

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (B)	
研究期間：2007 年～2008 年	
課題番号：19390417	
研究課題名 (和文)	メチル化マーカーと血清腫瘍マーカー併用によるヒト腎癌の 早期診断法の開発
研究課題名 (英文)	Clinical development of early detection method for renal cell carcinoma with serum cancer markers and methylated DNA-fragment cancer markers
研究代表者：執印 太郎 (SHUIN TARO)	
	高知大学・教育研究部医療学系・教授
	研究者番号：70128601

## 研究成果の概要：

ヒト腎の問題点は診断マーカーが存在しないため画像以外には早期診断が難しいこと、また転移の早期発見が難しく転移癌への有効な治療法が存在しないことである。そのためヒト DNA メチル化マーカーと血清マーカーの開発を検討した。その結果血清マーカー HIG2, TMEM22 などの有用性を検討し明らかにした。また methylated DAN marker HOXB13 などを中心にメチル化 DNA マーカーについても蛋白の発現誘導実験を行い、新しいマーカーの存在を検討した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2008 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

## 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：腎細胞癌、腫瘍マーカー、HIG2、Hoxb13

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト腎癌についての問題点は診断マーカーが存在しないため画像以外には早期診断が難しいこと、また転移の早期発見が難しく転移癌への有効な治療法が存在しないことである。我々は現在までヒト腎細胞癌の診断に関与する有力なマーカーの開発を目指して研究を続けてきた。ヒト腎癌における遺伝子のメチル化解析を行い腎癌の新規 DNA マーカーとしてのメチル化遺伝子、Hoxb13、及び 4 つのメチル化 DNA マーカーである MIRC33, 34, 72-1, 72-2 を同定した。

## 2. 研究の目的

これらのメチル化 DNA マーカーと以前に発見した HIG2 という血清マーカーについてさらに解析を加え、ヒト腎癌の診断マーカーになり得るかを検討することが目的である。また、さらに新規の血清およびメチル化 DNA マーカーを探索することが目的である。

## 3. 研究の方法

ヒト腎臓癌 DNA 解析による新規メチル化マーカーの発見、cDNAmicroarray による血清

DNA マーカーの探索、ヒト腎癌患者血清の集積によるヒト血清マーカーの解析、Hoxb13 蛋白の誘導実験を行い、新しい蛋白の探索を行った。

4. 研究成果

- ① 腎細胞癌を用いた cDNAmicroarray 研究で新規の腫瘍マーカーの候補として TMEM22 を発見した。これについて現在も臨床的なマーカーとしての意義を検討中である。
- ② HOXB13 の in vitro 強発現系における発現比較による実験では細胞 apoptosis を誘導し、さらにその cDNAmicroarray 解析の結果で腫瘍マーカー候補遺伝子を探索した。その探索による結果で、GDNF, RET, Wnt, Gprotein pathway 等の血中マーカーの候補遺伝子蛋白が探索し得た。現在、これらの腫瘍マーカーの意義について検討中である (図 1-6 参照)
- ③ この研究過程で悪性リンパ腫や T cell leukemia で発現している DNA メチル化マーカー bone morphogenetic protein-6 を探索し得た。これはそのまま悪性リンパ腫や白血病でマーカーとして使用できる。
- ④ 既知の腫瘍マーカー HIG2 の有用性については現在も検討中である。これらは順次、論文化していく予定である。

図 1 CMVpromoter による Hoxb13 の転写誘導系

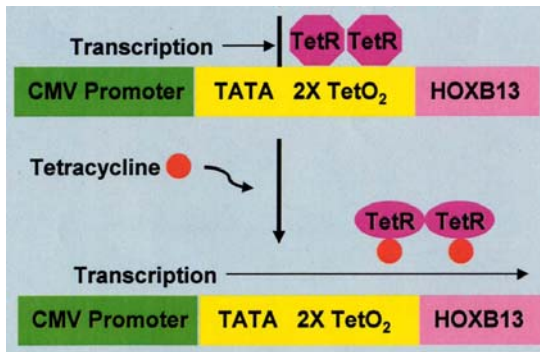


図 2 CMVpromoter による Hoxb13 の転写誘導腎癌細胞における Hoxb13 の誘導

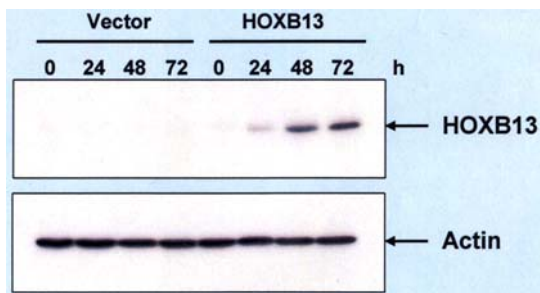


図 3 Hoxb13 による腎癌細胞の apoptosis 解析

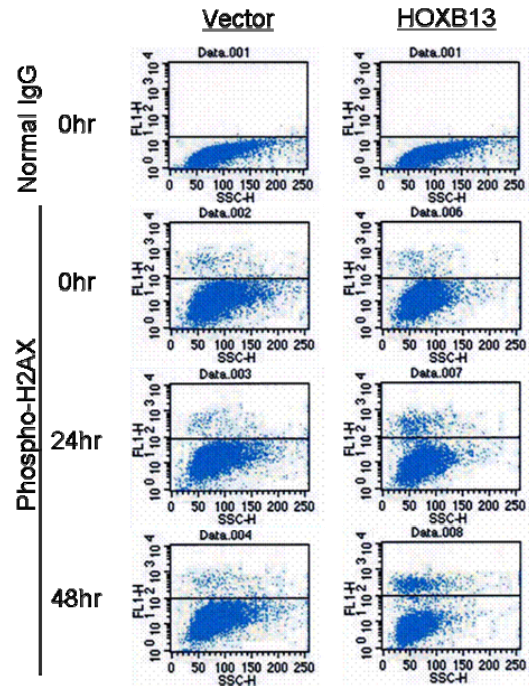


図 4 Micorarray 解析による HOXB13 高発現された mRNA 分布

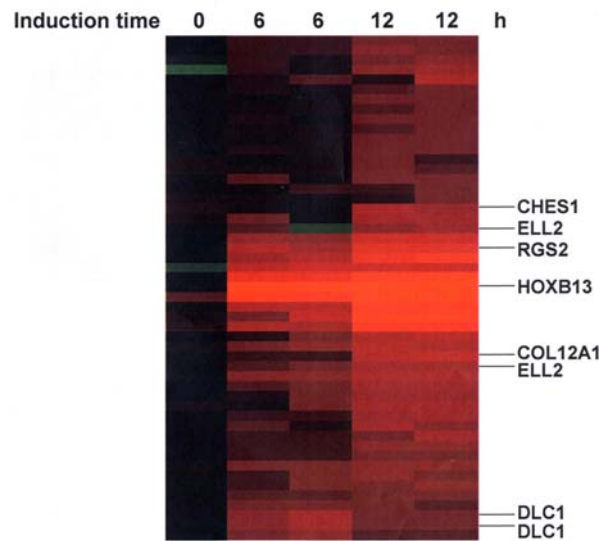


図5 Microarray解析から導き出された Hoxb13に関わる signal pathway(1)

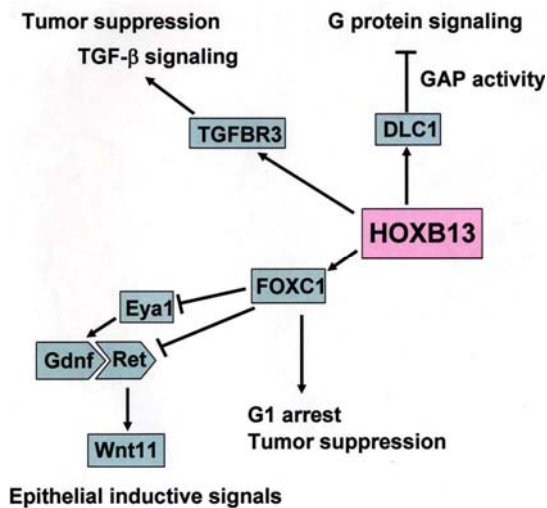
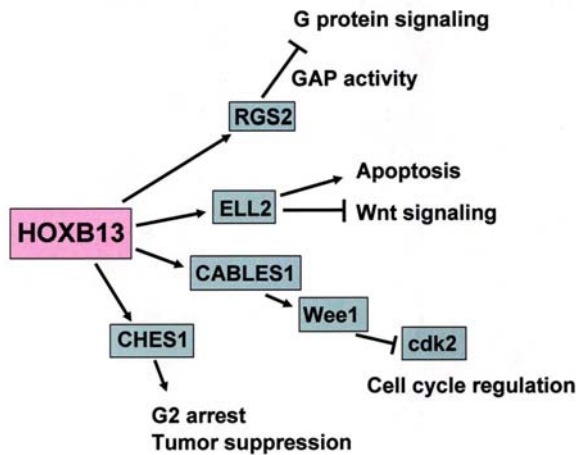


図6 Microarray解析から導き出された Hoxb13に関わる signal pathway(2)



## 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 13 件)

- ① Fujioka T, Obara W, Miki T, Akaza H, Hara I, Hirao Y, Kakehi Y, Kanayama HO, Naito S, Nonomura N, Ogawa Y, Ozono S, Shimazui T, Shinohara N, Shuin T, Takahashi S, Tomita Y, Eto M, Inoue K, Kato T, Kinouchi T, Konda R, Mugiya S, Nagamori S, Nakazawa H, Nishitani MA, Oikawa T, Sugimoto M, Takahashi M, Mizutani Y, Obara W. Evidence-based clinical practice guidelines for renal cell carcinoma (Summary--JUA 2007 Edition) Int J Urol. 16(4):339,

2009. 査読有り

- ② Dobashi S, Katagiri T, Hirota E, Ashida S, Daigo Y, Shuin T, Fujioka T, Miki T, Nakamura Y. Involvement of TMEM22 overexpression in the growth of renal cell carcinoma cells. OncolRep. 21(2):305-312, 2009. 査読有り
- ③ Kuroda N, Katto K, Yamaguchi T, Kawada T, Imamura Y, Hes O, Michal M, Shuin T, Lee GH. Chromophobe renal cell carcinoma: useful diagnostic application of imprint cytology and fluorescence in situ hybridization of chromosomes 10 and 21 in two cases of typical and eosinophilic variants. MedMolMorphol. 41(4):227-232, 2008. 査読有り
- ④ Iguchi M, Kakinuma Y, Kurabayashi A, Sato T, Shuin T, Hong SB, Schmidt LS, Furihata M. Acute inactivation of the VHL gene contributes to protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney. Nephron Exp Nephrol. 110(3):e82-90, 2008. 査読有り
- ⑤ Kuroda N, Tamura M, Taguchi T, Tominaga A, Hes O, Michal M, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Hayashi Y, Shuin T, Lee GH. Sarcomatoid acquired cystic disease-associated renal cell carcinoma. HistolHistopathol. 23(11):1327-1331, 2008. 査読有り
- ⑥ Taniguchi A, Nemoto Y, Yokoyama A, Kotani N, Imai S, Shuin T, Daibata M. Promoter methylation of the bone morphogenetic protein-6 gene in association with adult T-cell leukemia. Int J Cancer. 123(8):1824-1831, 2008. 査読有り
- ⑦ Obara W, Mizutani Y, Oyama C, Akaza H, Ishii N, Kohri K, Namiki M, Okuyama A, Shima H, Yokoyama M, Shuin T, Miki T, Watanabe Y, Fujioka T. Prospective study of combined treatment with interferon-alpha and active vitamin D3 for Japanese patients with metastatic renal cell carcinoma. Int J Urol. 15(9):794-799, 2008. 査読有り
- ⑧ Kinoshita K, Goryo K, Takada M, Tomokuni Y, Aso T, Okuda H, Shuin T, Fukumura H, Sogawa. K Ternary complex formation of pVHL, elongin B and elongin C visualized in living cells by a fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy technique. FEBS J.

- 274(21):5567-75, 2007. 査読有り
- ⑨ Iiyama T, Udaka K, Takeda S, Takeuchi T, Adachi YC, Ohtsuki Y, Tsuboi A, Nakatsuka S, Elisseeva OA, Oji Y, Kawakami M, Nakajima H, Nishida S, Shirakata T, Oka Y, Shuin T, Sugiyama H. WT1 (Wilms' tumor 1) peptide immunotherapy for renal cell carcinoma. *Microbiol Immunol.* 51(5):519-30, 2007. 査読有り
- ⑩ Daibata M, Nemoto Y, Bandobashi K, Kotani N, Kuroda M, Tsuchiya M, Okuda H, Takakuwa T, Imai S, Shuin T, Taguchi H. Promoter hypermethylation of the bone morphogenetic protein-6 gene in malignant lymphoma. *Clin Cancer Res.* 13(12):3528-3535, 2007. 査読有り
- ⑪ Kudo Y, Kakinuma Y, Iguchi M, Sato T, Sugiura T, Furihata M, Shuin T. Modification in the von Hippel-Lindau protein is involved in the progression of experimentally induced rat glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol.* 106(3):e97-106, 2007. 査読有り
- ⑫ Kuroda N, Inoue Y, Taguchi T, Tominaga A, Hes O, Michal M, Hayashi Y, Hiroi M, Shuin T, Lee GH. Renal leiomyoma: an immunohistochemical, ultrastructural and comparative genomic hybridization study *Histol Histopathol.* 22(8):883-8, 2007. 査読有り
- ⑬ Karashima T, Inoue K, Fukata S, Iiyama T, Kurabayashi A, Kawada C, Shuin T. Blockade of the vascular endothelial growth factor-receptor 2 pathway inhibits the growth of human renal cell carcinoma, RBM1-IT4, in the kidney but not in the bone of nude mice. *Int J Oncol.* 30(4):937-45, 2007. 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

- ① 奥田平和. 腎細胞癌における HOXB13 癌抑制遺伝子の転写標的の同定. 第 66 回日本癌学会学術総会. 2007 年 10 月 5 日 (横浜)
- ② 奥田平和. BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会) 2007 年 12 月 5 日 (横浜)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

執印 太郎 (SHUIN TARO)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号: 70128601

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

蘆田 真吾 (ASHIDA SHINGO)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号: 80380327

井上 啓史 (INOUE KEIJI)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号: 00294827