

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590416

研究課題名(和文)再発性腎癌に特異的な遺伝子異常の同定と解析

研究課題名(英文)Identification of the genomic alterations in metastatic renal cell carcinoma.

研究代表者

守山 正胤(Moriyama, Masatsugu)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：90239707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎細胞癌の進行(転移)に関わる遺伝子を同定する目的で、原発巣を手術し得た腎細胞癌症例のうち、転移により再発し、かつ転移巣を手術的に切除し得た症例20例について原発巣と転移巣のゲノム異常をアレイCGH解析により比較した。その結果、9p24.1-p13.3領域が転移巣であらたにゲノムの欠失を引き起こすことを見出した。腎癌細胞株を用いてこの領域の遺伝子発現を網羅的に調べたところ、NDUFB6遺伝子がgene copy-lossにより発現低下することを見出した。同遺伝子の発現低下した腎癌細胞株に同遺伝子を導入すると増殖抑制を引き起こすことからNDUFB6が新しいがん抑制遺伝子であることを発見した。

研究成果の概要(英文)：We performed array CGH analysis to analyze the genomic profiles of 20 cases of primary ccRCC and their corresponding metastases. We identified 32 chromosomal regions in which gene copy number alterations were detected more frequently in metastases than in the primary tumors. Among these 32 regions, 9p24.1-p13.3 loss was the most statistically significant alteration. Transcriptome analysis revealed that 2 out of 58 genes located at 9p24.1-p13.3 were downregulated due to gene copy number loss in ccRCCs. Reexpression of these 2 genes in ccRCC cell lines revealed that downregulation of NDUFB6 due to loss at 9p24.1-p13.3 may confer a growth advantage on metastatic ccRCC cells. On the basis of our present data, we propose that NDUFB6 is a possible tumor suppressor of metastatic ccRCCs.

研究分野：分子病理学

キーワード：腎細胞癌 転移 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

1) 研究の学術的背景

癌は遺伝子異常が蓄積した結果発症する遺伝子病であり、したがって癌の発症と進展のメカニズムを解明するためには癌において蓄積する遺伝子異常を明らかにすることが必要である。我々はこれまで、手術的に摘出された腎臓明細胞癌(ccRCC)原発巣のゲノム異常(DNAコピー数異常)、mRNA発現、microRNA発現をマイクロアレイを用いて網羅的に解析し、以下の知見を報告してきた。

1) 予後不良であるhigh grade ccRCCでは有意に14q lossの頻度が高いこと(J Pathol, 2007)、2) さらに14q loss領域にある遺伝子の発現を解析して、SAV1遺伝子が14q lossと関連して発現低下し、それが癌細胞のアポトーシスを抑制していること(BMC Cancer, 2011)、3) ccRCCにおけるmicroRNA発現プロファイルを解析して、miR-200c、-141の発現低下によりZEB2の発現が亢進し結果としてE-cadherinが発現低下すること(J Pathol, 2008)、4) さらにccRCCにおいてmiR-210が発現亢進し、それが染色体の中心体増幅をもたらし、aneuploid cellの増加につながることを発見した(J Pathol, 2011)。以上の知見は、いずれもccRCCの原発巣において高頻度に見いだされたものであることから、比較的早期に引き起こされた遺伝子異常であると考えられる。一方、ccRCCは原発巣の外科手術後、数年の経過の後にしばしば肺や脳などに遠隔転移をおこす。再発転移のメカニズム解明は、再発転移性腎癌の治療法の確立に必要不可欠であるが、転移巣の癌細胞において新たに付加された遺伝子異常は十分解明されていない。

本研究において、我々が目指すのは転移巣において新たに加わった遺伝子異常の中から転移の成立と進展に関わる遺伝子を同定し、その遺伝子機能を明らかにすることである。

2. 研究の目的

腎癌培養細胞を用いて gene-copy loss によって発現低下する遺伝子を絞り込む。転移巣の解析はパラフィン包埋組織を用いたが、mRNAの発現を同様にパラフィン包埋組織を用いてトランスクリプトーム解析することは困難である。そこで腎癌組織と同じゲノム異常をもつ腎癌培養株を用いて解析する。腎癌培養細胞をアレイ CGH 法により解析して、lossを認める細胞株と認めない細胞株に分ける。そしてさらに mRNA 発現をトランスクリプトーム解析によって網羅的に調べて、loss領域に存在する遺伝子のうちで、これらの領域の loss によって発現低下する遺伝子を抽出する。さらに候補遺伝子が発現低下した腎癌細胞株に遺伝子導入して発現を補うと細胞増殖の亢進や細胞死の抑制がなくなるか否かを明らかにする。抽出された遺伝子の cDNA を組み込んだ組み換えレンチウィルスを作製し loss を認めた腎癌細胞株に遺伝子導入して、導入前の細胞と導入後の細胞について、1) 細胞増殖、2) アポトーシスあるいはアノキス誘導、3) 細胞の浸潤能の変化を比較解析して、発現低下した候補遺伝子の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 腎癌細胞株のアレイ CGH 解析

腎癌細胞株(786-0, 769-P, ACHN, Caki2 など)を用いてアレイ CGH 解析を行う。

- 1) 腎癌細胞株から抽出したゲノムと正常ゲノムを制限酵素 Alu と Rsa で切断した後、それぞれ Cy5、Cy3 で蛍光標識する。(Agilent 社製 Genomic DNA Labeling Kit Plus を用いる)
- 2) 蛍光標識した両ゲノムを混和した後、アレイ上のオリゴプローブと 65 で 24 時間ハイブリダイズさせる。(Agilent 社製 4x44K

CGH マイクロアレイ及び Oligo aCGH Hybridization Kit を用いる)

3) アレイを洗浄する。(Agilent 社製 Wash Buffer)

4) スキャナ(Agilent 社製 G2565BA)によりアレイ上の蛍光シグナルを検出し画像化する。画像をもとに、個々のプローブの蛍光強度を数値化する。(Agilent 社製 Feature extraction software を用いる)

5) genomic workbench software により、それぞれの細胞株におけるゲノム異常を解析して、解析した腎癌細胞株を gene copy loss を認める細胞株と認めない細胞株に分ける。

(2) 腎癌細胞株のトランスクリプトーム解析(1色法 マイクロアレイ: Agilent 社)(守山、中田)

1) アレイ CGH 解析を行った腎癌細胞株より RNA を抽出し(RNeasy; Qiagen 社)、バイオアナライザー (Agilent 社) により RNA の品質を調べる。

2) 品質の良い RNA を用いて cDNA を合成する。続いて、cDNA より Cy3 で蛍光標識された cRNA を合成、精製し、アレイ上のオリゴプローブと 65 で 17 時間ハイブリダイズさせる。(Agilent 社製 4x44K Whole Human Genome array 及び Oligo Hybridization Kit を用いる)

3) アレイを洗浄し、スキャナによりアレイ上の蛍光シグナルを検出し画像化する。画像をもとに、個々のプローブの蛍光強度を数値化し、Gene Spring software により解析する。

4) gene-copy loss 領域に存在する遺伝子のうちで、gene copy loss によって発現低下する候補遺伝子を抽出する。

(3) リアルタイム PCR による発現解析と候補遺伝子の抽出

1) トランスクリプトーム解析によって発現低下を認めた遺伝子について、リアルタイム PCR により確認する。

2) loss によって発現低下する遺伝子候補を特定する。

(4) loss 領域の転移抑制遺伝子候補の遺伝子導入による機能解析実験

1) 24 年度の解析で同定された候補遺伝子の cDNA を他研究者からの供与あるいは購入してそれを組み換えレンチウィルスベクターに組み込み、組み換えウィルスを作製する。

2) 作製した組み換えウィルスを loss を有しかつ候補遺伝子が発現低下している細胞株に遺伝子導入して一過性発現させ、細胞増殖能をコントロール細胞と比較する(MTS assay)。次いで細胞増殖能が有意に低下する遺伝子を特定する(転移抑制遺伝子候補の絞り込み)。

3) 同様に Boyden-Chamber 法により、癌細胞の浸潤能を解析する。候補遺伝子が発現低下している細胞株に遺伝子導入して浸潤能が低下するか否かを解析する。

(5) 転移抑制遺伝子候補の siRNA を用いた発現抑制解析

上述の実験で、遺伝子導入によって、a)細胞増殖の低下、b)浸潤能の低下を認めたものについては以下の実験を追加する。

発現低下を認めなかった細胞株に対して、shRNA を発現させる組み換えレンチウィルスを作製して、感染させて候補遺伝子をノックダウンすることによって、a)増殖能の亢進、b)浸潤能の亢進を示すか否かを解析する。

4. 研究成果

腎細胞癌の原発巣を摘出後、転移し、転移巣を外科的に切除できた 20 例について、原発巣と転移巣のゲノム異常をアレイ CGH 解析によって比較したところ、転移巣は複数の染色体領域でゲノム異常を検出する悪性度の高い腫瘍であった。

そこで、転移巣で高頻度検出された各ゲノム異常を最初から持っている原発巣ともっていない原発巣の 2 群間でそれぞれの症例の予

後を比較して、予後に違いがあるかどうかを調べたところ、9p24.1-p13.3領域にコピー数低下を認めた症例の予後が不良であることを認めた。そこで、次に9p24.1-p13.3領域に存在し、コピー数のlossによって発現低下する遺伝子の発現を原発巣に9p24.1-p13.3領域のlossを有する症例と有しない症例の2群に分けて、トランスクリプトーム解析により比較したところ、2つの遺伝子NDUFB6とLRRC9の発現がゲノムコピー数のlossによって低下することを見出した。次に、両遺伝子をレンチウィルスの組み換えウィルスに組み込み、腎癌細胞株に過剰発現させたところ、NDUFB6のみで増殖能の低下を認めた。一方、アポトーシスならびに浸潤能は変化しなかった。次にsiRNAを用いてNDUFB6遺伝子のノックダウンを行ったところ、増殖能が亢進することを見出した。

以上の結果から、NDUFB6は、9p欠失による発現低下によってがん細胞にgrowth advantageをもたらすこと、そしてそれが転移巣で顕著であることから、腎癌の進行による悪性化に関わることが明らかとなった。

以上についてまとめ、つづく業績欄の論文として発表している。

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 5件)

Yoshioka S, Tsukamoto Y, Hijiya N, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Takeuchi I, Seto M, Kawano K, Moriyama M.

Genomic profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization.
PLoS One. 2013;8(2):e56165.
doi: 10.1371/journal.pone.0056165.
査読あり

Matsuo M, Nakada C, Tsukamoto Y, Noguchi T, Uchida T, Hijiya N, Matsuura K, Moriyama M.

MiR-29c is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell proliferation by targeting RCC2.
Mol Cancer. 2013 12:15.
doi: 10.1186/1476-4598-12-15.
査読あり

Nomura T, Yamasaki M, Hirai K, Inoue T, Sato R, Matsuura K, Moriyama M, Sato F, Mimata H.

Targeting the Vav3 oncogene enhances docetaxel-induced apoptosis through the inhibition of androgen receptor phosphorylation in LNCaP prostate cancer cells under chronic hypoxia.
Mol Cancer. 2013 12:27.
doi: 10.1186/1476-4598-12-27.
査読あり

Matsuura K, Inoue T, Kai T, Yano S, Kashima K, Yokoyama S, Sato F, Nomura T, Mimata H, Moriyama M, Kuroda N, Nagashima Y.

Molecular analysis of a case of renal cell carcinoma with t(6;11)(p21;q12) reveals a link to a lysosome-like structure.
Histopathology. 2014 64(2):306-9.
doi: 10.1111/his.12238.
査読あり

Narimatsu T, Matsuura K, Nakada C, Tsukamoto Y, Hijiya N, Kai T, Inoue T, Uchida T, Nomura T, Sato F, Seto M, Takeuchi I, Mimata H, Moriyama M.

Downregulation of NDUFB6 due to 9p24.1-p13.3 loss is implicated in metastatic clear cell renal cell carcinoma.
Cancer Med. 2015 4(1):112-24.
doi: 10.1002/cam4.351.
査読あり

[学会発表](計 1件)

甲斐友喜、松浦恵子、中田知里、塚本善之、守山正胤ほか

SAV1inhibits renal tumor growth in xenograft model.

第 73 回日本癌学会学術総会
2014 年 9 月 25~27 日
横浜パシフィコ（神奈川県横浜市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

守山 正胤 (MORIYAMA Masatsugu)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：90239707

(2)研究分担者

中田 知里 (NAKADA Chisato)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：60379625