

## テクニカルノート

# 分子生物学的手法を用いた泌尿生殖器癌の遺伝子 および遺伝子周囲変異の解析

松山豪泰, 平田 寛, 矢野誠司, 山本義明, 是永佳仁, 井上 亮,  
原 智彦, 大見千英高, 坂野 滋, 吉弘 悟, 内藤克輔

山口大学医学部分子制御系・泌尿器科学講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

**Key words** : FISH, CGH, 腎細胞癌, 膀胱癌, 前立腺癌

### 1. はじめに

癌は遺伝子の病気であることが解明されて久しいが最近では遺伝子のみならず遺伝子周囲の変異 (epigenetic change) が癌の発生, 浸潤, 転移に深く関与していることが明らかになってきた。当教室では腎細胞癌, 膀胱癌, 前立腺癌を中心とする泌尿生殖器癌におけるこれまでの遺伝子変異研究において得られた知見をもとに遺伝子プロモーター領域のメチレーション, 増殖関連リガンドがレセプターを介した細胞内シグナル伝達異常, 細胞分裂期のチェックポイント異常により発生する中心体複製異常, さらにヒトゲノムにおける (一塩基) 遺伝子多型と癌の発生などのepigenetic changeについて研究を進めている。本論文ではこれらの研究について紹介する。

### 2. 膀胱癌における中心体複製異常と新規分子標的薬をもちいた基礎検討

膀胱癌は尿路生殖器腫瘍のなかでも最も発生頻度が高い腫瘍の一つで, その発生, 再発, 腫瘍進展のメカニズムは明らかではない。表在性膀胱癌は多中心性, 異時性発生が特徴的で, その発生メカニズムも単一のクローンが播種されるclonal origin説と尿路上皮全体が遺伝子または遺伝子周囲変異を来すfield change説があり, 意見の一致をみていない。

われわれはFISH (fluorescence in situ hybridization) 法をもちいた検討で, 表在性膀胱癌の正常周囲粘膜にも腫瘍と同じ特定染色体の異数体異常があることを報告した<sup>1)</sup>。現在臨床検体をもちいて腫瘍および正常周囲粘膜における腫瘍抑制遺伝子のメチレーション異常を検討中である。

染色体異数体異常に関しては表在性膀胱癌では9番染色体monosomy, 7番染色体polysomyに代表される染色体異数体異常が, 浸潤性および上皮内癌においては染色体17番短腕欠失 (p53遺伝子変異) に代表される染色体構造異常がおもな遺伝子変異であることを報告してきた<sup>1-3)</sup>。また表在性膀胱癌の周囲正常粘膜や尿細胞診陰性症例の細胞診検体中に上記染色体異数体異常が存在することを報告<sup>3)</sup>しており, 異数体数異常と予後との関連性が示唆される。異数体異常はmitotic spindle checkpointの異常により発生するが, われわれは細胞分裂時に紡錘体の両極を形成し正常の分裂を誘導する中心体の複製異常に着目し, 農学部獣医学学科 (奥田 優助教授), 病理学第2講座 (佐々木功典教授) との共同研究で膀胱癌における染色体異数体異常と中心体複製異常との関連および中心体複製異常に関連した遺伝子について研究を進めている。ヒト継代膀胱癌培養細胞株をもちいた基礎検討では中心体過剰複製は染色体不安定性に関与していること, CGH (comparative genomic hybridization) 法をもちいた検討で中心体過剰複製株はすべて染色体20q13領域のコピー数増加がみられた。現在臨床検体をもちいた検討で中心体過剰複製が予後に及ぼす影響について検討中

平成15年12月26日受理

ある。

また新規分子標的薬であるGefitinib (ZD1839) のヒト継代膀胱癌培養細胞株12株に対する抗腫瘍効果とその作用機序の解明をcDNA microarray法, Western blotting法をもちいて解析中である。これまでの検討でGefitinibの標的であるEGFレセプターの発現の有無と抗腫瘍効果は相関しないことが明らかとなった。今後Gefitinibの膀胱癌における作用機序の解明と高感受性株と低感受性株間のクラスター解析による効果予測症例のスクリーニングを目指している。

### 3. 前立腺癌における網羅的遺伝子変異解析と細胞内シグナル伝達異常

前立腺癌は欧米男性の臓器別癌発生率の第1-3位を占めており、その発生には遺伝的素因と環境要因が深く関与している。本邦でも食生活を中心とした生活環境の変化とともに急速に増加しつつある腫瘍である。われわれは病理学第2講座(佐々木功典教授)との共同研究で、前立腺癌における特定染色体の遺伝子変異が根治的前立腺全摘術後の腫瘍進展や再発に及ぼす影響をFISH法<sup>4)</sup>やCGH法<sup>5)</sup>をもちいて検討してきた。現在BAC cloneを使ったarray CGH法をもちいて網羅的遺伝子変異解析を行っており、特定遺伝子のコピー数減少に関する情報は従来のCGH法と同等もしくは優れているという結果が示され、今後の網羅的遺伝子変異解析の有用なツールとなりうると思われる<sup>6)</sup>。また前述のGefitinibのヒト継代前立腺癌細胞株に対する抗腫瘍効果とその作用機序の解明を微生物学講座(白井睦訓教授)との共同研究で、cDNA microarray法をもちいて解析中である。前立腺癌は抗男性ホルモン治療に対して強い感受性をもち、当初は癌のコントロールが可能であるが、その後ホルモン抵抗性となり不幸な転機をとる。この研究によりホルモン感受性腫瘍から抵抗性腫瘍への変化に影響をおよぼす遺伝子群の変化やEGFレセプターを介した細胞内シグナル伝達異常の解明を目指している。

### 4. 腎細胞癌における遺伝多型解析と特定染色体の欠失解析

腎細胞癌は外科的治療以外の有効な治療法がなく、早期発見が重要であるにもかかわらず有用な腫瘍マーカーがない。われわれは臨床検査医学講座(日野田裕治教授)との共同研究で、腫瘍の浸潤進展に関与するMMP(matrix metalloproteinase)の遺伝子多型解析を血液由来DNAをもちいておこなってきた。その結果MMP-1プロモーター領域の遺伝多型の一つが有意に腎細胞癌患者に多いことを発見した<sup>7)</sup>。現在隣接するMMP-3との連鎖不均衡解析を行っており、疾患感受性遺伝子の発見を目指している。また今後酸化ストレスによるDNA傷害の修復酵素の遺伝多型解析を計画している。

これまでのFISH法による特定染色体の欠失解析では染色体5q22-23領域の欠失が腎細胞癌患者の予後に強い影響を与えることを報告した<sup>8)</sup>。現在遺伝子実験施設(水上洋一助教授)のご協力の下、multiplex PCR法をもちいた5番染色体長腕および18番染色体長腕領域の欠失解析をおこなっており、同領域上の腫瘍抑制遺伝子の解明を目指している。また正常腎および腎細胞癌から抽出したタンパクの解析により、新規腫瘍マーカーおよび癌抗原ペプチドの発見を計画している。

### 5. おわりに

ポストゲノムの時代を迎え、泌尿生殖器癌の研究は遺伝子変異解析とともに遺伝子周囲の変化さらにはプロテオミクスへと拡がりをみせている。今後これらの領域からの膨大な情報をいかに臨床に役立てるかが重要な課題となるであろう。

### 6. 謝 辞

Gefitinibはアストラゼネカ社より供与を受けた。また一連の研究にあたり以下の講座の先生方にご指導いただいております。この場をお借りして深謝いたします。

・特殊専門領域腫瘍病態学(臨床検査医学)講座:  
日野田裕治 先生

- ・先端分子応用医科学 (病理学第2) 講座 :  
佐々木功典 先生
- ・生殖・発達・感染医科学 (微生物学) 講座 :  
白井睦訓 先生, 三浦公志郎 先生
- ・分子感知医科学 (眼科学) 講座 : 西田輝夫 先生
- ・山口大学総合科学実験センター  
(遺伝子実験施設) : 水上洋一 先生
- ・農学部獣医学科 (家畜内科学) : 奥田 優 先生

### 文 献

- 1) Matsuyama H, Bergerheim USR, Nilsson I, Pan Y, Skoog L, Tribukait B, Ekman P. Non-random numerical aberrations of chromosomes 7, 9, 10 in DNA-diploid bladder cancer detected by in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1994 ; 77 : 118-124.
- 2) Matsuyama H, Pan Y, Mahdy EA, Malmström P-U, Hedrum A, Uhlen M, Busch C, Hirano T, Auer G, Tribukait B, Naito K, Lichter P, Ekman P, Bergerheim USR. *p53* deletion as a genetic marker in urothelial tumor by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 1994 ; 54 : 6057-6060.
- 3) Tsukamoto M, Matsuyama H, Oba K, Yoshihiro S, Takahashi M, Naito K. Numerical aberration of chromosome 9 in bladder cancer : a possible prognostic marker for early recurrence. *Cancer Genet Cytogenet* 2002 ; 134 : 1-5.
- 4) Matsuyama H, Pan Y, Oba K, Yoshihiro S, Matsuda K, Häggarth L, Kudren D, Naito K, Bergerheim USR, Ekman P. Deletions on chromosome 8p22 may predict disease progression as well as pathological staging in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001 ; 7 : 3139-3143.
- 5) Matsuda K, Matsuyama H, Yano S, Fukunaga K, Matsumoto H, Hara T, Yoshihiro S, Oga A, Kawauchi S, Furuya T, Naito K, Sasaki K. The low frequency of 13q loss in Japanese prostate cancers ; Comparison of CGH data between Japanese and Caucasian patients. *Cancer Genet Cytogenet* 2004 (in press).
- 6) Yano S, Matsuyama H, Matsuda K, Matsumoto H, Yoshihiro S, Naito K. Accuracy of the new array CGH technique in detecting DNA copy number aberrations : Comparison with conventional CGH and LOH analysis in prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2004 (in press) .
- 7) Hirata H, Naito K, Yoshihiro S, Matsuyama H, Suehiro Y, Hinoda Y. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter is associated with conventional renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003 ; 106 : 373-374.
- 8) Nagao K, Matsuyama H, Yoshihiro S, Yamaguchi S, Oba K, Naito K. Clinical significance of allelic loss of chromosomes 5q22.3-23.2 in nonpapillary renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2002 ; 136 : 23-30.