

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791656

研究課題名(和文)膀胱がんにおける治療標的となり得るがん関連遺伝子の解析および転移予測指標の確立

研究課題名(英文) Analysis of the tumor related genes may serves as targets for therapy and construction of predictive models in patients with bladder cancer.

研究代表者

西山 直隆 (Nishiyama, Naotaka)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70619030

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)：膀胱がん細胞株、膀胱がん手術検体を用いて、尿路上皮がんにおけるArray CGH解析、3D Gene発現解析でのゲノム網羅的解析を行った。転移を有する尿路上皮がんに対して行われるシスプラチン+ゲムシタピン療法(GC療法)に対して、抵抗性と相関するがん関連遺伝子ADAMTS1(ADAM metalloproteinase with thrombospondin (TSP) type I motif, 1)を見出した。免疫染色の結果、ADAMTS1において、ADAMTS1の免疫染色陽性例とGC療法に対する無増悪生存期間($p=0.032$)および疾患特異的生存率($p=0.006$)とに有意に相関していた。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify genome wide gene expression profiling and copy number alterations in urothelial carcinomas(UCs), array CGH analysis and highly sensitive DNA chip microarrays were performed in UCs obtained from patients and bladder cancer cell lines. Analysis of the data identified cancer related gene ADMTS1 (ADAM metalloproteinase with thrombospondin (TSP) type I motif, 1) which correlated with resistance to chemotherapy with gemcitabine and cisplatin (GC). In the patients with GC, there were significant difference in progression free survival ($p=0.032$) and cancer specific survival ($p=0.006$) between negative and positive ADMTS1 in the immunohistochemistry.

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：膀胱がん ゲノム網羅的解析 ADAMTS1

1. 研究開始当初の背景

膀胱がんは時間的・空間的多発性が顕著で、様々な経過をとる尿路上皮がんにおいて診断と治療は困難な事が少なく、浸潤がんへと移行した場合に臨床的な予後も不良である。さらに転移を有する膀胱がんに対する治療にはシスプラチンをベースにした化学療法がおこなわれているが、シスプラチンに耐性を示す転移を有する膀胱がんに対する化学療法は確立されていない。シスプラチンをベースにした化学療法に代わる新たな治療法のために、治療標的となる新たながん関連遺伝子の確立が期待されている。また予後の改善を図るために浸潤性膀胱がんに対するより早期の治療の導入を目的とした転移予測指標の確立の必要性がある。

研究者は、先に尿路上皮がん 49 検体において、244K oligonucleotide array を用いたアレイ CGH 法にてゲノム網羅的にゲノム構造異常を解析し、ゲノム構造異常の臨床病理学的意義に関して研究を行った(Carcinogenesis 2011, 32, 462-46)。Array CGH 解析での全染色体における尿路上皮がんの染色体数の変化と臨床病理学的因子が有意に相関する染色体座は 2q33.3-q37.3、4p15.1-q26、5q13.3-q35.2 の遺伝子欠損と p11.2-q11.23、20q13.11-q13.31 の遺伝子増幅が組織学的異型度と相関しており、7p21.2-p21.1 の増幅は深達度と相関していた。6q14.1-q27、17p13-q11.1 の欠損と 19q13.11-q13.12、20q13.12-q13.33 の増幅はリンパ管浸潤相関していた。16p12.2-p12.1 の欠損と 3q26.31-q29、20q13.12-q13.33 の増幅は尿管浸潤と相関していた。5q14.1-q23.2、6q14.1-q27、8p22-p21.3、11q13.5-q14.1、15q11.2-q22.2 の欠損と 3q27.3-q29、7p11.2-q11.22、10p13-p12.33、12q24.31、19q13.11-q13.2 の増幅は非乳頭状尿路上皮がんへの進展と相関していた。1p33-p31.1、2q22.1-q23.1、10q11.23-q21.1、15q21.3 の欠損は尿路外再発と相関していた。8q 遺伝子増幅と 9q、11p、14q の遺伝子欠損は尿路上皮がんを高率に見られるが、それらの染色体数の変化は臨床病理学的因子(悪性度)との相関関係は見られなかったため、これらの領域には発がん早期に寄与する遺伝子が位置する可能性があった。

これらの結果から①尿路上皮がんの悪性度を反映する臨床病理学的因子と染色体構造異常は相関しており、それらの染色体座に位置するがん関連遺伝子は治療標的になりうる可能性、

②尿路上皮がんの尿路外再発と相関する染色体構造異常が位置する染色体座は予後規定因子になりうる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究は Array CGH 解析にて得られた染色体座に位置する尿路上皮がんにて報告されていないがん関連遺伝子の機能解析、転移・再発と相関する染色体構造異常を複数組み合わせさせた転移予測指標の確立を目指した。

臨床病理学的因子と相関する染色体座に位置する多数のがん関連遺伝子の絞り込み、および臨床病理学的因子と相関するがん関連遺伝子の発現解析を行うために以下の研究を行った。

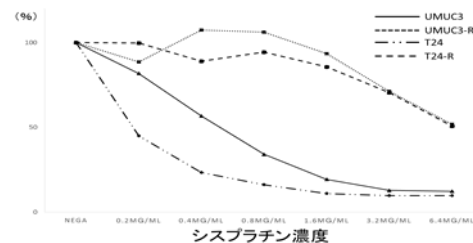
3. 研究の方法

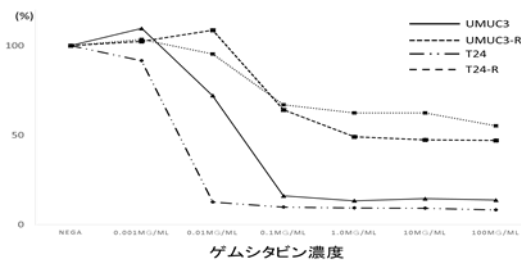
(1) 膀胱がん細胞株 T24、UMUC3 を用いてシスプラチン耐性株(T24-R、UMUC3-R)を作成。

(2) 3D-Gene Human Oligo chip 25K(東レ株式会社)を用いた発現解析を T24 vs T24-R、UMUC3 vs UMUC3-R および手術標本より得られた検体を用いて RNA 抽出し GC 療法長期奏功症例 vs GC 療法早期耐性症例のそれぞれでゲノム網羅的な RNA 発現解析を行った。

4. 研究成果

研究者は、膀胱がん細胞株 T24、UMUC3 を用いてシスプラチン耐性株を作成、T24、T24 シスプラチン耐性株(T24-R)、UMUC3、UMUC3 シスプラチン耐性株(UMUC3-R)での細胞毒性試験を施行した。細胞毒性試験では T24-R、UMUC3-R はシスプラチンだけではなくゲムシタビンにも同様に耐性を獲得していることを見出した。

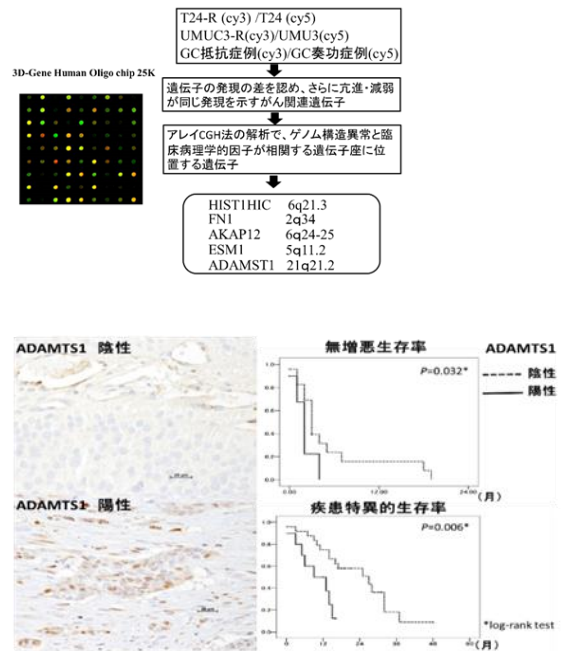




これらの細胞株において、3D-Gene Human Oligo chip 25K (東レ株式会社)を用いた発現解析を T24 vs T24-R, UMUC3 vs UMUC3-R および手術標本より得られた検体を用いて RNA 抽出し GC 療法長期奏功症例 vs GC 療法早期耐性症例のそれぞれでゲノム網羅的な RNA 発現解析を行った。全染色体における尿路上皮がんの RNA 遺伝子発現とシスプラチン耐性および GC 療法抵抗性と関連すると考えられるがん関連遺伝子、9 遺伝子を見出した。(HISTH1C;6q21.3 発現亢進, RPL10;Xq2.8 発現減弱, FN1;2q34 発現減弱, ADAMTS1;21q21.2 発現亢進, AKAP12;6q24 発現亢進, ESM1;5q11.2 発現亢進, RND3;2q23.3 発現亢進, CXCL2;4q21 発現亢進, SERPINB2;18q21.3 発現亢進)。

また先に研究者は尿路上皮がん 49 検体において、244K oligonucleotide array を用いたアレイ CGH 法にてゲノム網羅的にゲノム構造異常を解析し、ゲノム構造異常の臨床病理学的意義に関して研究を行った (Carcinogenesis 2011, 32, 462-46)。3D-Gene 発現解析で同定したがん関連遺伝子9遺伝子において、アレイ CGH 法の解析で、ゲノム構造異常と臨床病理学的因子が相関する遺伝子座に位置する遺伝子は HISTH1C、AKAP12、ADAMTS1、FN1 であり、これらの遺伝子について免疫染色を行い検討した。免疫染色は当院にて転移を有する尿路上皮がんに対し GC 療法を行った 32 症例を対象とした。

免疫染色の結果、ADAMTS1 においてがん細胞における ADAMTS1 陽性率 67%以上の症例 9 例を陽性症例と判定した場合、ADAMTS1 の免疫染色陽性例と GC 療法に対する無増悪生存期間 (p=0.032) および疾患特異的生存率 (p=0.006)とに有意に相関していた。



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 2 件)

- 1) Nishiyama N, Kitamura H, Maeda T, Takahashi S, Masumori N, Hasegawa T and Tsukamoto T: Clinicopathological analysis of patients with non-muscle-invasive bladder cancer: Prognostic value and clinical reliability of the 2004 WHO classification system. Jpn J Clin Oncol 43; 1124-1131, 2013. 査読有、DOI: 10.1093/jjco/hyt120.
- 2) Nishiyama N, Kitamura H, Mutoh M, Yanase M, Iwaki H, Hasegawa T, Tsukamoto T: Clinicopathological analysis of patients with nonmuscle-invasive bladder cancer who underwent radical cystectomy. Surgical Science 3; 347-352, 2012. 査読有、DOI: 10.4236/ss.2012.37068

[学会発表] (計 2 件)

- 1) 西山直隆、進藤哲哉、堀田裕、高橋 敦、柳瀬雅裕、伊藤直樹、立木 仁、宮尾則臣、松川雅則、国島康晴、田口圭介、北村 寛、舛森直哉: BCG failure をきたした筋層非浸潤性膀胱癌の予後に関する後ろ向き・多施設共同研究。第 51 回日本癌治療学会総会、2013 年 10 月 24-26 日、京都。

- 2) Nnishiyama N, Kitamura H, Masumori N, Hasegawa T, Tsukamoto T: Clinico-pathological analysis of patients with nonmuscle-invasive bladder cancer: Prognostic value and clinical reliability of the WHO grading system of 2004. AUA 2013 Annual Meeting, May 4-8, 2013, San Diego, USA.

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 直隆 (NISHIYAMA NAOTAKA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70619030