

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2013

課題番号：21592058

研究課題名(和文)腎癌関連遺伝子解析・蛋白解析による病理・予後診断、オーダーメイド医療の構築

研究課題名(英文)Pathological and prognostic diagnosis of renal cell carcinoma related gene and protein analysis for order made (personalized) medicine.

研究代表者

杉村 淳(Sugimura, Jun)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：80306018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腎細胞癌マイクロアレイ結果から抽出された組織型や予後関連遺伝子候補を中心に、腎細胞癌臨床検体を使用して蛋白レベルの解析を行い、臨床情報を加え、さらに精度の高い遺伝子情報とすることで比較検討・解析を行うことが重要であった。また、後天性嚢胞腎に合併した腎細胞がん組織を使用し、マーカーを用いて免疫組織学的特徴を明らかにした。多彩な免疫組織学的プロファイルを示したが、複数のマーカーを組み合わせることで正確な鑑別診断が可能と考えられた。臨床データを組み合わせることで、腎細胞癌の正確な組織診断、予後予測、治療法の創造・選択 オオーダーメイド医療が可能となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined immunochemical and genetic analysis with renal cell carcinoma about prognostic or pathological gene selected from previous microarray studies. Especially, it was valuable the analysis of protein expression with clinical information. In addition, we demonstrated immunochemical characteristics of acquired polycystic kidney disease with renal cell cancer using several markers. Although those tumors showed a variety of immunochemical profiles, combined with multiple markers allows the accurate differential diagnosis. Our data combined clinical data will show accurate diagnosis of renal cell carcinoma, prognosis and order made (personalized) medicine.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：遺伝子解析 腎癌 蛋白発現 後天性嚢胞

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の発生や進展、予後決定には、特定の遺伝子が関与すると考えられている。より有効な診断・治療を行うことは、臨床データ、関連遺伝子の発現、治療に対する感受性を解析し比較検討することから可能になると期待される。これまでに cDNA マイクロアレイにより腎癌の各組織型特異的遺伝子・予後関連遺伝子が抽出されてきた。(J Urol. 2006 Jun; 175(6): 2302-6. Adv Cancer Res. 2003; 89: 157-81. Oncogene. 2003 Oct 2; 22(43): 6810-8. Histopathology. 2007 Apr; 50(5): 678-80.) これらの遺伝子が実際の蛋白レベルに影響しているかどうか、疾患の原因・予後・治療方法の解析に必要である。

## 2. 研究の目的

マイクロアレイ結果から抽出された腎細胞がんの組織型や予後関連遺伝子候補(業績 Adv Cancer Res. 2003; 89: 157-81.)を中心に、腎細胞癌臨床検体を使用し、蛋白・mRNA レベルの解析を行い、臨床情報を加え、さらに精度の高い遺伝子情報とするように比較検討・解析を行う。これにより、腎細胞癌の正確な組織診断、予後予測、治療法の創造・選択が可能となる。この結果を基に個々の腎癌症例で蛋白・mRNA レベルの解析を行い、その患者の持つ特異的な遺伝子情報を明らかにし、オーダーメイド医療を実現化すること。

## 3. 研究の方法

1. これまでに cDNA マイクロアレイにより抽出された、腎細胞癌の各組織型特異的遺伝子・予後関連遺伝子を中心に、責任遺伝子候補をターゲットに、免疫染色、RT-PCR・Western blotting 等複数の方法で各サンプルにおける遺伝子個々の蛋白・mRNA レベルの発現を評価する。腎癌臨床検体(各組織型随時採取、80 で冷凍保存)から、RNA・蛋白を抽出する。
2. 臨床データおよび cDNA マイクロアレイの結果(Adv Cancer Res. 2003; 89: 157-81, Togashi A. *et al*/Cancer Res. 65: 4817-26, 2005.等)から、各組織型特異的遺伝子・予後規定因子の検索目的に、責任遺伝子候補をターゲットに Affymetrix を使用した Gene expression profiling や、SNP 解析および免疫染色、RT-PCR・Western blotting で各サンプルにおける遺伝子個々の蛋白・mRNA レベルの発現を評価する。
3. 免疫染色、RT-PCR は、現有設備を使用し施行する。抗体・プライマーは各組織型特異的遺伝子・予後関連遺伝子候補

から選択し、その他の反応溶液とともに購入する。Western blotting は、ミニゲルを使用し、泳動・転写を行う。染色に使用する抗体は各組織型特異的遺伝子・予後関連遺伝子の中から選択し、これまでの報告や RT-PCR の結果と総合して判断する。Affymetrix を使用した Gene expression profiling や SNP 解析については研究協力者と協議する。

4. 解析で得られた責任遺伝子について、その作用やこれまでの報告を参考に、その制御法の検索を行う。この結果を腎細胞癌症例の持つ特異的な遺伝子情報と比較し、特徴を把握して患者個々にあわせた治療法 individualized medicine を検討し、より精度の高い遺伝子情報とし、結果を発表・投稿する。

研究協力者 Van Andel Research Institute (Grand Rapids MI USA) Dr. Bin T. マイクロアレイ・データ解析

## 5. 研究成果

腎癌の組織診断困難例において、cDNA マイクロアレイが診断確定に有用であることを以前より述べてきた。摘出標本から needle biopsy で採取した組織の RNA を使用したマイクロアレイ解析・clustering の結果、biopsy の小組織を使用しても組織型鑑別が十分に可能であることを確認した。(Am J Transl Res 2009; 1: 55-61) 更に、予後が明解な検体の結果を統合すれば、今後新たな治療法の展開によっては術前診断困難例における needle biopsy を使用した診断確定の有用性が拡大し、個々の治療に反映されると推測する。腎細胞癌の関連遺伝子の cDNA マイクロアレイによる抽出は、(Adv Cancer Res. 2003; 89: 157-81, Oncogene. 2003; 43: 6810-8, Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98: 9754-9.) を base にした。最近分子標的薬の選択に組織型が重要視されているが、切除不能腎細胞癌症例等において、「従来は禁忌とされていた腫瘍生検を施行する機会が増加している。組織型鑑別や予後予測が可能であれば、更に系統立てた薬剤選択・加療が可能になる可能性がある。

また、腎細胞癌発生に関与する遺伝子候補として、acquired renal cystic disease (ARCD) における epithelial junction component の N-cadherin, Ksp-cadherin, E-cadherin, claudin-2, claudin-3 の発現を免疫組織学的に評価した。これらは ARCD では正常と異なる発現を示し、更に腫瘍部では N-cadherin と claudin-2 が散在性に発現していた。epithelial junction component の発現が ARCD 発生・癌化過程に関連している可能性が示唆された。また、腎細胞癌発生に関与する遺伝子候補 AKT/mTOR signal と

Gli 1 の関与を ARCD において免疫組織学的に評価した。慢性腎不全・透析患者が増加傾向にある現在、これらの患者にみられる ARCD に発生した腎細胞癌の正確な診断は、有効な治療方法の選択、更には医療費の有効活用・抑制に寄与する可能性がある。

Chromophobe renal cell carcinoma (chRCC) と renal oncocytoma は、前者は悪性腫瘍で後者は良性腫瘍であるが、形態学的または遺伝学的に類似している。この類似は共通の細胞学的起源と生物学的な差異を有することで説明され、癌化・診断・治療の差異も研究されてきた。Affymetrix を使用した chRCC と oncocytoma の Gene expression profiling、SNP 解析および免疫染色では、c-erbB2・mTOR の癌化関連性が示唆されたが、p-AKT・extracellular HER2 の関連性は確認されなかった。Parafibromin, aquaporin 6, や synaptogyrin 3 などは、新規免疫染色マーカーとしての有効性が示唆された。(BMC Cancer 2010; 10: 196-207) 検体の選択により、新たな診断・治療決定困難例における有用性が拡大し、個々の治療に反映されると推測する。また、腎癌発生に関与する遺伝子候補として、腎癌における hypoxia-inducible protein 2 (HIF2) の発現を免疫組織学的に評価した。HIF2 は組織型により Labeling index が異なり、また予後との関連性も示唆された。(ONCOLOGY LETTERS 2010; 1: 697-701)

末期腎不全患者に高率に発症する後天性嚢胞腎では renal cell carcinoma(RCC)が高頻度に合併する。このような RCC では clear cell RCC や papillary RCC 等 sporadic RCC の組織型に加え acquired cystic disease (ACD)-associated RCC や clear cell papillary RCC 等末期腎不全患者に特異的 RCC をみるが病理組織学的鑑別が困難なことも多い。従来報告では -Methylacyl CoA Racemase (AMACR), cytokeratin-7, vimentin が鑑別に有用とされているが、多くのマーカーを用いて後天性嚢胞腎に合併した RCC の免疫組織学的特徴を明らかにした報告は殆どない。我々は上記に Kit, RCC-marker, Glutathione S-Transferase (GST- ), Carbonic Anhydrase IX(CAIX), vimentin, PAX-2 を加え、RCC を合併する後天性嚢胞腎 33 例を用いて免疫学的プロフィールについて検討した。ACD-associated RCC は 7/8 例が vimentin 陽性であったが、CAIX は発現していなかった。Papillary RCC は CK7, PAX-2 を除き ACD-associated RCC と類似パターンを示した。Clear cell papillary RCC は 2/3 例が GST- , CAIX, vimentin 強陽性を示した。Clear cell RCC で早期転移した 1 例は CAIX 陰性であった。KIT は全例陰性であった。後天性嚢胞腎に合併した RCC は多彩な免疫組織学的プロフィールを示したが、これらのように複数のマーカーを組み合わせることで正確な鑑

別診断が可能と考えられた。

悪性腫瘍に対してより有効な診断・治療を行うことは、臨床データ、悪性腫瘍の発生や進展、予後決定に関与する特定遺伝子の発現、治療に対する感受性を解析し比較検討することから可能になると期待される。本研究では、腎細胞癌を対象としたマイクロアレイ結果から抽出された組織型や予後関連遺伝子候補を中心に、腎細胞癌臨床検体を使用して蛋白レベルの解析を行い、臨床情報に加え、さらに精度の高い遺伝子情報とすることで比較検討・解析を行うことが重要であった。慢性腎不全患者に多く見られる後天性嚢胞腎に合併した腎細胞がん組織を使用し、多くのマーカーを用いて免疫組織学的特徴を明らかにした。後天性嚢胞腎に合併した腎細胞癌は多彩な免疫組織学的プロフィールを示したが、複数のマーカーを組み合わせることで正確な鑑別診断が可能と考えられた。しかし、臨床データとの関連性についてはまだ解析していない。今後臨床データを組み合わせることで、腎細胞癌の正確な組織診断、予後予測、治療法の創造・選択が可能となる。免疫染色を追加するとともに臨床データを含めた分析を進め、結果を基に個々の腎癌症例の解析を行い、その患者の持つ特異的な遺伝子情報を明らかにし、オーダーメイド医療を実現化に近づきたい。

#### 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 4 件)

Izutsu T, Konda R, Sugimura J, Iwasaki K, Fujioka T. Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 is a putative factor for inhibition of neovascular formation in renal cell carcinoma. J Urol, 査読有、185, 2011, 2353-2358. doi: 10.1016/j.juro.2011.02.019. Epub 2011 Apr 21.

Tan MH, Wong CF, Tan HL, Yang XJ, Ditlev J, Matsuda D, Khoo SK, Sugimura J, Fujioka T, Furge KA, Kort E, Giraud S, Ferlicot S, Vielh P, Amsellem-Ouazana D, Debré D, Flam T, Thiounn N, Zerbib M, Benoît G, Droupy S, Molinié V, Vieillefond A, Tan PH, Richard S, Teh BT, Genomic expression and single-nucleotide polymorphism profiling discriminates chromophobe renal cell carcinoma and oncocytoma. BMC Cancer, 査読有、10, 2010, 196-207. doi: 10.1186/1471-2407-10-196.

Seo T, Konda R, Sugimura J, Iwasaki K, Nakamura Y, Fujioka T. Expression of hypoxia-inducible protein 2 in renal cell carcinoma: A promising candidate for molecular targeting therapy. ONCOLOGY LETTERS, 査読有、1, 2010, 697-701

Rogers CG, Ditlev JA, Tan MH, Sugimura J, Qian CN, Cooper J, Lane B, Jewett MA, Kahnoski RJ, Kort EJ, Teh BT. Microarray gene expression profiling using core biopsies of renal neoplasia. Am J Transl Res, 査読有、1, 2009, 55-61.

〔学会発表〕(計 4 件)

常盤 傑, 阿部 貴弥, 加藤 陽一郎, 岩崎 一洋, 高田 亮, 小原 航, 杉村 淳, 大森 聡, 丹治 進, 藤岡 知昭、当院における維持透析患者の悪性腫瘍に関する検討 第 51 回日本癌治療学会総会 2013/10/25 京都

杉村 淳, 近田 龍一郎, 小松 淳, 岩崎 一洋, 野澤 立, 藤島 洋介, 藤岡 知昭、後天性嚢胞腎に合併した腎癌における免疫組織学的プロファイル 第 101 回日本泌尿器科学会総会 2013/4/27 札幌

野澤 立, 近田 龍一郎, 杉村 淳, 小松 淳, 相馬 文彦, 大澤 泰介, 藤岡 知昭、腎癌を合併した後天性嚢胞腎における disruption of epithelial junction complexes 第 74 回日本泌尿器科学会東部総会 2009/10/30 松本

小松 淳, 近田 龍一郎, 杉村 淳, 大澤 泰介, 常盤 傑, 兼平 貢, 相馬 文彦, 藤岡 知昭 後天性腎嚢胞の発生と癌化における AKT/mTOR signal と Gli 1 の関与 第97回日本泌尿器科学会総会 2009/4/16 岡山

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

杉村 淳 (Sugimura Jun)  
岩手医科大学医学部 講師  
研究者番号：80306108

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：