

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 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592053

研究課題名（和文）腎癌の病態・予後と関連する遺伝子署名の同定と臨床診断への応用展開

研究課題名（英文）Identification of gene signatures associated with renal tumor characteristics and its clinical applications

研究代表者

矢尾 正祐 (YAO MASAHIRO)

横浜市立大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00260787

研究成果の概要（和文）：

腎癌はその組織型、遺伝子型、病態の異なる複数の腫瘍亜型で構成されていることが明らかになりつつある。我々は淡明細胞腎癌の転移の有無で発現量が大きく変動している遺伝子群のうち、3ヶ（AQP1, PLTP, PTHLH）に着目し、腎腫瘍 500 例以上について定量的リアルタイム PCR を用いて発現検証を行った。3 遺伝子の発現は腎腫瘍組亜型ごとに特徴的なパターンがみられ、さらに患者予後とも密接に関連することを見出した。これらの 3 遺伝子は腎癌の組織型および予後診断に有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Renal cell carcinomas (RCCs) are morphologically and genetically heterogeneous tumors and present diverse clinical courses. We selected differentially expressed gene-set between metastasis-positive and -negative phenotype from the DNA microarray data. We then focus on the three genes (AQP1, PLTP, and PTHLH) and confirmed their expression levels using quantitative reverse transcriptase PCR in more than 500 renal tumors. Each of the three genes presented unique expression patterns according to the renal tumor histology. We also demonstrated that each gene is tightly associated with clear cell RCC patient survivals. These data suggested that the three genes provide useful diagnostic and prognostic information for patients with RCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、遺伝子発現、予後

1. 研究開始当初の背景

近年の分子遺伝学・分子生物学的知見の集積により、腎癌がその発症機構の全く異なる複数の腫瘍亜型の集合体であることが明らか

にされ、これらの知見を加味した病理組織亜型診断が整備されてきた（2004年 WHO 腎腫瘍分類）。これをうけて臨床現場でも個々の腫瘍の遺伝子的背景に基づく患者の予後診断

および治療法の個別化・標準化が急務と考えられる。腎癌の予後診断には現在、患者の全身状態 (PS)、血液生化学検査や腫瘍の TNM・Grade 分類、腫瘍サイズなどの臨床病理因子を組み合わせた多変量モデル (UCLA の UISS、Memorial Sloan-Kettering 癌センターのノモグラム、Mayo clinic の SSIGN や、進行転移例での Motzer/MSKCC risk 分類など) が一般化しつつあり、0.7~0.85 程度の c-(concordance) index が示されている。さらに UCLA のグループは腫瘍関連遺伝子の因子 (p53, PTEN, CA9 の免疫組織染色性) を組み合わせ、精度の向上を目指す試みを行っているが c-index の改善までには至っていない。一方ここ 10 年間で、DNA マイクロアレイという革新的な解析法が開発されたが、腎癌においても数万遺伝子の中から、腎癌の高悪性化や転移、臨床病態と関連する発現遺伝子の選別が試みられ、2002 年以降我々を含め幾つかのグループから報告が行われている。しかしいずれも少数腎癌検体 (17~58 例程度) での解析であり、選別されてきた遺伝子セット (31~85 遺伝子程度) の共通性も低く、その後の多検体での検証作業もほとんど行われていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、腎癌の臨床病態や予後と密接に関連する遺伝子群を明らかにし、これらの差異すなわち遺伝子署名 (gene signature) を定量的 PCR 法で簡便、迅速に検出する系を構築し、これを用いた患者ごとの個別予後診断法への臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

我々は前段階の研究として、淡明細胞腎癌 27 例のマイクロアレイ解析を行い、転移の有無で発現量が大きく変動している上位約 400 遺伝子を一時選別した。この遺伝子セットと、既に論文報告されている腎癌のマイクロアレイ 5 論文 (合計で約 250 遺伝子 probe) および単体で論文報告されている遺伝子 (61 遺伝子) とを比較したところ、重複している遺伝子群を見出した。これらは異なる実験・解析系でも共通に見いだされていることより、非常に重要な遺伝子であることが示唆された。そこで様々な組織型を含む腎腫瘍 500 例以上について cDNA を合成し、定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR) による発現検出系を作成し、ランキングの上位に位置する遺伝子について、さらにその発現確認を行い、引き続き臨床病理諸因子、予後との関連の詳細について検証を行った。

4. 研究成果

腎癌のうちもっとも頻度の高い淡明細胞型を対象に、転移予後との関連が特に強いと考

えられる候補遺伝子 42 個を選別した。その中で上位に位置する 3 遺伝子、aquaporin 1 (AQP1)、Phospholipid transfer protein (PLTP)、Parathyroid hormone like hormone (PTHrP) に今回着目しさらに解析を進めた。転移例で発現値が低い遺伝子として見いだされた AQP1 に関して、qRT-PCR により腎腫瘍 559 例でその発現値を測定した。AQP1 は病理組織型別では、淡明細胞型 (n=502) と乳頭状腎癌で発現が有意的に高く、一方遠位系腎腫瘍である嫌色素型、oncocytoma、集合管癌では低かった。最も頻度の高い淡明細胞型では、偶発例、小サイズ、低 grade、低 stage、あるいは脈管浸潤陰性群で AQP1 の発現が有意に高かった。予後との関係では、全症例群での癌特異的生存、非再発生存、および進行転移症例群での癌特異的生存で、AQP1 高発現が単変量・多変量解析ともに予後良好因子となっていた。術後フォローアップ期間を 6 カ月ごとに区切り、logistic regression 解析により算出した予測値の時間依存性 ROC 解析 (time-dependent ROC analysis) では、UCLA Integrated Staging System (UISS) スコアモデル単独よりも、これに AQP1 因子を組み合わせることで、全症例群での癌死および再発予後、および転移群での癌死予後判定が全観察期間を通してより正確になることを確認した。

次に淡明細胞腎癌の予後不良例で特に発現亢進している遺伝子として PLTP の解析を行った。まず qRT-PCR により腎腫瘍サンプル 572 例でその遺伝子発現値を測定した。PLTP は病理組織型別では、淡明細胞型、乳頭状腎癌、集合管癌で発現が高く、一方遠位系腫瘍の嫌色素型、oncocytoma では低かった。最も症例の多い淡明細胞型の解析では男性、有症状群、サイズの大きな腫瘍、高 stage、血管浸潤陽性群で PLTP の発現が有意に高かった。予後との関係では、淡明細胞型の全症例群での癌特異的生存、非再発生存、および進行転移症例群での癌特異的生存で、PLTP 高発現が予後不良であった。また予後判定モデルである、Karakiewicz nomogram score と比較した多変量解析でも PLTP は独立した良好因子となっていた。一方、乳頭状腎癌では PLTP 発現と予後との明らかな関連は検出できなかった。次に免疫染色による PLTP の蛋白局在検出では、淡明細胞型の low grade 症例では主に細胞膜に、一方 high grade 例ではさらに細胞質にも高発現していた。また集合管癌でも細胞質で高発現していた。一方乳頭状腎癌では癌細胞で軽度の発現とともに、間質の foam cell (macrophage) で高発現していた。以上よ

り *PLTP* は淡明細胞腎癌で予後診断マーカーとなりうる可能性が考えられた。高Ca血症は腎癌、特に進行転移例の予後不良因子の一つとしてよく知られているが、その主原因は腫瘍細胞からのPTHrHの過剰発現・分泌であることが明らかとなっている。一方腎癌は、形態、発生分子機構、臨床病態の異なる複数の腫瘍亜型に細分類されるが、腫瘍亜型別のPTHrHの発現は細かく検討されていなかった。そこで多検体の腎腫瘍型別でのPTHrHの発現をTaqMan probeを用いた定量的real-time PCR法で検出した。その結果PTHrHは、淡明細胞型 (n=530) で発現率および発現値が有意に高く、それ以外の乳頭状、嫌色素型、集合管癌、分類不能型、oncocytoma、血管筋脂肪腫および正常腎ではいずれも発現値は低めであった。これらの非淡明細胞型の大部分で血清Ca値も正常域に留まっていたが、淡明細胞型で高Ca血症を呈したものはすべてPTHrHが過剰発現していた。さらに高Ca血症、高PTHrH発現ともに淡明細胞型の予後不良因子であったが、多変量解析ではPTHrHがより強い因子となっていた。以上より、腎癌のparaneoplastic signとして従来特徴づけられてきた「高Ca血症、PTHrH高発現、予後不良」という腫瘍形質は全体の80%を占める淡明細胞型の特性であり、他の非淡明細胞型では予後判定や患者層別化の臨床因子として用いるのは適切でない可能性が強く示唆された。

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 17 件)

- ① Morris MR, Ricketts CJ, Gentle D, McRonald F, Carli N, Khalili H, Brown M, Kishida T, Yao M, Banks RE, Clarke N, Latif F, Maher ER. Genome-wide methylation analysis identifies epigenetically inactivated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *Oncogene*, 30: 1390-1401, 2011.
- ② Shuib S, Wei W, Sur H, Morris MR, McMullan D, Rattenberry E, Meyer E, Maxwell P, Kishida T, Yao M, Latif F, Maher ER. Copy number profiling in von Hippel-Lindau disease renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 50: 479-882, 2011.
- ③ 中井川昇, 矢尾正祐. 【腎細胞癌の分子標的治療】 腎細胞癌の分子標的治療の理論的根拠(解説/特集)、*医学のあゆみ*, 236: 1085-1089, 2011.
- ④ 矢尾正祐, 中井川昇, 長嶋洋治, 岸田健. (Session 1) 疫学、診断 (画像、病理、分子発生学)、予後因子 腎癌 分子発生学. *泌尿器外科*, 24 特増: 715-716, 2011.
- ⑤ Morris MR, Ricketts C, Gentle D, Abdulrahman M, Clarke N, Brown M, Kishida T, Yao M, Latif F, Maher ER. Identification of candidate tumour suppressor genes frequently methylated in renal cell carcinoma. *Oncogene*, 29: 2104-2117, 2010.
- ⑥ Kishida T, Yao M, Uemura H, Ohlmann C, Tomita Y, Bukowski RM, Naito S. Molecular genetic events associated with renal cell carcinoma and its implication to treatment by molecular target therapy. *Int J Urol*, 17: 198-205, 2010.
- ⑦ 長嶋洋治, 稲山嘉明, 青木一郎, 矢尾正祐. 腎癌の病理分類. *日本臨床*, 68 増: 36-44, 2010.
- ⑧ 矢尾正祐, 近藤慶一, 中井川昇. 腎癌の癌遺伝子・癌抑制遺伝子. *日本臨床*, 68 増: 25-29, 2010.
- ⑨ 長嶋洋治, 小林志津子, 村上あゆみ, 青木一郎, 矢尾正祐. 【病理形態学キーワード】 腎 乳頭状構築. *病理と臨床*, 28 臨増: 202-203, 2010.
- ⑩ 長嶋洋治, 青木一郎, 稲山嘉明, 矢尾正祐. 【小径腎腫瘍の診断と治療 Update】 小径腎腫瘍の病理診断(解説/特集) *Urology View* 84: 15-20, 2010.
- ⑪ 矢尾正祐, 中井川昇, 近藤慶一, 長嶋洋治. 【腎腫瘍 up to date 2010s】 腎腫瘍の分子生物学. *病理と臨床*, 28, 1037-1042, 2010.
- ⑫ 長嶋洋治, 青木一郎, 稲山嘉明, 矢尾正祐, 松寄 理. 【腎腫瘍 up to date 2010s】 乳頭状腎細胞癌と集合管癌. *病理と臨床*, 28: 1048-1052, 2010.
- ⑬ Huang Y, Murakami T, Sano F, Kondo K, Nakaigawa N, Kishida T, Kubota Y, Nagashima Y, Yao M. Expression of Aquaporin 1 in primary renal tumors: A prognostic indicator for clear-cell renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 56: 690-698, 2009.
- ⑭ Kato I, Inayama Y, Yamanaka S, Ohshiro H, Gomi K, Shirai S, Aoki I, Uemura H, Miyoshi Y, Kubota Y, Yao M, Nagashima Y. Epithelioid angiomyolipoma of the kidney. *Pathol Int*, 59: 38-43, 2009.
- ⑮ McRonald FE, Morris MR, Gentle D, Winchester L, Baban D, Ragoussis J, Clarke NW, Brown MD, Kishida T, Yao M, Latif F, Maher ER. CpG methylation

profiling in VHL related and VHL unrelated renal cell carcinoma. Mol Cancer, 8: 31, 2009.

- ⑩ 中井川昇, 矢尾正祐, 窪田吉信. 【腎における細胞内シグナル伝達と病態生理】腎細胞癌におけるシグナル伝達. 腎と透析, 67: 387-381, 2009.
- ⑪ 長嶋洋治, 古林直人, 加川絵理子, 青木一郎, 稲山嘉明, 矢尾正祐. 【泌尿器画像診断 update】腎腫瘍の病理 (解説/特集). 臨床画像, 25 増: 6-18, 2009.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 矢尾正祐, 村上貴之, 黄エイ, 水野伸彦, 佐野太, 瀧桂子, 榎山和秀, 中井川昇, 塩井康一, 岸田健, 長嶋洋治, 窪田吉信. 腎腫瘍における PTHLH 遺伝子の発現解析: PTHLH は淡明細胞型腎癌に特異的な発現・予後マーカーである. 第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012 年 4 月 23 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② 矢尾正祐, 黄エイ, 長嶋洋治, 佐野太, 近藤慶一, 榎山和秀, 中井川昇, 塩井康一, 岸田健, 窪田吉信. 腎癌における PLTP 遺伝子の発現と臨床病理・予後との関係. 第 99 回日本泌尿器科学会総会、2011 年 4 月 22 日、名古屋国際会議場 (愛知)
- ③ Huang Y, Murakami T, Sano F, Kondo K, Nakaigawa N, Kishida K, Kubota Y, Nagashima Y, Yao M. Expression analysis of Phospholipid Transfer Protein in Clear Cell Renal Carcinoma. 第 69 回日本癌学会総会 (英文)、2010 年 9 月 24 日、大阪国際会議場 (大阪)
- ④ 矢尾正祐. 遺伝子発現からみた腎癌の新たな分類. 第 98 回日本泌尿器科学会総会、2010 年 4 月 29 日、盛岡市民文化ホール (岩手) (教育講演)
- ⑤ 矢尾正祐, 蓮見壽史, 村上貴之, 榎山和秀, 近藤慶一, 中井川昇, 長嶋洋治, 窪田吉信. 転移性腎癌治療: 病理組織型、遺伝子型からの俯瞰、第 47 回日本癌治療学会学術大会、2009 年 10 月 23 日、パシフィコ横浜 (神奈川県) (ワークショップ)
- ⑥ 黄エイ, 村上貴之, 佐野太, 近藤慶一, 中井川昇, 岸田健, 窪田吉信, 長嶋洋治, 矢尾正祐. 淡明細胞腎癌の予後と相関する発現遺伝子群の同定と予後予測スコアモデルの作成. 第 68 回日本癌学会総会 (英文)、2009 年 10 月 2 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑦ 矢尾正祐, 黄エイ, 村上貴之, 佐野太, 近藤慶一, 中井川昇, 岸田健, 長嶋洋治, 窪田吉信. 腎癌における Aquaporin 1 遺伝子発現とその診断有用性、臨床応用についての検討、第 97 回日本泌尿器科学会

総会、2009 年 4 月 17 日、岡山コンベンションセンター (岡山)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢尾 正祐 (YAO MASAHIRO)
横浜市立大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 00260787

(2) 研究分担者

中井川 昇 (NAKAIGAWA NOBORU)
横浜市立大学・附属病院・准教授
研究者番号: 00237207

長嶋 洋治 (NAGASHIMA YOJI)
横浜市立大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 10217995

(3) 連携研究者

()

研究者番号: