

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19590355  
 研究課題名（和文）アレイ CGH とトランスクリプトームによる腎癌の網羅的遺伝子解析  
 研究課題名（英文） Genome-wide analysis of renal cell carcinoma with array-based CGH and transcriptome  
 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：

アレイ CGH を用いて腎細胞癌(CCC)の発症にかかわるゲノム異常を検索したところ、特に 14 番染色体長腕(14q)の欠失が、高悪性度の CCC で高頻度にみられた。さらに網羅的遺伝子発現解析（トランスクリプトーム解析）を行い、ゲノムのコピー数異常が遺伝子発現異常に影響を与えていることを見出した。14q で遺伝子発現低下を示した遺伝子のいくつかは、実際に腎癌で遺伝子の発現が減弱しており、CCC の悪性化に関わる癌関連遺伝子と考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、腎癌、トランスクリプトーム、遺伝子解析、病型分類

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 癌の発生ならびに進行のメカニズムを明らかにするためには、遺伝子異常の実態が明らかにならなければならない。遺伝子異常のうち、特に癌遺伝子の活性化ならびに癌抑制遺伝子の不活化は遺伝子コピー

数の異常を伴うことが多い。したがって、遺伝子コピー数の異常を全染色体について網羅的に調べることでその癌で活性化あるいは不活化している遺伝子を絞り込むことができる。

(2) 腎細胞癌の悪性度は、病理組織学的に

診断した「核異型度」によって大きく左右される。すなわち核異型度が軽度のもの[low grade(Grade 1, 2)]では、5年生存率は約70%であるのに対し、核異型度が高度のもの[high grade (Grade 3, 4)]では5年生存率は約30-40%にすぎない。したがって、腎癌の治療成績を劇的に改善するためには、この両群の違いを分子レベルで解明し、その発症メカニズムの違いに基づく分子標的療法を開発することが不可欠である。

そこで、CCCの予後因子である組織学的核異型度(grade)とアレイCGHの結果を比較検討することにより、予後不良であるhigh grade群において、low grade群よりさらに付加されたゲノム異常を見出すこと、また遺伝子発現解析と統合することにより、low gradeからhigh gradeへと形質変換(悪性化)するために関わる遺伝子の解明が重要であると考えた。

## 2. 研究の目的

- 1) 多数症例の腎細胞癌のゲノムコピー数を解析することで、臨床病態と関連するゲノム異常領域を絞り込む。
- 2) 絞り込んだ領域から癌抑制遺伝子候補を絞り込み、候補遺伝子に関しては、その遺伝子変異の有無を解析する。
- 3) アレイCGH解析を行った症例に関して、遺伝子発現をマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行い、発現低下する遺伝子を特定する。
- 4) 癌抑制遺伝子候補に関して、その細胞生物学的な機能を解析する。
- 5) アレイCGHの結果に基づき、腎癌の新しい亜型分類の同定あるいは既存の病型の鑑別診断への応用すること、を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 癌遺伝子ならびに癌抑制遺伝子候補の特定と解析

- ① さらに症例を増やし、アレイCGHおよび網羅的遺伝子解析をおこなう。
- ② それぞれの候補遺伝子について、**Real-time PCR**により、実際に腎癌で遺伝子の発現が増強あるいは減弱、消失しているかどうかを調べる。**(Real-time PCR kitを用いる)**
- ③ 腎癌組織の切片を用いて免疫組織化学を行い、蛋白レベルでも発現が変化しているかどうかを検討する。

(2) 癌抑制遺伝子候補の解析

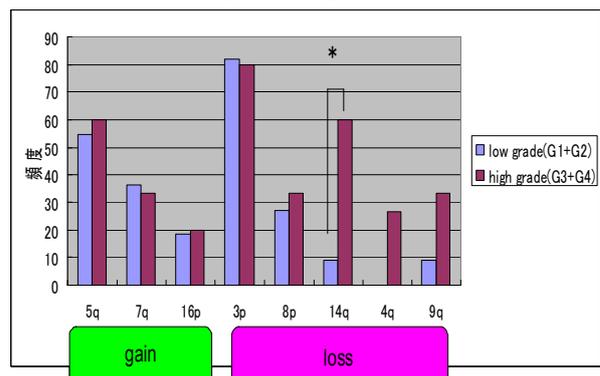
ヘミ欠失していることがアレイCGHで見られた領域において、**LOH(loss of heterozygosity)**解析をおこなう。また、シーケンスを行い点変異の有無を調べる。

(3) 候補遺伝子の機能解析

癌抑制遺伝子候補に関しては、腎癌細胞株のなかで候補遺伝子が欠失している細胞があれば、それに候補遺伝子を強制発現させることで、変化する表現形質(増殖抑制能、アポトーシス誘導能など)を解析する。

## 4. 研究成果

(1)アレイCGH解析によって、26例の腎癌におけるゲノム増幅領域と欠失領域の絞り込みを行い、5q, 7q, 16pのgain、3p, 8p, 9q, 14qのlossを高頻度に検出した。



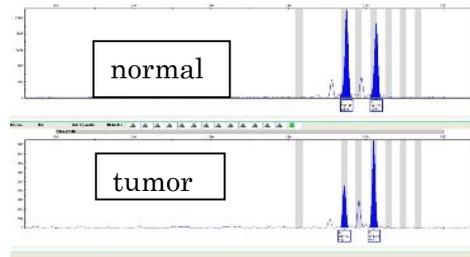
(2) トランスクリプトーム解析により、アレイ CGH 解析をおこなった症例のうち 22 例について、遺伝子発現(mRNA の発現)をマイクロアレイを用いて網羅的に調べた。ゲノムコピー数異常(copy number aberrations;CNAs)のある症例とない症例とで、明らかに発現のことなる遺伝子を抽出したところ、高頻度に gain を認めた染色体 5,7 番に多くの高発現を示す遺伝子が認められた。逆に有意に発現の低かった遺伝子は、高頻度に loss をみとめた染色体 14 番と 3 番に最も多く存在した。これらのことから、CCC では CNAs は遺伝子発現異常と関連していることがわかった。

(3) ゲノム異常と病理学的組織像とを比較した。14q の loss は high-grade CCC で付加されたゲノム異常であることがわかった。

Low-grade CCC と high-grade CCC の遺伝子発現プロファイルを比較すると、有意に発現低下している遺伝子は染色体 14 番と 9 番に多く存在傾向があることがわかった。すなわち、high-grade CCC での 14q でのコピー数低下は、この領域での遺伝子発現低下に関わっていることが示唆された。

(4) 抽出された遺伝子のいくつかは real-time PCR により、実際に腎癌で遺伝子の発現が増強あるいは減弱、消失しているかどうかを調べ、マイクロアレイのデータとよく関連していることを見出した。

(5) 癌抑制遺伝子候補として抽出された遺伝子の LOH を調べると、実際に腎癌症例では、正常部分ではみられない LOH が見出された。ただ、シーケンスによる遺伝子塩基配列の変異は見出せなかった。



(5) 腎癌細胞株のなかで候補遺伝子が存在するゲノム領域の欠失している細胞を用いて、それに候補遺伝子を強制発現させ、変化する表現形質(増殖抑制能、アポトーシス誘導能など)を解析したところ、アポトーシス感受性が増加するものがあった。また、正常細胞を SiRNA を用いてノックダウンしたところ、細胞増殖の増加がみられるものがあった。これらの候補遺伝子が、CCC の悪性転化に関わるものとして、示唆された。

#### 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 Nakada C., Matsuura K., Tsukamoto Y., Tanigawa M., Yoshimoto T., Narimatsu T., Nguyen LT., Hijiya N., Uchida T., Sato F., Mimata H., Seto M., Moriyama M. Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant downregulation of miR-141 and miR-200c., *The Journal of Pathology*, 216, 418-427, 2008, 査読有

② Tsukamoto Y., Uchida T., Karnan S., Noguchi T., Nguyen LT., Tanigawa M., Takeuchi I., Matsuura K., Hijiya N., Nakada C., Kishida T., Kawahara K., Ito H., Murakami K., Fujioka T., Seto M., Moriyama M. Genome-wide analysis of DNA copy number alterations and gene expression in gastric cancer., *The Journal of Pathology*, 216, 471-482, 2008, 査読有

③ Hijiya N., Miyawaki M., Kawahara K., Akamine S., Tsuji K., Kadota J., Akizuki S., Uchida T., Matsuura K., Tsukamoto Y., Moriyama M. Phosphorylation status of epidermal growth factor receptor is closely associated with

responsiveness to gefitinib in pulmonary adenocarcinoma., Human Pathology, 39, 316-323, 2008, 査読有

④ Tsukamoto Y., Hijiya N., Yano S., Yokoyama S., Nakada C., Uchida T., Matsuura K., Moriyama M.

Arpp/Ankrd2, a member of the muscle ankyrin repeat proteins (MARPs), translocates from the I-band to the nucleus after muscle injury., Histochemistry and Cell Biology, 129, 55-64, 2008, 査読有

⑤ Kanada R., Uchida T., Tsukamoto Y., Nguyen LT., Hijiya N., Matsuura K., Kodama M., Okimoto T., Murakami K., Fujioka T., Yanagisawa S., Moriyama M.

Genotyping of the cagA gene of Helicobacter pylori on immunohistochemistry with East Asian CagA-specific antibody., Pathology International, 58, 218-225, 2008, 査読有

⑥ Yoshimoto T, Matsuura K., Karnan S, Tagawa H, Nakada C, Tanigawa M, Tsukamoto Y, Uchida T, Kashima K, Akizuki S, Takeuchi I, Sato F, Mimata H, Seto M, Moriyama M.

High-resolution analysis of DNA copy number alterations and the gene expression in renal clear cell carcinoma., Journal of Pathology, 213, 392-401, 2007, 査読有

⑦ Matsuura K., Uesugi N, Hijiya N, Uchida T and Moriyama M

Upregulated expression of cardiac ankyrin-repeated protein in renal podocytes is associated with proteinuria severity in lupus nephritis., Human Pathology, 38, 410-419, 2007, 査読有

[学会発表] (計 3件)

① Taichiro Yoshimoto

High-resolution analysis of DNA copy number alterations and the gene expression in renal clear cell carcinoma

American Urological Association (AUA) 2008 Annual Meeting 2008年5月18日 Florida

② 成松隆弘

アレイCGHによる腎癌転移巣における網羅的ゲノム解析

第96回日本泌尿器科学会総会 2008年4月26日横浜市

③ Keiko Matsuura

High-resolution analysis of DNA copy number alterations and the gene expression in renal clear cell carcinoma  
第66回日本癌学会学術総会 2007年10月4日 横浜市

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