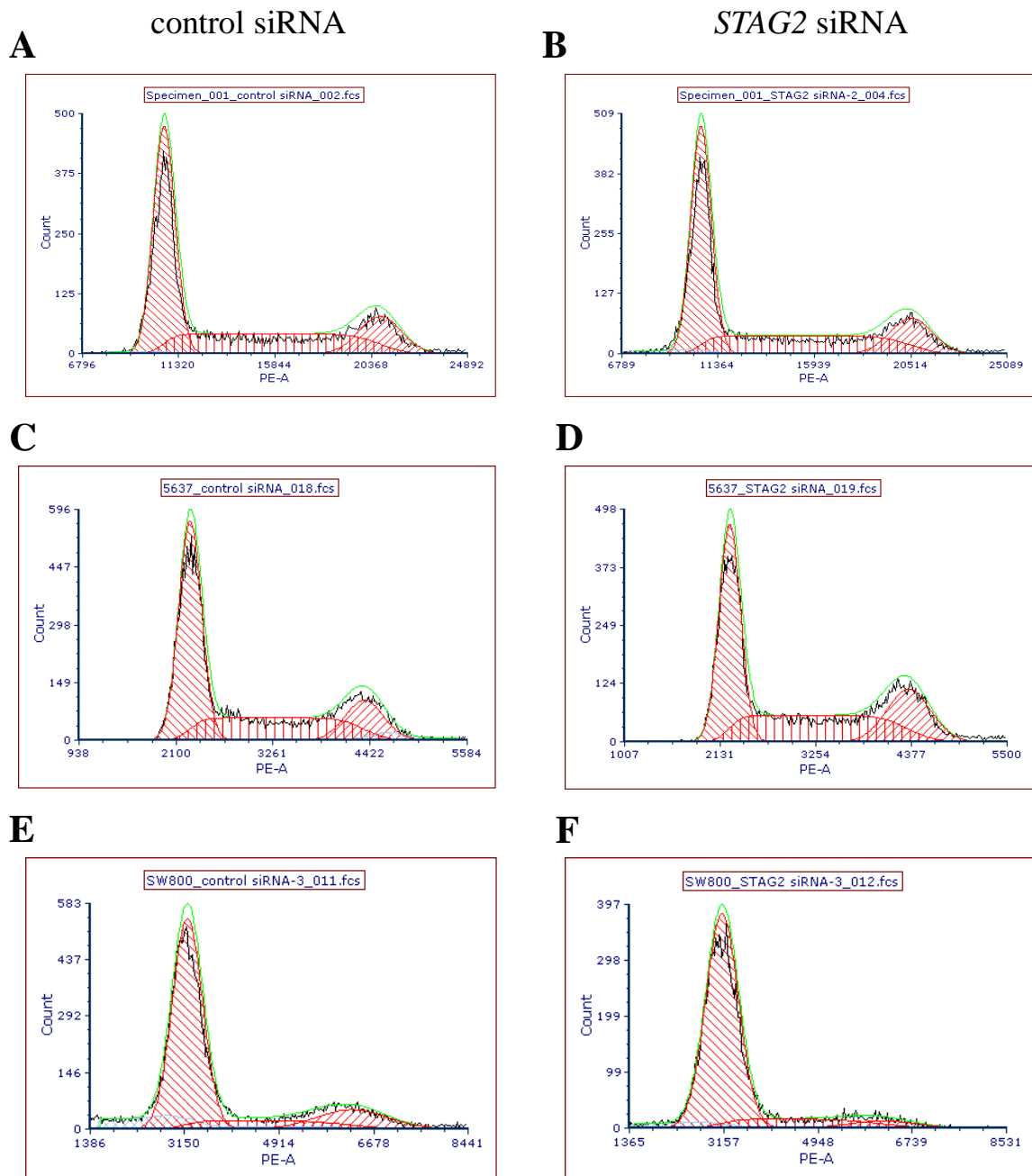
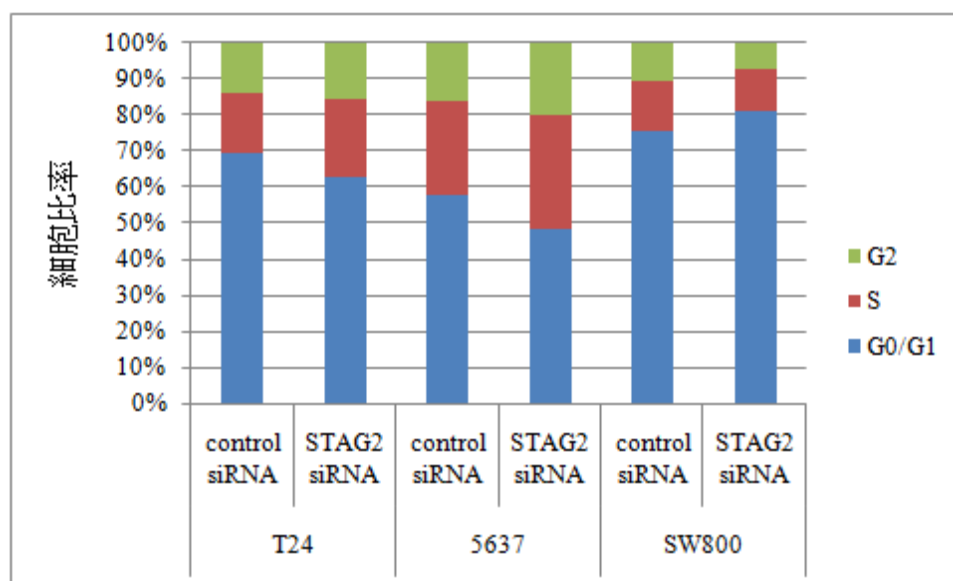


図13-1. PI染色による細胞周期解析図

T24(A, B)、5637(C, D)、SW800(E, F)におけるcontrol siRNA (A, C, E)および*STAG2* siRNA(B, D, F)導入後72時間における細胞周期解析図。SW800では*STAG2* siRNAによりG2期細胞の低下を認めるが、T24, 5637ではG2期細胞の低下は認められない。

G



	T24		5637		SW800	
(%)	control siRNA	STAG2 siRNA	control siRNA	STAG2 siRNA	control siRNA	STAG2 siRNA
G0/G1	69.3	63.0	57.7	48.1	75.7	81.0
S	16.9	21.4	26.1	31.6	14.0	11.8
G2	13.8	15.6	16.2	20.3 *	10.4	7.2

* $P < 0.05$

図13-2. PI染色による細胞周期解析

T24,5637,SW800における各細胞周期比率(G)。T24と5637はG0/G1期細胞比率が低下し、S期/G2期細胞が上昇するのに対し、SW800ではG0/G1期細胞比率が上昇し、S期/G2期細胞が低下する傾向を認めた。

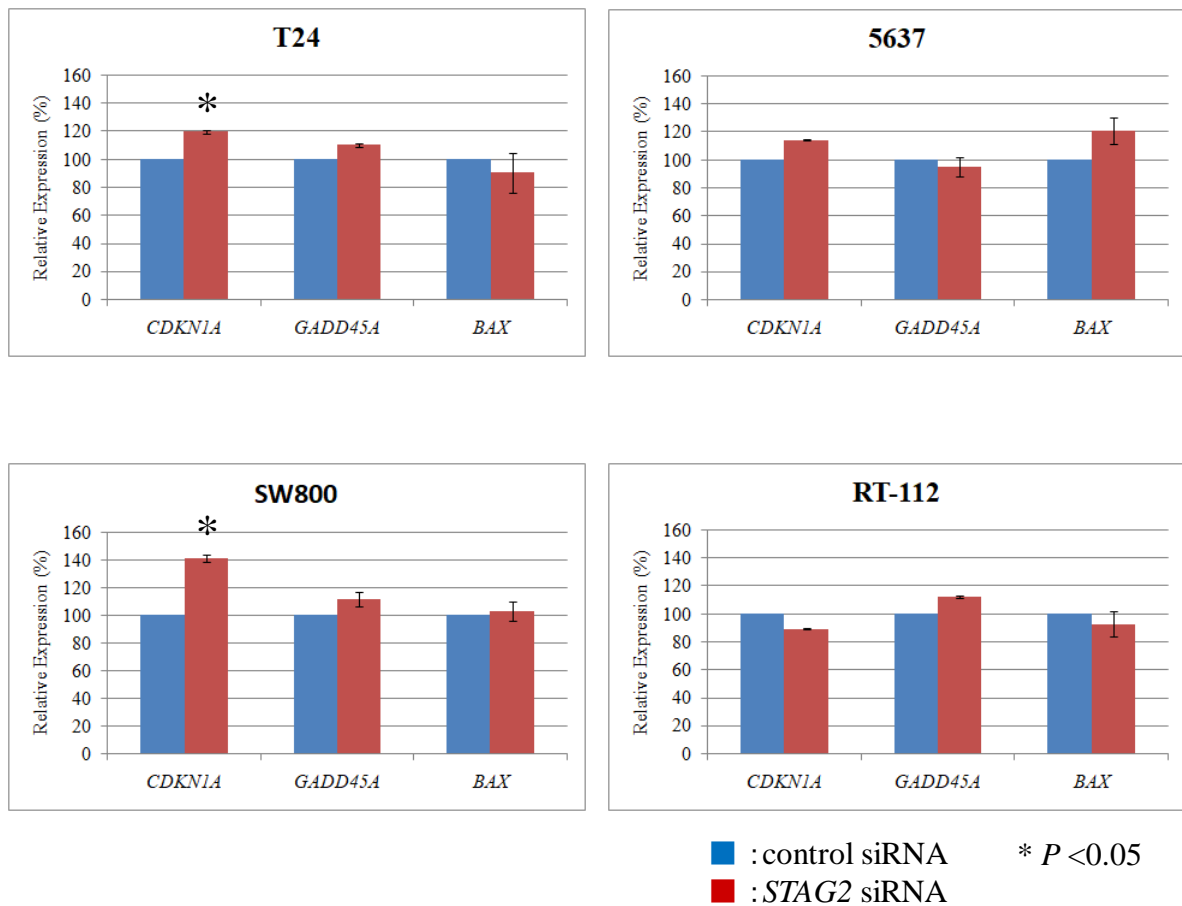


図14. p53経路関連遺伝子のmRNA発現量比較

STAG2 siRNA導入後48時間後のp53経路関連遺伝子発現の変化(*GAPDH*の発現との比較)。T24およびSW800において*CDKN1A*の有意な上昇を見せた以外は有意差を認めなかった。

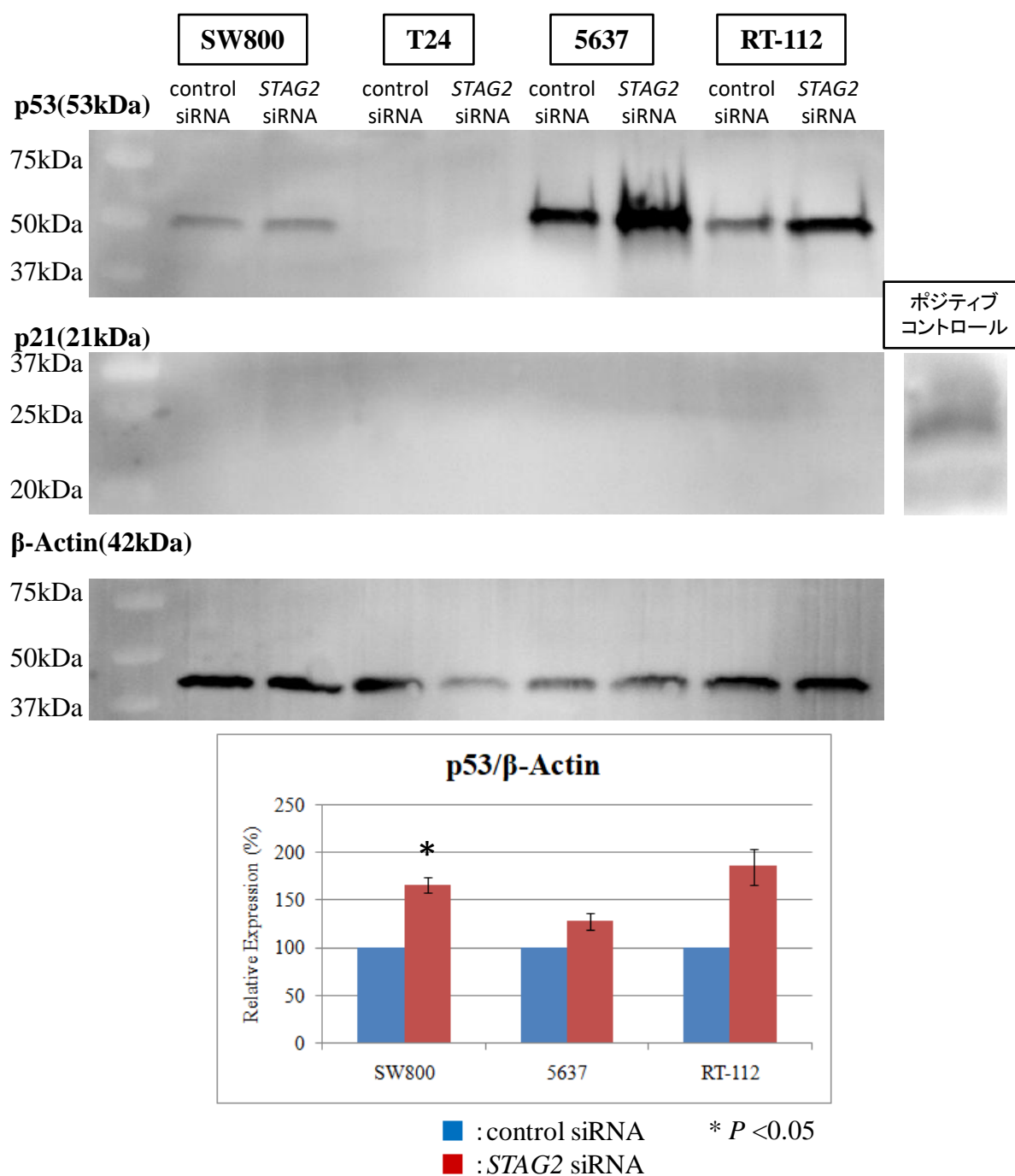


図15. siRNA導入後48時間後におけるp53とp21のタンパク発現
STAG2 siRNA導入後48時間におけるp53のタンパク発現をウエスタンブロットにより評価した。T24ではp53の発現は認めず、5637とRT-112で過剰発現を認めた。p21はいずれも検出されなかった。β-Actinで標準化を行ったところ、SW800でp53の有意な上昇を認めた。5637とRT-112でも有意ではないが上昇傾向を認めた。

考察

本研究では、上部尿路癌の臨床検体における STAG2 発現喪失症例の臨床病理学的特徴および予後に関して検討し、STAG2 発現喪失と増殖能および p53 パターンとの関連を見出した。増殖能が高い状態に STAG2 発現喪失が併存すると、染色体が不安定かつ正常な修復ができない状態で増殖を続けることにより悪性度を増し、最も予後不良となる可能性が示唆された。また、STAG2 発現喪失群で有意に Ki-67 陽性率が低かったことから STAG2 発現喪失は増殖能を抑制する因子と考えられた。しかし、p53 変異パターンの中では STAG2 発現喪失と併存しても増殖能は低下せず、p53 正常パターンの中では STAG2 発現喪失群で有意に Ki-67 陽性率が低かったことから、p53 経路正常の状態でのみ STAG2 発現喪失により増殖能が低下する可能性が示唆された。このように、STAG2 発現喪失腫瘍は増殖能の低い予後良好な群と、増殖能が高く予後不良な群とが混在していることから、STAG2 発現喪失が単独では有意な予後規定因子とはならず、前者の割合が多いことから全体としては予後良好な傾向となっていると考えられた。また、当院のデータだけでなく公開データセットでも STAG2 変異と p53 経路との間に交互作用を認めた。ただし、公開データセットでは STAG2 と TP53 の遺伝子変異を評価しており、タンパク発現を評価する免疫組織化学

染色における発現喪失とは異なる可能性が考えられる。実際、公開データセットにおける遺伝子変異の 89%は短縮型変異であるが、残りの 11%はミスセンス変異であり免疫組織化学染色では *STAG2* 正常になることが予想される。

続いて膀胱癌細胞株に対して *STAG2* をノックダウンし、増殖能および *p53* 経路との関連を評価した。その結果、*TP53* 正常である SW800 でのみ有意な増殖能の低下を認め、細胞周期解析では G2 期および S 期比率の低下と G0/G1 期比率の上昇を認め、G1 期細胞周期停止による増殖能の低下が示唆された。また、mRNA レベルでは *p21* をコードする遺伝子である *CDKN1A* の上昇を認め、タンパクレベルで *p53* の発現上昇を認めたが *p21* は検出できなかった。他の *TP53* 変異のある細胞株については有意な増殖能抑制を認めず、T24 において mRNA レベルでの *CDKN1A* の軽度上昇を認め、5637 と RT-112 ではタンパクレベルで *p53* が発現亢進する傾向を認めた。以上の結果から、*STAG2* 発現喪失により生じる増殖抑制および G1 期細胞周期停止に *p53* 経路が関与している可能性が示唆された。*p53* 正常パターンかつ *STAG2* 発現喪失群では予後良好であり増殖能低値となった臨床検体における結果を裏付けるものと考えられた。また、*p53* 経路異常の細胞株では *STAG2* をノックダウンしても増殖能の低下は認められなかったことから、*STAG2*

発現喪失による細胞分裂不安定な状態を維持したまま増殖を続けることが示唆され、p53 変異パターンかつ STAG2 発現喪失群で予後不良となった臨床結果を裏付ける結果と考えられた(図 16)。今回の研究では残念ながら G1 期細胞周期停止に関与する p21 タンパクをウェスタンブロットで確認することができなかった。ポジティブコントロールでは p21 が検出できたことから、検体内の絶対的なタンパク量不足によるものと考えられた。しかし、p21 は非常に不安定な分子であり、その半減期は 30 分前後と言われていることから、タンパク発現の亢進はあったが同時に分解も進んでしまい、検出できなかった可能性は否定できない[74]。以上の点からも SW800 において認められた増殖抑制が p53 経路に起因するものかについては議論の余地が残る。いずれにしても、STAG2 のノックダウンによる mRNA やタンパクの発現亢進は有意ではあるが軽度であり、その関与は限定的と考えられた。

STAG2 発現喪失は尿路上皮癌においてドライバー遺伝子あるいはがん発生の初期段階での関与の可能性が考えられている[54,55]。現在、尿路上皮癌の発癌については、*FGFR3* 変異や *RAS* 変異を伴う過形成から非浸潤乳頭状腫瘍に至る経路と、*TP53* 変異や *RBI* 変異による異形成から上皮内癌・浸潤癌に至る経路の 2 つの経路が存在すると想定されている(図 17)。上部尿路癌でも膀胱癌でも STAG2 発現喪失は

TP53 変異のない非浸潤低悪性度腫瘍に有意に多くみられていることから、前者において過形成から非浸潤乳頭状低悪性度腫瘍への過程に関与すると考えられている[75,76]。本研究において、*STAG2* 発現喪失は *p53* 経路正常な細胞に対して増殖抑制を起こすという結果であったが、それに基づく *STAG2* 発現喪失は腫瘍形成には抑制的に働くと思われる。クロマチンの構造維持と細胞分裂における姉妹染色体の接着を *STAG1* のみで行うという染色体としては不安定な状態のまま増殖を続けることや *STAG2* 発現喪失状態に伴う転写異常が発癌に関与すると考えられるが、*STAG2* 発現喪失状態の長期的な影響などさらなる研究が必要である。

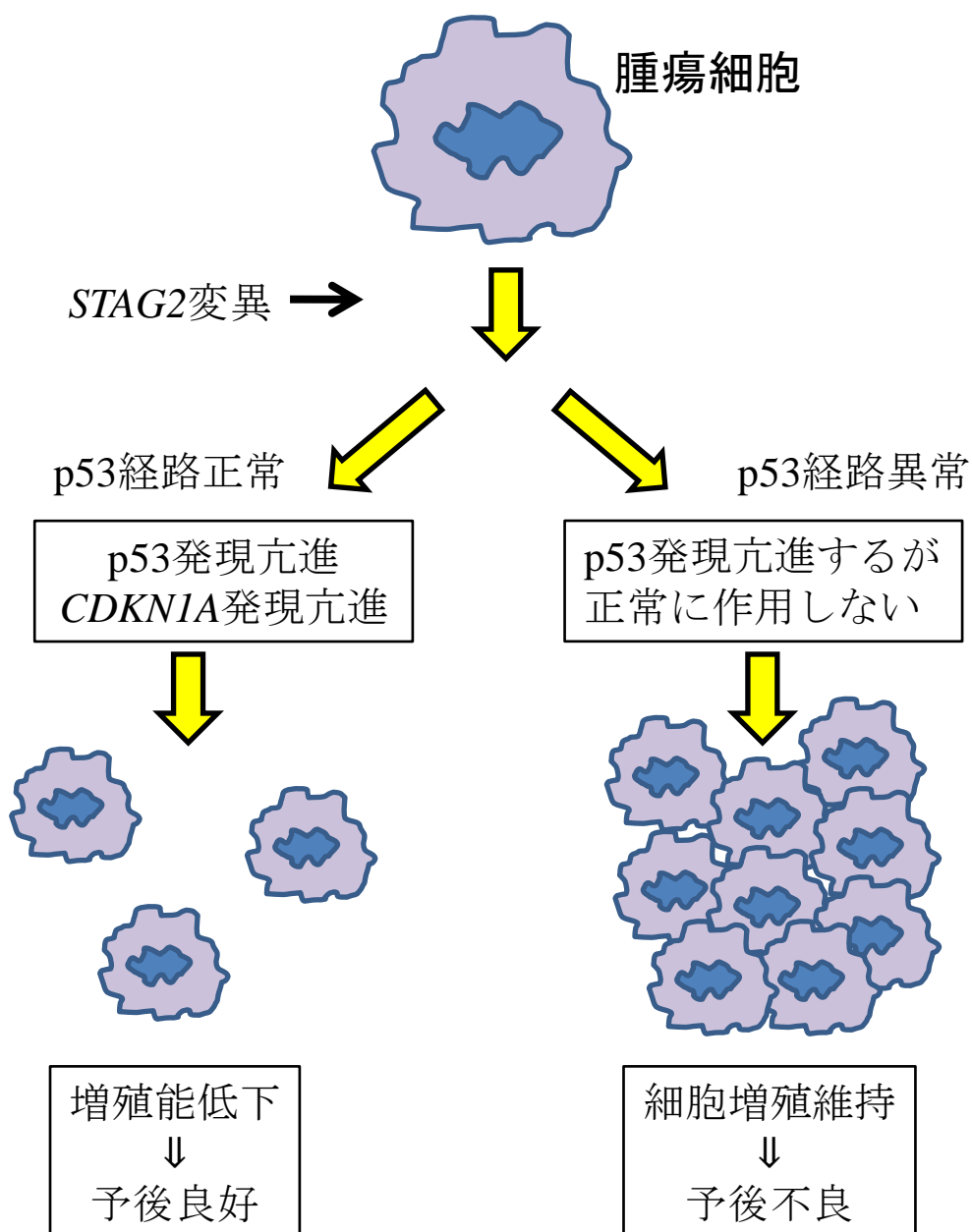


図16. 尿路上皮癌におけるSTAG2発現喪失に対する反応

STAG2変異によりSTAG2の発現が失われてもSTAG1がその機能を補填するため、腫瘍細胞は生存し増殖を続ける。その際のDNA損傷はごく軽微に留まり、p53経路が正常に機能する細胞ではp53-p21経路の軽度亢進により増殖能は低下する。その一方でp53経路に異常を伴う場合はp53-p21経路が機能せず、細胞増殖が維持される。

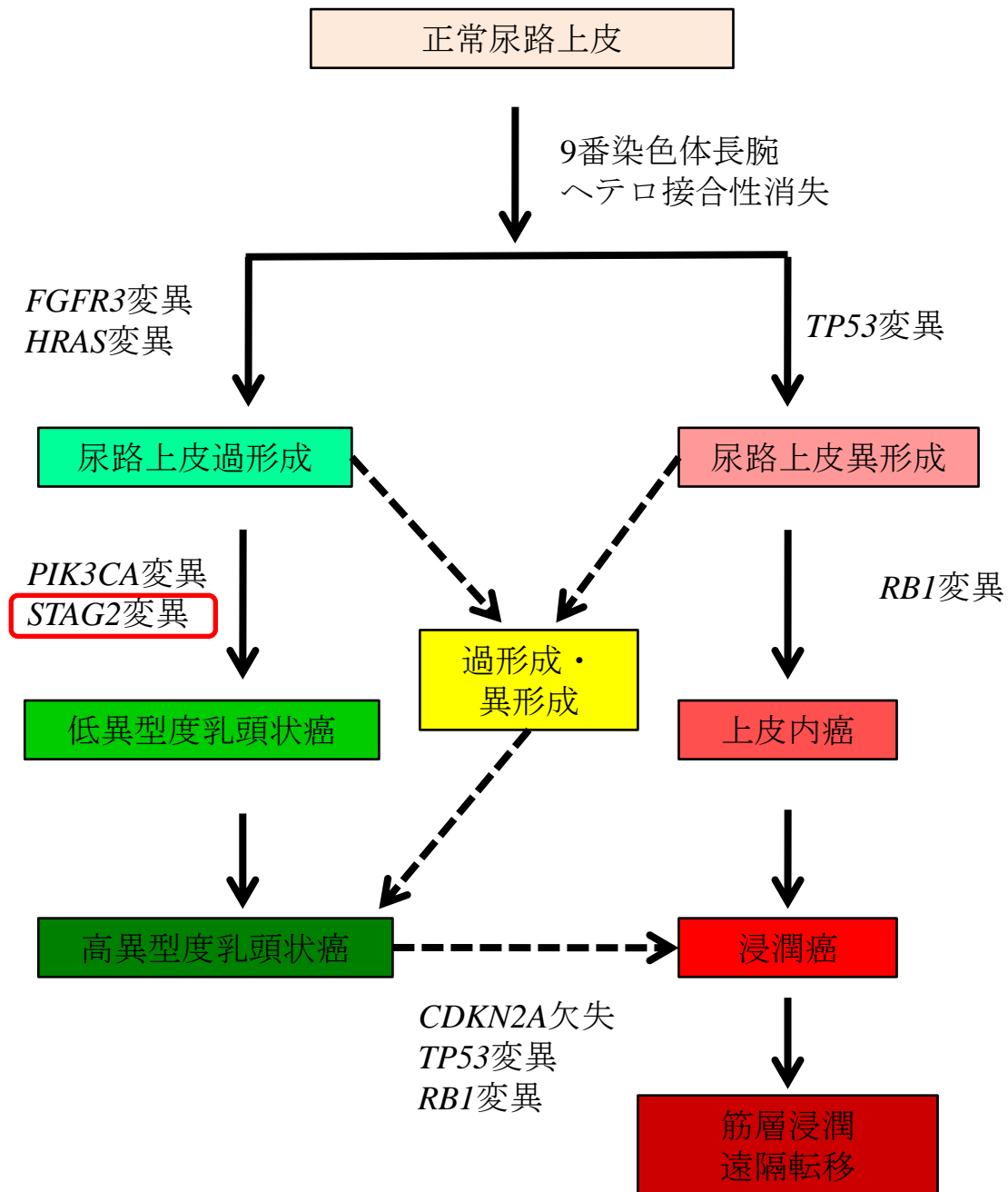


図17. 尿路上皮癌の発癌と進展の過程(文献76より改変)

FGFR3・*RAS*変異による過形成から低異型度癌への経路と、*TP53*・*RB1*変異による異形成から上皮内癌・浸潤癌に至る経路が想定されている。前者の一部に*TP53*・*RB1*変異や*CDKN2A*欠失などが加わることで後者に進展する例がある。*STAG2*変異は過形成から低異型度癌への過程に関与するとされている。

尿路上皮癌においては *STAG2* 変異または *STAG2* 発現喪失と *TP53* 変異との関連についての報告は少なく [47]、細胞株を用いて *STAG2* 発現喪失と p53 経路の関連を評価した研究は本研究が初めてである。膀胱癌のシーケンスでは *TP53* 変異と *STAG2* 変異の併存は 77 例中 2 例 (*STAG2* 変異 11 例)や 99 例中 0 例などの報告がある [45,46]。Taylor の報告ではミスセンス変異を除いた *STAG2* 変異と *TP53* 正常状態に正の相関を認めている [48]。Solomon の報告では *STAG2* 変異例で高頻度に p53 過剰発現を認めたとしているが [47]、総合的に判断すると *STAG2* 変異と *TP53* 変異の合併頻度は低いものと思われる。上部尿路癌の報告では両者の合併は 83 例中 3 例(*STAG2* 変異 19 例)であり [52]、本研究の 171 例中 5 例(*STAG2* 発現喪失 28 例)と比較しても大きな差はない。また、非浸潤膀胱癌において *STAG2* 発現喪失と p53 陰性および Ki-67 低値とが有意に関連することも報告されている [45]。膀胱癌の細胞株については、*STAG2* 変異の細胞株 7 種のうち 6 種で *TP53* 変異が併存しており、臨床検体との乖離がみられる [48]。しかし、本研究において *TP53* 正常細胞株において *STAG2* 変異が加わると増殖能の低下がみられたことから、*STAG2* 変異による細胞周期停止を抑制するために p53 経路の抑制(あるいは他の因子による細胞周期停止の抑制)が細胞株として樹立するためには必要であるものと考えられる。尿路上皮

癌のオルガノイド培養の際に *TP53* と *STAG2* の両者をノックアウトすることで効率的な培養が可能であったという報告もあり、両遺伝子の変異が併存することによる増殖能への影響を示唆している[77]。

今回の研究で、*STAG2* のノックダウンに対して p53 経路が関与はするもののその作用が限定的であった理由として、*STAG2* のパラログである *STAG1* の存在が考えられた。*STAG1* は *STAG2* と 70%以上が同じアミノ酸配列で構成されており、*STAG2* と同様にコヒーシン複合体を構成する[78,79](図 1)。正常細胞においては *STAG2* と比較して発現量は低く、*STAG2* が主なコヒーシン複合体の構成タンパクと考えられている[80]。また、*STAG2* は姉妹染色分体の中心部であるセントロメア領域に、*STAG1* は末端であるテロメア領域に主に発現するとされている[23]。*STAG1* と *STAG2* のどちらかが発現喪失した状態では増殖能は維持されるが、*STAG1* と *STAG2* が同時に発現喪失した場合に増殖低下および細胞死が誘導されると報告されている [24,41,81]。コヒーシン複合体の他の構成タンパクである *RAD21* や *SMC1*、*SMC3* はパラログが存在しないため単独の発現喪失により著明な細胞死を認める一方、*STAG1* と *STAG2* はどちらかが発現喪失した状態でももう一方の作用のみで細胞分裂を果たして生存できると考えられる。今回の研究でも *STAG2* をノックダウンしても *STAG1* の発現は維持されていた。

コヒーシンは細胞分裂以外でも作用していることが報告されており、CCCTC-binding factor (CTCF)タンパクと協調して遺伝子間のインスレーターとしての機能、クロマチン構造の維持への関与、さらにはエンハンサーとプロモーターを空間的に近づけることで転写の活性化に寄与するなど、姉妹染色分体の接着以外の機能も認められている[82-85]。造血幹細胞においては STAG2 の発現喪失により、STAG1 のみではクロマチンの構造を維持できず、細胞分化に関する遺伝子の転写活性が抑制され、その後の分化異常につながるという報告もあるように、STAG1 だけでは STAG2 の機能を完全には補うことができないことが予想される[25,86]。今回の研究においても発現喪失させた STAG2 の機能を補いつつも完全ではないため、軽微な DNA 損傷による限定的な増殖能の低下や p53 経路の発現亢進を招いたものと考えられた。

本研究においてはいくつかの課題がある。まずは、上部尿路癌の臨床検体を用いた研究については後ろ向き研究であることと、STAG2 と p53 の発現の有無については免疫組織化学染色による評価のみであり、STAG2 と TP53 の変異と完全に一致しているわけではないということである。STAG2 と TP53 の両者とも免疫組織化学染色による評価とシーケンスによる変異の有無は非常に高い相関があることが知られているが、STAG2 の免疫組織化学染色により検出できる腫瘍

は短縮型変異を持つ 85%であり、残りの 15%については免疫組織化学染色では検出できない[45,46]。TP53 については免疫組織化学染色とシーケンスの結果が異なるという報告もあり、免疫組織化学染色のみでの評価には注意する必要がある[87,88]。また、STAG2 発現喪失例に極端に生存率が高い群と極端に生存率が低い群が混在したため、単独では予後規定因子とはならなかった。その影響をなくすために Ki-67 高値群と低値群、p53 正常パターン群と異常パターン群のように分割して多変量解析を行う方法も検討されたが、分割することにより症例数が減るため本研究においては良い解析モデルとはなりえなかった。

今後症例数を増やすことでより詳細に STAG2 発現喪失と他因子との交絡を調整することが可能になると考える。細胞株を用いた研究については、使用した細胞株が膀胱癌の細胞株であり上部尿路を原発としているものではないということである。現在上部尿路癌から樹立された細胞株で購入可能なものは存在しないため、同じ尿路上皮癌である膀胱癌の細胞株を使用した。しかし、膀胱癌と上部尿路癌で遺伝子変異プロファイルが異なるなど、同じ尿路上皮癌でも性質が異なる可能性も指摘されている[52,89]。本来であれば上部尿路癌から樹立した細胞株における STAG2 ノックダウンの影響を確認する必要がある。膀胱癌細胞株との差も比較できるとより深い知見が得られるであろう。ま

た、今回増殖抑制を認めた *TP53* 正常細胞株が SW800 のみであるため、この細胞株に特異的な変化である可能性は否定できない。*STAG2* 発現喪失と *TP53* 変異との関連が普遍的なものであることを示すには、他の *TP53* 正常細胞株で同様の現象を確認する、あるいは *TP53* 正常株に対する *TP53* ノックダウンや *TP53* 変異株に対する正常 *TP53* ノックインによる *STAG2* ノックダウンとの関連を評価する必要がある。また、p53 経路および細胞周期関連遺伝子・タンパクの評価が部分的であるため、今後は網羅的な評価を行って全体像を明らかにしていく必要があると考える。さらに、尿路上皮癌の細胞株に対する *STAG2* ノックダウンは siRNA によるあくまで部分的かつ短期的な遺伝子発現の抑制であり、*STAG2* 変異による *STAG2* の完全な発現喪失状態が長期間継続している場合の作用とは異なる可能性がある。shRNA を発現するベクターの導入による *STAG2* ノックダウン細胞株を樹立するなど、長期的な変化を観察できる方法を検討していく必要があり、今後の研究課題と考える。

今後の展望としては、p53 経路の評価と組み合わせることにより悪性度の高い腫瘍の同定や予後予測に有用であると考えられ、追加治療の必要性など治療法の決定の判断材料になると考えられた。また、序文で述べた通り進行した尿路上皮癌は化学療法や免疫療法による治療が標準治療であるがその効果は限定的であり、分子標的薬などの個

別化医療についても尿路上皮癌については現段階では選択肢が少ないという現状である。尿路上皮癌における **STAG2** 発現喪失の機能的意義を解明することは、**STAG2** 変異の治療標的としての意義を確立することにつながると考えられ、将来的には **STAG2** 変異の有無がコンパニオン診断として尿路上皮癌の治療方針に関与できるよう研究を進めていきたい。

結論

上部尿路癌において **STAG2** 発現喪失が低異型度乳頭状非浸潤癌に多く、**Ki-67** 低値および **p53** 正常パターンと相関するという臨床病理学的特徴が明らかとなった。**Ki-67** 低値あるいは **p53** 正常パターンにおいては **STAG2** 発現喪失群で有意に生存率が高く、**Ki-67** 高値あるいは **p53** 変異パターンにおいては **STAG2** 発現喪失群で有意に生存率が低いなど、増殖能や **p53** 経路の状態によって **STAG2** 発現喪失の生存率への影響が異なることが判明した。また、膀胱癌細胞株では **TP53** 正常細胞株において **STAG2** 発現喪失により増殖能低下および G1 期細胞周期停止が誘導され、その反応に **p53** 経路が関与している可能性が示唆された。

引用文献

1. Huben RP, Mounzer AM, Murphy GP. Tumor grade and stage as prognostic variables in upper tract urothelial tumors. *Cancer*. 62: 2016–2, 1988.
2. 平成 29 年人口動態統計（厚生労働省大臣官房統計情報部編）
3. がん診療連携拠点病院等院内がん登録生存率集計(国立がん研究センターがん情報サービス)
4. 膀胱癌診療ガイドライン 2019 年版(日本泌尿器科学会 編)
5. 腎盂・尿管診療ガイドライン 2014 年版(日本泌尿器科学会 編)
6. von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol*. 23(21):4602–8, 2005.
7. Fradet Y, Bellmunt J, Vaughn DJ, et al. Randomized phase III KEYNOTE-045 trial of pembrolizumab versus paclitaxel, docetaxel, or vinflunine in recurrent advanced urothelial cancer: results of >2 years of follow-up. *Ann Oncol*. 30(6):970–976, 2019.
8. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, et al. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*. 376:1015–1026,

2017.

9. Champiat S, Dercle L, Ammari S, et al. Hyperprogressive Disease Is a New Pattern of Progression in Cancer Patients Treated by Anti-PD-1/PD-L1. *Clin Cancer Res.* 23(8):1920–28, 2017.

10. Ferrara R, Mezquita L, Texier M, et al. Hyper progressive Disease in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated With PD-1/PD-L1 Inhibitors or With Single-Agent Chemotherapy. *JAMA Oncol.* 4(11):1543–1552, 2018.

11. Yoshida T, Kates M, Fujita K, Bivalacqua TJ, McConkey DJ. Predictive biomarkers for drug response in bladder cancer. *Int J Urol.* 26(11):1044–1053, 2019.

12. Nishino M, Ramaiya NH, Hatabu H, Hodi FS. Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development. *Nat Rev Clin Oncol.* 14(11):655–668, 2017.

13. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 16(5):275–87, 2016.

14. DNA Sequencing Costs: Data. National Human Genome Research Institute.

<https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>

15. Cheng DT, Mitchell TN, Zehir A, et al. Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology. *J Mol Diagn.* 17(3):251–64, 2015.

16. Kohsaka S, Tatsuno K, Ueno T, et al. Comprehensive assay for the molecular profiling of cancer by target enrichment from formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Cancer Sci.* 110(4):1464–1479, 2019.

17. Perera TPS, Jovcheva E, Mevellec L, et al. Discovery and Pharmacological Characterization of JNJ-42756493 (Erdafitinib), a Functionally Selective Small-Molecule FGFR Family Inhibitor. *Mol Cancer Ther.* 16(6):1010–1020, 2017.

18. Karkera JD, Cardona GM, Bell K, et al. Oncogenic Characterization and Pharmacologic Sensitivity of Activating Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) Genetic Alterations to the Selective FGFR Inhibitor Erdafitinib. *Mol Cancer Ther.* 16(8):1717–1726, 2017.

19. Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K. Cohesins: chromosomal proteins that

- prevent premature separation of sister chromatids. *Cell*. 91(1):35–45, 1997.
20. Guacci V, Koshland D, Strunnikov A. A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell*. 91(1):47–57, 1997
21. Haarhuis JH, Elbatsh AM, Rowland BD. Cohesin and its regulation: on the logic of X-shaped chromosomes. *Dev Cell*. 13;31(1):7–18, 2014.
22. Prieto I, Suja JA, Pezzi N, et al. Mammalian STAG3 is a cohesion specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol*. 3(8):761–6, 2001.
23. Canudas S, Smith S. Differential regulation of telomere and centromere cohesion by the Scc3 homologues SA1 and SA2, respectively, in human cells. *J Cell Biol*. 187(2):165–73, 2009.
42. van der Lelij P, Lieb S, Jude J, et al. Synthetic lethality between the cohesion subunits *STAG1* and *STAG2* in diverse cancer contexts. *Elife*. 6:e26980, 2017.
25. Viny AD, Bowman RL, Liu Y, et al. Cohesin Members Stag1 and Stag2 Display Distinct Roles in Chromatin Accessibility and Topological Control of HSC Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell*. 25(5):682–696, 2019.

26. Countryman P, Fan Y, Gorthi A, et al. Cohesin SA2 is a sequence-independent DNA-binding protein that recognizes DNA replication and repair intermediates. *J Biol Chem.* 293(3):1054–1069, 2018.
27. Kleyman M, Kabeche L, Compton DA. STAG2 promotes error correction in mitosis by regulating kinetochore-microtubule attachments. *J Cell Sci.* 127:4225–33, 2014.
28. Barber TD, McManus K, Yuen KW, et al. Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(9):3443–8, 2008.
29. Rocquain J, Gelsi-Boyer V, Adelaide J, et al. Alteration of cohesion genes in myeloid diseases. *Am J Hematol.* 85(9):717–9, 2010.
30. Solomon DA, Kim T, Diaz-Martinez LA, et al. Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science.* 333:1039–43, 2011.
31. Kim MS, Kim SS, Je EM, Yoo NJ, Lee SH. Mutational and expressional analyses of STAG2 gene in solid cancers. *Neoplasma.* 59:524–9, 2012.
32. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature.* 505:495–501, 2014.
33. Tirode F, Surdez D, Ma X, Parker M, et al. Genomic landscape of Ewing

sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations. *Cancer Discov.* 4:1342–53, 2014.

34. Mullenders J, Aranda-Orgilles B, Lhoumaud P, et al. Cohesin loss alters adult hematopoietic stem cell homeostasis, leading to myeloproliferative neoplasm. *J Exp Med.* 212(11):1833–50, 2015.

35. Kon A, Shih LY, Minamino M, et al. Recurrent mutations in multiple components of the cohesion complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet.* 45(10):1232–7, 2013.

36. Evers L, Perez-Mancera PA, Lenkiewicz E, et al. STAG2 is a clinically relevant tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genome Med.* 6(1):9, 2014.

37. 日本経済新聞 2016/8/5 「AI、がん治療法助言 白血病のタイプ見抜く」

<https://www.nikkei.com/article/DGXLZO05697850U6A800C1000000/>

38. Bailey ML, O'Neil NJ, van Pel DM, Solomon DA, Waldman T, Hieter P. Glioblastoma cells containing mutations in the cohesin component STAG2 are sensitive to PARP inhibition. *Mol Cancer Ther.* 13:724–32, 2014.

39. Matto N, aymes TJ, Kulasekararaj AG, Mian SA, Mufti GJ. Mutations in Cohesin Complex As Potential Targets for therapeutic Intervention By

PARP (Poly ADP Ribose Polymerase) Inhibitors in Myelodysplastic Syndrome. *Blood*. 126:1221, 2015.

40. McLellan JL, O’Neil NJ, Barrett I, et al. Synthetic lethality of cohesions with PARPs and replication fork mediators. *PLoS Genet*. 8(3):e1002574, 2012.

41. Liu Y, Xu H, Van der Jeught K, et al. Somatic mutation of the cohesion complex subunit confers therapeutic vulnerabilities in cancer. *J Clin Invest*. 128(7):2951–2965, 2018.

42. Stewart E, Goshorn R, Bradley C, et al. Targeting the DNA repair pathway in Ewing sarcoma. *Cell Rep*. 9(3):829–41, 2014.

43. Ding S, Diep J, Feng N, et al. STAG2 deficiency induces interferon responses via cGAS-STING pathway and restricts virus infection. *Nat Commun*. 9(1):1485, 2018.

44. Shen CH, Kim SH, Trousil S, et al. Loss of cohesion complex components STAG2 or STAG3 confers resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Nat Med*. 22(9):1056–61, 2016.

45. Balbas-Martinez C, Sagrera A, Carrillo-de-Santa-Pau E, et al. Recurrent inactivation of STAG2 in bladder cancer is not associated with aneuploidy. *Nat Genet* 45: 1464–9, 2013.

46. Guo G, Sun X, Chen C, et al. Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. *Nat Genet.* 45:1459–63, 2013.
47. Solomon DA, Kim JS, Bondaruk J, et al. Frequent truncating mutations of STAG2 in bladder cancer. *Nat Genet.* 45:1428–30, 2013.
48. Taylor CF, Platt FM, Hurst CD, Thygesen HH, Knowles MA. Frequent inactivating mutations of STAG2 in bladder cancer are associated with low tumour grade and stage and inversely related to chromosomal copy number changes. *Hum Mol Genet.* 23:1964–74, 2014.
49. Qiao Y, Zhu X, Li A, Yang S, Zhang J. Complete loss of STAG2 expression is an indicator of good prognosis in patients with bladder cancer. *Tumour Biol.* 37:10279–86, 2016.
50. Han Y, Zheng Q, Tian Y, Ji Z, Ye H. Identification of a nine-gene panel as a prognostic indicator for recurrence with muscle-invasive bladder cancer. *J Surg Oncol.* 119(8):1145–1154, 2019.
51. Lelo A, Prip F, Harris BT, et al. STAG2 Is a Biomarker for Prediction of Recurrence and Progression in Papillary Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Clin Cancer Res.* 24(17):4145–4153, 2018.

52. Sfakianos JP, Cha EK, Iyer G, et al. Genomic Characterization of Upper Tract Urothelial Carcinoma. *Eur Urol*. 68:970–7, 2015.
53. Li Q, Bagrodia A, Cha EK, Coleman JA. Prognostic Genetic Signatures in Upper Tract Urothelial Carcinoma. *Curr Urol Rep*. 17(2):12, 2016.
54. Li X, Zhang TW, Tang JL, et al. Loss of STAG2 causes aneuploidy in normal human bladder cells. *Genet Mol Res*. 14:2638–46, 2015.
55. Daniloski Z, Smith S. Loss of Tumor Suppressor STAG2 Promotes Telomere Recombination and Extends the Replicative Lifespan of Normal Human Cells. *Cancer Res*. 77(20):5530–5542, 2017.
56. Wang H, Zhong J, Wu C, et al. Stromal antigen 2 functions as a tumor suppressor in bladder cancer cells. *Oncol Rep*. 38(2):917–925, 2017.
57. Liu KX, Lamba N, Hwang WL, et al. Risk stratification by somatic mutation burden in Ewing sarcoma. *Cancer*. 125(8):1357–1364., 2019.
58. Zhang Y, Song J, Shi Q, et al. The prognostic signature of the somatic mutations in Ewing sarcoma: from a network view. *Jpn J Clin Oncol*. 49(7):604–613, 2019.
59. Mondal G, Stevers M, Goode B, Ashworth A, Solomon DA. A requirement for STAG2 in replication fork progression creates a targetable synthetic lethality in cohesion-mutant cancers. *Nat Commun*. 10(1):1686,

2019.

60. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol.* 70:106–19, 2016.

61. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 31(1):13–20, 1983.

62. Oosterhuis JW, Schapers RF, Janssen-Heijnen ML, Smeets AW, Pauwels RP. MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder: clinical significance and comparison with other prognostic factors. *Cancer.* 88:2598–605, 2000.

63. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 133:1710–5, 1984.

64. Oosterhuis JW, Schapers RF, Janssen-Heijnen ML, Smeets AW, Pauwels RP. MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder; clinical significance and comparison with other prognostic factors. *Cancer.* 88:2598–605, 2000.

65. Wu TT, Chen JH, Lee YH, Huang JK. The role of bcl-2, p53, and ki-67

index in predicting tumor recurrence for low grade superficial transitional cell bladder carcinoma. *J Urol*. 163:758–60, 2000.

66. Curtin K, Slattery ML, Holubkov R, et al. p53 alterations in colon tumors: a comparison of SSCP/sequencing and immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 12(4):380–6, 2004.

67. Fromont G, Roupret M, Amira N, et al. Tissue microarray analysis of the prognostic value of E-cadherin, Ki67, p53, p27, survivin and MSH2 expression in upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Eur Urol*. 48:764–70, 2005.

68. Ando K, Oki E, Saeki H, et al. Discrimination of p53 immunohistochemistry-positive tumors by its staining pattern in gastric cancer. *Cancer Med*. 4(1):75–83, 2015.

69. Köbel M, Reuss A, du Bois A, et al. The biological and clinical value of p53 expression in pelvic high-grade serous carcinomas. *J Pathol*. 222(2): 191–8, 2010.

70. Habuchi T, Kinoshita H, Yamada H, et al. Oncogene amplification in urothelial cancers with p53 gene mutation or MDM2 amplification. *J Natl Cancer Inst*. 86(17):1331–5, 1994.

71. Lianes P, Orlow I, Zhang ZF, et al. Altered patterns of MDM2 and TP53

expression in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 86(17):1325–30, 1994.

72. Earl J, Rico D, Carrillo-de-Santa-Pau E, et al. The UBC-40 Urothelial Bladder Cancer cell line index: a genomic resource for functional studies. *BMC Genomics.* 22;16:403, 2015.

73. Zuiverloon TCM, de Jong FC, Costello JC, Theodorescu D. Systematic Review: Characteristics and Preclinical Uses of Bladder Cancer Cell Lines. *Bladder Cancer.* 4(2):169–183, 2018.

74. Tsuruta F, Takebe A, Haratake K, et al. SCFFbl12 Increases p12Waf1/Cip1 Expression Level through Atypical Ubiquitin Chain Synthesis. *Mol Cell Biol.* 36(16):2182–94, 2016.

75. Inamura K. Bladder Cancer: New Insights into its Molecular Pathology. *Cancers (Basel).* 10(4). pii: E100, 2018.

76. Wu XR. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer.* 5(9):713–25, 2005.

77. Mullenders J, de Jongh E, Brousalı A, et al. Mouse and human urothelial cancer organoids: A tool for bladder cancer research. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 116(10): 4567–4574, 2019.

78. Carramolino L, Lee BC, Zaballos A, et al. SA-1, nuclear protein

encoded by one member of novel gene family: molecular cloning and detection in hemopoietic organs. *Gene*. 195(2):151–9, 1997.

79. Zhang N, Jiang Y, Mao Q, et al. Characterization of the interaction between the cohesion subunits Rad21 and SA1/2. *PLoS One*. 8(7):e69458, 2013.

80. Holzmann J, Fuchs J, Pichler P, Peters JM, Mechtler K. Lesson from the stoichiometry determination of the cohesion complex: a short protease mediated elution increases the recovery from cross-linked antibody-conjugated beads. *J Proteome Res*. 10(2): 780–9, 2011.

81. Benedatti L, Cerada M, Monteverde L, Desai N, Ciccarelli FD. Synthetic lethal interaction between the tumour suppressor STAG2 and its paralog STAG1. *Oncotarget*. 8(23):37619–37632, 2017.

82. Kojic A, Cuadrado A, De Koninck M, et al. Distinct roles of cohesion-SA1 and cohesion-SA2 in 3D chromosome organization. *Nat Struct Mol Biol*. 25(6):496–504, 2018.

83. Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, et al. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*. 451(7180):79–801, 2008.

84. Rubio ED, Reiss DJ, Welch PL, et al. CTCF physically links cohesion to chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 17;105(24):8309–14.

85. Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, et al. Mediator and cohesion connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*. 467(7314):430–5, 2010.
86. Rollins RA, Morcillo P, Dorsett D. Nipped-B, a *Drosophila* homologue of chromosomal adherins, participates in activation by remote enhancers in the cut and Ultrabithorax genes. *Genetics*. 152(2):577–93, 1999.
87. Puhalla H, Kandoler D, Ludwig C, et al. p53 analysis in gallbladder cancer: comparison of gene analysis versus immunohistochemistry. *Anticancer Res*. 24(2C):1201–6, 2004.
88. Sjögren S, Inganäs M, Norberg T, et al. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst*. 88(3-4):173–82, 1996.
89. Sanford T, Porten S, Meng MV. Molecular Analysis of Upper Tract and Bladder Urothelial Carcinoma: Results from a Microarray Comparison. *PLoS One*. 10(8):20137141, 2015.

謝辞

本研究の遂行を御支援、御指導いただきました指導教官である
東京大学大学院医学系研究科外科学専攻臓器病態外科学講座 泌尿器
外科学 久米春喜 教授ならびに本間之夫 前教授に深く感謝いたし
ます。

また、本研究全般に渡り、御指導および御協力いただきました
東京大学大学院病因・病理学専攻病理学講座 人体病理学・病理診断
学 森川鉄平 准教授(現 NTT 東日本関東病院 病理診断科 部長)、
牛久哲男 教授ならびに深山正久 前教授に感謝申し上げます。

本研究に数々のご助言・ご協力を賜りました東京大学大学院医
学系研究科病因・病理学専攻病理学講座 国田朱子 助教、同研究室
の他の先生方、実験助手の皆様、また泌尿器科学教室の先生方、実験
助手の齋藤愛穂氏に厚く御礼申し上げます。