

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 4 月 10 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592029

研究課題名（和文） 進行性前立腺癌の予後予測ならびに治療における新規標的分子の探索的研究

研究課題名（英文） Exploratory study of prognostic and therapeutic target moleculars in advanced prostate cancer

研究代表者

土谷順彦（TSUCHIYA NORIHIKO）

秋田大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70282176

研究成果の概要（和文）：進行性前立腺癌の予後は癌進展や治療反応性に関わる複数の遺伝的要因が関与していると考えられている。我々は、癌関連遺伝子 SNP アレイを用いて、生存期間に関わる遺伝子の同定を試みた。1979 年から 2009 年までの間に、4 施設で骨転移を有する前立腺癌と診断された 188 例の患者を対象とした。SNP 解析にはイルミナ社製 Cancer SNP panel を用いて、408 個の癌関連遺伝子における 1421 の SNP をタイピングし、log rank 法を用いて癌特異的生存期間に関与する SNP をスクリーニングした。その結果、14 個（6 遺伝子；XRCC4, PMS1, GATA3, IL13, CASP8, and IGF1）の生存期間に有意差を有する SNP が同定された。14 個の SNP を用いて癌特異的生存のリスク分類を行った場合、有意に生存期間が短い高リスク患者を同定することができた（ $P=0.0027$ ）。次に、6 遺伝子それぞれから最も関連度の高い SNP を 1 個ずつ選び、6SNPs を用いた予後予測モデルを作成した。リスク SNP の個数は有意に癌特異的生存期間と関連していた（ $P=7.20 \times 10^{-8}$ ）。PSA、ALP、Gleason score を因子に加えた多変量解析においても、リスク SNP を 4 個以上有することは、0-3 個と比較して独立した予後予測因子であることが示された（ $P=1.8 \times 10^{-7}$ ）。癌関連 SNP アレイ解析により、進行性前立腺癌の生存期間に関連する 6 個の候補遺伝子が同定された。これらの遺伝子の SNP 解析と従来の臨床病理学的なリスク因子との併用により、より正確な予後予測や個人に合わせた治療法の選択につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Individual genetic variations may have a significant influence on the survival of metastatic prostate cancer (PCa) patients. We aimed to identify target genes and their variations involved in the survival of PCa patients using a single nucleotide polymorphism (SNP) panel. A total of 185 PCa patients with bone metastasis at initial diagnosis were analyzed. Each patient was genotyped using a Cancer SNP panel that contained 1421 SNPs in 408 cancer-related genes. SNPs associated with the survival were screened by log rank test. Fourteen SNPs in six genes, XRCC4, PMS1, GATA3, IL13, CASP8, and IGF1, were identified to have statistically significant association with the cancer-specific survival. The cancer-specific survivals of patients grouped according to the number of risk genotypes of 6 SNPs selected from the 14 SNPs differed significantly (0-1 vs 2-3 vs 4-6 risk genotypes, $P = 7.20 \times 10^{-8}$). The high-risk group was independently associated with the survival in a multivariate analysis that included conventional clinicopathological variables ($P=1.8 \times 10^{-7}$). We identified 14 SNPs in 6 cancer-related genes which were associated with poor survival in patients with metastatic PCa. A panel of SNPs may help predict the survival of those patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌の進展や予後には、癌の悪性度や進展度などの癌自体の因子の他に腫瘍微小環境や遺伝子学的素因など宿主側の因子が関与しているが、なかでも、宿主の遺伝子学的素因と癌の予後との関連が最近になって注目されてきている。しかし、前立腺癌の予後に関連する遺伝子学的研究は我々が報告した以外にはほとんどないのが現状である。

(2) 進行性前立腺癌の予後を規定する因子として我々が同定した、CYP19やVEGFも治療に対する反応性を修飾している可能性が示唆される (Tsuchiya N, et al, J Clin Oncol, 2006)。前立腺癌患者においても、予後を規定する遺伝子として、治療関連遺伝子が同定される可能性がある。

2. 研究の目的

(1) これまで、進行性前立腺癌に対してホルモン療法を中心とした様々な治療が行われてきたが、治療法の選択は個々の医師に委ねられていた。正確な予後予測によって、予後良好群に対しては過剰な治療を避け、予後不良群に関しては診断時から積極的な治療を行うことで、生

活の質 (QOL) と予後を改善することができる。本研究では予後マーカーとしての遺伝子多型を突き止めることを目的とする。

(2) 本研究によって、これまで注目されなかった分子が癌進展関連分子として同定される左脳性がある。これらの候補遺伝子・分子の機能と癌の進展における役割を、分子生物学的手法を用いて解析することを二次的な目的とする。

3. 研究の方法

(1) 秋田大学ならびに関連施設から、倫理委員会での承認ならびに患者からのインフォームドコンセントを得た上で収集された、約 250 例の病期D前立腺癌患者の血液検体 (ゲノム DNA) で遺伝子型を判定する。SNP アレイを用いて、約 400 の癌関連遺伝子上の約 1,400 種類の SNP を同時に解析する。これらの SNPs について、250 例の進行性前立腺癌の癌特異的生存率ならびに全生存率を Kaplan-Meier 法を用いて分析し、log-rank 法を用いて遺伝子型毎の生存率を比較する。また、Cox-proportional Hazard Model を用いて、他の臨床的因子による影響を考慮した場合の SNP のハザードを算出し、独立した予後規定因子となりうる SNP を見出す。10 個から 20 個程

度の候補 SNP が同定されると予測される。以上により得られた、候補遺伝子の機能は各種データベースを用いておおよその機能を予測することが可能である。それらの遺伝子が、前立腺癌の進展ならびに予後に与える影響を予測した上で、適切な方法を選択して個々の遺伝子の生物学的な意義の検討を行う。

(2) 候補遺伝子は、細胞増殖、細胞分化、アポトーシス、細胞周期調節、細胞遊走などをはじめ様々な個別の機能を有していると考えられる。有望な候補遺伝子に関しては、前立腺癌細胞または正常前立腺と前立腺癌における mRNA の発現を RT-PCR を用いて確認する。前立腺癌において発現が亢進している遺伝子に関しては、前立腺癌細胞を用いて iRNA を用いた遺伝子のノックダウンを行い、細胞増殖能やアポトーシス、浸潤能・転移能、細胞周期に与える影響などを検討する。前立腺癌において発現が低下している候補遺伝子に関しては発現ベクターを作製し、発現が低下または発現していない前立腺癌細胞に遺伝子導入を行い、同様の細胞実験を行う。

4. 研究成果

(1) False discovery rate のカットオフを 30% に設定すると、14 個 (6 遺伝子) の生存期間に有意差を有する SNP が同定された (表 1)。

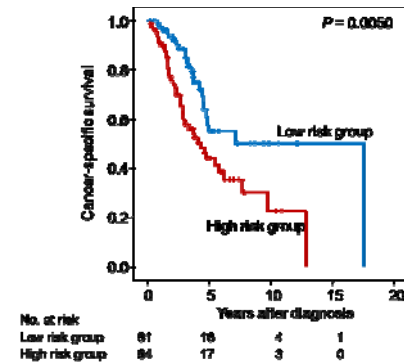
表 1

Gene (location, function), SNP	Genotype	MAF ^a	logrank χ^2	P
XPC2C1 (5p14, DNA strand-break repair)	GG vs AG, AA	48	9.46	0.0021
	AA vs AG, GG	48	9.39	0.0026
FUS1 (2p21, DNA mismatch repair)	GG, AG vs AA	46	4.38	0.036
	GG, AG vs AA	46	7.82	0.0052
	AA, AG vs GG	46	7.27	0.0078
	GG, AG vs AA	46	8.84	0.0033
IL13 (2q31, Cytokines)	AA, AG vs GG	50	6.22	0.023
	AA, AG vs GG	48	6.86	0.0135
IGF1 (12q24, Growth Factor)	GG, AG vs AA	45	3.45	0.0638
	GG, AG vs AA	45	3.45	0.0638
GATA3 (10p14, Transcription Factor)	GG, AG vs AA	50	6.86	0.009
	GG, GG vs CC	49	6.87	0.0089
	GG, AG vs AA	49	6.27	0.0235
CASP8 (2p21, Apoptosis)	AA vs AG, CC	48	3.45	0.0638
	AA vs AG, CC	48	3.45	0.0638

アレイ分析により同定された候補SNPsを

用いたリスク分類に従った患者の癌特異的生存を図 1 に示す。

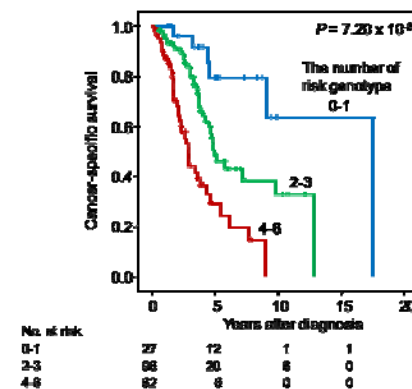
図 1



スクリーニング後に選択された 14 個の SNPs を用い、効果の大きさの差を組み入れて高リスク群と低リスク群に分類することにより予後スコア指数を開発した。その予測の精度を、全モデル構築過程に対して、leave-one-out cross validation により検証した。高リスク群の癌特異的生存は、低リスク群患者よりも有意に短かった ($P=0.0050$)

(2) 図 2 に 6 個の候補遺伝子から選択した 6 個の代表 SNPs の危険遺伝子型の数に基づく、患者の癌特異的生存を示す。各患者は危険遺伝子型の数が、(1) 0 個又は 1 個、(2) 2 個又は 3 個、(3) 4 個～6 個の 3 群のうちの 1 つに割り当てた。3 群間の癌特異的生存は有意に異なっていた ($P=7.20 \times 10^{-8}$)。

図 2



(3) Cox比例ハザード回帰分析では、診断時のALP、生検組織のGleason scoreとともに、SNPsによるhigh risk群が独立した予後予測因子であった (表2)。

表2

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age (>70 vs <70 years)	1.32 (0.84 - 2.07)	0.222		
PSA (>315 vs <315 ng/mL)	1.41 (0.90 - 2.23)	0.139		
HGB (<13.5 vs >13.5 g/dL)	1.13 (0.71 - 1.80)	0.617		
ALP (>350 vs <350 IU/L)	2.88 (1.77 - 4.70)	2.17 x 10 ⁻⁵	2.64 (1.81 - 4.82)	6.83 x 10 ⁻⁴
LDH (>500 vs <500 IU/L)	2.69 (1.47 - 4.92)	1.39 x 10 ⁻³	1.80 (0.78 - 3.80)	6.210
Gleason score (>9 vs <9)	2.38 (1.50 - 3.78)	2.47 x 10 ⁻⁴	2.10 (1.28 - 3.47)	4.78 x 10 ⁻³
Risk genotype (4-6 vs 0-3)	3.21 (2.04 - 5.05)	4.65 x 10 ⁻⁴	2.87 (1.18 - 6.62)	1.14 x 10 ⁻³

(4) 多変量解析でも、4個以上のリスク遺伝子型の保有は独立した予後予測因子であった (表4)。

表4

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age (>70 vs <70 years)	1.32 (0.84 - 2.07)	0.222		
PSA (>315 vs <315 ng/mL)	1.41 (0.90 - 2.23)	0.139		
HGB (<13.5 vs >13.5 g/dL)	1.13 (0.71 - 1.80)	0.617		
ALP (>350 vs <350 IU/L)	2.88 (1.77 - 4.70)	2.17 x 10 ⁻⁵	2.22 (1.32 - 3.73)	2.60 x 10 ⁻³
LDH (>500 vs <500 IU/L)	2.69 (1.47 - 4.92)	1.39 x 10 ⁻³	1.22 (0.62 - 2.40)	0.569
Gleason score (>9 vs <9)	2.38 (1.50 - 3.78)	2.47 x 10 ⁻⁴	2.16 (1.31 - 3.56)	2.65 x 10 ⁻³
Risk genotype (4-6 vs 0-3)	3.21 (2.04 - 5.05)	4.65 x 10 ⁻⁴	3.06 (1.80 - 5.19)	3.48 x 10 ⁻³

癌関連SNPアレイ解析により、進行性前立腺癌の生存期間に関連する6個の候補遺伝子における14個のSNPsが同定された。これらのSNPsと従来の臨床病学的なリスク因子とを組み合わせる使用することにより、より正確な予後予測や個人に合わせた治療法の選択につながる可能性がある。

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8件)

1. Narita S, Tsuchiya N, Yuasa T, et al. Outcome, clinical prognostic factors and genetic predictors of adverse reactions of intermittent combination chemotherapy with docetaxel, estramustine phosphate and carboplatin for castration-resistant prostate cancer. Int J Clin Oncol 2011.
2. Huang M, Narita S, Tsuchiya N, et al. Overexpression of Fn14 Promotes Androgen Independent Prostate Cancer Progression through MMP-9 and Correlates with Poor Treatment Outcome. Carcinogenesis 2011.

3. Ma Z, Tsuchiya N, Yuasa T, et al. Clinical significance of polymorphism and expression of chromogranin a and endothelin-1 in prostate cancer. J Urol 2010;184:1182-8.

4. Wang W, Yuasa T, Tsuchiya N, et al. The novel tumor-suppressor Mel-18 in prostate cancer: its functional polymorphism, expression and clinical significance. Int J Cancer 2009;125:2836-43.

5. Tsuchiya N, Narita S, Kumazawa T, et al. Clinical significance of a single nucleotide polymorphism and allelic imbalance of matrix metalloproteinase-1 promoter region in prostate cancer. Oncol Rep 2009;22:493-9.

6. 土谷順彦、羽瀧友則、前立腺癌における遺伝子多型、日本臨牀、69、79-86、2011.

7. 井上高光、土谷順彦、羽瀧友則、前立腺癌の発症・進展メカニズム、日本臨牀、69、79-86、2011.

8. 土谷順彦、成田伸太郎、井上高光、他 遺伝子多型による化学療法副作用予測、日本臨牀、68、371-375、2010.

[学会発表] (計11件)

1. Ma Z, Tsuchiya N, Yuasa T, et al. Polymorphisms of fibroblast growth factor receptor 4 have association with the development of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia and the progression of prostate cancer in a Japanese population (moderated poster) The 104th Annual Meeting of the American Urological Association Chicago, USA, 2009.

2. Ma Z, Tsuchiya N, Yuasa T, et al. Influence of polymorphisms and expression of chromogranin A and endothelin-1 on the development and progression of prostate cancer (moderated poster) The 104th Annual Meeting of the American Urological Association Chicago, USA, 2009.

3. Narita N, Yuasa T, Tsuchiya N, et al. A genetic polymorphism of tge osteoprotegerin gene is associated with an increased risk of advanced prostate cancer (moderated poster) The 104th Annual Meeting of the American Urological Association Chicago, USA, 2009.

4. Narita S, Tsuruta H, Saito M, et al. Evaluation of outcomes and genetic predictive factors for prognosis and toxicity in hormone-refractory prostate cancer patients following combination therapy with docetaxel, estramustine, and carboplatin (moderated poster) The 104th Annual Meeting of the American Urological Association Chicago, USA, 2009.

Association Chicago, USA, 2009.

5. Wang W, Yuasa T, Tsuchiya N, et al. The novel fumor-suppressor Mel-18 in prostate cancer: its functional polymorphism, expression, and clinical significance (moderated poster) The 104th Annual Meeting of the American Urological Association Chicago, USA, 2009.

6. Huang M, Narita S, Ma Z, et al. Tweak-Fn14 signaling regulates androgen-independent prostate cancer cell invasiveness and correlates with poor patient outcome The 105th Annual Meeting of the American Urological Association, 2010.

7. Narita S, Numakura K, Obara T, et al. Genetic polymorphism influences individual variations in serum testosterone levels in prostate cancer patients treated with androgen deprivation therapy. The 105th Annual Meeting of the American Urological Association, 2010.

8. Tsuchiya N, Narita S, Ma Z, et al. Insulin-like growth factor -I (IGF-I) polymorphisms predict the survival of prostate cancer patients with bone metastasis at initial presentation The 105th Annual Meeting of the American Urological Association San Francisco, USA, 2010.

9. Huang M, Narita S, Numakura K, et al. Prostate cancer progression under high-fat diet is enhanced by MCP-1/CCR2 signaling The 106th Annual Meeting of the American Urological Association Washington D.C., 2011.

10. Narita S, Tsuchiya N, Maita S, et al. Preoperative serum levels of interleukin-6 and interleukin-12 predict biochemical recurrence in patients with prostate cancer treated using radical prostatectomy The 106th Annual Meeting of the American Urological Association Washington D.C., 2011.

11. Tsuchiya N, Matsui S, Narita S, et al. Prediction of Survival in Metastatic Prostate Cancer Patients by SNP Array Analysis of Cancer-Associated Genes The 106th Annual Meeting of the American Urological Association Washington D.C., 2011.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：前立腺癌の予後の予測方法

発明者：羽瀨友則、土谷順彦

権利者：秋田大学

種類：特許

番号：特願 2011-186698

出願年月日：2011 年 8 月 30

国内外の別：国内・国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~hinyoki/default.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土谷順彦 (TSUCHIYA NORIHIKO)

秋田大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70282176

(2) 研究分担者

羽瀨友則 (HABUCHI TOMONORI)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00293861

堀川洋平 (HORIKAWA YOHEI)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：40361232

成田伸太郎 (NARITA SHINTARO)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：40396552