

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590373

研究課題名（和文）腎細胞癌の再発、転移に関わるゲノム異常の解明

研究課題名（英文）Elucidation of genomic aberrations involved in recurrence and metastasis of renal cell carcinoma

## 研究代表者

松浦 恵子 (MATSUURA KEIKO)

大分大学 医学部 准教授

研究者番号：00291542

## 研究成果の概要（和文）：

腎細胞癌の原発巣と再発転移巣のパラフィン包埋組織から抽出したゲノムDNAを用いてアレイCGH解析を行い、両群間において異なるゲノム異常を同定した。また腎癌細胞株を用いて、プロモーター領域のメチル化及び遺伝子発現異常を調べた。その結果、9番染色体の欠失がみられる症例ほど、再発転移までの期間が短いことを発見し、腎癌の再発転移に関わる遺伝子候補として同領域に存在する遺伝子の中から2つを特定した。

## 研究成果の概要（英文）：

We analyzed primary and metastatic lesions of renal cell carcinoma (RCC) by array based comparative genomic hybridization (CGH), using genomic DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples. We identified some different genomic aberrations between two groups. Next, we analyzed the methylation profiles of promoter regions, and also examined gene expression profiles. As a result of these findings, we found that the patients with 9p loss in primary tumors showed significantly lower recurrence (metastasis) free survival rate than the patients without 9p loss. Two genes located in 9p were identified as a candidate gene associated with recurrence and metastasis in RCC.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 人体病理学

キーワード：アレイ CGH、腎細胞癌、再発、メチル化、ゲノム異常

## 1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌の予後を規定する因子として最も重要であるのは、腫瘍の広がり (stage) であり、特に遠隔転移は腎癌の予後を大きく左右する。転移は30-40%にのぼり、現在では転移性腎細胞癌の治療にはインターフェロンに加え、チロシンキナーゼ阻害剤、mTOR阻害剤などの分子標的治療薬の併用が試みられているが治療効果は限定的である。今後腎癌により適した分子標的治療薬の開発が望まれるが、その実現には腎癌の転移に関わる分子の同定が不可欠である。癌は遺伝子異常が蓄積した結果起こる遺伝子病であると信じられており、癌の転移にも特定の遺伝子異常の蓄積が関与する可能性は高い。ゲノムコピー数異常に関して、これまで我々は、腎癌原発巣の凍結手術材料を用いてアレイCGH解析 (癌細胞のゲノムのコピー異常を網羅的に調べることのできるマイクロアレイ解析) を行い、遺伝子コピー数異常を全染色体について網羅的に解析してきた。(J. Pathology, 213, 392-401, 2007)。ゲノムコピー数の異常以外に、発癌にかかわる重要なゲノム異常として、癌細胞におけるゲノムの異常なメチル化による遺伝子発現異常が知られている。このことから異常メチル化によって不活化される腎癌の発症に関わる癌抑制遺伝子ならびに腎癌の転移に関わる癌抑制遺伝子の特定ができるはずである。腎癌の転移に関しては、解析は未だ不十分であり、転移巣におけるゲノム異常の解析は非常に少なく、染色体CGHによる解析が散見されるのみである。さらに同一症例で再発時の転移巣と原発巣を比較解析した研究はない。また、転移に関わるメチル化異常の網羅的解析も未だ行なわれていない。本研究により腎癌の転移に関わる遺伝子異常を特定できれば、腎癌の新しい治療薬の開発につながるものと期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、腎癌原発巣と転移巣のゲノムDNAを抽出して

- 1) 転移巣と原発巣におけるゲノム異常 (ゲノムコピー数異常とメチル化異常) を比較することで、どのようなゲノム異常が転移に関わるのかを解

明する。

- 2) 転移に特異的なゲノム異常を有する腎癌細胞株を特定して、それぞれ候補遺伝子を遺伝子導入あるいは siRNA を用いた発現抑制実験を行い、候補遺伝子を絞り込み、責任遺伝子を同定する。

本研究によって癌の転移責任遺伝子の同定をめざし、それに基づく分子標的治療法の実現につなげていくことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 症例の選定とゲノムDNAの抽出

大分大学医学部付属病院泌尿器科ならびに関連病院で治療された腎細胞癌症例のうち、原発巣を手術的に摘出後、遠隔転移で再発し転移組織を外科的に切除された症例を選ぶ。次に、原発巣ならびに転移巣のパラフィン包埋組織から厚さ 10 μm で連続切片を切り出し、トルイジンブルー染色した後、大分大学医学部に設置されている Arcturus 社製 Laser Captured Microdissection (LCM) を用いて癌組織のみを切り取り、ゲノムDNAを抽出する。

(2) アレイCGH解析による腎癌原発巣ならびに遠隔転移巣のゲノム異常の解析  
転移陽性症例15例の原発巣および転移巣のパラフィン切片から抽出したゲノムDNAを用いてAgilent社製の4x44K CGH MicroarrayによりアレイCGH解析を行う。数値化されたデータを解析ソフト (Agilent社製CGH analytics, ver. 3.5) により解析する。

(3) 症例のゲノムのメチル化の網羅的解析  
遺伝子の 5' 上流の CpG アイランドのメチル化の有無 (すなわち、hypermethylation の有無) を methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) 法で網羅的に調べる。正常組織由来ゲノムと癌組織由来ゲノムをそれぞれ超音波で破碎した後、抗メチル化シトシン特異的抗体で免疫沈降して、ゲノムを蛍光標識し混和した後、Agilent 社製の 244K Human CpG Island array と解析ソフト (Agilent 社 ChIP Analytics) を用いてメチル化の認められた遺伝子を抽出する。また抽出された高度メチル化候補遺伝子について、腎癌症例のゲノムDNAを bisulfite 処理しメチル化特異的PCR法によって、正常部分と癌部のゲノムでのメチル化の有無を確認する。

### (4) 腎癌細胞株におけるトランスクリプトーム解析

腎癌細胞株におけるトランスクリプトーム解析を行い、ゲノムコピー数異常を認めた領域において、発現上昇あるいは発現低下している遺伝子を抽出する。

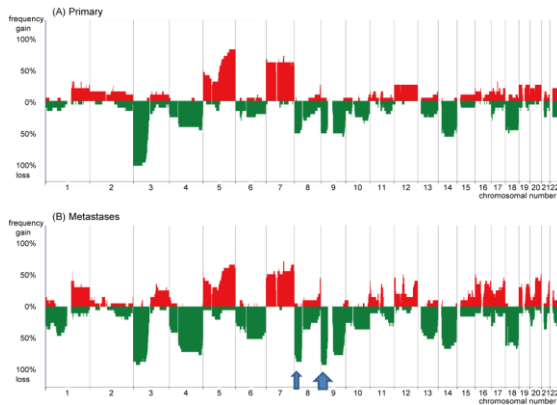
(5) 腎細胞癌の転移に関与すると考えられる候補遺伝子の機能解析

抽出されてきた候補遺伝子について、候補遺伝子cDNAを強制発現させ、その増殖能、アポトーシス抑制能、および細胞の浸潤能を含むphenotypeを観察する。遺伝子発現の亢進している細胞に関してはsiRNAを用いたノックダウンを行い、同様に遺伝子の機能解析をおこなう。

4. 研究成果

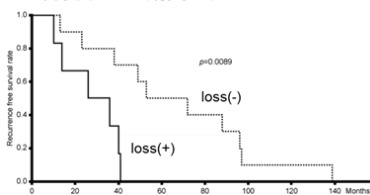
(1) 腎細胞癌症例のうち、原発巣を手術的に摘出後、遠隔転移で再発し転移組織を外科的に切除された症例 15 例を選び、原発巣ならびに転移巣のパラフィン包埋組織から Laser Captured Microdissection (LCM) を用いて癌組織のみを切り取り、抽出したゲノム DNA を用いてアレイ CGH 解析を行なったところ、両群間において異なるゲノム異常を同定した(図1)。原発巣と比較して転移巣でゲノム異常が有意に高頻度に見られた領域を統計学的に抽出したところ、9p24.1-p13.3 など数か所が転移巣有意に見出された。

図1 原発巣と転移巣のCGH解析の結果



(2) 9p24.1-p13.3の欠失がみられる症例ほど、再発(転移)までの期間が短いことを予後調査によりあきらかにした(図2)。

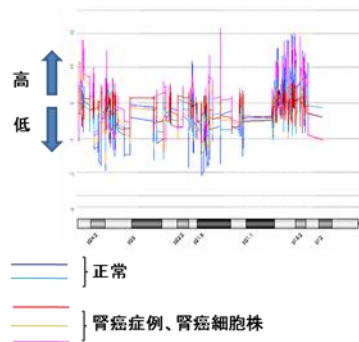
図2 9p24.1-p13.3 lossがあると再発までの期間が短い



(3) 腎癌細胞株を用いて、プロモーター領域のメチル化を、methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) 法で網羅的に調べた。その結果、コントロールとなる

末梢血リンパ球と異なり、腎癌に特異的にメチル化を示す領域や遺伝子の候補を見出した(図3)。

図3 9p領域のメチル化(例)

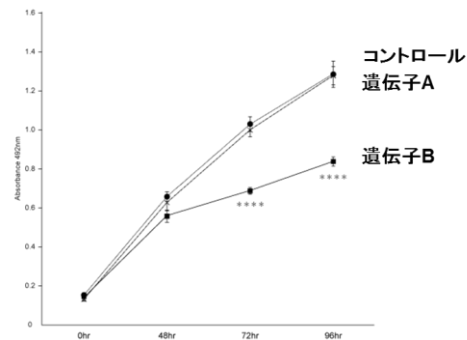


(4) 腎癌細胞株におけるトランスクリプトーム解析を行い、ゲノムコピー数異常を認めた領域において、発現上昇あるいは発現低下している遺伝子を抽出した。

(5) 特に有意差の著しかった9p24.1-p13.3に存在する58個の遺伝子について、新たに30症例の腎細胞癌の手術標本から抽出された遺伝子の発現変化をリアルタイムPCRで確認した。9p24.1-p13.3の欠失が見られた症例と見られなかった症例の2群にわけ、リアルタイムPCRによる遺伝子発現に有意差があった2つの遺伝子を特定した。

(6) 2つの遺伝子について、腎癌細胞株でもその遺伝子発現が正常腎組織より低いものを選び、レンチウイルス系により、遺伝子導入を行った。2つのうち1つの遺伝子では、その過剰発現により腎癌細胞株の増殖が抑制された(図4)。しかし、アポトーシスや浸潤には関係しなかった。今後、候補遺伝子の機能解析をより詳細に行うことで、再発(転移)に関わる遺伝子異常の同定とそのメカニズムを解明する予定である。

図4 遺伝子Bを遺伝子導入すると増殖が抑制される



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 7 件)

- ① Inoue T, Matsuura K, Yoshimoto T, Nguyen LT, Tsukamoto Y, Nakada C, Hijiya N, Narimatsu T, Nomura T, Sato F, Nagashima Y, Kashima K, Hatakeyama S, Ohyama C, Numakura K, Habuchi T, Nakagawa M, Seto M, Mimata H, Moriyama M. Genomic profiling of renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease  
**Cancer Science** 103(3), 2012, 569-576
- ② Matsuura K, Nakada C, Mashio M, Narimatsu T, Yoshimoto T, Tanigawa M, Tsukamoto Y, Hijiya N, Takeuchi I, Nomura T, Sato F, Mimata H, Seto M, Moriyama M. Downregulation of SAV1 plays a role in pathogenesis of high-grade clear cell renal cell carcinoma.  
**BMC cancer** 11(1), 2011, 1-10
- ③ Kuroda A, Tsukamoto Y, Nguyen LT, Noguchi T, Takeuchi I, Uchida M, Uchida T, Hijiya N, Nakada C, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Matsuura K, Seto M, Ito H, Fujioka T, Moriyama M. Genomic profiling of submucosal-invasive gastric cancer by array-based comparative genomic hybridization.  
**PloS one** 6(7), 2011, 1-11
- ④ Nakada C, Tsukamoto Y, Matsuura K, Nguyen TL, Hijiya N, Uchida T, Sato F, Mimata H, Seto M, Moriyama M. Overexpression of miR-210, a downstream molecule of HIF1 $\alpha$ , causes centrosome amplification in renal carcinoma cells.  
**Journal of Pathology** 224, 2011, 280-288
- ⑤ Tsukamoto Y\*, Nakada C\*, Noguchi T, Tanigawa M, Tung N, Uchida T, Hijiya N, Matsuura K, Fujioka T, Seto M, Moriyama M. (\*equal contribution) MicroRNA-375 is down-regulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3 $\zeta$ .

**Cancer Research** 70, 2010, 2339-2349

- ⑥ Uchida M, Tsukamoto Y, Uchida T, Ishikawa Y, Nagai T, Hijiya N, Tung N, Nakada C, Kuroda A, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Noguchi T, Matsuura K, Tanigawa M, Seto M, Ito H, Fujioka T, Takeuchi I, Moriyama M. Genomic profiling of gastric carcinoma in situ and adenomas by array-based comparative genomic hybridization.  
**Journal of Pathology** 221, 2010, 96-105
- ⑦ Kiyosaki K, Nakada C, Hijiya N, Tsukamoto Y, Matsuura K, Nakatsuka K, Daa T, Yokoyama S, Imaizumi M, Moriyama M. Analysis of p53 mutations and the expression of p53 and p21WAF1/CIP1 protein in 15 cases of sebaceous carcinoma of the eyelid.  
**Invest Ophthalmol Vis Sci**. 51(1), 2010, 7-11

[学会発表] (計 18 件)

- ① 成松隆弘, 松浦恵子, 泥谷直樹, 中田知里, 井上亨, 野村威雄, 竹内一郎, 瀬戸加大, 佐藤文憲, 守山正胤, 三股浩光  
網羅的ゲノム解析による腎癌転移関連遺伝子の同定と解析  
第 21 回泌尿器科分子細胞研究会  
2012 年 2 月 11 日 北海道札幌市
- ② 井上亨, 松浦恵子, 長嶋洋治, 成松隆弘, 野村威雄, 佐藤文憲, 守山正胤, 三股浩光  
集合管癌の臨床病理学的検討  
第 63 回日本泌尿器科学会西日本総会  
2011 年 11 月 5 日 福岡県久留米市
- ③ Narimatsu T, Matsuura K, Nakada C, Inoue T, Nomura T, Sato F, Moriyama M, Mimata H  
GENOMIC COPY NUMBER LOSS AT 9P IS ASSOCIATED WITH METASTASIS OF RENAL CELL CARCINOMA  
2011 AUA Annual Meeting  
2011 年 5 月 16 日 Atlanta, USA
- ④ Inoue T, Matsuura K, Yoshimoto T, Narimatsu T, Sato F, Nagashima Y, Hatakeyama S, Ohyama C, Habuchi T, Nakagawa M, Moriyama M, Mimata H

GENOMIC PROFILING OF RENAL CELL CARCINOMA IN PATIENTS WITH END-STAGE RENAL DISEASE

2011 AUA Annual Meeting

2011年5月15日 Atlanta, USA

- ⑤ Narimatsu T, Matsuura K, Hijiya N, Nakada C, Inoue T, Nomura T, Sato F, Seto M, Mimata H, Moriyama M  
9p24.1-p13.3 loss may be indicator to predict metastasis of clear cell renal cell carcinoma  
70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association  
2011年10月3日 愛知県名古屋市
- ⑥ Matsuura K, Nakada C, Narimatsu T, Tsukamoto Y, Nomura T, Sato F, Mimata H, Seto M, Moriyama M  
Frequent deregulation of the Hippo signaling pathway in high-grade clear cell renal cell carcinoma  
70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association  
2011年10月3日 愛知県名古屋市
- ⑦ 井上享, 松浦恵子, 吉本多一郎, 成松隆弘, 長嶋洋治, 畠山真吾, 佐藤文憲, 大山力, 羽瀧友則, 中川昌之, 三股浩光, 守山正胤  
Array CGH analysis of renal cell carcinomas in patients with end-stage renal disease  
第99回日本泌尿器科学会総会  
2011年4月23日 愛知県名古屋市
- ⑧ 成松隆弘, 松浦恵子, 井上享, 吉本多一郎, 中田知里, 竹内一郎, 瀬戸加大, 佐藤文憲, 三股浩光, 守山正胤  
腎癌転移と9p ゲノムコピー数異常の関係  
第99回日本泌尿器科学会総会  
2011年4月23日 愛知県名古屋市
- ⑨ 成松隆弘, 松浦恵子, 中田知里, 井上享, 野村威雄, 佐藤文憲, 守山正胤, 三股浩光  
腎癌転移と9p ゲノムコピー数異常の関係  
第20回分子細胞研究会  
2011年3月12日 三重県津市
- ⑩ Inoue T, Yoshimoto T, Matsuura K, Narimatsu T, Nakada C, Nagashima Y, Hatakeyama S, Sato F, Oyama C, Habuchi T, Nakagawa M, Moriyama M, Mimata H  
Array CGH analysis of renal cell carcinomas in patients with end-stage renal disease  
第62回日本泌尿器科学会西日本総会  
2010年11月5日 鹿児島県鹿児島市
- ⑪ Inoue T, Yoshimoto T, Narimatsu T, Nagashima Y, Matsuura K, Hatakeyama S, Sato F, Ohyama C, Habuchi T, Nakagawa M, Moriyama M, Mimata H  
Array CGH analysis of renal cell carcinomas in patients with end-stage renal disease  
69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association  
2010年9月24日 大阪府大阪市
- ⑫ Narimatsu T, Inoue T, Yoshimoto T, Nakada C, Matsuura K, Sato F, Seto M, Mimata H, Moriyama M  
Genomic copy number loss at 9p is associated with metastasis of renal cell carcinoma.  
69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association  
2010年9月23日 大阪府大阪市
- ⑬ 井上享, 吉本多一郎, 成松隆弘, 中田知里, 松浦恵子, 守山正胤, 瀬戸加大, 長嶋洋治, 佐藤文憲, 羽瀧友則, 三股浩光  
透析腎癌の網羅的ゲノム解析  
第98回日本泌尿器科学会総会  
2010年4月28日 岩手県盛岡市
- ⑭ 成松隆弘, 井上享, 吉本多一郎, 中田知里, 松浦恵子, 守山正胤, 瀬戸加大, 佐藤文憲, 三股浩光  
転移性腎癌におけるゲノムコピー数異常の増加  
第98回日本泌尿器科学会総会  
2010年4月29日 岩手県盛岡市
- ⑮ 井上享, 成松隆, 中田知里, 松浦恵子, 佐藤文, 長嶋洋治, 矢尾正祐, 窪田吉信, 羽瀧友則, 大山力, 西山博之, 小川修, 中川昌之, 守山正胤, 三股浩光  
ペリニ管癌の網羅的ゲノム解析  
第19回泌尿器科分子・細胞研究会  
2010年2月 神戸市
- ⑯ Narimatsu T, Inoue T, Yoshimoto T, Nakada C, Matsuura K, Moriyama M, Seto M, Sato F, Mimata H  
Increased DNA Copy Number

Alterations in Metastatic Renal Cell Carcinoma.

第 96 回日本泌尿器科学会西日本総会  
2009 年 11 月 高松市

- ⑰ 井上享, 成松隆, 吉本多一郎, 中田知里,  
松浦恵子, 守山正胤, 佐藤文憲, 三股浩  
光

腎細胞癌の網羅的 DNA メチル化異常の  
解析

第 97 回日本泌尿器科学会総会  
2009 年 4 月 岡山市

- ⑱ 成松隆弘, 井上享, 吉本多一郎, 中田知  
里, 松浦恵子, 守山正胤, 瀬戸加大, 佐  
藤文憲, 三股浩光

Array CGH による腎癌転移巣の網羅的  
解析

第 97 回日本泌尿器科学会総会  
2009 年 4 月 岡山市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 恵子 (MATSUURA KEIKO)

大分大学 医学部 准教授

研究者番号: 00291542

(2) 研究分担者

守山 正胤 (MORIYAMA MASATSUGU)

大分大学 医学部 教授

研究者番号: 90238707

(3) 連携研究者

なし