

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20140

研究課題名(和文) 高品質血液RNAを用いた腎細胞癌新規血液バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Discovery of new biomarker for the diagnosis of renal cell carcinoma using purified RNA from peripheral blood

研究代表者

木内 利郎 (Kinouchi, Toshiro)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30747069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)：腎癌患者、健常者それぞれ12例の末梢血からPAXgeneを用いてRNAを抽出し、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。腎癌患者において有意に発現上昇していた遺伝子であるCXCL7に注目し、別のコホート180例を用いて検証し、腎癌患者において有意に発現上昇していることを確認し、ROC曲線解析にてAUC=0.722と診断で有用であった。またCXCL7は腎癌の進行に伴い上昇し、pT1aの小径腎癌患者においても上昇していた。術後の検体では検証しえた全例で発現低下を認めた。多変量解析を行ったところ、末梢血液細胞におけるCXCL7の発現は独立した腎癌の診断の予測因子であった。

研究成果の概要(英文)：Whole blood was collected from 12 RCC patients and 12 healthy volunteers as controls. Whole blood was collected directly into a PAXgene RNA tube to instantly stabilize RNA, and we performed gene expression profiling using microarrays. We confirmed the microarray results using qRT-PCR, then selected candidate genes for diagnosing RCC. We then verified the predictive ability using a verification cohort (n=180). We identified 15 genes differentially expressed in RCC patients versus controls. We focused on CXCL7, which was upregulated in RCC patients. Receiver Operatorating Characteristic curve analysis showed that the expression level of CXCL7 in peripheral blood cells was useful to diagnose RCC patients in the verification cohort (AUC=0.722).

研究分野：泌尿器悪性腫瘍

キーワード：腎癌 血液 CXCL7 診断 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

腎癌には確立された血液バイオマーカーがなく、診断や治療効果のモニタリングも CT などの画像検査によって行われており、診断・モニタリングに有用なバイオマーカーが必要である。

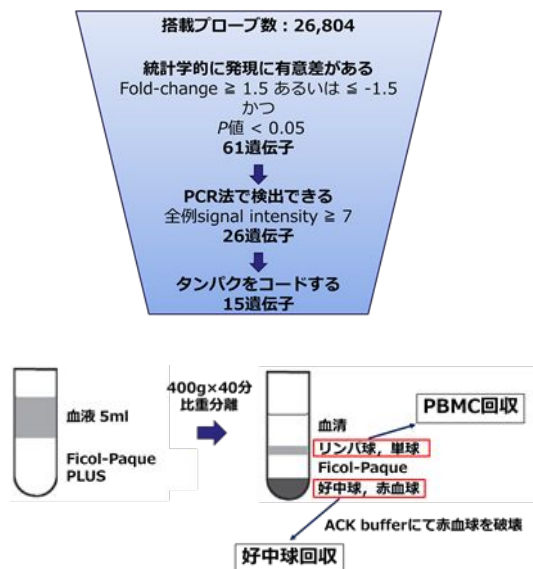
2. 研究の目的

末梢血液細胞の遺伝子発現解析を行うことで、腎癌患者において特異的に発現変化する遺伝子群を同定し、新規腎癌診断バイオマーカーを創生する。

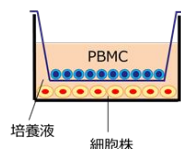
3. 研究の方法

腎癌患者 (n=12) 健康者 (n=12) から PAXgene® RNA system を用いて採血、RNA の抽出を行い、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。より簡便な PCR 法による診断のため、腎癌患者において発現変化をきたす遺伝子群を選定。その中で CXCL7 に着目し、別のコホート (n=180) についてその診断予測能を評価した。また術後の検体が採取可能であった症例に関しては、術前術後の末梢血液細胞における CXCL7 の発現変化を比較した。さらに遺伝子発現変化が腎癌細胞によって引き起こされていることを確認するため、健康者 (n=6) から採取した末梢血単核細胞 (PBMC) と腎癌細胞株を共培養し、遺伝子の発現変化を PCR 法にて評価した。

PCR法による診断を前提に候補遺伝子を選定



①腎癌細胞株Caki-2, 786-Oおよびコントロールとして正常腎由来細胞株 HEK293Tを2日間培養。



②健康者より採取したPBMCをトランスウェルインサートに播種し、共培養。

③18時間後にPBMCを回収。

④CXCL7の発現上昇が同様にみられるか定量的PCR法を用いて検証した。

4. 研究成果

マイクロアレイの結果から腎癌患者の末梢血液細胞で発現変化していた 15 遺伝子を選定し、PCR 法にて同様の結果が得られることを確認した。ROC 曲線解析にて最も AUC が高かった CXCL7 に着目した。別のコホート 180 例を用いた検証にて末梢血液細胞における CXCL7 の発現は腎癌患者において健康者に比し有意に上昇し、ROC 曲線解析にて AUC=0.722 と腎癌の診断に有用であった。さらに末梢血液細胞における CXCL7 の発現は病勢の進行に伴い上昇しており、pT1a のいわゆる小径腎癌患者においても健康者に比し有意に発現が上昇していた。多変量解析を施行したところ、末梢血液細胞における CXCL7 の発現は独立した腎癌の診断予測因子であった。また採取した術後の検体においては全例 (n=10) CXCL7 の発現低下を認めた。検証した 130 例において CXCL7 の高発現群では有意に予後不良であった。CXCL7 は PBMC に主に発現しており、腎癌細胞株と共培養した健康者由来の PBMC では正常腎細胞株と共培養した PBMC に比し有意に CXCL7 の発現が上昇していた。

患者背景

	Discovery cohort	
	Healthy controls (n = 12)	RCC patients (n = 12)
Age, years (median)	29-78 (64)	36-79 (62)
Gender, male/female	9/3	9/3
Hb, g/dL (median)	11.0-15.5 (14.0)	9.2-16.2 (12.9)
CRP, mg/dL (median)	0-0.05 (0)	0-13.94 (0.28)
NLR (median)	0.93-3.97 (1.78)	1.15-5.87 (1.95)
TNM stage, I/II/III/IV		6/0/4/2
Histological type		
Clear cell		11
Papillary		1
Chromophobe		0
Unclassified		0

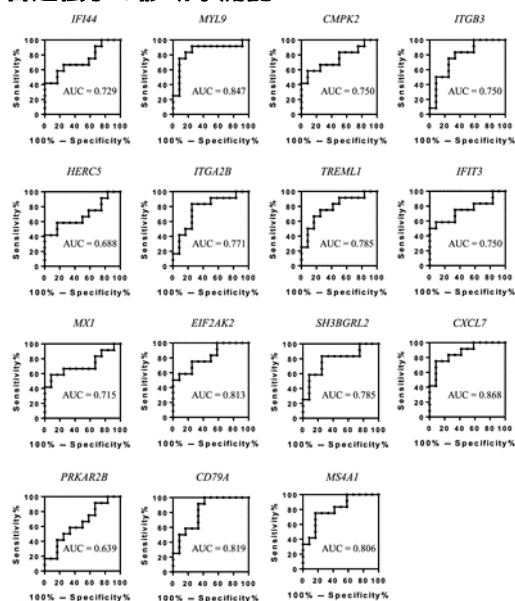
Hb, hemoglobin; CRP, C-reactive protein; NLR, neutrophil to lymphocyte ratio.

Verification cohort	
Healthy controls (n = 50)	RCC patients (n = 130)
48-76 (66)	27-83 (64)
39/11	95/35
12.0-17.6 (14.2)	4.9-17.4 (13.6)
0-0.69 (0)	0-19.86 (0.05)
0.83-12.23 (1.96)	0.87-9.68 (2.46)
	78/9/26/17
	111
	7
	6
	6

マイクロアレイの結果から抽出された 15 遺伝子群

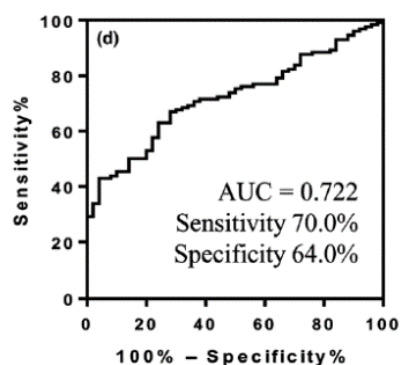
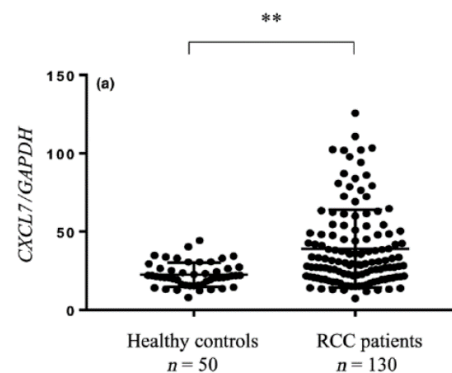
Gene	Coding protein	Fold-change	P-value
<i>IFI44</i>	Interferon induced protein 44 like	2.04	0.019
<i>MYL9</i>	Myosin light chain 9	1.78	0.001
<i>CMPK2</i>	Cytidine/uridine monophosphate kinase 2	1.77	0.032
<i>ITGB3</i>	Integrin α -IIb/ β -3	1.72	0.009
<i>HERC5</i>	HECT and RLD domain containing e3 ubiquitin protein ligase 5	1.71	0.043
<i>ITGA2B</i>	Integrin subunit α 2b	1.70	0.010
<i>TREML1</i>	Triggering receptor expressed on myeloid cells like 1	1.63	0.007
<i>IFIT3</i>	Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3	1.61	0.033
<i>MX1</i>	MX dynamin like GTPase 1	1.59	0.039
<i>EIF2AK2</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2 α kinase 2	1.57	0.005
<i>SH3BGR2</i>	SH3 domain binding glutamate rich protein like 2	1.53	0.011
<i>CXCL7</i>	C-X-C motif chemokine ligand 7	1.51	0.001
<i>PRKAR2B</i>	Protein kinase CAMP-dependent type II regulatory subunit β	1.50	0.011
<i>CD79A</i>	CD79a molecule	-1.65	0.022
<i>MS4A1</i>	Membrane spanning 4-domains A1	-1.67	0.023

各遺伝子の診断予測能

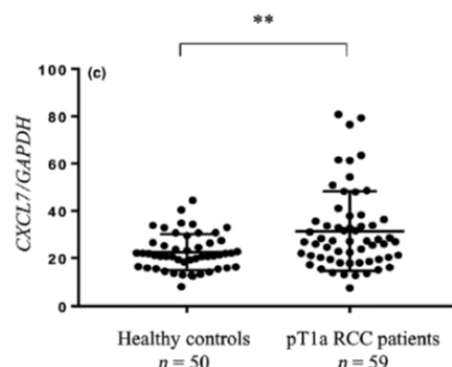
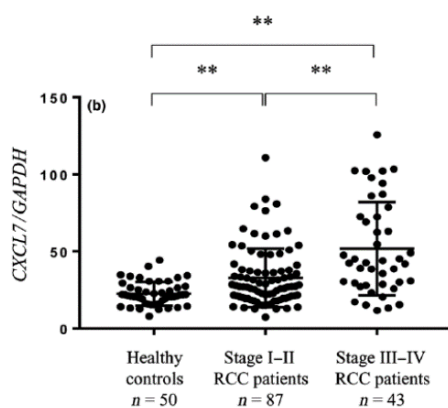


最も AUC の高かった CXCL7 に着目した。

腎癌患者の末梢血液細胞において CXCL7 は有意に発現上昇しており、腎癌の診断に有用であった



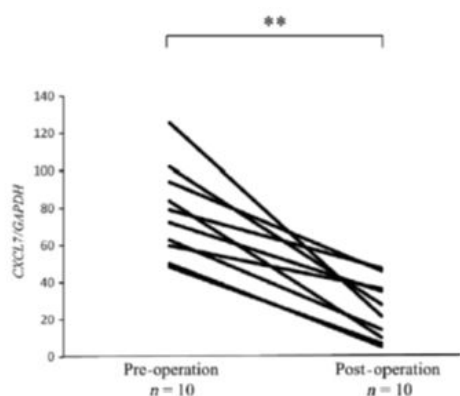
腎癌の進行に伴って CXCL7 は発現上昇していた。また小径腎癌患者(pT1a)においても健康者に比し、発現上昇していた



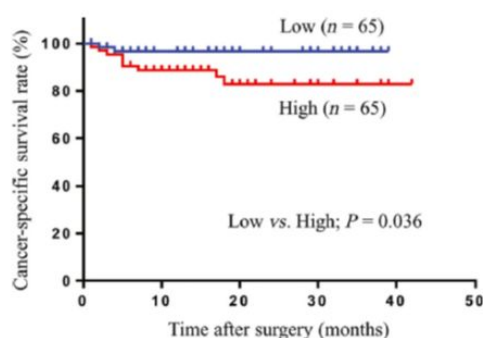
多変量解析にて末梢血液細胞における CXCL7 の発現は独立した腎癌の診断予測因子であった

	Multivariate analysis		
	OR	95% CI	P-value
Age			
Gender (male vs female)			
Hb	0.820	0.632-1.051	0.124
CRP	1.144	0.853-1.851	0.486
NLR			
CXCL7 expression in peripheral blood cells	1.066	1.033-1.109	<0.001

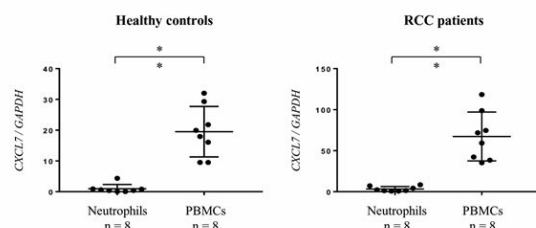
術後の評価が可能であった症例では全例で術後に CXCL7 の発現低下を認めた



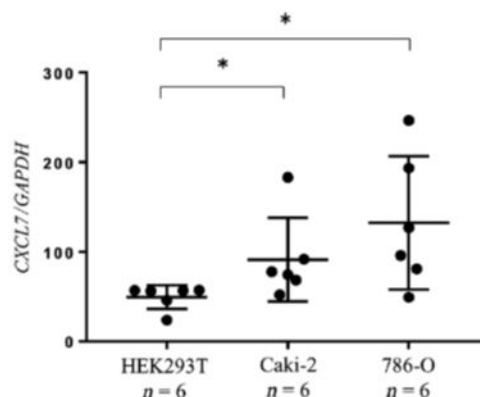
末梢血液細胞における CXCL7 高発現群では有意に予後不良であった



CXCL7 は主に PBMC に発現していた



腎癌細胞株と共培養した健康者由来の PBMC において、正常腎細胞株と共培養したもの に比し、有意に CXCL7 の発現が上昇していた



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Expression level of CXCL7 in peripheral blood cells is a potential biomarker for the diagnosis of renal cell carcinoma.

Kinouchi T, Uemura M, Wang C, Ishizuya Y, Yamamoto Y, Hayashi T, Matsuzaki K, Nakata W, Yoshida T, Jingushi K, Kawashima A, Ujike T, Nagahara A, Fujita K, Imamura R, Ueda Y, Kitae K, Tsujikawa K, Nonomura N. Cancer Sci. 2017 Dec;108(12):2495-2502. doi: 10.1111/cas.13414. Epub 2017 Oct 25.

〔学会発表〕(計4件)

末梢血液細胞における CXCL7 の発現は腎癌の新規診断バイオマーカーになりうる

木内利郎, 植村元秀, 石津谷祐, 王 聡, 山本致之, 松崎恭介, 林 拓自, 川村憲彦, 河嶋厚成, 氏家 剛, 永原 啓, 藤田和利, 神宮司健太郎, 鎌谷研吾, 辻川和丈, 野々村祝夫

第26回泌尿器分子・細胞研究会

末梢血液細胞の遺伝子発現プロファイリングによる腎癌の新規バイオマーカー探索

木内利郎, 植村元秀, 林 拓自, 松崎恭介, 川村憲彦, 河嶋厚成, 氏家 剛, 永原 啓, 藤田和利, 神宮司健太郎, 鎌谷研吾, 辻川和丈, 野々村祝夫

第105回日本泌尿器科学会総会

Gene expression profiling from peripheral blood may provide a new biomarker for the diagnosis of renal cell carcinoma

Toshiro Kinouchi, Motohide Uemura, Kosuke Nakano, Cong Wang, Yu Ishizuya, Norihiko Kawamura, Kentaro Jingushi, Atsunari Kawashima, Takeshi Ujike, Akira Nagahara, Kazutoshi Fujita, , Kazutake Tsujikawa, and Norio Nonomura

第 76 回日本癌学会学術総会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

木内 利郎 (Kinouchi, Toshiro)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30747069

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()