論文の内容の要旨

論文題目　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

氏名　宮川　仁平

背景と目的

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・再発を認めた尿路上皮癌に対する標準治療としての化学療法は一時的な奏功は期待できても次第に抵抗性を獲得して治療困難となる。近年注目を浴びている免疫チェックポイント阻害剤についても治療効果は限定的である。そのような状況のなか、次世代シークエンスの普及に伴い、尿路上皮癌についてもゲノム解析が進んでおり、個々の腫瘍の変異に応じた分子標的医療が期待されているが、残念ながら尿路上皮癌において治療標的となる遺伝子変異は現時点では少ない。

膀胱癌のシークエンスにより姉妹染色分体の接着に関与するコヒーシン複合体の構成タンパクである Stromal antigen 2 (STAG2)の遺伝子 *STAG2* の変異が高頻度に認められた。*STAG2* の変異は Ewing 肉腫、血液腫瘍、神経膠芽腫などにも高頻度に見られ、発現喪失により異数体の出現に関与することが報告されている。正常尿路上皮細胞において STAG2 発現喪失により異数体が出現したという報告はあるが、尿路上皮癌の臨床検体では STAG2 発現喪失と異数体との関連は否定的であり、尿路上皮癌の細胞株を用いた研究でも STAG2 発現喪失による異数体の出現は認められなかった。このことから、STAG2 変異が腫瘍発生の初期に関与することが示唆されているが、尿路上皮癌における機能的意義は不明瞭な部分が多く、また治療標的としての意義も不明である。

Ewing 肉腫においては *STAG2* 変異と *TP53* 変異が併存した場合には相乗的に生存率を低下させると報告されている。また近年正常上皮細胞において *STAG2* をノックダウンすると p53 経路を介して細胞周期停止が誘導されるという報告があり、STAG2 発現喪失状態における p53 経路の作用が注目されるようになった。しかし、尿路上皮癌においては STAG2 発現喪失と p53 経路の関連についての報告が皆無である。

今回我々は上部尿路癌(腎盂癌および尿管癌)における STAG2 発現喪失の臨床病理学的意義や生存率との関係を増殖能や p53 パターンとの関連も含めて検討を行った。さらに、同じ尿路上皮癌である膀胱癌の細胞株を用いて *STAG2* をノックダウンさせることで STAG2 発現喪失と増殖能および p53 経路との関連について研究を行った。

方法と結果

東京大学医学部附属病院で腎尿管全摘除術を行った術前化学療法未施行の上部尿路癌171例について組織マイクロアレイを作成し、免疫組織化学染色によって腫瘍細胞のSTAG2発現喪失を評価した。腫瘍細胞が完全に染まらない症例をSTAG2発現喪失と判定し、臨床病理学的因子との関連を解析した。その他、Ki-67染色とp53染色を行い、STAG2発現喪失との関連および予後との関連を評価した。その結果、STAG2発現喪失は低異型度・乳頭状・非浸潤癌との間に有意な相関を認めた(いずれも P <0.01)。さらにKi-67低値と有意な相関を認め(P <0.01)、p53正常パターンと相関する傾向を認めた(P =0.051)。STAG2発現喪失群で無転移生存率(MFS)、癌特異的生存率(CSS)ともに生存率が高い傾向にあったが単独では統計学的な有意差は認められなかった(MFS: P =0.19, CSS: P =0.46)。多変量解析でもSTAG2発現喪失は有意な予後規定因子ではなかった(MFS: P =0.96, CSS: P=0.94)。Ki-67値により2群に分けて解析したところ、Ki-67低値群ではSTAG2発現喪失で生存率が高く(MFS: P =0.049, CSS: P =0.069)、その一方でKi-67高値群では逆に有意に生存率が低い結果となり(MFS: P =0.013, CSS: P <0.01)、STAG2発現喪失とKi-67との間に交互作用を認めた（ともに $P_{\mathrm{interaction}}$ <0.01）。また、p53のパターンによる分割でも同様の傾向を認め、p53正常パターンではSTAG2発現喪失群で生存率が高い傾向(MFS: P =0.12, CSS: P =0.18)、p53変異パターンでは生存率が低い傾向を認め(MFS: P =0.28, CSS: P =0.16)、統計学的な有意差はつかなかったものの交互作用の傾向を認めた（MFS: $P_{\mathrm{interaction}}$ =0.058, CSS: $P_{\mathrm{interaction}}$ =0.051）。このことから増殖能や *TP53* 変異の有無といった腫瘍の性質によりSTAG2発現喪失の生存率への影響が異なる可能性が示唆された。

STAG2発現喪失とp53パターンで4群に分割しKi-67陽性率を評価したところ、STAG2発現喪失かつp53正常パターン群で他の3群と比較して有意にKi-67陽性率が低値であった。このことから、p53正常状態においてはSTAG2発現喪失により増殖能が低下し、生存率が高くなる可能性が示唆された。

また、上部尿路癌85例の公開データセットにおいて *STAG2* 変異とp53経路異常を抽出して同様の解析を行ったところ、東大病院症例と同様にp53経路正常群では *STAG2* 変異で生存率が高く、p53経路異常群では逆に生存率が低く、*STAG2* 変異とp53経路との間に有意な交互作用を認めた。

つづいて、膀胱癌の細胞株に対してsiRNAを用いて *STAG2* をノックダウンして短期的なSTAG2発現喪失状態を作り、その際の増殖能の変化や細胞周期解析、さらにp53経路との関連を評価した。*TP53* 正常株であるSW800と *TP53* 変異株であるT24, 5637, RT-112という計4種の細胞株に対して *STAG2* をノックダウンしたところ、T24, 5637, RT-112は有意な増殖能の変化を認めなかったがSW800において有意な増殖能の低下を認めた。細胞周期解析では統計学的な有意差は認めなかったがSW800でのみG0/G1期細胞比率が増加し、S期・G2期の細胞比率が低下する傾向を認めた。細胞株のmRNA発現をRT-PCRで評価したところ、p53経路内の遺伝子のうち *CDKN1A* のみSTAG2 siRNA群で有意な上昇を見せた。また、

タンパク発現をウエスタンブロットで評価したところ、SW800 においては STAG2 siRNA 群で p53 の有意な上昇を、5637 と RT-112 については有意ではないが上昇の傾向を認めた。T24 については *TP53* のナンセンス変異を有するため p53 は検出できなかった。いずれの群においても p21 の発現は検出できなかった。

結論

以上より、上部尿路癌において STAG2 発現喪失は乳頭状・低異型度・非浸潤癌に多く認められ、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 正常パターンの症例においては STAG2 発現喪失群で生存率が高く、Ki-67 高値あるいは p53 変異パターンの症例においては STAG2 発現喪失群で生存率が低いなど、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* 正常株において STAG2 発現喪失群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。

STAG2 発現喪失は p53 経路の評価と組み合わせることで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た。また、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ため、今後研究を進めることで *STAG2* 変異が治療方針決定やコンパニオン診断としての活用へ関与することが期待される。