

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592400

研究課題名(和文)腎癌の治療反応特異的な分子シグナル経路の同定とその臨床応用研究

研究課題名(英文)Identification of molecular signatures associated with kidney cancer prognosis

研究代表者

矢尾 正祐 (YAO, MASAHIRO)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00260787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：腎癌の予後因子である高Ca血症およびその原因であるPTHrP遺伝子に着目して解析を行った。血清Ca値は初発時683例、再発時71例を集積した。腫瘍PTHrP発現は623例をリアルタイムPCRで検出した。高Ca血症およびPTHrP高発現は淡明細胞型のみに見られ、それ以外の組織型ではみられなかった。PTHrP高発現は淡明細胞腎癌の全生存の有意な予後不良因子であり、さらにstage IV進行例でも、MSKCC、NCCN等の予後因子を組み入れた多変量解析モデルにおいて、PTHrPが独立した予後因子であった。腫瘍PTHrP発現検出は、淡明細胞腎癌の診断・予後マーカーになると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We reviewed corrected serum Ca levels at initial onset (n=683) and/or as of recurrence (n=71) in patients with RCC. We also examined a total of 623 renal tumor samples for PTHrP mRNA expressions by quantitative real-time PCR. High serum Ca concomitant with PTHrP overexpression in tumors was observed exclusively in clear cell RCC but not in other non-clear cell tumors. In clear cell RCC, univariate and multivariate Cox analyses demonstrated that high PTHrP expression was strongly associated with poor overall survival for patients who underwent standard nephrectomy. Moreover, in stage IV advanced cases, PTHrP expressions remained as independent prognostic parameters for OS in multivariate Cox model. These data suggest that the previously characterized tumor signatures of high serum Ca due to high PTHrP expression and poor prognosis are clear cell RCC-specific features, and detection of tumor PTHrP expression will be a potent diagnostic and prognostic marker for clear cell RCCs.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎癌 遺伝子発現 予後 分子マーカー

1. 研究開始当初の背景

近年の分子遺伝学・分子生物学的知見の集積により、腎癌がその分子発症機構および生物学的特性の全く異なる複数の腫瘍亜型の集合体であることが明らかにされ、新しい病理組織型診断が整備されてきた(2004年WHO腎腫瘍分類)。これをうけて臨床現場でも個々の腫瘍の遺伝子背景に基づく、診断および治療法の個別化・標準化が急務と考えられる。

限局性の腎癌では腎摘除術が現在標準療法として位置づけられる。一方手術不能の進行・転移例では、インターフェロンなどのサイトカイン療法が長らく施行されてきたがその成績は決して満足できるものではなかった。最近になり、これらの進行・転移例に対して、ソラフェニブ、スニチニブさらにエペロリムス、テムスロリムスなどのいわゆる新規分子標的薬が相次いで導入され、従来のサイトカイン療法と比較して明らかに優れた治療効果が見られるようになった。また分子標的薬を交代使用することでこれまでにないような長期の延命例も稀ではなく、まさに腎癌治療のパラダイムシフトがもたらされたといえる。一方、これらの新規薬物は患者ごとの治療効果の差異とともに特有な副作用も必発する。最も効果が期待される患者に最適な治療薬物の選択、使用が熱望されているが、いずれも新しい薬物でありその効果、反応性を事前に判別し予測する方法は世界的にもまだ確立されていない。

高Ca血症は腎癌の3~17%にみられ、特に進行転移例では、MSKCC, NCCN, 最近のDatabase Consortium modelでも予後不良因子の一つに上げられ、以前のサイトカイン治療のみならず、新規の分子標的治療が行われた患者でも、予後と強く相関することが複数の研究で示されている。さらに高Caの主な原因は腎癌腫瘍細胞からのparathyroid hormone like hormone (PTHrP)の過剰発現であることも、先行研究で明らかとなっている。一方腎癌での高Ca血症やPTHrPの知見は、以前の病理組織型分類時代のものであり、新しい組織型分類下でのこれらの状態、臨床像との関連は全く検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、腎癌の病態・予後を規定する遺伝子変化のうち、特に分子標的治療薬の標的シグナル経路に着目し、分子標的治療薬の反応性・効果と強く関連する発現遺伝子(群)を明らかにする。引き続きその遺伝子データに基づいた個別患者ごとの適正な薬物選択・治療選択法の臨床応用を図る。

3. 研究の方法

腎癌のうちもっとも頻度の高い淡明細胞型を対象に、転移事象と関連する発現変動遺伝子を我々が解析したDNAマイクロアレイ・データから抽出し、さらに既存 database に登

録されているマイクロアレイ・データとも比較し、予後との関連が特に強いと考えられる遺伝子群の抽出を試みた。その結果、高Caの原因であるPTHrP遺伝子もこの中に含まれていることが見いだされた。

そこでこの遺伝子の発現状態を多検体の腎癌で確認検証した。1991年~2013年に標準的な腎摘除術治療後、WHO分類を用いて腫瘍の病理組織診断を行った。血清Ca値は腎腫瘍の初発時683例と再発時の71例の値を診療記録より連続的に集積した。Orrellらの補正式で補正を行い、標準どおり補正Ca値>10mg/dLを異常値とした。

さらにStage IV症例で、姑息的腎摘除術+残存病変に対する分子標的治療薬を含む全身治療を行った進行例では、腎摘術直前の、LDH, ヘモグロビン値(Hb), KPS, 好中球数, 血小板数についてもそのデータ集積を行った。

PTHrP遺伝子発現はTaqMan probeを用いた定量的real-time PCR法で測定した。凍結保存されている腎腫瘍組織検体(淡明細胞腎癌: 542例、その他の組織型: 114例)およびコントロールの正常腎34例よりRNAを抽出、さらにcDNAを合成した。全てのPTHrP遺伝子のvariantに対応できるようなprimer, probeを以下のようにデザインし、定量的PCRに用いた。

5' -GCTCGGTGGAGGGTCTCA-3' (forward primer),

5' -TCATGGAGGAGCTGATGTTTCAG-3' (reverse primer),

5' -6FAM-CCGCCGCCTCAAAGAGCTGTG-Dark Quencher-3' (probe)。

内在性コントロールはACTBを使用し遺伝子発現値の補正を行った。PCRは2回反応を行い平均値をシグナル値とした。PCRシグナル値はlog2変換後、解析に使用した。またPTHrP発現検出限界以下の検体については、最低検体値の半量をそのシグナル値とし、以後の解析に用いた。

4. 研究成果

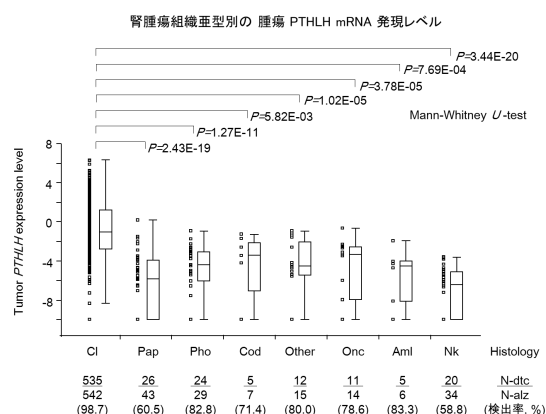
(1) 高Ca血症は淡明細胞型腎癌にみられる病態である

高Ca血症は、淡明細胞型に有意にみられ(49回/758回測定中、6.5%)、一方それ以外の腫瘍組織型では、集合管癌多発転移の一例を除いては、みられなかった(1回/143回測定中)。淡明細胞型では、病期およびgradeと正相関がみられ、stage IV、20%、再発例、15%、またG3、16%、G4、23%が高Ca血症を呈していた。

(2) PTHrP遺伝子高発現は淡明細胞型にみられる

PTHrP遺伝子は淡明細胞型腎癌ではPCR法で532/542例中(98.7%)で検出され、その中には非常に高いシグナル値を示すものがみられた。一方、他の腫瘍組織型および正常腎

ではいずれも、検出頻度、シグナル値とも明らかに低値であった(下図)。



(3) 腎癌での血清 Ca 値と PTHLH 発現との関係

淡明細胞型腎癌では 349 例で Ca 値と PTHLH 発現の両データが得られていた。

PTHLH 発現値の cutoff 値 (= 1.275) 以上では 20/22 例で、高 Ca 血症がみられていた。一方、淡明細胞型以外の組織型 81 例では、全て正常 Ca 値、低 PTHLH 発現値であった。また集合管癌多発転移で高 Ca がみられた一例も原発腫瘍での PTHLH 発現は検出限界値以下であった。

(4) VHL 遺伝子変異と PTHLH 発現値は関連みられず

PTHLH 遺伝子発現が VHL 遺伝子によって調節されているとの先行報告があり、淡明細胞型腎癌で VHL 遺伝子変異(遺伝子内変異、promoter methylation)の有 vs. 無 (n=132 vs. 112)で、PTHLH 発現値との関係を見たが、明らかな関連は検出できなかった (Mann-Whitney U: $P=0.260$)。変異あるいは methylation 陽性の腫瘍群内でも PTHLH の発現にはばらつきがあり、VHL 遺伝子変異があっても、PTHLH 発現値が低い例も散見された。

(5) 淡明細胞型腎癌の PTHLH 高発現例は予後不良である

淡明細胞型腎癌 (n=542)のうち、PTHLH 高発現例(シグナル値>1.275)は 131 例(24%)であった。生存率の単変量解析で、この高発現群は、低発現群に比べ有意に全生存(OS)および根治術後再発予後が不良であった。さらに性別、初発症状、stage, grade 因子を含む Cox 多変量解析では、PTHLH は独立した OS 予後不良因子となっていた。一方、根治術後再発予後解析では、PTHLH の独立性ははっきりしなかった。

次に、stage IV で姑息的腎摘除術を行った進行例(n=113)でも、単変量解析および、NCCN、Database Consortium model の予後因子を組み入れた複数の多変量解析モデルにおいても、PTHLH 発現因子が有意な独立した予後因子となっていた。

以上より次の結論が得られた。

高 Ca 血症、およびその主要原因である

PTHLH 過剰発現は淡明細胞型腎癌の特性であり、それ以外の腎腫瘍組織型では稀である。

MSKCC, NCCN や Database Consortium risk model あるいは血清 Ca 値を患者の予後判定や層別化に用いる際には、病理組織型診断を配慮し、使用していく必要がある。腫瘍 PTHLH 発現は淡明細胞型腎癌の予後判別の分子マーカーとなり得る。

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 11 件)

長嶋洋治, 青木一郎, 近藤慶一, 中井川昇, 岸田健, 宮城洋平, 矢尾正祐. 腫瘍病理診断の up to date 腎腫瘍の病理診断 up to date. 臨床病理, (査読なし) 62(6): 568-577, 2014. http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=co3labor/2014/006206/006&name=0568-0577j&UseRID=163.212.32.57&base=jamas_pdf

Yao M, Murakami T, Shioi K, Mizuno N, Ito H, Kondo K, Hasumi H, Sano F, Makiyama K, Nakaigawa N, Kishida T, Nagashima Y, Yamanaka S, Kubota Y. Tumor signatures of PTHLH overexpression, high serum calcium, and poor prognosis were observed exclusively in clear cell but not non clear cell renal carcinomas. Cancer Med. (査読あり) 2014 Aug;3(4):845-54. doi: 10.1002/cam4.270. Epub 2014 May 26.

Kakizoe M, Yao M, Tateishi U, Minamimoto R, Ueno D, Namura K, Makiyama K, Hayashi N, Sano F, Kishida T, Kobayashi K, Noguchi S, Ikeda I, Ohgo Y, Taguri M, Morita S, Inoue T, Kubota Y, Nakaigawa N. The early response of renal cell carcinoma to tyrosine kinase inhibitors evaluated by FDG PET/CT was not influenced by metastatic organ. BMC Cancer. (査読あり) 2014 Jun 2;14(1):390. doi: 10.1186/1471-2407-14-390.

中村麻美, 矢尾正祐, 佐野太, 坂田綾子, 蓼沼知之, 槇山和秀, 中井川昇, 窪田吉信. Birt-Hogg-Dubé 症候群に発症した転移性腎癌に対する分子標的治療の経験. 泌尿器科紀要, (査読あり) 59(8): 503-506, 2013. <http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/bitstream/2433/178386/1/5>

9_503.pdf

蓼沼知之, 矢尾正祐, 坂田綾子, 佐野太, 槇山和秀, 中井川昇, 中山崇, 稲山嘉昭, 窪田吉信. 腎細胞癌心筋転移に対してスニチニブが有効であった1例. 泌尿器科紀要, (査読あり) 59(2): 97-101, 2013. http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/bitstream/2433/173105/1/5_97.pdf

長嶋洋治, 谷口多美代, 黒田直人, 矢尾正祐. 分子標的治療時代の腎癌病理の立場から. 臨床泌尿器科, (査読なし) 67(1): 13-18, 2013. <http://medicalfinder.jp/doi/pdf/10.11477/mf.1413102992>

Slater AA, Alokail M, Gentle D, Yao M, Kovacs G, Maher ER, Latif F. DNA methylation profiling distinguishes histological subtypes of renal cell carcinoma. *Epigenetics*. (査読あり) 2013 Mar;8(3):252-67. doi: 10.4161/epi.23817.

Nagashima Y, Kuroda N, Yao M. Transition of organizational category on renal cancer. *Jpn J Clin Oncol*. (査読あり) 2013 Mar;43(3):233-42. doi: 10.1093/jjco/hyt006. Epub 2013 Feb 6.

Sano F, Makiyama K, Tatenuma T, Sakata R, Yamanaka H, Fusayasu S, Nakayama T, Nakaigawa N, Yao M, Kubota Y. Presurgical downstaging of vena caval tumor thrombus in advanced clear cell renal cell carcinoma using temsirolimus. *Int J Urol*, (査読あり) 20(6):637-639, 2013. doi: 10.1111/iju.12012.

Ito H, Shioi K, Murakami T, Takizawa A, Sano F, Kawahara T, Mizuno N, Makiyama K, Nakaigawa N, Kishida T, Miura T, Kubota Y, Yao M. C-reactive protein in patients with advanced metastatic renal cell carcinoma: Usefulness in identifying patients most likely to benefit from initial nephrectomy. *BMC Cancer*. (査読あり) 2012 Aug 2;12(1):337. doi: 10.1186/1471-2407-12-337.

Ueno D, Yao M, Tateishi U, Minamimoto R, Makiyama K, Hayashi N, Sano F, Murakami T, Kishida T, Miura T, Kobayashi K, Noguchi S, Ikeda I, Ohgo

Y, Inoue T, Kubota Y, Nakaigawa N. Early assessment by FDG-PET/CT of patients with advanced renal cell carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitors is predictive of disease course. *BMC Cancer*. (査読あり) 2012 May 2;12(1):162. doi: 10.1186/1471-2407-12-162.

[学会発表](計 7件)

矢尾正祐, 村上貴之, 塩井康一, 水野伸彦, 槇山和秀, 中井川昇, 近藤慶一, 岸田健, 長嶋洋治, 窪田吉信. 腫瘍 PTHLH 高発現は stage IV 進行性淡明細胞腎癌の予後不良因子である. 第 102 回日本泌尿器科学会総会 2014/4/24-27, 神戸国際会議場(兵庫県)

長嶋洋治, 青木一郎, 矢尾正祐. 傍糸球体細胞腫瘍の 4 例. 第 72 回日本癌学会総会, 2013 年 10 月 3 日, パシフィコ横浜(神奈川県)

矢尾正祐, 村上貴之, 水野伸彦, 塩井康一, 佐野太, 淵桂子, 槇山和秀, 中井川昇, 近藤慶一, 岸田健, 長嶋洋治, 窪田吉信. 腫瘍 PTHLH 過剰発現に伴う血清 Ca 高値は淡明細胞型腎癌に特異的な予後不良因子・腫瘍特性であり非淡明細胞型にはあてはまらない. 第 101 回日本泌尿器科学会総会, 2013 年 4 月 27 日, 札幌さっぽろ芸術文化の館(北海道)

中井川昇, 矢尾正祐, 窪田吉信. FDG PET/CT に基づいた進行性腎癌に対する治療戦略. 第 77 回日本泌尿器科学会東部総会, 2012 年 10 月 17 日, 東京ドームホテル(東京都)

矢尾正祐, 村上貴之, 黄エイ, 水野伸彦, 佐野太, 淵桂子, 槇山和秀, 中井川昇, 塩井康一, 岸田健, 長嶋洋治, 窪田吉信. Hypercalcemia due to overexpression of tumor PTHLH exclusively observed in clear cell subtype renal carcinoma. 第 71 回日本癌学会総会, 2012 年 9 月 21 日, ホテルロイトン札幌(北海道)

矢尾正祐, 村上貴之, 黄エイ, 水野伸彦, 佐野太, 淵桂子, 槇山和秀, 中井川昇, 塩井康一, 岸田健, 長嶋洋治, 窪田吉信. 腎腫瘍における PTHLH 遺伝子の発現解析: PTHLH は淡明細胞型腎癌に特異的な発現・予後マーカーである. 第 100 回日本泌尿器科学会総会, 2012/4/23, パシフィコ横浜(神奈川県)

中井川 昇, 矢尾正祐, 上野大樹, 村上
貴之, 榎山和秀, 小林一樹, 大古美治,
池田伊知郎, 岸田 健, 野口純男, 三浦 猛,
窪田吉信. FDG PET/CT を用いた進行性腎
細胞癌に対する TKI 治療の経時的評価の
有用性についての検討. 第 100 回日本泌
尿器科学会総会, 2012/4/23, パシフィ
コ横浜 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢尾 正祐 (YAO MASAHIRO)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 00260787

(2) 研究分担者

中井川 昇 (NAKAIGAWA NOBORU)
横浜市立大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 00237207

長嶋 洋治 (NAGASHIMA YOJI)
横浜市立大学・医学研究科・客員教授
研究者番号: 10217995