

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462402

研究課題名(和文)腎細胞癌の進展とクロマチン制御関連遺伝子異常

研究課題名(英文)Role of the chromatin regulating genes in the progression of renal cell carcinoma

研究代表者

久米 春喜(Kume, Haruki)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：10272577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小径腎癌ではhyperploidであることが唯一の予後不良因子であったが、クロマチン制御関連遺伝子の変異とhyperploidであることは相関しておらず、クロマチン制御関連遺伝子の変異がhyperploidにつながっていることを示唆するものではなかった。また、薬物治療においてもクロマチン制御関連遺伝子の発現と薬物療法開始からの予後の相関は認められなかった。このようにクロマチン制御関連遺伝子の異常が腎癌進展に寄与する部分は少ないと考えられる。ただし、いまだ断片的なデータであるので、今後の研究の蓄積が待たれる。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of the chromatin regulating genes in the progression of renal cell carcinoma (RCC) including PBRM1 gene, BAP1 gene, SETD2 gene, which have been shown to be frequently mutated, firstly we analyzed cases with small RCC (≤ 4 cm). Multivariate analysis showed that hyperploid tumor was the only predictive factor. However, there was no relation between hyperploid tumor and mutation of chromatin regulating genes. Then we analyzed metastatic cases. The progression free survival was similar in cases with and without mutation of chromatin regulating genes.

In conclusion, the chromatin regulating genes may play only a minor role in the progression of RCC.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：腎細胞癌 クロマチン制御遺伝子 癌の進展

研究業績の概要

1. 研究当初の背景

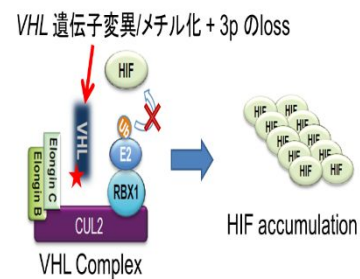
腎細胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) による本邦での癌死数は 7168 人で部位別では白血病に次いで 7 番目に多く、年次推移では罹患率、死亡数ともに年々増加している。腎細胞癌の予後は必ずしも良いものではなく、腫瘍径 4 cm 以下の症例でも 10 年で約 5% の症例に転移が発生し、転移が発生した場合には集学的治療を行っても全生存期間の中央値は 1-1.5 年程度である。このような予後を改善するには腎細胞癌の遺伝子に関する基礎的な研究が非常に重要である。

腎細胞癌はその病理組織像からいくつかの組織型に分類されている。最も多い組織型である淡明細胞型腎細胞癌 (約 80%) は近位尿管により発生し、原因遺伝子は VHL 遺伝子である。この VHL 遺伝子は、VHL 病 (von Hippel Lindau 病: 中枢神経系の血管芽腫、網膜血管腫、副腎褐色細胞腫、腎細胞癌などの腫瘍性、嚢胞性病変が複数の臓器に発生する常染色体優性の遺伝性疾患) の家系の解析から 1993 年に 3p25 領域に発見された。癌抑制遺伝子である VHL 遺伝子は転写調節因子である低酸素環境適応因子 (HIF; hypoxia inducible factor) の分解に参与する。VHL 遺伝子の変異により HIF の蓄積が起これ、PDGF 遺伝子や VEGF 遺伝子といった血管新生遺伝子の転写が促進され、さらに下流の増殖因子が過剰発現により、腎細胞癌の発生つなぐと考えられている。

我々は最近、240 例の淡明細胞型腎細胞癌に対し詳細な遺伝子解析を行った。すなわち、高密度オリゴヌクレオチドアレイによるゲノムコピー数の解析 (240 例)、さらに次世代シーケンサーを用いた全ゲノム塩基配列解析 (14 例)、全エクソン塩基配列解析 (106 例)、RNA 塩基配列解析 (100 例)、DNA メチル化解析 (106 例) を行った (Sato、

Kume、Ogagwa ら、Nature Genet 2013)。その結果、VHL 遺伝子、PBRM1 遺伝子、BAP1 遺伝子、SETD2 遺伝子の遺伝子変異が高頻度に認められた (それぞれ 40%、26%、7%、11%)。これらの遺伝子のうち VHL 遺伝子以外の 3 つは、クロマチン制御に関する遺伝子であり、ヒストンのメチル化、アセチル化、脱ユビキチン化などに関与することが知られている。

図1 Clear Cell RCC 発生のメカニズム



2. 研究の目的

これらのクロマチン制御に関する遺伝子変異と予後との関係を解析したところ、VHL 遺伝子や PBRM1 遺伝子の変異の有無は予後に影響なかったのに対し、BAP1 遺伝子の変異例では全生存率が有意に低く、SETD2 遺伝子の変異例では高頻度に遠隔転移をきたすことが判明した。実際に、ほかのグループからは、同一症例内の原発巣、転移巣の遺伝子変異を詳細に調べ、SETD2 遺伝子の変異により淡明細胞型腎細胞癌の悪性度が増すことが最近報告されている (Gerlinger ら、N Eng J Med, 2012 図 3)。これらの知見をもとにクロマチン制御に関する遺伝子と淡明細胞型腎細胞癌の進展について研究することが、本研究の目的である。

図2 クロマチン制御関連遺伝子変異と予後

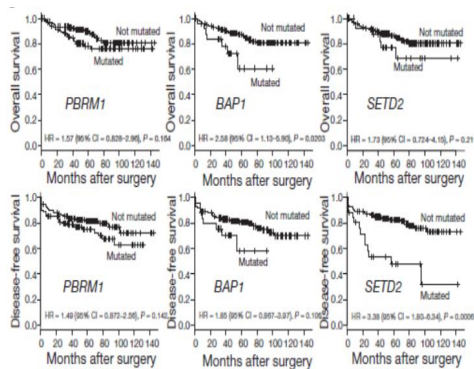
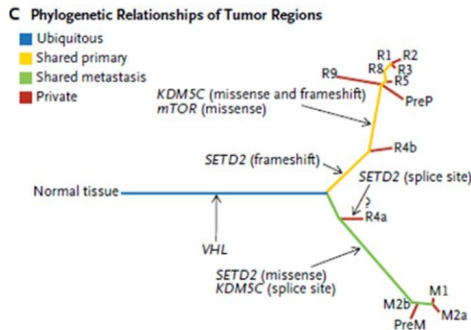


図3 SETD2変異と悪性度の増加



3. 研究の方法

比較的予後の良いとされている 4 cm以下の症例で解析を行うことで、より重要な因子を抽出できると考え、ゲノム解析のデータをサブ解析した。

次に、予後に大きく規定するものは転移の存在であるが、有転移症例に絞って、その予後に関わる因子について解析を行うこととした。

最後に、近年、癌細胞が免疫系からの攻撃を逃れることにより、病勢進行や治療抵抗につながる事が言われている。今回、97 例の clear cell RCC 症例の RNA sequence データベースをもとに、腫瘍での HLA の発現、ネオエピトープ (遺伝子変異を由来とする抗原決定部位) 数と予後について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 小径腎癌での検討

比較的予後の良いとされている 4 cm以下の症例で解析を行うことで、より重要な因子を抽出できると考えた。そこで、4 cm以下の症例で、コピー数解析、全エキソンシーケンス、mRNA 発現解析、メチレーション解析すべてが揃っていた症例は 35 例について解析を行った。

男/女 28/7 名、年齢中央値 65 歳、腫瘍径中央値 3.0 cmであった。このうち 5 例で経過中に転移が出現した (観察期間中央値 2157 日)。検討項目は、臨床病理学的所見 (年齢、性別、病理組織所見 (腫瘍径、pT stage、Grade、脈管侵襲)) および以下に示す網羅的ゲノム解析の結果である。

1. コピー数解析 (Hyperloid、3p del、3p UPD、3pLOH、5q gain、7q gain、8q LOH、9p LOH、14q LOH)
2. DNA 遺伝子変異 (VHL、TCEB1、PBRM1、BAP1、SETD2) 変異数 (中央値 45 個未満か?)
3. mRNA 発現パターン ccA、ccB4. メチル化 (高メチル化 vs 中+低メチル化) これらについて単変量解析を行い、p 値が 0.05 以下であったものについて多変量解析を行った。

単変量解析では脈管侵襲、Grade、Hyperloid、14q LOH が有意な因子として挙げられたが、そのうち多変量解析では Hyperloid であることのみが唯一の危険因子として挙げられた。Hyperloid 腫瘍はクロマチンが大きく変化した腫瘍であることから、クロマチンの変化が腎癌進展に重要であることを再確認した (表 1)。一方で、クロマチン制御関連遺伝子である *PBRM1*、*BAP1*、*SETD2* 遺伝子変異と hyperloid であることについてはフィッシャーの直接確率検定ではいずれも有意差を認めなかった (それぞれ $p=0.553$ 、 0.599 、 0.595 、両側検定値)。すなわち、この解析ではクロマチン制御関連遺伝子の変異が hyperloid につながってい

ることを示唆するものではなかった。

表1 解析結果

		N	単変量解析		多変量解析	
			REF	p値	REF	p値
脈管侵襲	なし	29	REF		REF	
	あり	6	12.1	0.0004	4.7 (0.4 - 60.7)	0.232
Grade	1, 2	29	REF		REF	
	3, 4	6	11.6	0.0006	8.9 (0.6 - >100)	0.104
Hyperploid	なし	31	REF		REF	
	あり	4	6.7	0.016	16.6 (1.04 - >100)	0.047
14q LOH	なし	26	REF		REF	
	あり	9	6.7	0.039	3.9 (0.2 - 64.7)	0.341

(2) 有転移症例での検討：薬物療法の反応性
 予後に大きく規定するものは転移の存在である
 が、有転移症例に絞って、その予後に関わる因子
 について解析を行うこととした。有転移既に転移
 を有している症例 18 例を対象に、遺伝子発現と薬
 物(TKI, tyrosine kinase
 inhibitor および mTOR
 阻害薬)への反応性、予
 後について解析した。対
 象となる遺伝子は、先の
 解析で変異が多く認めら
 れた HIF-VEGF 経路の遺
 伝子群、PIK3-mTOR
 signaling の遺伝子群であ
 る。

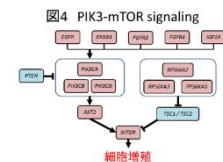
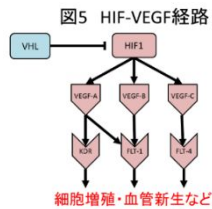


図6 TKI効果と遺伝子変異

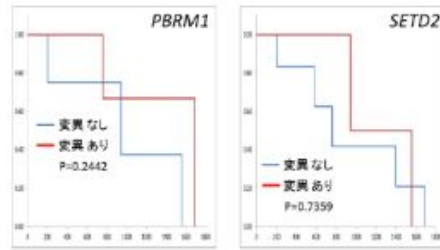


図7 mTOR阻害薬効果と遺伝子変異

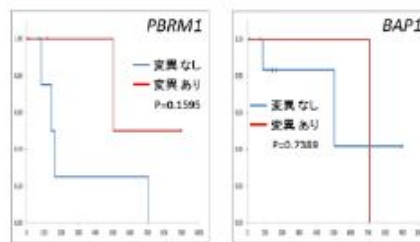


図8 TKI効果と遺伝子発現

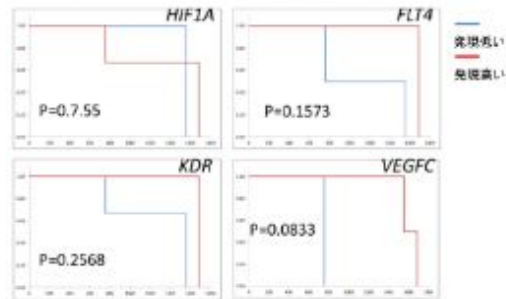
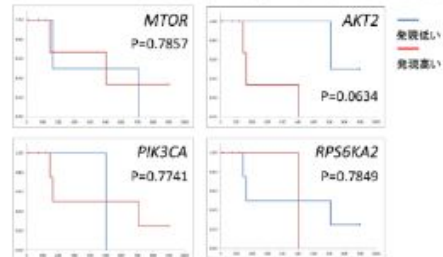


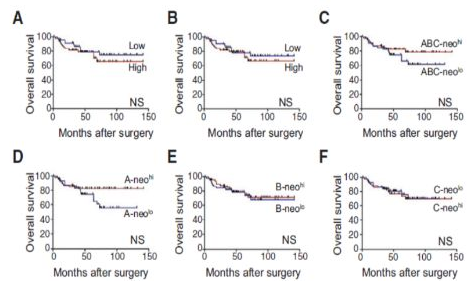
図9 mTOR阻害薬効果と遺伝子発現



PBRM1、SETD2いずれも変異の有無で各薬剤
 投与後の予後で大きな差は認めなかった。mTOR
 阻害薬は遺伝子発現と効果とはっきりしなかった
 遺伝子が多かった。TKI では遺伝子発現と効果と
 に弱いながら相関を認める遺伝子が多かった。

薬物療法に対する効果予想は、今後の課題であ
 ると考えた。

図10 HLA発現、ネオエピトープと予後-1

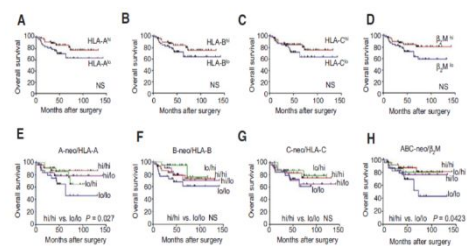


(3) 腫瘍免疫に関する研究

近年、癌細胞が免疫系からの攻撃を逃れることにより、病勢進行や治療抵抗につながる言われている。今回、97例の clear cell RCC 症例の RNA sequence データベースをもとに、腫瘍での HLA の発現、ネオエピトープ（遺伝子変異を由来とする抗原決定部位）数と予後について解析を行った。ネオエピトープは Immune Epitope Database and Analysis Resource (<http://www.iedb.org/>) offline、MHC class I epitope binding algorithms (NetMHCpan v2.8) を用いて評価、IC50 値が 500 nmol/L 未満をネオエピトープと定義した。

HLA-A、B、C へのネオエピトープ数は予後とは関係なかった（図 10）。また HLA-A、B、C、2 ミクログロブリンは発現の高いほど予後が良かったが、有意差は認められなかった（図 11）。一方で、ネオエピトープ数と HLA、2 ミクログロブリンの発現を組み合わせると、HLA、2 ミクログロブリン発現が高かつネオエピトープが多い症例は HLA、2 ミクログロブリン発現が低かつネオエピトープが少ない症例に比べ、予後が有意に良かった（図 11）。

図11 HLA発現、ネオエピトープと予後-2

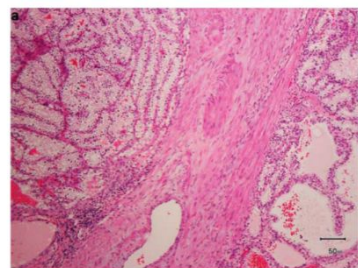


(4) TCEB1 変異腎細胞癌、新たな組織型

Clear cell renal cell carcinoma では VHL 遺伝子変異が約 9 割に認められたが、同じ VHL complex を形成する ElonginC をコードする TCEB1 遺伝子変異が約 5%の症例で見出されている。これらの VHL 変異と TCEB1 変異は排他的に起っていた。Memorial Sloan Kettering Cancer Center との共

同研究で、TCEB1 変異の腎細胞癌の臨床、病理組織学上の特徴を検討した。組織

図12 TCEB1変異腎細胞癌



学的には通常の clear cell RCC に類似しているが、筋線維束により仕切られている、高倍率で透明な胞体が細かな粒子状に見える、等の特徴があることが判明した。全体に Low grade が多く、予後は良好であった。今後は遺伝子解析に基づく新亜型となる予定である (図 12)。

(5) 成果のまとめ

Clear cell renal cell carcinoma ではクロマチン制御関連遺伝子の多いことが先行研究で判明した。クロマチン制御関連遺伝子の異常がどのように腎細胞癌の進展、予後に関連するかを調べた。小径腎癌では hyperploid であることが唯一の予後不良因子であったが、クロマチン制御関連遺伝子の変異と hyperploid であることは相関しておらず、クロマチン制御関連遺伝子の変異が hyperploid につながっていることを示唆するものではなかった。また、薬物治療においてもクロマチン制御関連遺伝子の発現と薬物療法開始からの予後の相関は認められなかった。

このようにクロマチン制御関連遺伝子の異常が腎癌進展に寄与する部分は少ないと考えられる。ただし、いまだ断片的なデータであるので、今後の研究の蓄積が待たれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Gong X, Sibrashvili Z, Eminaga O, Shen Z, Sato Y, Kume H, Homma Y, Ogawa S, Khavari PA, Pollack JR, Brooks JD. Novel lincRNA SLINKY is a prognostic biomarker in kidney cancer. *Oncotarget*. 2017; 8: 18657-18669.

Matsushita H, Sato Y, Karasaki T, Nakagawa T, Kume H, Ogawa S, Homma Y, Kakimi K. Neoantigen Load, Antigen Presentation Machinery, and Immune

Signatures Determine Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res*. 2016; 4: 463-71.

Hakimi AA, Tickoo SK, Jacobsen A, Sarungbam J, Sfakianos JP, Sato Y, Morikawa T, Kume H, Fukayama M, Homma Y, Chen YB, Sankin AI, Mano R, Coleman JA, Russo P, Ogawa S, Sander C, Hsieh JJ, Reuter VE. TCEB1-mutated renal cell carcinoma: a distinct genomic and morphological subtype. *Mod Pathol*. 2015; 28: 845-53.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久米 春喜 (KUME, Haruki)

東京大学・医学部附属病院・登録診療医
研究者番号 : 10272577

(2) 研究分担者

山田 大介 (YAMADA, Daisuke)

東京大学・医学部附属病院・登録診療医
研究者番号 : 00623696

中川 徹 (NAKAGAWA, Tohru)

東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 40591730

東 剛司 (AZUMA, Takeshi)

東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 50719854

川合 剛人 (KAWAI, Taketo)

東京大学・医学部附属病院・登録診療医
研究者番号 : 60343133