

第14番染色体長腕上に存在する急速進行型
ヒト腎細胞癌の責任遺伝子同定と機能解析

(課題番号: 13470332)

平成13年度～平成15年度科学研究費補助金 基盤研究(B)(2)研究

成果報告書

平成16年6月

研究代表者 岡本 圭生

(滋賀医科大学泌尿器科助手)

滋賀医科大学附属図書館



2003009010

はしがき

腎細胞癌は成人に発生する腎悪性腫瘍としてはもっとも頻度の高いものであるが、現在のところ手術療法が唯一の確立された治療法であり難治性癌の一つとされる。殊に体重減少や急性炎症反応(血沈、CRP陽性)を伴ったいわゆる paraneoplastic inflammatory syndrome を呈する症例ではきわめて急速な転帰をとることが多く(以下急速進行症例と略す)予後不良症例が多い。われわれは上記のような予後不良症例の多い、急速進行症例に特異的な遺伝子変化を明らかにすべく研究を進めてきたが、その結果第14番染色体長腕上に原因遺伝子が存在する可能性を強く示唆する解析結果を得た。本申請では第14番染色体長腕に存在すると考えられる、腎細胞癌の進展に関わる遺伝子を同定すべく研究を進めた。

研究組織

研究代表者 岡本 圭生(滋賀医科大学泌尿器科)

研究分担者 岡田 裕作(滋賀医科大学泌尿器科)

小川 修(京都大学医学研究科泌尿器科学)

研究協力者 川上享弘(滋賀医科大学泌尿器科)

研究経費

平成13年度 4,500,000 円

平成14年度 2,800,000 円

平成15年度 2,800,000 円

総額 10,100,000 円

研究発表

(1) 英文原著

*Corresponding author

1. Kawakami T, Zhang C, Taniguchi T, Kim CJ, Okada Y, Sugihara H, Hattori T, Reeve AE, Ogawa O, Okamoto K*; Characterization of loss-of-inactive X in Klinefelter syndrome and female derived cancer cells. *ONCOGENE* in press. 2004
2. Kawakami, T., Okamoto, K*, Ogawa, O. Okada, Y.: XIST unmethylated DNA fragments in male-derived plasma as a tumour marker for testicular cancer. *Lancet*, 363: 40, 2004
3. Kawakami, T., Okamoto, K*, Sugihara, H. Hattori, T. Reeve, A. E. Ogawa, O. Okada, Y.: The MET proto-oncogene is not a major target for the gain of chromosome 7 in testicular germ-cell tumors of adolescents. *Virchows Arch*, 444: 480, 2004
4. Kawakami, T., Okamoto, K*, Kataoka A, Koizumi S, Iwaki H, Sugihara H, Reeve AE, Ogawa O, Okada Y.: Multipoint methylation analysis indicates a distinctive epigenetic phenotype among testicular germ cell tumors and testicular malignant lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 38: 97, 2003
5. Kawakami, T., Okamoto, K. *, Ogawa, O., Okada Y.: Multipoint methylation and expression analysis of tumor suppressor genes in human renal cancer cells. *Urology*, 61: 226, 2003
6. Kawakami T, Okamoto K*, Sugihara H, Hattori T, Reeve AE, Ogawa O, Okada Y; The Roles of Supernumerical X chromosomes and XIST expression in Testicular Germ Cell Tumors. *J Urol* 169: 1546-52, 2003.
7. Nishikawa Z, Okamoto K*, Kataoka A, Soga H, Wakabayashi Y, Kushima R, Okada Y. Transitional cell carcinoma in a single ectopic ureter opening into the ejaculatory duct. *Urology* 60: 912. 2002.

8. Takimoto Y, Okamoto K*, Wakabayashi Y, and Okada Y; Torsion of a spermatocele: A rare manifestation of the spermatocele. *Urol Int* 69: 164–65, 2002.
9. Yuasa T, Okamoto K*, Kawakami T, Mishina M, Ogawa O, Okada Y.; Expression patterns of cancer/testis antigens in testicular germ cell tumors and in adjacent testicular tissues. *J Urol* 165: 1790–94, 2001.

(2) 口頭発表

1. Multipoint Methylation Analysis Indicates a Distinctive Epigenetic Phenotype Among Testicular Germ Cell Tumors and Testicular Malignant Lymphomas: Okamoto K, Kawakami T, Sugihara H, Hattori T, Reeve A. E, Ogawa O, Okada Y. 第 92 回日本泌尿器学会総会(大阪)2004
2. 川上享弘、岡本圭生、杉原洋行、小川修、岡田裕作: 精巣腫瘍における第11番染色体短腕の刷り込み遺伝子領域の脱メチル化とその意義. 第 92 回日本泌尿器学会総会(大阪)2004
3. 川上享弘、岡本圭生、岡田裕作、杉原洋行、小川修: 精巣腫瘍における癌遺伝子 MCF2 (Xq27)の変異解析. 第 91 回日本泌尿器学会総会(徳島)2003
4. 岡本圭生、川上享弘、岡田裕作、杉原洋行、小川修: 腎細胞癌における E-cadherin 遺伝子不活化機構についての検討. 第 91 回日本泌尿器学会総会(徳島)2003
5. 岡本圭生、川上享弘、岡田裕作 DNA メチル化をもちいたヒト精巣腫瘍の新しい診断法の開発 第3回滋賀医科大学・京都工芸繊維大学ジョイントセミナー「遺伝子診断と治療の最前線 (大津) 2002
6. 川上享弘、岡本圭生、岡田裕作、小川修: 精巣腫瘍発生において X 染色体数の増加とX染色体不活化機構の果たす生物学的意義についての検討. 第 90 回日本泌尿器学会総会(東京)2002
7. 岩城 秀出洙、岡本圭生、川上享弘、岡田裕作、小川修: 精巣腫瘍における methylation profile の検討. 第 90 回日本泌尿器学会総会(東京)2002

8. 岡本圭生、川上享弘、岡田裕作、小川修:腎細胞癌における VHL 遺伝子と E-cadherin 遺伝子メチル化制御の相関 第 90 回日本泌尿器学会総会(東京) 2002
9. 加藤研次郎、小泉修一、岡本圭生、岡田裕作. 父子に発生した精巣腫瘍 第 175 回日本泌尿器科学会関西地方会 西宮市 2001
10. 岡本圭生、湯浅 健、岡田裕作、三品睦輝、小川 修. 精巣腫瘍における Cancer Testis Antigen 遺伝子の包括的発現解析. 第 88 回日本泌尿器科学会総会、2000. (札幌)

研究成果

本研究課題の成果を要約すると以下のとおりである。その詳細は添付した発表論文および関連資料に記載する。

腎細胞癌は成人に発生する腎悪性腫瘍としてはもっとも頻度の高いものである。

腎細胞癌にみられる遺伝子欠失としては 3p loss がもっとも高頻度であり、ついで 14q, 8p, 9p の欠失の頻度が高い。腎細胞癌の9割以上の組織型が淡明細胞癌であり、淡明細胞型腎細胞癌の発癌には VHL 遺伝子が重要な働きをしていることが既に明らかとなっている。すなわち、3p 遺伝子領域の欠失および VHL 遺伝子の両側アレルの不活化が淡明細胞癌の初期発生に重要な molecular event とされる。

一方、従来より 14q 領域の欠失が淡明細胞型腎細胞癌の進行、転移に関わっているらしいことはわかっていたが、これまでのところ明らかな癌抑制遺伝子については同定されていない。われわれは 14q の欠失が淡明細胞型腎細胞癌において広い範囲(14S1426, 14S617, 14S611, 14S616)で見られ、事に従来より急速進行型とされる炎症反応を伴った淡明細胞型腎細胞癌に特異的にこの領域の欠失がみられることより、14 番染色体長腕に存在する癌抑制遺伝子の同定を試みた。

まず 14 番染色体長腕上に存在する既知の候補遺伝子についての解析を行った。

すなわち、CDKN3;14q22、TNFAIP2; 14q32、FOS; 14q24、I κ B (I-kappa B α); 14q13 である。I-kappaB は Hodgkin's lymphoma での変異が報告されていること、同変異が炎症性サイトカインの転写因子である NF- κ B の恒常的刺激につながっているらしいこと (Emmerich et al., 1999)、Hodgkin's lymphoma でもいわゆる B syndrome といわれる発熱、発汗、体重減少が高頻度に見られ IL-6 を始めとする腫瘍の内因性のサイトカイン産生がこれらに参与していることより、われわれの想定する第 14 番染色体長腕 (14q)上の paraneoplastic inflammatory を伴ったヒト腎細胞癌急速進行症例を規定する責任遺伝子としてはきわめて有力な候補遺伝子と考えられる。しかしながら I-kappaB については腎細胞癌における発現源弱は認めら

れずさらに全 Exon について変異の有無を検討したが、Exon 4, 5, 6 にそれぞれ single nucleotide polymorphism (SNP)を認めたが体細胞変異は認めなかった。

したがって、I-kappaB が腎癌の癌抑制遺伝子として寄与している可能性は少ないと考えられた。同様に CDKN3, TNFAIP2, FOS ほか約 20 の遺伝子について検討したがいずれも腎癌での発現源弱、変異は認められなかった。

われわれは腎細胞癌における癌抑制遺伝子の不活化機構の 1 つとして VHL 遺伝子でも明らかにされた DNA のメチル化についても積極的に解析した。その中で転移浸潤機構に関与すると考えられる E-cadherin 遺伝子の変化について詳細な検討を行った。候補遺伝子座でのメチル化による修飾を検討する中で腎細胞癌では複数の癌抑制遺伝子が不活化していることが判明した。

特にp16, p15といった第9番染色体上の遺伝子群と第16番染色体上のE-cadherin 遺伝子が同時に不活化している例が多く存在することが明らかになった。

さらに、われわれは腎細胞癌における E-cadherin 遺伝子の変異の有無および biallelic methylation の可能性についても検討した。E-cadherin 遺伝子の 16 個の Exon 領域について SSCP、sequencing による変異および多型解析を行った。また bisulfite genomic sequence により DNA のメチル化を同定した後、プロモーター領域に存在する A/C 多型を用いて biallelic methylation がおこっているか否かも検討した。その結果、腎細胞癌組織および細胞株で E-cadherin の遺伝子変異は検出されなかった。14 細胞株中 7 例で E-cadherin 遺伝子の発現消失を認めた 7 例ではいずれも 100%メチル化を認めた。E-cadherin 遺伝子のメチル化を認めたサンプルのうち A/C 多型を認めた細胞株 2 例および腎癌組織 3 例ではいずれも biallelic methylation を認めた。このことから、腎細胞癌における E-cadherin 遺伝子 gene alteration の主たる機構はメチル化による遺伝子不活化であり、その多くは biallelic methylation によるものと推測された。これ以外にもわれわれは精巣腫瘍のメチル化の変化についても詳細な検討を行い報告した。

今回の申請では第 14 番染色体長腕上に存在すると推定される腎癌進展に関わる遺伝子の同定に精力をあげて取り組んできたが、予想外に第 14 番の遺伝子の多くは腎癌で主だった発現減弱を示さず、候補遺伝子の絞りこみは困難を極めた。

しかしながら現在、14q31 上に存在する候補遺伝子が存在することが絞られ、当該遺伝子の機能について腎癌由来細胞株に野生型遺伝子を組み込むことにより、その癌抑制遺伝子としての機能を果たしているか否かを検討中である。