

平成22年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18209049
 研究課題名（和文） 泌尿器科がんの統合的 OMICS データの臨床応用を目指した検証研究
 研究課題名（英文） Validation of OMICS data of urological malignancies for the clinical use
 研究代表者
 小川 修 (Osamu Ogawa)
 京都大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：90260611

研究成果の概要（和文）：本研究は泌尿器科癌において、これまで蓄積してきた研究成果の臨床的応用を実現化するための具体的かつ本格的な検証を目的とした。遺伝子多型解析を含む遺伝子解析(Genome)データ、網羅的発現解析(Transcriptome)データ、さらには蛋白解析(Proteome)データを統合したデータベースを構築し、この OMICS データを詳細な臨床情報に照らし合わせることで候補となりうる分子マーカー(群)や分子標的をさらに探索した。そして、この情報を細胞培養系やモデル動物を用いた実験系に持ち込み、その機能的意義を明確にした。

研究成果の概要（英文）：In this project we aimed to carry out experiments which were essential for application of our achieved findings to clinical settings. First, we developed a comprehensive database incorporating genomic data including gene polymorphism, transcriptome data, and proteomic data. Second, we explored novel molecular targets for diagnosis or treatment by analyzing this database and clinical information. Finally, functions and roles of the molecules were investigated using in-vitro and in-vivo experimental models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	13,300,000	3,990,000	17,290,000
2007年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2008年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
年度			
総計	35,500,000	10,650,000	46,150,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：泌尿器科癌、OMICS、遺伝子解析、網羅的発現解析、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

尿路性器系には様々な疫学特性や異なった治療反応性を示す多様な悪性腫瘍が発生する。例えば腎細胞がんは免疫療法が奏効し、いっぽう尿路上皮がんは化学療法に高い反

応性を示す。また、前立腺がんは内分泌療法に著効を示す特異な悪性腫瘍のひとつであり、精巣腫瘍は転移のある進行がんでさえ化学療法を中心とする集学的治療によって根治が可能な唯一の固形がんと考えられる。

さらにこれらのがんは、移行上皮がん、腺がん、胚細胞腫瘍といった多様な組織像を呈し、これらの臨床病理学的特徴を利用した泌尿器科がんの分子研究は、ヒトがんにおける発がん分子機構の解明において大きな役割を果たしてきた歴史がある。

このように多彩な臨床病理学的特性を持つ泌尿器科がんであるが、未だに満足できる診断・治療におけるバイオマーカーは存在しない。最も有用とされる前立腺特異抗原 (PSA) でさえ、前立腺がんにおける治療アウトカムのサロゲートマーカーとはされておらず、腎細胞がん、膀胱がんにはいたってはいかなる有用な分子マーカーも存在しないとさえ考えられる。さらに、前述したように、泌尿器科がんはそれぞれ特色のある治療に反応を示すが、その治療反応性には大きな個人差が認められ、これまでのような画一的な治療レジメンの遂行では治療アウトカムの革新的な改善は期待出来ない。したがって早期発見や治療反応性を予測出来る診断システムの開発は、泌尿器科がんの治療戦略において大きなインパクトを与える可能性が高い。また、転移性腎がん、内分泌不応前立腺がん、絨毛成分を含む精巣腫瘍など、既存の治療戦略では予後の改善が望めない難治がんもあり、このようながんにおいては新しい分子標的の探索が求められている。

社会医学的側面からも泌尿器科がんは重要である。近年の前立腺がんの急増にも代表されるように、高齢者の泌尿器科がんは増加の一途であり、泌尿器科がんに対する効率的な治療戦略の確立は、超高齢化社会を迎えた我が国において医学的な観点のみならず医療経済や国民生活の点からも緊急性を要する重要課題である。

上記のような泌尿器科がんの問題点を克服する目的で、我々は平成 14 年度より、科学研究費基盤Aの助成を受け「新規遺伝子解析プログラムを応用した泌尿器腫瘍の分子診断システムの開発」という研究テーマに取り組んできた。その中で、我々は1000 例を超える膀胱がんのアウトカム研究を立ち上げ、現時点における日本の膀胱がん治療の標準的治療成績を示すとともに治療成績に影響を与える因子について報告した。

さらに抗癌剤感受性を予測する目的で、M-VAC療法をベースとした前向き臨床研究を立ち上げ、現在症例集積と発現解析の最中である（「浸潤性膀胱癌の化学療法に対する遺伝子発現量による感受性予測に関する臨床試験」(京大倫理委員会承認番号G106)）。網羅的遺伝子解析に関しては、膀胱癌や腎細胞癌で百数十例の規模の解析を修了し、血中もしくは尿中の分子マーカー候補をすでに数種類同定している（後述）。また、新しい遺伝子発現の解析手法を開発し、膀胱がんの

臨床病理像との関連に関する報告している。

しかしながら、このような High-throughput 解析や大規模アウトカム研究から得られた情報のみでは、実際のがん臨床に応用出来るレベルには到達出来ないことに思い至った。

2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまで蓄積してきた研究成果の臨床的応用を実現化するための具体的かつ本格的な検証研究に着手する。我々が蓄積した遺伝子多型解析を含む遺伝子解析 (Genome) データ、網羅的発現解析 (Transcriptome) データ、さらには蛋白質解析 (Proteome) データを統合したデータベースを構築し、この OMICS データを詳細な臨床情報に照らし合わせることで候補となりうる分子マーカー (群) や分子標的をさらに探索する。そして、この情報を細胞培養系やモデル動物を用いた実験系に持ち込み、その機能的意義を明確にするとともに、前向き臨床研究を組み立てることにより最終的な検証を行うことが本研究の目的である。

最終的には、これまで特許申請を行ってきた (あるいはこれから同定する) マーカー候補や分子標的候補を実際のがん臨床で利用出来るレベルに引き上げることが目標となる。

3. 研究の方法

各種泌尿器科がんの大規模アウトカム研究から得られたデータと OMICS 統合データを総合的に解析した。このとき我々が開発した新しい OMICS 解析手法を導入することによって、新たな結論を導き出せる可能性があると考えられた。

また、解析結果の検証を行うために、培養細胞系以外に特に動物モデルを用いた検証系を確立させた。(各泌尿器科癌における実験の詳細は以下の項目に詳細に記載した。)

4. 研究成果

(1) 尿路上皮癌

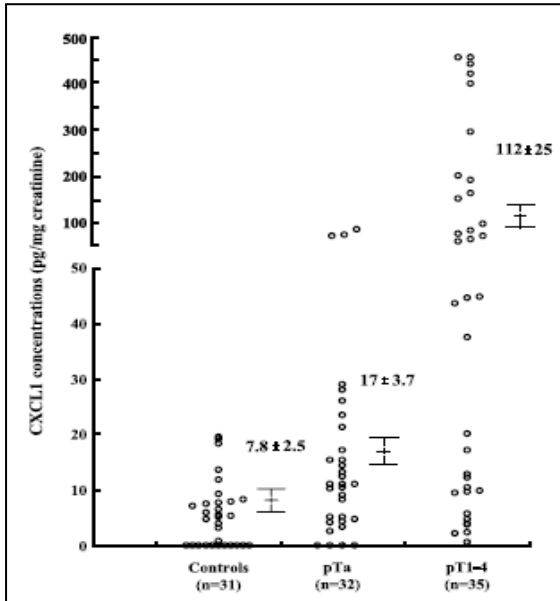
①尿路上皮癌の腫瘍検体を用いた DNA マイクロアレイ解析を行い、PAK1 が表在性膀胱癌の再発予測に役立つことを示した。

②多発性膀胱癌の臨床検体を用いた CGH アレイにより、異時性膀胱癌の染色体変異が経時的に蓄積していくことを証明した。

③細胞株上清のショットガンプロテオミクスにより浸潤と関与する蛋白質として見出した CXCL1 は、膀胱癌浸潤に重要な役割を果たしており、新規尿中マーカーとしての有望性が示唆された。

④この分子が膀胱癌の尿中診断マーカーとして有用であるかどうかを、実際の膀胱癌患者尿 67 検体とコントロール尿 33 検体を用いて ELISA 法で検討した。CXCL1 はすでに膀胱癌尿中マーカーとして確立している NMP22, BTA と比較して感度・特異度の両者において優れていた。現在膀胱癌診断キットとして実用化可能性を検討している。

さらに、浸潤癌に対する多剤併用化学療法の有効群と無効群での DNA マイクロアレイ比較による化学療法感受性マーカーとしての galectin7 の意義を示した。



⑤また、漢方薬の一種である triptolide の膀胱癌細胞に対する影響と分子機序について、プロテオミクスを用いた解析を行い、p53 の転写共役因子のひとつである GSK-3 β が重要な役割を果たし、さらに p21 発現低下のためシスプラチン誘導性細胞死の増強が生じることを示した。

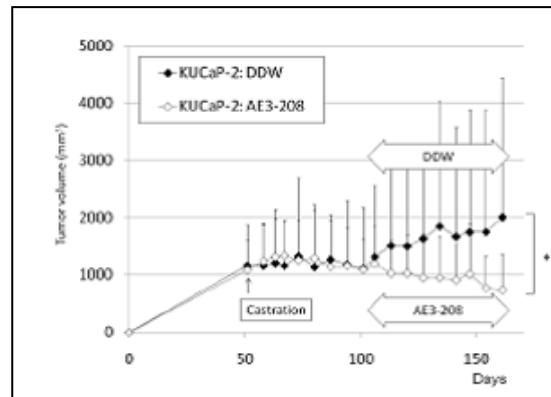
(2) 前立腺癌

①ヒト前立腺癌による組織マイクロアレイを用いた免疫染色により、Akt の活性化が前立腺癌の悪性度と相関することを示した。

②また、網羅的遺伝子連鎖解析により同定された 8q24 遺伝子多型が日本人の前立腺癌発生リスクおよびその悪性度に影響を与えることを示した。

③前立腺癌ホルモン不応性獲得機序の研究において、新規樹立したアンドロゲン依存性前立腺癌 Xenograft である KUCaP を用いた DNA マイクロアレイ解析により、去勢抵抗性獲得に際し変動する遺伝子を抽出した。それらの遺伝子のうち、EP4 遺伝子に注目し、同遺伝子が前立腺癌の去勢抵抗性獲得に寄与し、去勢抵抗性前立腺癌の新たな治療標的分子となる可能性を示した。

④さらに特許取得を行い、共同出願先である小野薬品工業との共同研究の形を取り、その特異的拮抗剤である ONO-AE3-208 の臨床応用に向けて、動物実験による安全性と効果の検討を行っている。



(3) 腎細胞癌

①転移性腎細胞癌のインターフェロン α 免疫療法に対する感受性が STAT3 遺伝子多型と相関することを Case-control 研究で証明した。

②また、腎癌患者の抽出標本を用いた DNA マイクロアレイ解析により、CDCP1 の発現がその予後に影響を及ぼしていることを示した。

③また、同解析により同定した TU3A は、腎癌細胞においてメチル化により制御されていることを示した。

さらに腎癌患者の血清を用いたプロテオーム解析により同定された候補蛋白質のうち、組織 DNA マイクロアレイデータと統合し絞り込んだ 6 種類の候補について腎細胞癌のバイオマーカーとしての有用性の検証を行っている。また、転移性腎癌のインターフェロン感受性と STAT3 遺伝子多型と相関を検証するための全国規模の前向き研究 (研究名 RCC-SELECT) を現在進行中である。

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 19 件)

(1) Terada N, Ogawa O et al. Identification of EP4 as a potential target for the treatment of castration-resistant prostate cancer using a novel xenograft model. *Cancer Res* (70) 1606-1615 2010
査読有

(2) Kobayashi T, Nakamura E, Ogawa O et al. Activation of Rac1 is closely related to androgen-independent cell proliferation of prostate cancer cells both in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol*;24(4):722-34, 2010
査読有

(3) Kobayashi T, Nakamura E, Ogawa O et al. Restoration of cyclin D2 has an inhibitory potential on the proliferation of LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 387(1):196-201, 2009 査読有

(4) Nishizawa K, Nishiyama H, Ogawa O et al. Fluorescent imaging of high-grade bladder cancer using a specific antagonist for chemokine receptor CXCR4. *Int J Cancer* 2009. 査読有

(5) Kawanishi H, Tsujimoto G, Nakamura E, Ogawa O et al. Secreted CXCL1 is a potential mediator and marker of the tumor invasion of bladder cancer. *Clin Cancer Res* (14) 2579-2587 2008 査読有

(6) Matsui Y, Ogawa O, Nishiyama H et al. Cancer-specific enhancement of cisplatin-induced cytotoxicity with triptolide through an interaction of inactivated glycogen synthase kinase-3beta with p53. *Oncogene* (27) 4603-4614 2008 査読有

(7) Shimizu Y, Nakamura E, Ogawa O et al. Increased Akt and phosphorylated Akt expression associated with malignant biological features of prostate cancer in Japanese men. *BJU Int* (100) 685-690 査読有

(8) Terada N, Ogawa O et al. Association of genetic polymorphisms at 8q24 with the risk of prostate cancer in a Japanese population. *Prostate* (68) 1689-1695 2008 査読有

(9) Awakura Y, Nakamura E, Tsujimoto G, Ogawa O et al. Microarray-based identification of CUB-domain containing protein 1 as a potential prognostic marker in conventional renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* (134) 1363-1369 2008 査読有

(10) Awakura Y, Nakamura E, Ogawa O et al. Methylation-associated silencing of TU3A in human cancers. *Int J Oncol* (33) 893-899 2008 査読有

(11) Awakura Y, Nakamura E, Ogawa O et al. Methylation-associated silencing of SFRP1 in renal cell carcinoma. *Oncol Rep.* 20(5):1257-63, 2008. 査読有

(12) Ito M, Nishiyama H, Ogawa O et al. P21-activated kinase 1: a new molecular marker for intravesical recurrence after transurethral resection of bladder cancer. *J Urol* (178) 1073-1079 2007 査読有

(13) Kawanishi H, Nishiyama H, Ogawa O et al. Genetic analysis of multifocal superficial urothelial cancers by array-based comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer* (97) 260-266 2007 査読有

(14) Matsui Y, Nishiyama H, Ogawa O et al. Sensitizing effect of galectin-7 in urothelial cancer to cisplatin through the accumulation of intracellular reactive oxygen species. *Cancer Res* (67) 1212-1220 2007 査読有

(15) Inoue T, Ogawa O, Nakamura E et al. The roles of androgen-dependent and -independent activation of signal transduction pathways for cell proliferation of prostate cancer cells. *Expert Rev Endocrinol Metab* (2) 689-704 2007 査読有

(16) Ito N, Nakamura E, Ogawa O et al. STAT3 polymorphism predicts interferon-alfa response in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* (25) 2785-2791 2007 査読有

(17) Shang D, Nishiyama H, Ogawa O et al. Synergy of interferon-alpha and 5-fluorouracil in human renal cell carcinoma requires p53 activity. *Eur Urol* 52: 1131-1139, 2007. 査読有

(18) Shang D, Ogawa O et al. Demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine enhances susceptibility of renal cell carcinoma to paclitaxel. *Urology* 69: 1007-1012, 2007. 査読有

(19) Nakamura E, Ogawa O et al. Clusterin is a secreted marker for a hypoxia-inducible factor-independent function of the von hippel-lindau tumor suppressor protein. *Am J Pathol* 168:574-584, 2006. 査読有

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 前立腺癌のホルモン不応性獲得に関与する遺伝子および治療薬

発明者: 小川 修、辻本 豪三 他

権利者: 松本 紘、川津 和一十

種類: 特許権

番号: 2009-019701

取得年月日: 2009年1月30日

国内外の別: 国内

[その他]
ホームページ等
<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 修 (Osamu Ogawa)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90260611

(2) 研究分担者

西山 博之 (Hiroyuki Nishiyama)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：20324642

乾 賢一 (Kenichi Inui)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70034030

福島 雅典 (Masanori Fukushima)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80107820

辻本 豪三 (Gouzo Tujimoto)
京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：80172013

中村 英二郎 (Eijiro Nakamura)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：90293878