

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月27日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592047

研究課題名（和文） 淡明細胞型腎癌患者におけるコピー数多型の解析

研究課題名（英文） Genetic variations in patients with clear cell renal cancer

研究代表者

坂野 滋 (SAKANO SHIGERU)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60363107

研究成果の概要（和文）：淡明細胞型腎癌患者において、MTHFR および RASSF1A 遺伝子型およびハプロタイプは、予後予測因子として有用である可能性が示唆された。さらに、これらの所見は淡明細胞型腎癌進展のメカニズムを解明する手がかりとなる可能性が考えられた。また、淡明細胞型腎癌発生リスクに關与している可能性のあるコピー数多型を同定した。

研究成果の概要（英文）：In clear cell renal cell carcinoma (CCRCC) patients, MTHFR and RASSF1A genotypes and haplotypes might be useful as prognostic factors. Furthermore, these findings might contribute to the understanding of the mechanisms underlying CCRCC progression. We have found copy number variations that are potentially involved in the risk of CCRCC development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：腎癌、遺伝子多型、コピー数多型、予後

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学的手法の発達により、腫瘍はいくつかの癌遺伝子・癌抑制遺伝子・細胞周期関連遺伝子等の癌関連遺伝子の1次的変化もしくは発現変化の集積によって発生し、さらに進展することが明らかにされ、腫瘍細胞におけるこれら癌関連遺伝子変化と腫瘍の臨床的・病理学的性質および進展・予後との関係について多くの検討がなされてきた。

しかしながら、腫瘍の進展は腫瘍細胞周囲の正常細胞との関係にも強く依存しているとされることから（Cell. 2000;100:57-70）、宿主個々の遺伝的背景は腫瘍発生のリスクだけでなく、腫瘍進展（増大・浸潤・転移）・予後（治療に対する反応・生存）にも影響を及ぼすと考えられた（Cancer Lett. 2004;208:1-33; Nat Rev Cancer. 2006;6:141-146）。

そこでこれまでわれわれは、宿主個々の遺伝的因子である一塩基多型 (SNP) が、代表的泌尿器癌である腎癌および尿路上皮癌の進展・予後に与える影響について検討してきた。腎癌の stage, stage grouping および予後等と VEGF 遺伝子一塩基多型との関連について検討・報告した。また腎癌患者において、いくつかの臨床・病理学的所見および生存率と DNA 修復遺伝子 (XPC, XPD, XPG, XRCC1, XRCC3) 一塩基多型との関連について検討・報告した。

尿路上皮癌については、DNA 修復遺伝子一塩基多型と膀胱癌罹患率との関係、および XPG 遺伝子一塩基多型と表在性膀胱癌の stage, grade および予後等との関連について報告した。また上部尿路癌患者において、DNA 修復遺伝子一塩基多型と全生存率および癌特異生存率との間の有意な関連について報告した。さらに、抗癌化学放射線療法が施行された浸潤性膀胱癌患者において DNA 修復遺伝子一塩基多型と治療効果・予後の関係について解析・報告した。

2008 年になり腎癌および膀胱癌患者の生存率には遺伝性があることが報告された (J Am Soc Nephrol. 2008;19:985-991)。これはわれわれのこれまでの腎癌および尿路上皮癌患者における一塩基多型と予後との関連に関する data を支持するものと考えられた。

さらに最近、健常人でも個人によってはゲノム上の遺伝子が 1 つのみ、もしくは 3 つ以上存在する例が多数発見され、ある特定の遺伝子の数自体に個人差 (コピー数多型, CNV: copy number variation) があることが明らかにされた (Nature. 2006;444:444-454)。しかもこのコピー数多型は、一塩基多型をはるかに上回るヒトゲノム全体の 12% を超える広い領域に存在することから、コピー数多型は一塩基多型以上に個人間のゲノム配列の差、すなわち多様性を生み出していると考えられた。

したがってコピー数多型は、腫瘍発生のリスク、腫瘍の進展・予後および薬剤に対する効果・副作用等に大きな影響を及ぼし、その解析によって、癌患者個人に最適な治療を提供するテーラーメイド医療を実現させることができる可能性が示唆された。そこで本研究では、病因遺伝子変化が比較的明らかにされつつある淡明細胞型腎癌に照準を絞り、コピー数多型と腎癌発症リスク、腫瘍進展・予後等との関連について解析することとした。

2. 研究の目的

淡明細胞型腎癌患者および健常人末梢血 DNA において、1,000 ヶ所以上の領域の

3,000 を超える遺伝子コピー数多型 (Nature. 2006;444:444-454) を CNV アレイを用いて網羅的に検出し、腎癌発症リスク、腫瘍進展 (増大・浸潤・転移)、予後・生存率との関連について解析することにより、コピー数多型によって規定される患者個々の遺伝的背景が淡明細胞型腎癌の生物学的特性に与える影響を明らかにする。

これまで腎癌患者の遺伝子コピー数多型に関する報告はなく、本研究は極めて独創的であると考えられる。コピー数多型は一塩基多型をはるかに上回るヒトゲノムの広い領域に存在し、個人間の多様性により大きな影響を及ぼしていることが予想される。

あるコピー数多型が腫瘍の進展・予後と密接に関連し、これらの予測因子となり、腎癌患者治療の個別化 (必要な患者にのみ必要な治療をする) につながるものが予想される。

さらにそれらは腎癌進展の機構解明の一助になると考えられる。また、癌患者の分子生物学的予後予測因子の多くは手術等により採取された腫瘍組織を検体材料としたものであるが、本研究の検体材料としては末梢血 2 ml 程度で十分であり、検体採取が容易なことも患者にとって大きな利点となる。

3. 研究の方法

対象: 1995 年から 2006 年の間に当科で病理組織学的に診断された淡明細胞型腎癌患者約 300 例および健常男女 20 人ずつ合計 40 人。

方法:

(1) 治療前に淡明細胞型腎癌患者より採取した末梢血約 2 ml から DNA を抽出し、 -80°C にて凍結保存。

(2) 健常ボランティアより採取した末梢血約 2 ml から DNA を抽出し、男女 20 人分ずつの DNA をそれぞれ混合し対照とする。

(3) 腎癌患者 30 例の DNA と性別を一致させた対照 DNA をそれぞれランダムプライミング法で Cy3, Cy5 を用いて蛍光標識する。

(4) DNA の繰り返し領域を Cot-1 DNA にてマスクし、MacArray Karyo™ C-tip (Macrogen, Korea) を用い copy number variation array-based comparative genomic hybridization (CNV aCGH) を行う。

(5) GenePix 4000B (Molecular Devices, Canada) で画像情報をコンピューターに取り込み、MAC viewer (Macrogen, Korea) を用いて CNV 解析を行い、統計処理によりそれぞれ腎癌発症リスク、腫瘍進展および予後等と特異性の高い遺伝子コピー数多型領域を絞り込む。

(6) CNV aCGH 法にて絞り込まれたコピー数多型領域について残りの腎癌患者の DNA を用

いて real-time quantitative PCR 法にて CNV コピー数の解析をする。

(7) これらのコピー数多型またはいくつかのコピー数多型の組み合わせが腎癌発症リスク、個々の腎癌患者の腫瘍の進展・予後の予測因子となり得るか検討する。

(8) 国際医学会にて発表および論文執筆、国際医学誌に投稿。

4. 研究成果

(1) 淡明細胞型腎癌患者 240 例について、metylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子の 2 つの遺伝子多型 (C677T, A1298C) の遺伝子型およびハプロタイプと、腎癌の臨床病理学的性質および予後との関連を解析した。MTHFR A1298C 遺伝子多型には、いくつかの進行腎癌の性質と有意な関連が認められた。この関連は男性患者においてより強く認められた。一方女性患者では、MTHFR C677T 遺伝子多型に、いくつかの進行腎癌の性質との間に有意な関連が認められた。さらに女性患者では、MTHFR C677T 遺伝子多型と MTHFR 677T-1298A ハプロタイプと、低い生存率との間に有意な関連が認められた。

これらの結果より、MTHFR 遺伝子型およびハプロタイプは、とくに女性において、淡明細胞型腎癌患者の予後を予測する因子として有用であり、これにより治療の個人化を実現させる可能性のあることが示唆された。

これらの結果の原因として、MTHFR 遺伝子多型が葉酸代謝を改変し、これにより DNA 合成または DNA メチル化に異常が起こり、これが淡明細胞型腎癌の進展に影響を与えたことが考えられた。以上のことは淡明細胞型腎癌の進展のメカニズムを解明する助けとなる可能性があることが示唆された。

(2) 淡明細胞型腎癌患者 179 例について、RASSF1A 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の程度と、腎癌の臨床病理学的性質および予後との関連を解析した。RASSF1A 高メチル化は、高グレード・高ステージの腎癌と有意な関連が認められた。また、RASSF1A 高メチル化は、不良な生存率と有意な関連が認められた。

RASSF1A 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の程度は、淡明細胞型腎癌患者の予後を予測する因子として有用であり、これにより治療の個人化を実現させる可能性のあることが示唆された。

(3) 淡明細胞型腎癌患者 224 例について、Ras association domain family 1A (RASSF1A) 遺伝子の 3 つの遺伝子多型 (133A1a/Ser, -710C/T, -392C/T) の遺伝子型およびハプロタイプと、腎癌の臨床病理学的性質および予

後との関連を解析した。RASSF1A -710CTT 遺伝子型は、高ステージの腎癌と有意な関連が認められた。また、RASSF1A 133A1a-710T-392T ハプロタイプと-710CTT 遺伝子型は、不良な無再発生存率と有意な関連が認められた。これらの結果より、RASSF1A 遺伝子型およびハプロタイプは、淡明細胞型腎癌患者の予後を予測する因子として有用であると考えられた。

(4) 淡明細胞型腎癌患者 20 例および健康男女合計約 40 人においてコピー数多型を解析し、腎癌発症リスクに関与している可能性のあるコピー数多型を同定した。

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 3 件)

① Yoshihisa Kawai, Shigeru Sakano, Naoko Okayama, Yutaka Suehiro, Hideyasu Matsuyama, Yuji Hinoda: Association of RASSF1A genotype and haplotype with the progression of clear cell renal cell carcinoma in Japanese patients. BJU International; In press (2012) (査読有) .

② Shigeru Sakano, Yuji Hinoda, Naoko Okayama, Yoshihisa Kawai, Hideaki Ito, Kazuhiro Nagao, Takahiko Hara, Hideyasu Matsuyama: Gender-specific association of methylenetetrahydrofolate reductase genotype and haplotype with the aggressiveness and prognosis of clear cell renal cell carcinoma in Japanese patients. BJU International; 106: 424-430 (2010) (査読有) .

③ Yoshihisa Kawai, Shigeru Sakano, Yutaka Suehiro, Toshiyuki Okada, Yoshihito Korenaga, Takahiko Hara, Katsusuke Naito, Hideyasu Matsuyama, Yuji Hinoda: Methylation level of the RASSF1A promoter is an independent prognostic factor for clear-cell renal cell carcinoma. Annals of Oncology; 21: 1612-1617 (2010) (査読有) .

[学会発表] (計 2 件)

① Shigeru Sakano, Yuji Hinoda, Naoko Okayama, Yoshihisa Kawai, Jun Nishijima, Yoshihiro Miyachika, Hiroaki Matsumoto, Kazuhiro Nagao, Takahiko Hara, Hideyasu Matsuyama: Methylenetetrahydrofolate reductase genotype and haplotype may be associated with the aggressiveness and prognosis of clear cell renal cell

carcinoma. The 32nd Congress of the Société Internationale d'Urologie ; 2011年10月17日 (Berlin, Germany) .

② Shigeru Sakano, Yuji Hinoda, Naoko Okayama, Yoshihisa Kawai, Hideaki Ito, Satoshi Eguchi, Yoshihiro Miyachika, Taku Misumi, Tomohiko Hara, Kazuhiro Nagao, Takahiko Hara, Katsusuke Naito, Hideyasu Matsuyama: Methylenetetrahydrofolate reductase genotype or haplotype and the prognosis of clear cell renal cell carcinoma. 第 68 回日本癌学会学術総会 ; 2009年10月2日 (横浜市 パシフィコ横浜).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂野 滋 (SAKANO SHIGERU)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 60363107