

研究種目：若手研究(B)	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19791125	
研究課題名（和文）	遺伝子発現情報に基づく腎盂尿管腫瘍に対するM-VAC化学療法感受性予測法の確立
研究課題名（英文）	Predicting Response to Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin Neoadjuvant Chemotherapy for Pelvic and Ureter Cancers through Gene Expression Profiling
研究代表者	
高田 亮 (TAKATA RYO)	
岩手医科大学・医学部・助教	
研究者番号：00438467	

研究成果の概要：

腎盂尿管癌 15 症例の癌特異的 RNA より、マイクロアレイおよびリアルタイム PCR をもちいて感受性予測 14 遺伝子の発現量を定量し感受性を予測した。その結果、奏効群においては 6 例中 4 例、非奏効群においては 9 例中 6 例の感受性を予測可能であった。すなわち、本予測法で腎盂尿管癌に対する M-VAC 療法の感受性予測は可能であるが、膀胱癌の感受性予測に比べ感度・特異度ともやや低下しており、腎盂尿管癌特異的な感受性予測法の構築が必要であると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	800,000	0	800,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	240,000	1,840,000

研究分野： 泌尿器科学

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： 腎盂尿管癌 M-VAC 療法 オーダーメイド医療 感受性予測 遺伝子発現情報

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎盂尿管癌に対する化学療法

腎盂・尿管癌は膀胱癌に比べ、一般にその解剖学的特徴から早期に浸潤、転移をきたしやすく、予後不良であると考えられている。そのため、腫瘍の外科的摘出だけでなく、早期に適切な化学療法を行う事が重要であるが、一般的に移行上皮癌に用いられる4剤併用化学療法であるM-VAC療法においても30-40%の症例は化学療法の効果が得られず、またSecond lineの化学療法の有効性も低いため、その対処に苦慮する結果となっている。

(2) 化学療法感受性予測の必要性

腎盂尿管癌に対するM-VAC療法は、①微小転移の抑制を目的に術前化学療法として施行される場合、②腎尿管全摘後再発の治療として行なわれる場合があるが、いずれにおいても化学療法の適応症例が明確ではなく、無効群においては不必要な治療である可能性-すなわち副作用の発生に加え、手術や他の治療法が不本意に遅延することによる癌の進行という問題を有している。すなわち、精度の高いM-VAC術前化学療法の感受性予測システムの構築およびその臨床応用は急務である。この化学療法感受性予測システムは、進行性の腎盂尿管腫瘍における個々の患者の腫瘍に応じたオーダーメイド医療の実現の可能性に向けて重要な役割を果たすものと考えられる。

また、腎盂尿管癌は膀胱癌に比較して著しく予後が不良であり、その一因として腎盂尿管に膀胱癌と異なる化学療法耐性獲得機序が存在する可能性がある。すなわち、膀胱癌と腎盂尿管癌における化学療法感受性の相違を、遺伝子発現情報の網羅的な解析により分子生物学的に解き明かすことは、抗腫瘍剤に対する癌の耐性獲得機序の理解に有用である。

一方、腎盂尿管腫瘍に対するM-VAC化学療法の感受性予測のマーカーとしては、一部の遺伝子に関する報告(Shinohara N, et al.: Eur Urol. 1994;26(4):327-33)があるのみで、私どもの報告した、癌細胞を純化した検体での遺伝子解析に基づく感受性予測に関する試みは未だなされていない。

2. 研究の目的

われわれと、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター・中村祐輔教授の共同研究により開発した膀胱癌M-VAC術前療法感受性予測システム(Takata R, et al: Clin Cancer Res, 2005, 11:2625-2636)は、膀胱癌の化学

療法感受性を高い精度で予測可能であった。また、その予測スコアは予後と強く関連することが見いだされており、現在更にGC療法に対する化学療法感受性予測法を研究中である。

腎盂尿管腫瘍は膀胱癌と同様、組織学的には移行上皮癌からなり、その術前化学療法としてM-VAC療法が施行されるため、本予測は腎盂尿管癌のM-VAC療法感受性および予後予測にも応用可能であることが期待される。

そこで、私どもの構築した予測システムによって腎盂尿管腫瘍のM-VAC療法感受性およびその予後を予測可能か判定し、その臨床的意義の検証を行なうことを本研究の目的とする。また、腎盂尿管癌の遺伝子発現情報と膀胱癌の遺伝子発現情報の網羅的解析により、腎盂尿管癌で特異的に発現変動を認める遺伝子群を同定し、抗腫瘍剤の耐性獲得機序との関連を検討することを目的に研究をおこなった。

3. 研究の方法

(1) 検討症例

本学および関連病院において、臨床病期T2以上の腎盂尿管癌に対し腎尿管全摘を施行された後の経過観察中に再発あるいは転移を認めM-VAC療法を施行された症例、および浸潤性の腎盂尿管癌と診断され、術前化学療法を施行された計15例を用いて研究をおこなった。

再発・転移症例については手術時の標本を-80℃で凍結保存した組織を用い、術前化学療法施行例においては化学療法施行前に経尿道あるいは経尿管内視鏡的にcold punch法により生検を施行し、遺伝子解析用組織を採取、OCTコンパウンド包埋後、直ちに-80℃で凍結保存したものを使用した。全例においてM-VAC療法を2コース以上施行し、抗腫瘍効果は化学療法施行前後のMRI施行による画像診断により判定し、可能な症例に対しては手術標本により組織学的に確認した。なおこれら患者において、遺伝子解析のために書面によるインフォームドコンセントを得た。

(2) 腎盂尿管癌特異的RNAの抽出

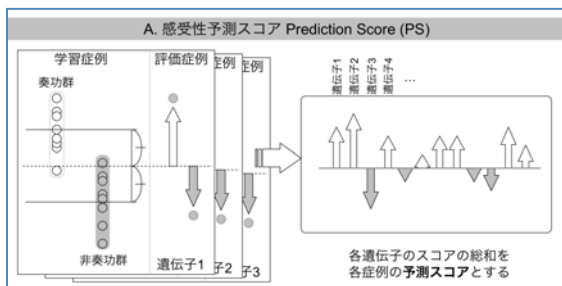
この検体よりレーザーマイクロビームマイクロダイセクション法を用いて腎盂尿管癌部の癌細胞のみを20000~40000細胞採取し、QIAGEN社のRNeasy Micro Kitを用いて癌特異的なRNAを抽出した。RNAは、T7増幅法によって約10000倍に増幅した後、-80℃で保存した。その一部を解析用に逆転写反応によってcDNAとし、-20℃で保存した。

し、リアルタイム PCR 法で得られた発現量と比較すると、膀胱癌での解析と同様に高い相関を示したため、感受性予測はリアルタイム PCR を用いておこなうこととした。

そこで、さらに 10 検体を追加し、同様にマイクロダイセクション法で癌特異的 RNA を抽出。cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法によって 14 遺伝子の発現量を解析した。

(3) リアルタイム PCR による感受性予測法

リアルタイム PCR によって得られた発現情報を基に、感受性予測をおこなった。感受性予測システムは、各遺伝子の発現量を基に感受性を点数化する手法をもちいた。まずある遺伝子について、学習症例である奏効群 8 例と非奏効群 7 例の遺伝子発現量の平均値を各々算出。その中点を基準点（ゼロ）として、感受性を予測する症例の遺伝子発現量が奏効群に近い（プラスに加点）非奏効群に近い（マイナスに加点）を点数化する。この点数化を 14 遺伝子すべてについておこない、その総和をもって評価症例の感受性予測スコアとした。最終的に、感受性予測スコアが陽性であれば「感受性あり」、陰性であれば

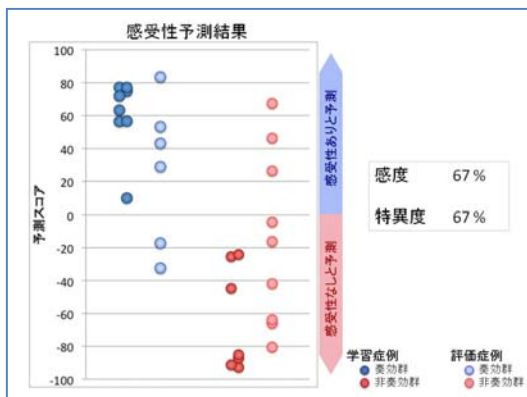


「感受性なし」と定義した。

(4) 感受性予測結果

15 例の発現情報より、感受性予測スコアを算出し、臨床学的な M-VAC 感受性結果との関連を検討した。

以前膀胱癌で検討した時と同様、M-VAC 療法 2 コース後の MRI により、2 方向測定で評価病変が 60% 以上縮小していた場合を奏効例、それ以外を非奏効例と定義した。その結果 15



例中 6 例が奏効群、9 例が非奏効群に分類された。

感受性予測結果を下に示す。濃い青と赤で示した点が、システムの構築に用いた膀胱癌学習症例奏効群・非奏効群の感受性予測スコア、水色と桃色で示した点が、今回検討対象となった腎盂尿管癌 15 症例の奏効群・非奏効群おのこの感受性予測スコアである。

結果、化学療法奏効群 6 例中 4 例において感受性予測スコアが陽性を示し、非奏効群 9 例中 6 例において感受性予測スコアが陰性を示した。すなわち、奏効群を基準とした場合、感度 67%・特異度 67% で M-VAC 化学療法の感受性を予測可能であることが判明した。

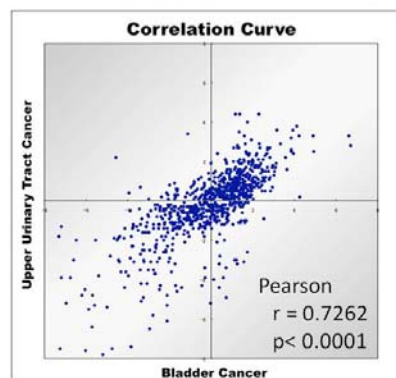
次に、この感受性予測法の臨床学的な意義について陽性的中率と陰性的中率を算出した。予測スコア 0 を基準とした場合、陽性的中率は 54% (4/7 例) と正確な予測が得られなかった一方、陰性的中率は 75% (6/8 例) と感受性予測能を有することが判明した。すなわち、特に感受性予測陰性群においては、本感受性予測法を用いることで一定の予測効果が期待されることが判明した。下図は各症例



の予測スコアを低い順からプロットしたもので、棒グラフの色が実際の感受性を示す。

(5) 膀胱癌と腎盂尿管癌の発現情報の比較以上より、我々の構築した M-VAC 感受性予測法は、腎盂尿管癌症例においても一定の感受性予測が可能であることが示されたが、膀胱癌における予測に比較してその予測精度は

膀胱癌と腎盂尿管癌の遺伝子発現情報の比較



低いと考えられた。その原因として、膀胱癌と腎盂尿管癌の遺伝子発現背景が異なる可能性を考え、膀胱癌の遺伝子発現情報と、腎盂尿管癌の遺伝子発現情報の網羅的な比較を行った。

マイクロアレイのデータベース上、腎盂尿管癌及び膀胱癌各々において、50%以上の症例でCy5・Cy3共にcutoff値以上の発現情報を有する874遺伝子を抽出し、発現量の相関を検討した。相関図を下に示す。

その結果、Pearsonの相関係数による検討において、 $p < 0.0001$ と両者に強い相関を認め、一方、相関図のとおり発現の傾向は一致するものの、各々の遺伝子で見ると、発現量の一致しないもの相当量含まれていることがわかった。

すなわち、病理学的に膀胱癌と腎盂尿管癌は同一（移行上皮癌）であるが、その遺伝子発現には癌の局在特異的な発現を示すものがあると考えられた。この発現量の違いが膀胱癌に比べ腎盂尿管癌において感受性予測率が低下している原因となっている可能性が考えられた。

(6) まとめと今後の展望

近年、網羅的な遺伝子発現情報より一人一人の癌の性質を見出し、その特性を評価することが可能となってきた。実際米国では、2007年にマイクロアレイを用いた70種類の遺伝子発現量より乳がんの再発リスクを評価する検査法がFDAに認可されるなど、臨床に応用する動きが活発となってきている。

われわれは以前、遺伝子発現情報に基づく浸潤性膀胱癌に対するM-VAC術前化学療法感受性予測システムを構築し、高精度にその感受性を予測可能であることを証明した。今回、さらに組織学的に同一である腎盂尿管癌のM-VAC化学療法感受性予測が本システムで予測可能か検討した。その結果、感受性なしと判断された症例群においては、高率に感受性を認めなかった一方、感受性ありと予測された症例群においては、感受性予測率は不良であった。すなわち、以前われわれが同定した感受性予測14遺伝子は、一定の感受性予測が可能であったが、膀胱癌に比べその予測精度は低下していた。

その原因としては、同一の組織系であるにもかかわらず、網羅的な遺伝子発現解析においては、遺伝子発現に相違がみられる遺伝子が多く含まれているためと考えられた。そこで今後、腎盂尿管癌のM-VAC感受性判定に特異的な遺伝子群を同定するため、さらに追加症例を用いた遺伝子発現解析をおこないたい。

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 高田亮、加藤陽一郎、片桐豊雅、他 浸潤性膀胱癌に対するMVAC化学療法感受性予測法によるオーダーメイド術前化学療法 癌の臨床、in press
- ② 高田亮、片桐豊雅、兼平貢、他 膀胱癌組織の遺伝子発現解析によるMVACネオアジュバント化学療法の効果予測、Urology View、6巻、1347-9636、2008年、無
- ③ 高田亮、片桐豊雅、兼平貢、他 遺伝子多型・突然変異・遺伝子発現情報による診断 癌での遺伝子発現情報を利用した診断 進行性膀胱癌におけるM-VAC術前化学療法の有効性診断法の開発 実験医学、25巻、2653-2661、2007、無
- ④ 高田亮、片桐豊雅、兼平貢、他 泌尿生殖器癌に対する化学療法の現状と今後の展望 M-VAC術前補助化学療法感受性予測の臨床応用に向けた感受性予測カードシステムの構築 泌尿器外科、20巻、543-545、2007年、無
- ⑤ Tamura K, Furihata M, Tsunoda T, et al. (他21名、5番目) Molecular features of hormone refractory prostate cancer cells by genome-wide gene expression profiles. Cancer Res. 1:67(11):5117-25. 2007 有
- ⑥ Kanehira M, Katagiri T, Shimo A, Takata R, et al. (他4名) Oncogenic role of MPHOSP1, a cancer-testis antigen specific to human bladder cancer. Cancer Res. 1:67(7):3276-85 2007 有

[学会発表] (計8件)

- ① 常盤傑、浸潤性膀胱癌の化学療法における治療効果判定規準の検討、第28回日本画像医学会、2009年2月28日、東京
- ② 兼平貢、膀胱癌新規治療標的分子DEPDC1の細胞増殖機構の解明、第67回日本癌学会総会、2008年9月、名古屋
- ③ 原田陽介、膀胱癌新規治療標的分子DEPDC1の細胞増殖機構の解明、第67回日本癌学会総会、2008年9月、名古屋
- ④ 小原航、膀胱癌に対する新規腫瘍抗原遺伝子MPHOSP1およびDEPDC1由来HLA-A24拘束性エピトープペプチドを用いた腫瘍特異的ワクチン療法、第67回日本癌学会総会、2008年9月、名古屋
- ⑤ 高田亮、膀胱癌の遺伝子発現プロファイル 基礎研究から臨床応用への取り組み、第67回日本癌学会総会、2008年9月、

- 名古屋
- ⑥ 高田亮、抗癌剤感受性試験 浸潤性膀胱癌に対するMVAC化学療法感受性予測法によるオーダーメイド術前化学療法、第46回日本癌治療学会総会、2008年9月、名古屋
 - ⑦ 高田亮、遺伝子発現情報に基づくM-VAC術前化学療法感受性予測システムの検証、第96回日本泌尿器科学会総会、2008年4月、横浜
 - ⑧ 高田亮、浸潤性膀胱癌における「遺伝子発現情報に基づいたMVAC術前化学療法感受性予測システム」の予後因子としての有用性、第66回日本癌学会総会、2007年9月、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 亮 (TAKATA RYO)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：00438467

(2) 分担研究者

(3) 連携研究者