

腫瘍最前線レポート - 第31回

～筆者から一言～

今回は移行上皮癌の遺伝子診断についてです。癌の遺伝子診断はヒトでは一般的な診断方法ですが、犬においては診療の現場で利用されている遺伝子診断の種類は数える程度です。最近、移行上皮癌において感度の高い遺伝診断方法が可能となりました。移行上皮癌に対しては、従来も腫瘍抗原テスト (bladder tumor antigen test) が存在していましたが、膀胱炎の症例でも陽性を示すことがあることから、確定診断に用いられることはありませんでした。しかし、BRAF 遺伝子検査は移行上皮癌に認められる BRAF 遺伝子の変異を検出する検査であり、膀胱炎の症例では陽性を示しません。この検査は尿沈渣を用いても行うことができるため、患者への負担も少ないです。ただし検査が陰性となった場合は、移行上皮癌が完全に否定されたわけではないので、さらなる検査を行わなければなりません。また BRAF 遺伝子は、ヒトの悪性黒色腫をはじめとする多くの腫瘍で変異が認められるがん原遺伝子であり、ヒトの医療ではこの遺伝子産物をターゲットとするさまざまな治療薬が開発されています。犬でこれらの治療薬が利用できる日がくれば、治療法の限られている移行上皮癌に対する治療選択肢が広がり、生存期間延長に繋がるかもしれません。

犬の尿路および前立腺癌の分子診断検査としての尿の遺伝子を用いた BRAF 変異の検出
PLoS One. 2015 Dec 9;10(12):e0144170.

Detection of BRAF Mutation in Urine DNA as a Molecular Diagnostic for Canine Urothelial and Prostatic Carcinoma.

Mochizuki H, Shapiro SG, Breen M.

下部尿路の尿路上皮癌 (UC) と前立腺癌 (PC) は犬で認められる尿生殖器の悪性度の高いがんであり、周辺組織への浸潤と高率に発生する転移が特徴である。現在、UC と PC の診断にはバイオプシーにより得られた病理組織学的検査が必要である。バイオプシーを行うには特殊な医療機器が必要であり、また侵襲的な検査であるため、病理組織学的診断に至らないこともある。このため、非侵襲的な検査による UC と PC の診断が必要である。近年、犬において BRAF 遺伝子の V595E 変異が 80% にのぼる犬 UC と PC で検出された。今回の報告では、犬の尿路上皮癌における BRAF 遺伝子の V595E 変異検出のため、droplet digital PCR (ddPCR) 法を確立した。今回確立した検出法を、UC (n= 48) と PC (n= 23) の生検材料と、非腫瘍性の膀胱上皮 (n= 38) を用いて評価した。さらに、UC (n= 48) と PC (n= 23) の症例と、膀胱炎をわずらう犬と健康な犬からなるコントロールより得られた自然排尿により採取された尿サンプルについても、評価を行なった。全ての犬で、変異検出の感度をサンガー法と比較した。ddPCR はサンガー法よりも検出感度に優れた方法であった。UC の 75% と PC の 85% で遺伝子の変異が検出され、コントロールでの変異の検出率は 0% であり、変異の発現頻度 0.01% まで検出可能であった。さらに、ddPCR 法は UC と PC の症例の 83% で変異を検出したことから、非侵襲的な診断法としての有用性を示した。今回の結果により、ddPCR が感度の高い分子生物学的方法であり、犬の UC と PC において正確でなおかつ非侵襲的な診断法となりうることが示唆された。

Abstract

Urothelial carcinoma (UC) of the lower urinary tract and prostatic carcinoma (PC) are aggressive genitourinary cancers in dogs, characterized by invasion to surrounding tissues and high metastatic potential. Current diagnosis of canine UC and PC requires histopathological examination of a biopsy. Such specimens require specialized medical equipment and are invasive procedures, limiting the availability of diagnosis by histopathology for many canine patients. Access to a non-invasive means to confirm diagnosis is currently an unmet need. Recently, the canine BRAF V595E mutation was detected in ~80% of canine UCs and PCs. In this study, we developed a droplet digital PCR (ddPCR) assay for detection of the canine BRAF V595E mutation in canine urogenital tumors. The assay was evaluated in DNA samples prepared from biopsy specimens of UC (n = 48) and PC (n = 27), as well as non-neoplastic bladder epithelium (n = 38). In addition the assay was assessed for use with DNA isolated from free catch urine samples derived from canine patients with UC (n = 23), PC (n = 3), as well as from dogs with cystitis and healthy controls (n = 37). In all cases the sensitivity to detect the mutant allele was compared with conventional Sanger sequencing. ddPCR had superior sensitivity for detection of the V595E mutation: 75% of UC, 85% of PC, and 0% of control samples were mutation positive, respectively, and the V595E mutation was detected at a level as low as just 1 in 10,000 alleles (~0.01%). Furthermore, the ddPCR assay identified the mutation in free catch urine samples from 83% of canine UC and PC patients, demonstrating its utility as a non-invasive means of diagnosis. We have shown that ddPCR is a sensitive molecular technique with the potential to facilitate accurate and non-invasive means of canine UC and PC diagnosis.

犬における下部尿路移行上皮癌のスクリーニングとしての膀胱腫瘍抗原試験の有効性

Am J Vet Res. 2003 Aug;64(8):1017-20.

Evaluation of a bladder tumor antigen test as a screening test for transitional cell carcinoma of the lower urinary tract in dogs.

Henry CJ, Tyler JW, McEntee MC, Stokol T, Rogers KS, Chun R, Garrett LD, McCaw DL, Higginbotham ML, Flessland KA, Stokes PK.

目的：犬における下部尿路移行上皮癌（TCC）のスクリーニング法として獣医版の膀胱腫瘍抗原（V-BTA）試験の有効性を検討すること。

症例：飼い犬 229 例

方法：V-BTA rapid latex agglutination urine dipstick test を用いて 48 時間以内に検査ができるように、1つの検査機関に翌日配達で尿サンプルが郵送された。尿サンプルは4つのグループより採取された：1) 下部尿路 TCC の犬、2) 健康なコントロール犬、3) TCC 以外の尿路系疾患をもつ健康でないコントロール犬、4) 尿路系疾患をもたない健康でないコントロール犬。試験の特異性と感度は、通常の方法を用いて計算した。症例の病状、試験を行なった環境、尿の組成、症例のシグナルメントが V-BTA 試験に与える影響を調べるためにロジスティックモデルが開発された。

結果：計 48 例の下部尿路 TCC（疑われる症例が 3 例、確定診断がなされた症例が 45 例）を含む計 229 の尿サンプルの解析を行なった。TCC の全症例（TCC が疑われる症例も含む）、TCC と診断された症例、膀胱 TCC と診断された症例での試験の感度はそれぞれ 88、87、そして 85%であった。健康なコントロール犬、TCC 以外の尿路系疾患をもつ健康でないコントロール犬、尿路系疾患をもたない健康でないコントロール犬における試験の特異度はそれぞれ 84、41、そして 86%であった。遠心された尿サンプルを行なった場合の方が、遠心されていないサンプルを使った時よりもよい結果を得ることができた。

結論と臨床的意義：今回の結果から、尿路 TCC の犬のスクリーニングに V-BTA 試験が有効であることが示唆された。

OBJECTIVE:

To evaluate the veterinary version of the bladder tumor antigen (V-BTA) test as a screening test for transitional cell carcinoma (TCC) of the lower urinary tract of dogs.

ANIMALS:

229 client-owned dogs.

PROCEDURE:

Urine samples from dogs were shipped overnight to a single laboratory to facilitate testing within 48 hours of collection by use of the V-BTA rapid latex agglutination urine dipstick test. Groups of dogs included the following: 1) dogs with TCC of the lower urinary tract, 2) healthy control dogs, 3) unhealthy control dogs with non-TCC urinary tract disease, and 4) unhealthy control dogs without urinary tract disease. Test sensitivity and specificity were calculated by use of standard methods. Logistic models were developed to assess the effect of disease status, test conditions, urine composition, and signalment on the performance of the V-BTA test.

RESULTS:

A total of 229 urine samples were analyzed, including 48 from dogs with suspected ($n = 3$) or confirmed (45) TCC. Test sensitivities were 88, 87, and 85% for all dogs with (suspected and confirmed) TCC, dogs with confirmed TCC at any site, and dogs with confirmed TCC of the urinary bladder, respectively. Test specificities were 84, 41, and 86% for healthy control dogs, unhealthy control dogs with non-TCC urinary tract disease, and unhealthy control dogs without urinary tract disease, respectively. The test performed slightly better on centrifuged urine samples than on uncentrifuged urine samples.

CONCLUSIONS AND CLINICAL RELEVANCE:

Our results indicate that the V-BTA test is useful in screening for urinary tract TCC in dogs.