

博士論文

論文題目 淡明細胞型腎細胞癌における統合的分子解析

氏 名 佐藤 悠佑

要旨

淡明細胞型腎細胞癌における分子病態の全体像を明らかにするために、106症例を対象とし、体細胞性の遺伝子変異、ゲノムコピー数、遺伝子発現、DNAメチル化の異常を網羅的に検出し統合的な解析を行った。その結果、新規の遺伝子変異として *TCEB1* のホットスポット変異を検出したほか、mTOR シグナリングパスウェイが高頻度に異常をきたしていることを明らかにした。また、ゲノム異常のパターンによる症例の分類を行い、予後との関連を見出した。分子病態に基づいた分類が予後の予測や治療方針の検討に有用となりうることが示唆された。

序文

腎細胞癌（RCC）は、成人に生じる悪性腫瘍のうち 2-3%を占め¹、国立がんセンターの集計によると本邦において年間約 18,000 人が発症し、約 7,000 人が死亡している²。RCC は組織学的にいくつかのサブタイプに分類されるが、そのうち淡明細胞型腎細胞癌（ccRCC）が最も頻度が高く、70-80%を占めている³。進行例に対してはインターフェロン α やインターロイキン 2 を用いた免疫療法や、血管新生阻害薬あるいは mTOR 阻害薬などの分子標的薬が使用されるが、腫瘍の完全消失がえられる例は少ない⁴。根治のためには外科的に完全に切除する必要があり、転移例や再発例は予後不良である。

癌の病態や発生の原因を追及する研究は古くからなされているが、現在では細胞におけるゲノム異常の蓄積によって癌が生じるという考え方が広く受け入れられている。癌関連遺伝子に生じた変異や癒合遺伝子の形成、あるいはゲノムコピー数の増加・欠失や発現量の変化など、ゲノムの質的・量的な異常が癌細胞の発生に関わっていると考えられている。したがって、癌の病態を深く理解するためには、癌細胞において生じているゲノム異常を詳細に明らかにする必要があり、特定の遺伝子・タンパクに注目した解析ではなく、ゲノムの全領域、そして全ての遺伝子を対象した、網羅的な解析によってのみ、分子病態の全体像に迫ることが可能であると考えられる。

ccRCCにおけるゲノム異常としては、極めて高頻度に *VHL* の不活化が生じていることが古くから知られている⁵。*VHL* 遺伝子は3番染色体短腕(3p)に位置しているが、ccRCCでは、およそ90%の症例で3pのヘテロ接合性の消失(LOH)が見られる⁵。さらに、対側アレルにおいて *VHL* 遺伝子の変異^{6,7}あるいはプロモーターのメチル化⁸が生じることにより、*VHL* の両アレルの不活化が生じる。*VHL* はE3ユビキチンライゲースとして知られており、Elongin B およびElongin Cと複合体を形成している⁹。これがCUL3およびRBX1とともに基質である低酸素誘導因子(HIF α)をユビキチン化し、プロテアソームにおける分解を促している¹⁰。低酸素環境下においては、HIF α がユビキチン化を受けないため蓄積し^{11,12}、これが核内へ移行してHIF β とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子上流に結合して遺伝子の転写を誘導する¹³。ccRCCでは*VHL*の機能が喪失することによりHIFが蓄積し、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)をはじめとする標的遺伝子の転写が誘導され、腫瘍の発生に寄与していると言われて¹⁴。

マイクロアレイの開発により、ゲノムコピー数や遺伝子発現の変化を網羅的かつ高速に解析できるようにことは、癌のゲノム解析に大きな進展をもたらした。近年ではさらに、シーケンス技術が大きく発展したことに伴い、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析や全ゲノム解析によって、遺伝子変異をも網羅的に検出できるようになった。Illumina社の次世代シーケンサーであ

る HiSeq2000 システムでは、シーケンス用ライブラリ（断片化した DNA の両端に、アダプター配列を付加したもの）を大量並列シーケンシングすることにより、1 回のラン（10 日～14 日）で約 500Gb のシーケンスデータを得ることができる。HiSeq2000 システムでのランにより、およそ 100bp 長の塩基配列情報（シーケンスリード）が大量に得られ、これを各種マッピングツールを用いてレファレンスのゲノム配列（hg19）の適切な領域にマッピングする（図 1）。そのうえで、ゲノム上の各ポジションについて腫瘍 DNA と正常 DNA を比較し、体細胞性変異を検出する。また、単に変異の有無だけではなく、変異アリル頻度（変異の生じているポジションにおいて、変異のリード数を、変異および野生型の双方のリード数の合計で除したもの）を算出することにより、その変異を持った細胞が腫瘍全体の中でどの程度の割合を占めているのかを推定することが可能である。腫瘍発生の初期に生じた変異であれば（ドライバー変異かパッセンジャー変異かには関わらず）、ほとんどの腫瘍細胞がその変異を有していると考えられるため、変異アリル頻度は高くなるが、腫瘍進展の過程で後から生じ、一部の腫瘍細胞のみが有している変異の場合は、低い変異アリル頻度が観察される。これらの情報を用いて、どのような様式で変異が蓄積し、癌の発生や進展に至るのかを推測しうると考えられる。

ccRCC においては、他の悪性腫瘍で高頻度に見られる *RAS*, *BRAF*, *TP53*、

CDKN2A、*RBI* などの変異頻度が低く¹⁵、*VHL* の不活化の他に分子病態に重要な役割を占めている遺伝子異常は長い間不明であったが、網羅的な遺伝子変異解析が行われた結果、2010 年以降に、*PBRM1*¹⁶、*BAP1*¹⁷、*SETD2*¹⁵、*KDM5C*¹⁵ など、クロマチン制御・ヒストン修飾に関する遺伝子変異が ccRCC で高頻度に生じていることが明らかとなった。Varela らの報告¹⁶では、7 例の ccRCC に対して全エクソンシーケンシングを行ったところ、4 例に *PBRM1* 変異を認めた。さらに 220 例において同遺伝子の変異解析を行ったところ、41% の症例に変異を検出した。また、Peña-Llopis らの報告¹⁷では、やはり 7 例の全エクソンシーケンシングにより *BAP1* の変異を見出したため、さらに 176 例で変異解析を行い 14% の症例に変異を検出した。Guo らの報告¹⁸では、10 症例の全エクソンシーケンシングを行い、*VHL* 以外にもユビキチンによるタンパク分解機構に関する遺伝子の変異が生じていることを明らかとした。しかしながら、ここで挙げたようなこれまでの研究では、網羅的な解析を行った症例数が少ない、あるいは遺伝子発現や DNA メチル化などの他のゲノム異常も合わせた包括的な解析がされていないという点で不十分なものであった。

したがって、ccRCC の分子病態は完全に明らかにされたとは言えず、その全体像を解明するためには、多数の検体を用いて、遺伝子変異、ゲノムコピー数、遺伝子発現、DNA メチル化などあらゆる観点からのゲノム異常を網羅的に検出

し、それらを統合的に解析する必要がある。本研究では 106 例の ccRCC を対象とし、各検体について、全エクソン・全ゲノムシーケンシング、RNA シーケンシング、マイクロアレイによる遺伝子発現解析、DNA メチル化解析、ゲノムコピー数解析を行い、検出された異常を統合的に解析した。重要な遺伝子変異については、さらに症例を 134 例追加し、合計 240 例について解析を行った。

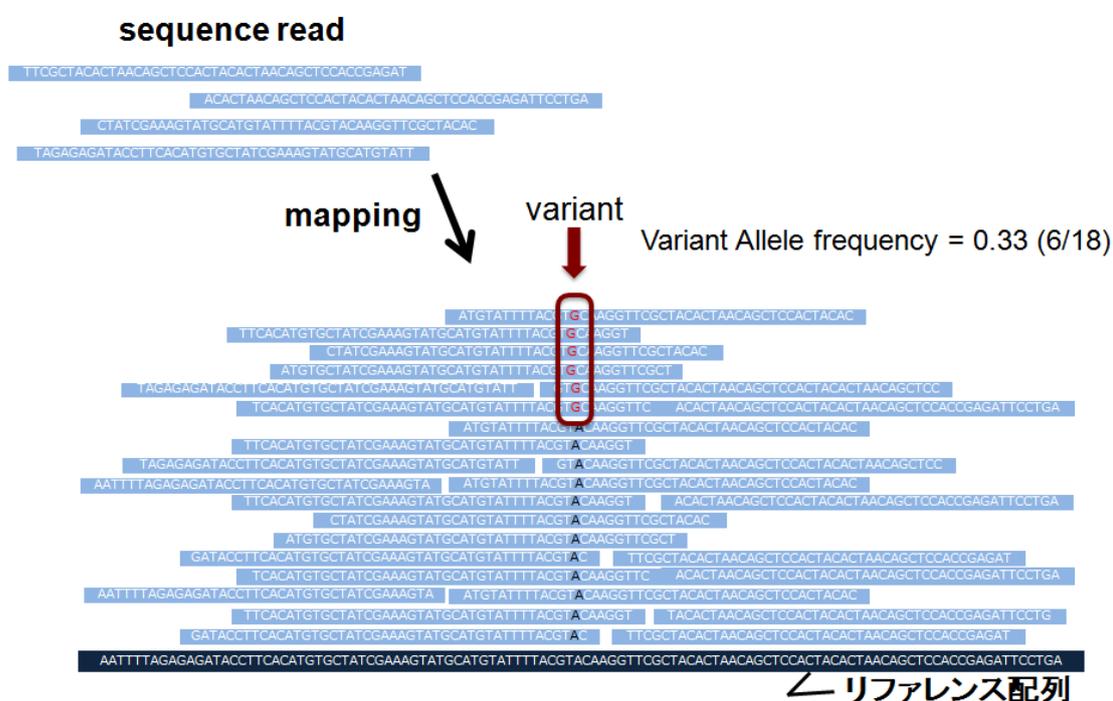


図 1 次世代シーケンサーを用いた解析による変異の検出

次世代シーケンサーによるシーケンシングによって、100bp 長のシーケンズリードが大量に得られる。これをリファレンス配列を参照して、適切な領域にマッピングすることにより、検体 DNA における塩基配列情報が決定される。リファレンス配列と異なる塩基がある場合は variant として検出され、腫瘍検体と正常検体との比較により、体細胞性変異であるかどうか決定される。また、variant を含んだリードがどの程度の割合を占めているかを計算することにより、variant allele frequency が算出される。

方法

【対象とした検体】

本研究は東京大学 ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を受けて施行された（「固形腫瘍における遺伝子異常の網羅的解析」承認番号 G1598、「全ゲノムシーケンスによる泌尿器腫瘍の治療標的分子の同定」承認番号 G3511）。

ccRCC と診断され、1999 年から 2009 年間に東京大学医学部附属病院泌尿器科にて根治的腎摘除術または腎部分切除術を施行した 240 例から解析用の組織を採取した。このうち 106 例を Exome-cohort とし、全エクソン解析のほか、RNA シークエンシング、マイクロアレイ解析の対象とした。Exome-cohort において検出された主要な遺伝子変異については、全 240 症例において検証した。

組織の採取は、手術にて腫瘍を摘除した直後に可及的速やかに行った。腫瘍組織ならびに腫瘍に付随して切除された正常腎組織の一部を採取し、液体窒素下で保存した。正常腎組織が十分に採取できなかった 13 症例については、末梢血を採取した。術前に、免疫療法や分子標的薬の投与を受けた症例はなかった。また、いずれの症例も、組織学的に ccRCC の所見に合致することを確認した。組織学的診断は、森川鉄平氏と共同で行った。

DNA は Gentra Puregene Kit (Qiagen) を用いて抽出した。RNA は RNeasy Kit

(Qiagen) を用いて採取した。採取した RNA は 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies) を用いて分析し、RNA integrity number が 7 以上のものをその後の解析に用いた。

【全エクソンシーケンシング】

106 例の腫瘍 DNA とそれに対応する正常 DNA について、全エクソンシーケンシングを行った。1.5~3 μ g の DNA を用いて、シーケンス用のライブラリー調整を行った。まず、Covaris (M&S Instruments) にて DNA を約 200bp のサイズにランダムに剪断した。断片化した DNA の両端に、HiSeq2000 (Illumina) にてシーケンシングするためのアダプター配列を付加した。その後、SureSelect Human All Exon kit (Agilent Technologies) を用いて液相ハイブリダイゼーションによるエクソン領域の濃縮を行った。調整した DNA ライブラリーは、HiSeq2000 (Illumina) を用いて両端 100bp のシーケンシングを行った。得られたシーケンスリードは、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) を用いてレファレンス配列 (hg19) にマッピングした。

変異の検出は、EBcall アルゴリズム¹⁹を用いて行った。まず、10 検体以上の正常 DNA のシーケンスデータから、ゲノム上の各ポジションにおけるシーケンシングのエラー率を見積もった。次に、それぞれの腫瘍 DNA において、レファレンスの配列 (hg19) と異なるミスマッチの頻度を、正常 DNA のデータか

から見積もったエラー率と比較した。腫瘍 DNA におけるミスマッチの頻度が、エラー率よりも有意に高い場合に、体細胞性変異の候補とした。EBcall アルゴリズムの開発は、白石友一氏と共同で行った。

【全ゲノムシーケンシング】

Exome-cohort のうち、14 症例の腫瘍 DNA とそれに対応する正常 DNA について、全ゲノムシーケンシングを行った。1 μ g の DNA を、Covaris (M&S Instruments) にて約 400bp のサイズにランダムに剪断し、NEBNext DNA Library Preparation kit を用いてシーケンスライブラリーを作成した。作成した DNA ライブラリーは、HiSeq2000 (Illumina) を用いて両端 100bp のシーケンシングを行った。得られたシーケンスリードは、BWA を用いてレファレンス配列 (hg19) にマッピングし、マッピングされなかったリードはさらに Blat を用いて再度マッピングした。

リファレンスの配列 (hg19) と比較して、腫瘍ゲノムにおいて 7 リード以上のミスマッチがあり、同じ部位の正常ゲノムにおけるミスマッチが 1 リード以下 (一塩基置換) あるいは 0 リード (挿入欠失) の場合に、体細胞性変異の候補とした。全ゲノムシーケンシングの解析 (マッピングおよび体細胞変異の検出方法の検討) は、奥野友介氏と共同で行った。

【RNA シーケンシング】

Exome-cohort 106 例のうち 100 例について、RNA シークエンシングを行った。

1 μ g の total RNA から、TruSeq RNA Sample Preparation kit (Illumina) を用いてシーケンスライブラリーを作成した。まず、poly-T 付加磁気ビーズにて total RNA から poly-A RNA (mRNA) を精製し、これを 2 価陽イオンにて化学的に断片化した。断片化した mRNA から、逆転写酵素 (SuperScript II Reverse Transcriptase, Life Technologies) を用いて cDNA を合成し、アダプター配列を付加した。作成したライブラリーは HiSeq2000 (Illumina) を用いて両端 100bp のシーケンシングを行った。得られたシーケンスリードは、Bowtie ならびに Blat を用いてレファレンス配列 (hg19) にマッピングした。

マッピングされたシーケンスデータから、Genomon-fusion (<http://genomon.hgc.jp/rna/>) を用いて癒合遺伝子を検出した。癒合遺伝子の接合部をまたぐシーケンスリードは、それを構成する 2 つの遺伝子にマッピングされうるが、Genomon-fusion ではこのようなシーケンスリードを検出することにより、癒合遺伝子を高精度に捉えることが可能である。検出された癒合遺伝子の候補は、Reverse Transcription-PCR にて確認した。Total RNA 500mg から逆転写酵素 (RevaTra Ace Reverse Transcriptase, TOYOBO) を用いて合成した cDNA を鋳型として、KOD-Plus Neo (TOYOBO) を用いて PCR を行った。

Genomon-fusion による癒合遺伝子の検出方法の開発は、白石友一氏と共同で行

った。

【マイクロアレイ解析】

SNP アレイによるゲノムコピー数解析

240 症例を対象として、SNP アレイによるゲノムコピー数解析を行った。解析は GeneChip Human 250K NspI Array (Affymetrix) を用いて行った。500ng の DNA を制限酵素 (NspI) で消化し、PCR 増幅および断片化して、アレイとのハイブリダイゼーションを行った。スキャンされたシグナル強度から、GTYPE ソフトウェア (Affymetrix) にて SNP タイピングを行い、CNAG/AsCNAR (Copy number analyzer for GeneChip/Allele-specific copy number analysis with anonymous reference) アルゴリズム^{20,21} を用いて、トータルおよびアレル特異的なコピー数を決定した。すなわち、アレイ上に搭載された約 250,000 の SNP プローブのそれぞれから得られるハイブリダイゼーションシグナルから、腫瘍細胞と正常細胞のシグナル比を算出し、網羅的にコピー数を解析した。また、SNP プローブにおいてヘテロ接合性を示した箇所においては、2つのアレルを区別しそれぞれにおいてアレル特異的なコピー数解析を行った。アレル特異的なコピー数を行うことにより、total のコピー数異常を伴わない LOH (ヘテロ接合性の消失、loss of heterozygosity) すなわち uniparental disomy (UPD) をも網羅的に検出することができた。SNP アレイで決定した 240 例のコピー数について、GISTIC 2.0

(Genomic Identification of Significant Targets in Cancer) ソフトウェア²²を用いて解析し、バックグラウンドのコピー数異常の頻度と比較して、有意に (q value <0.25) コピー数異常を生じている領域を検出した。

DNA メチル化解析

Exome-cohort 106 例について、Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina) を用いて網羅的な DNA メチル化解析を行った。500ng の DNA に対し、EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) を用いてバイサルファイト処理することにより、非メチル化シトシンをウラシルに変換させた (メチル化シトシンは変換しない)。これを PCR 増幅ならびに断片化し、アレイとのハイブリダイゼーションを行った。各プローブサイトには、メチル化プローブ (シトシンに対応) と非メチル化プローブ (ウラシルに対応) が設定されており、スキャンによって両者のシグナル強度を測定した。メチル化プローブの intensity (M) と非メチル化プローブの intensity (U) から、 β -value ($M/(M+U)$) を算出し、メチル化の評価指標とした。メチル化の状態による症例のクラスタリングは、全プローブのうち X 染色体と Y 染色体に配置されたものを除外し、さらに症例間の β -value の分散が大きい 3,562 個 (上位 1%) のプローブを用いて行った。

遺伝子発現解析

Exome-cohort 106 例のうち 101 例について、Human Gene Expression 4x44K v2

Microarray (Agilent Technologies) を用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行った。500ng の total RNA から cRNA を合成し、Cyanine3 でラベル化 (1色法) した。これを断片化した後、アレイとのハイブリダイゼーションを行った。スキャンによって検出したシグナル値を Feature Extraction ソフトウェアにて解析し、各遺伝子の発現値を抽出した。検体間の発現データの正規化のために quantile normalization を行った。解析した症例を、ccA および ccB の2つのサブグループに分類するために、既報の文献と同様に²³K-means 法による症例のクラスタリングを行った。

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (<http://www.broadinstitute.org/gsea/>) にて、DNA メチル化および遺伝子発現のプロファイリングを行った。

SNP アレイによるコピー数解析ならびに遺伝子発現解析は、佐藤亜以子氏と共同で行った。DNA メチル化解析は、アレイ実験は永江玄太氏と共同で、データの解析は島村徹平氏と共同で行った。

【免疫染色】

Exome-cohort 106 例について、HIF タンパクに対する免疫染色を行った。HIF1 α の免疫染色にはマウスモノクローナル抗体 (1:300, Clone H1alpha67, NB100-122, Novus Biomedicals Inc., Littleton, CO) を、HIF2 α の免疫染色にはウサギモノクローナル抗体 (1:1000, NB100-105; Novus Biomedicals Inc., Littleton, CO) を用いた。

HIF1 α 、HIF2 α とともに 5%以上の腫瘍細胞の核が染色された場合に陽性と判定した。陽性例は、核の免疫反応性の強度に応じて、1+: mild, 2+: moderate, 3+: strong の3段階に分類した。

免疫染色は、前田大地氏と共同で行った。

【細胞株への遺伝子導入】

HeLa 細胞および HEK293T 細胞を、10%ウシ胎児血清および 1%ペニシリン・ストレプトマイシンを加えた DMEM 培地 (Gibco) で培養した。TCEB1 (Elongin C) の全長 cDNA はヒト大腸組織から抽出した cDNA から PCR 増幅にて作成し、タンパクの N 末端に 3 コピーの HA 配列をタグ付けした。これを鋳型として、QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) を用いて Tyr79Cys ならびに Ala100Pro の変異を有した TCEB1 の cDNA を作成した。VHL および TCEB2 の cDNA も同様の方法で作成し、VHL にはタンパクの N 末端に 3 コピーの FLAG 配列をタグ付けした。

HeLa 細胞には pMXs-puro レトロウイルスベクターを用いて、empty vector (Mock)、野生型 Elongin C および変異型 Elongin C (Tyr79Cys および Ala100Pro) を導入し、安定的に発現させた。293T 細胞にはリン酸カルシウム法を用いて、各遺伝子を一過性に発現させ、48 時間経過後に各種の実験に用いた。

内因性の Elongin C のノックダウンは siRNA (Takara Bio) を用いて行った。

ノックダウンを行う細胞に外因性の TCEB1 (Elongin C) を導入する際には、siRNA の影響を受けないように、あらかじめ PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara Bio) を用いて、アミノ酸が変化しないような 4 塩基の塩基置換変異を生じさせておいた。(c.210A>C; Leu70Leu, c.211_213TCG>AGC; Ser71Ser)。siRNA は Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いて HeLa 細胞に導入し、48 時間経過後に実験に用いた。

これらの実験および解析は、吉里哲一氏と共同で行った。

【タンパク質の抽出とイムノブロット解析】

細胞株からのタンパク質は、RIPA バッファー(Santa Cruz Biotechnology)を用いて抽出した。細胞溶解液は 10%ポリアクリルアミドゲルにて泳動し、表 1 に示す抗体を用いてタンパクの検出を行った。

【統計解析】

統計解析はソフトウェア R を用いて行った。生存時間解析は Kaplan・マイヤー法を用いて行い、Log-rank 法にて 2 群間の差を検定した。多重検定による False Discovery Rate の制御が必要な場合は、Benjamini-Hochberg 法を用いて q-value を算出した。

表 1 イムノブロット解析に用いた抗体

| | Target | Host | Company | Catalog Number | Dilution |
|-------------------------|--|----------------|-------------------------------|----------------------------|----------|
| Primary antibody | Elongin C | Mouse | BD Bioscience | 610761 | 1:1000 |
| | HIF-1a | Mouse | BD Bioscience | 610958 | 1:1000 |
| | CUL2 | Rabbit | Invitrogen | 511800 | 1:500 |
| | VHL | Mouse | BD Bioscience | 556347 | 1:500 |
| | Actin | Goat | Santa Cruz Biotechnology | sc-1616 | 1:4000 |
| | HA | Rabbit | Covance | PRB-101C | 1:4000 |
| | HA | Mouse | Covance | MMS-101P | 1:4000 |
| | Flag | Rabbit | Sigma-Aldrich | F425 | 1:4000 |
| | Flag | Mouse | Wako Pure Chemical Industries | 018-22381 | 1:4000 |
| | Secondary HRP-conjugated antibody | Anti-mouse IgG | Sheep | GE Healthcare Life Science | NA931 |
| Anti-rabbit IgG | | Donkey | GE Healthcare Life Science | NA934 | 1:8000 |
| Anti-goat IgG | | Goat | Santa Cruz Biotechnology | sc-2033 | 1:8000 |

結果

【全ゲノムシーケンシングおよび全エクソンシーケンシングによる遺伝子変異の検出】

14 症例について施行した全ゲノムシーケンシングにおいて、腫瘍ゲノムは 1 例あたり平均 47.2 リード、正常ゲノムは 1 例あたり平均 33.6 リードの深度でシーケンスされた。また、20 リード以上の深度でシーケンスされたのは、全ゲノム領域の 95% (腫瘍) および 90% (正常) であった。合計で 71,424 個の体細胞性変異を検出し (1 例あたり平均 1.7/megabase)、このうち 68,273 個が一塩基置換 (SNV)、3,151 個が挿入欠失 (indel) であった (図 2a)。SNV のパターンの分布としては、T>C/A>G の transition が最も多く、次いで C>T/G>A の transition、C>A/G>T の transversion が多くみられた (図 2c)。C>T/G>A の transition は多くの悪性腫瘍における主要な塩基置換のパターンであるが²⁴、T>C/A>G および C>A/G>T は今回の ccRCC における SNV のパターンを特徴づけるものであった。同様の特徴は肝細胞癌においても報告されている²⁵。

染色体転座、逆位などのゲノム構造異常は、1 例あたり平均 12 個 (0 個—35 個) 検出された。複数例において構造異常が集積していた領域はなかった。

遺伝子のコーディング領域におけるアミノ酸の変化を伴う変異は、1 例あたり平均 47 個検出されたが (図 2b)、これは全ての体細胞性変異のうち 0.92% を占

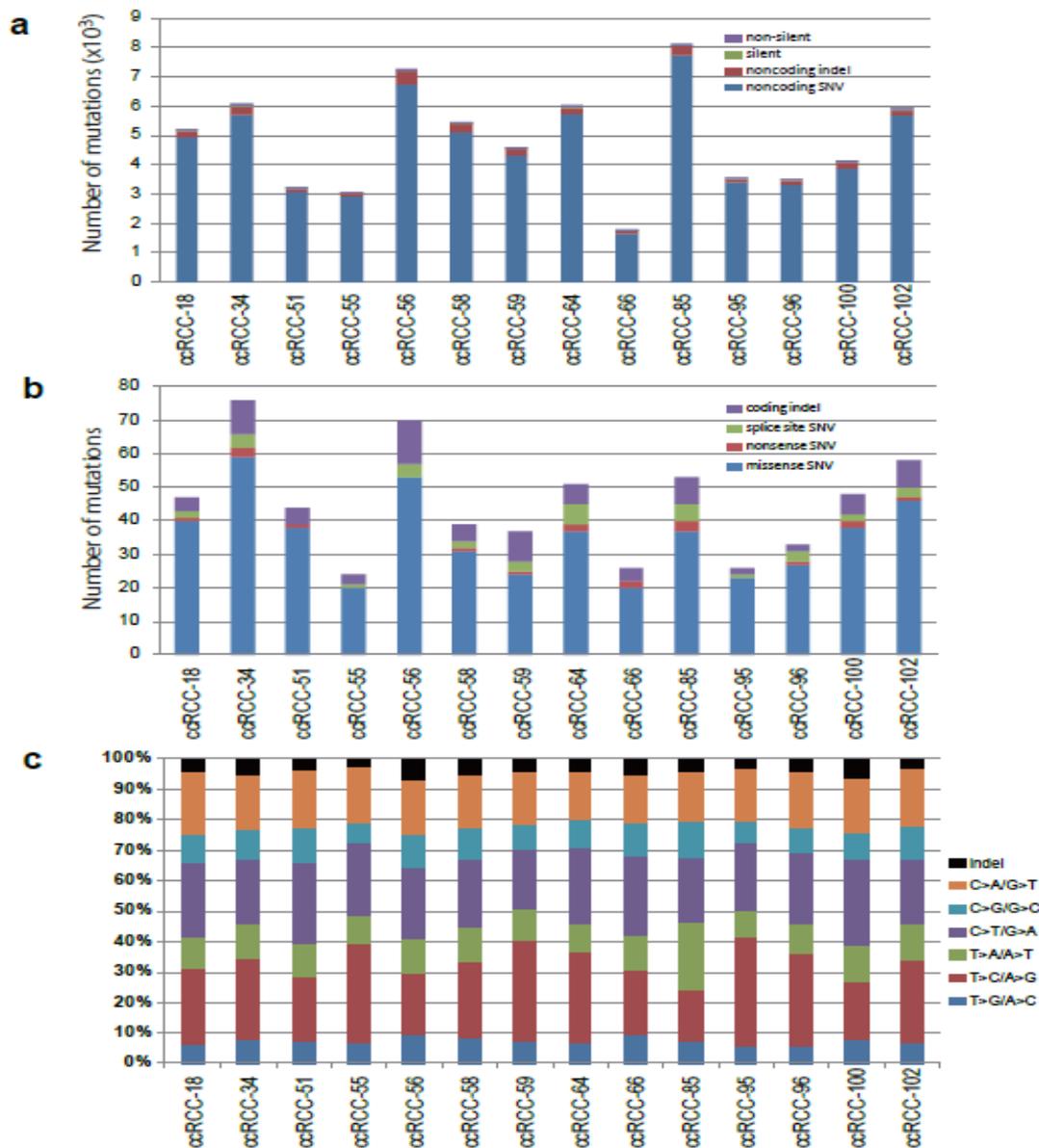


図2 全ゲノムシーケンシングにより検出された変異数

(a) 各症例の、ゲノム全領域における変異の総数を示す。1例あたり平均 5,100 個 (1.7/megabase) の変異を検出した。また、ほとんどの変異は noncoding 領域に生じていた。

(b) 各症例の、コーディング領域におけるアミノ酸の変化を伴う変異数を示す。これらの変異は、ゲノム全領域における変異の 0.92% を占めていた。

(c) 各症例の、検出された変異の、塩基置換のパターンを示す。C>T/G>A の置換は多くの悪性腫瘍における主要な塩基置換のパターンであるが、ccRCC では T>C/A>G や C>A/G>T の置換も多く見られた。

めていた。この割合は、ゲノム全領域に対する遺伝子のコーディング領域のサイズの比率とほぼ同等であり、変異は概ねランダムに生じていることが示唆された。

次に、ccRCC の発生および進展においてドライバーとなる遺伝子変異の全体像を明らかとするために、106 例を対象に全エクソンシーケンシングを行った。濃縮した全エクソン領域に対し、腫瘍検体は 1 例あたり平均で 129.4 リード、正常検体は 1 例あたり平均で 126.3 リードの深度でシーケンスされた。また、20 リード以上の深度でシーケンスされたのは、全エクソン領域の 89%であった。合計で 5,171 個（1 例あたり平均 48.8 個）の体細胞性変異を検出し、このうち 4,234 個がミスセンス変異、232 個がナンセンス変異、140 個がスプライスサイト変異、557 個が挿入欠失(indel)、8 個がストップコドンの延長を伴う変異であった。

全ゲノムシーケンシングと全エクソンシーケンシングの両方を行った 14 症例について、双方の解析で検出された変異を比較したところ、839 の遺伝子変異のうち 539 変異（64%）が両方のプラットフォームで検出された（図 3a）。全エクソンシーケンシングのみで検出された変異は 183 個あった。全エクソンシーケンシングでは、より深い深度でシーケンスされたことを反映して、変異アレル頻度の低い、サブクローナルな変異を効率的にとらえられていた（図

3b,c)。一方、全ゲノムシーケンシングのみで検出された変異は 117 個であったが、これらのほとんどは、全エクソンシーケンシングでは変異のあった領域のシーケンス深度が浅いために変異の検出に失敗していた。平均のシーケンス深度は、全エクソンシーケンシングの方が圧倒的に深かったが（129.4 対 47.2）、GC rich な領域においては全エクソンシーケンシングでは十分なシーケンス深度が得られていなかった。これは、エクソン領域を濃縮する際に、相補的な配列の cRNA と検体 DNA をハイブリダイゼーションするのであるが、GC rich な領域はハイブリダイゼーションの効率が悪く、その結果シーケンス深度が浅くなるものと考えられた。全ゲノムシーケンシングでは、比較的均一なシーケンス深度が得られたため、領域によっては全ゲノムシーケンシングの方がより深くシーケンスすることが可能であった。

検出された変異について deep sequencing を行い、それぞれの変異のアリル頻度を測定したところ、14 例中 12 例においてサブクローナルな変異を見出すことができた（図 4）。これは、ccRCC において腫瘍内の heterogeneity が一般的に見られることを示唆している。

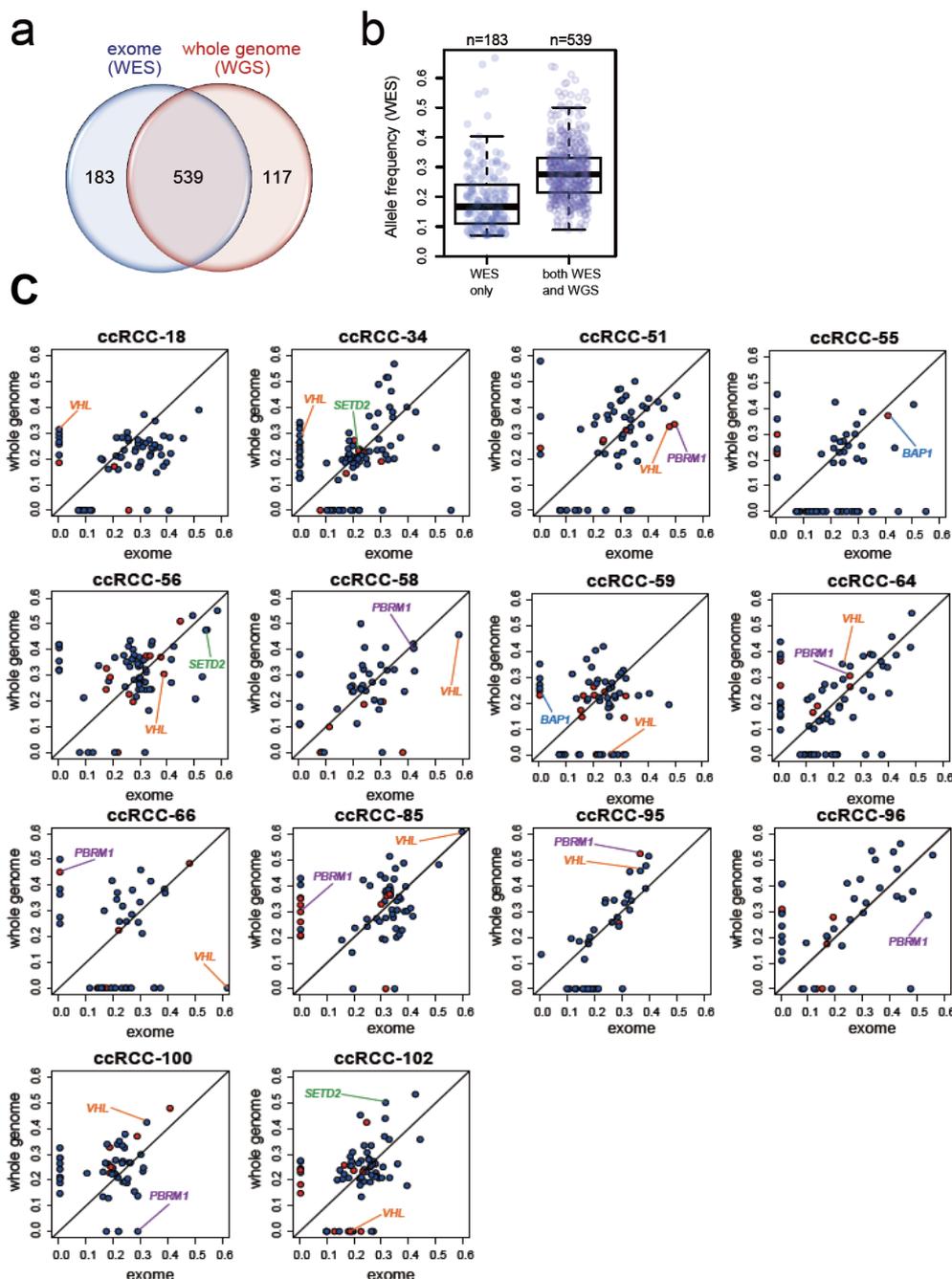


図 3 全ゲノムシーケンシング (WGS) と全エクソンシーケンシング (WES) によって検出された変異の比較

(a) 全 839 変異のうち、双方で検出されたのは 539 変異であった。183 変異は WES のみで、117 変異は WGS のみで検出された。

(b) WES では、シーケンス深度が深いことを反映し、変異アレル頻度の低い変異を検出できていた。

(c) 各症例において、検出された変異の変異アレル頻度の比較を示す。一塩基置換は青で、挿入欠失は赤で表示する。主要な変異遺伝子 (*VHL*, *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2*) がある場合はそれを示す。

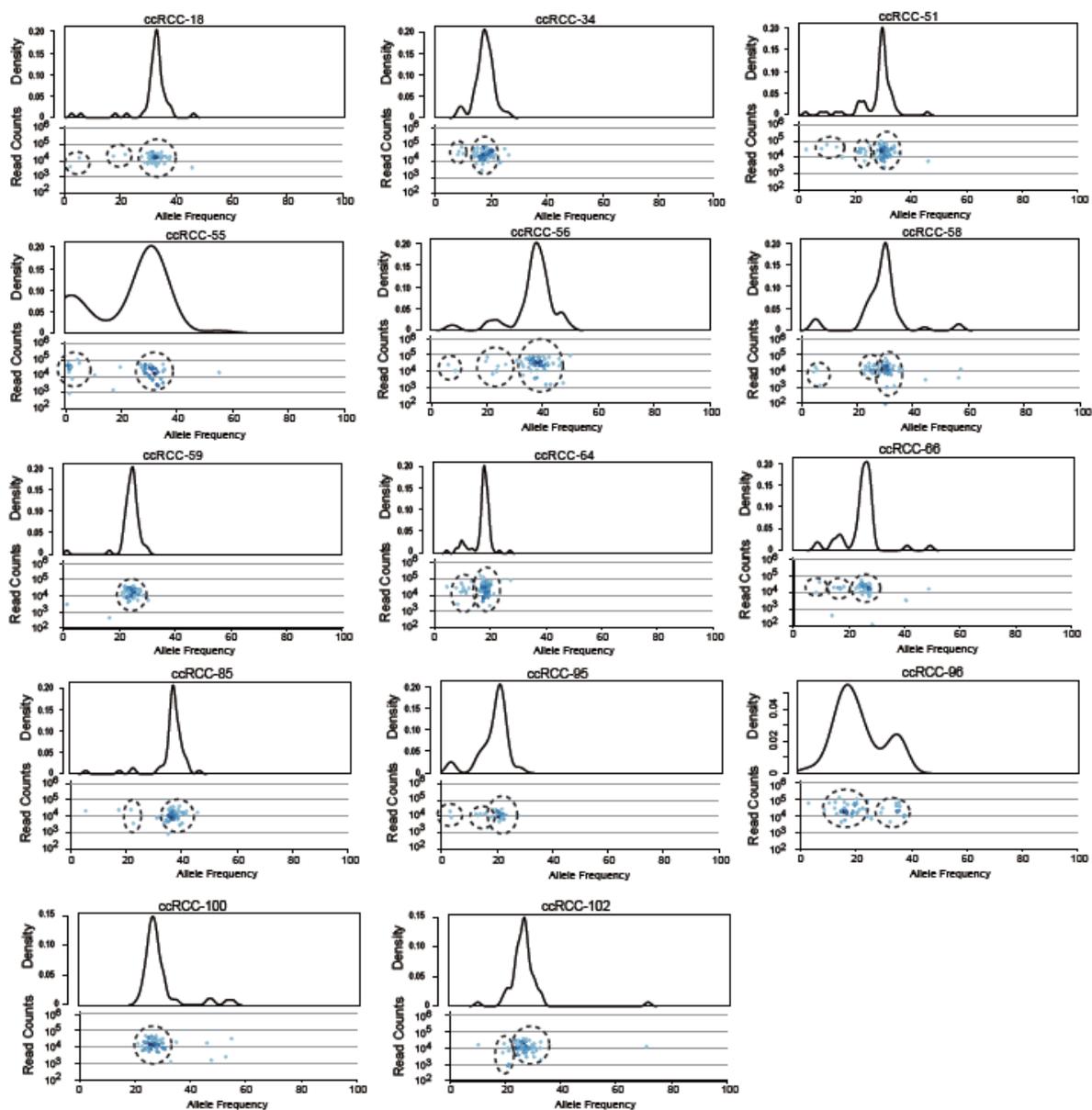


図4 腫瘍内の heterogeneity

全ゲノムシーケンシングを行った14例において、検出された変異のアリル頻度を deep sequencing で決定し、縦軸にシーケンス深度、横軸にアリル頻度をプロットした (各図の下段)。さらにカーネル密度推定によりクローン集団を推定したところ (各図の上段)、14例中12例でサブクローナルな集団が見出された。

【3 番染色体短腕における遺伝子変異】

106 例の全エクソン解析において、777 の遺伝子変異が複数症例に重複して観察された。各遺伝子の変異頻度を、バックグラウンドの変異頻度と比較したところ、28 の遺伝子が有意に ($q < 0.05$) 高頻度に変異を生じていると考えられた (表 2)。バックグラウンドの変異頻度は、遺伝子のサイズ (サイズの大きい遺伝子ほど変異が生じやすい) と DNA 複製の際のタイミング (DNA 複製のタイミングが後の遺伝子ほど変異が起こりやすい) を考慮のうえ決定した。上位 5 遺伝子のうち *VHL*、*PBRM1*、*BAP1*、*SETD2* の 4 遺伝子はいずれも 3 番染色体短腕、3p25 から 3p21 の間の領域に位置していた。この領域はコピー数解析において極めて高頻度にヘテロ接合性の消失(LOH)が検出されており、ccRCC において重要な遺伝子変異と考えられた (図 5)。

これらの遺伝子について、136 症例を追加し、合計 240 例において target sequencing による変異解析と、コピー数解析、プロモーターのメチル化の検出を行った。3p LOH は、欠失 (175 例) とコピー数異常の伴わない LOH (uniparental disomy, UPD; 51 例) を合わせ、226 症例 (94%) において観察された (図 6,7a)。3p LOH のない症例には、*BAP1* 遺伝子の変異が 1 例に見られたのみで、それ以外にこれら 4 遺伝子の異常は観察されなかった (図 7a)。3p LOH の見られた 226 例のうち、ほとんどの症例において (221 例、97.8%)、残存アレルの *VHL* 遺伝

表 2 全エクソンシーケンシングにおいて、有意に変異していた遺伝子

| 遺伝子 | ナンセンス | | | 合計 | 症例数 | P 値 | q 値 |
|---------------|-------|-----------------|----|----|-------------------------|------------------------|-----|
| | ミスセンス | /挿入欠失/ スプライス | | | | | |
| <i>VHL</i> | 19 | 23 | 42 | 42 | 1.32×10^{-102} | 1.03×10^{-99} | |
| <i>PBRM1</i> | 4 | 24 | 28 | 28 | 2.63×10^{-36} | 1.02×10^{-33} | |
| <i>BAP1</i> | 3 | 5 | 8 | 8 | 1.82×10^{-09} | 4.71×10^{-07} | |
| <i>TCEB1</i> | 5 | 0 | 5 | 5 | 7.07×10^{-09} | 1.37×10^{-06} | |
| <i>SETD2</i> | 5 | 7 | 12 | 12 | 2.06×10^{-08} | 3.20×10^{-06} | |
| <i>FPGT</i> | 4 | 1 | 5 | 3 | 1.13×10^{-07} | 1.46×10^{-05} | |
| <i>MUDENG</i> | 6 | 1 | 7 | 2 | 3.38×10^{-07} | 3.75×10^{-05} | |
| <i>KEAP1</i> | 3 | 2 | 5 | 5 | 5.95×10^{-05} | 5.13×10^{-03} | |
| <i>TET2</i> | 7 | 1 | 8 | 6 | 5.59×10^{-05} | 5.43×10^{-03} | |
| <i>MUC4</i> | 6 | 0 | 6 | 6 | 1.02×10^{-04} | 7.91×10^{-03} | |
| <i>MLLT10</i> | 3 | 0 | 3 | 3 | 2.30×10^{-04} | 1.49×10^{-02} | |
| <i>KRT32</i> | 3 | 1 | 4 | 4 | 2.21×10^{-04} | 1.56×10^{-02} | |
| <i>MSGN1</i> | 3 | 0 | 3 | 2 | 2.85×10^{-04} | 1.58×10^{-02} | |
| <i>M6PR</i> | 1 | 2 | 3 | 3 | 2.77×10^{-04} | 1.66×10^{-02} | |
| <i>RPL14</i> | 3 | 0 | 3 | 2 | 3.90×10^{-04} | 1.89×10^{-02} | |
| <i>GRB7</i> | 4 | 0 | 4 | 4 | 4.20×10^{-04} | 1.92×10^{-02} | |
| <i>TP53</i> | 1 | 2 | 3 | 3 | 3.85×10^{-04} | 1.99×10^{-02} | |
| <i>CSMD3</i> | 8 | 1 | 9 | 8 | 7.08×10^{-04} | 2.75×10^{-02} | |
| <i>DNHD1</i> | 3 | 1 | 4 | 3 | 6.44×10^{-04} | 2.78×10^{-02} | |
| <i>PIK3CA</i> | 5 | 0 | 5 | 5 | 6.90×10^{-04} | 2.82×10^{-02} | |
| <i>NLRP12</i> | 3 | 0 | 3 | 3 | 8.93×10^{-04} | 3.31×10^{-02} | |
| <i>VMO1</i> | 2 | 0 | 2 | 2 | 9.89×10^{-04} | 3.49×10^{-02} | |
| <i>OR4C13</i> | 2 | 1 | 3 | 3 | 1.10×10^{-03} | 3.72×10^{-02} | |
| <i>KCNMA1</i> | 4 | 1 | 5 | 5 | 1.24×10^{-03} | 4.00×10^{-02} | |
| <i>MTOR</i> | 7 | 0 | 7 | 6 | 1.44×10^{-03} | 4.48×10^{-02} | |
| <i>LMAN2L</i> | 1 | 2 | 3 | 2 | 1.69×10^{-03} | 4.68×10^{-02} | |
| <i>YIPF3</i> | 2 | 1 | 3 | 2 | 1.57×10^{-03} | 4.69×10^{-02} | |
| <i>ZNF536</i> | 5 | 0 | 5 | 5 | 1.63×10^{-03} | 4.70×10^{-02} | |

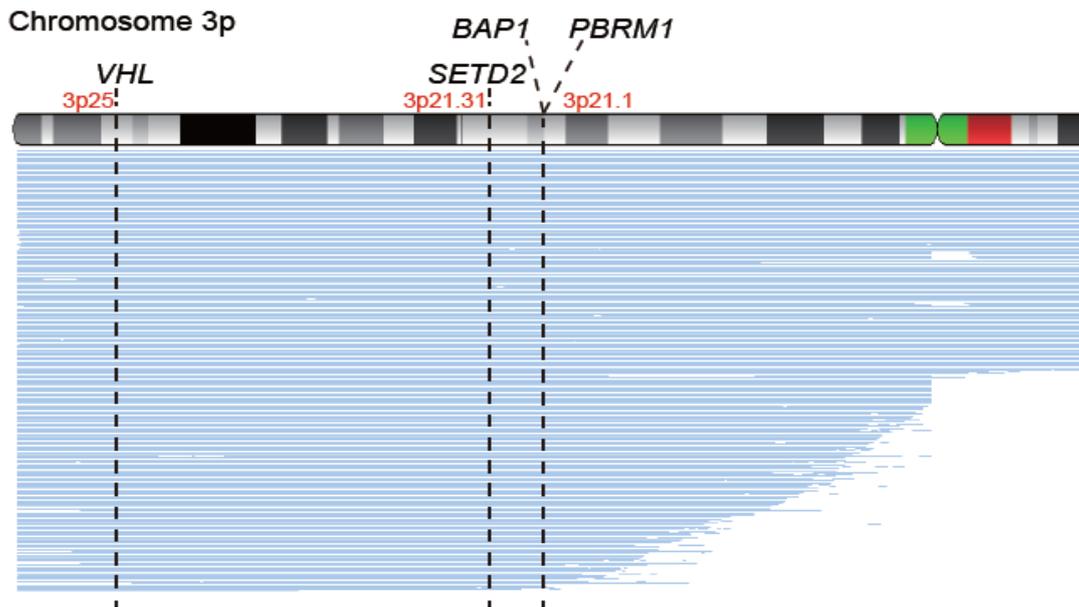


図 5 3 番染色体短腕の LOH

SNP アレイによるコピー数解析において、各症例で検出された 3 番染色体短腕の LOH 領域を青線で示す (240 例中 226 例)。高頻度に変異が見られた 4 遺伝子は、LOH の集積している領域 (3p25-3p21.1) に存在していた。

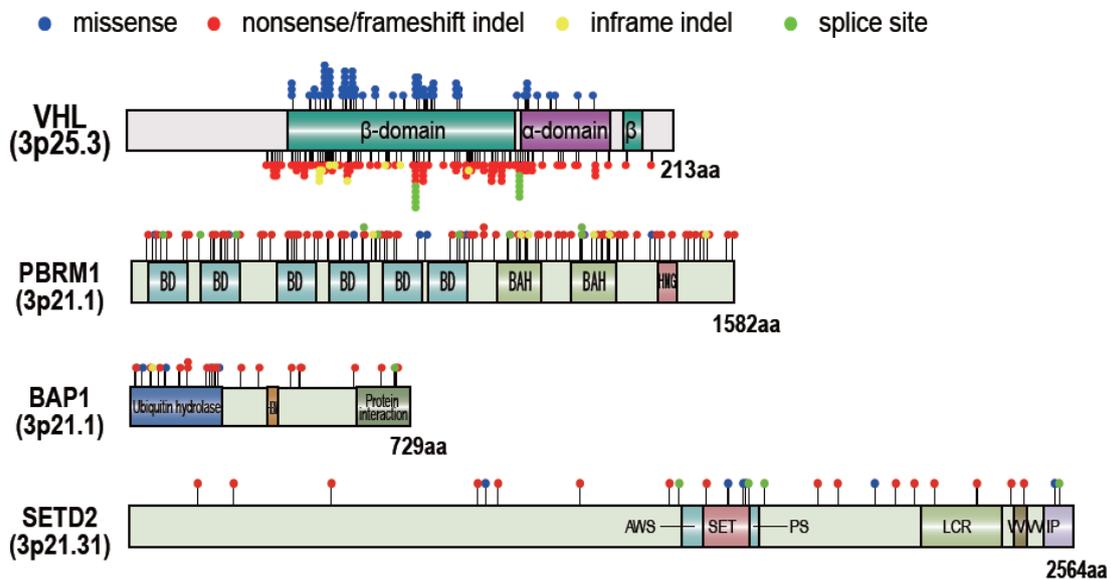


図 6 VHL、PBRM1、BAP1、SETD2 の変異の分布

全エクソンシーケンシングにて高頻度に変異し、3 番染色体短腕に存在する 4 遺伝子 (*VHL*, *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2*) について、240 例の変異解析を行った。各変異を丸で示し、変異の種類を凡例のごとく色で示す。知られている機能ドメインは、色のついたボックスで示す。4 遺伝子ともタンパクの機能喪失を生じる変異が多く見られた。

子は変異（197例；ナンセンス変異16例、ミスセンス変異70例、挿入欠失100例、スプライスサイト変異11例）もしくはプロモーターのメチル化（24例）が生じていた。*PBRM1*、*BAP1*、*SETD2*については、変異は高頻度に検出されたものの、プロモーターのメチル化は見られなかった。また、*PBRM1*の変異と*BAP1*の変異は、排他的に生じていた($P = 2.05 \times 10^{-3}$, Fischer's exact test)。これら3遺伝子の変異のほとんどは（149変異中147変異）、*VHL*の変異またはメチル化を来している症例に生じていた（*PBRM1*: 98変異全て、*BAP1*: 25変異中24変異、*SETD2*: 26変異中25変異）（図7a）。このうち*PBRM1*の変異例では、*PBRM1*の変異アレル頻度と*VHL*の変異アレル頻度の間に有意な差がなかったのに対し、*BAP1*および*SETD2*の変異例では、*BAP1/SETD2*の変異アレル頻度が*VHL*の変異アレル頻度よりも明らかに低い症例が存在した（図7b）。このことから、*VHL*および*PBRM1*の変異はccRCCの発生の早期から先行して生じているのに対し、*BAP1*あるいは*SETD2*の変異は、後から生じることで、腫瘍の進展や転移に関わっていることが示唆された。

次に、これらの変異の有無と予後との関連について解析した。最近の報告²⁶⁻²⁸と同様に、*PBRM1*の変異の有無は予後に影響を与えなかったのに対し、*BAP1*の変異例は全生存率が有意に低かった(hazards ratio (HR) = 2.58, 95% confidence interval (CI) = 1.13–5.90; $P = 0.0203$)。また、*SETD2*の変異例は高頻度に転移をき

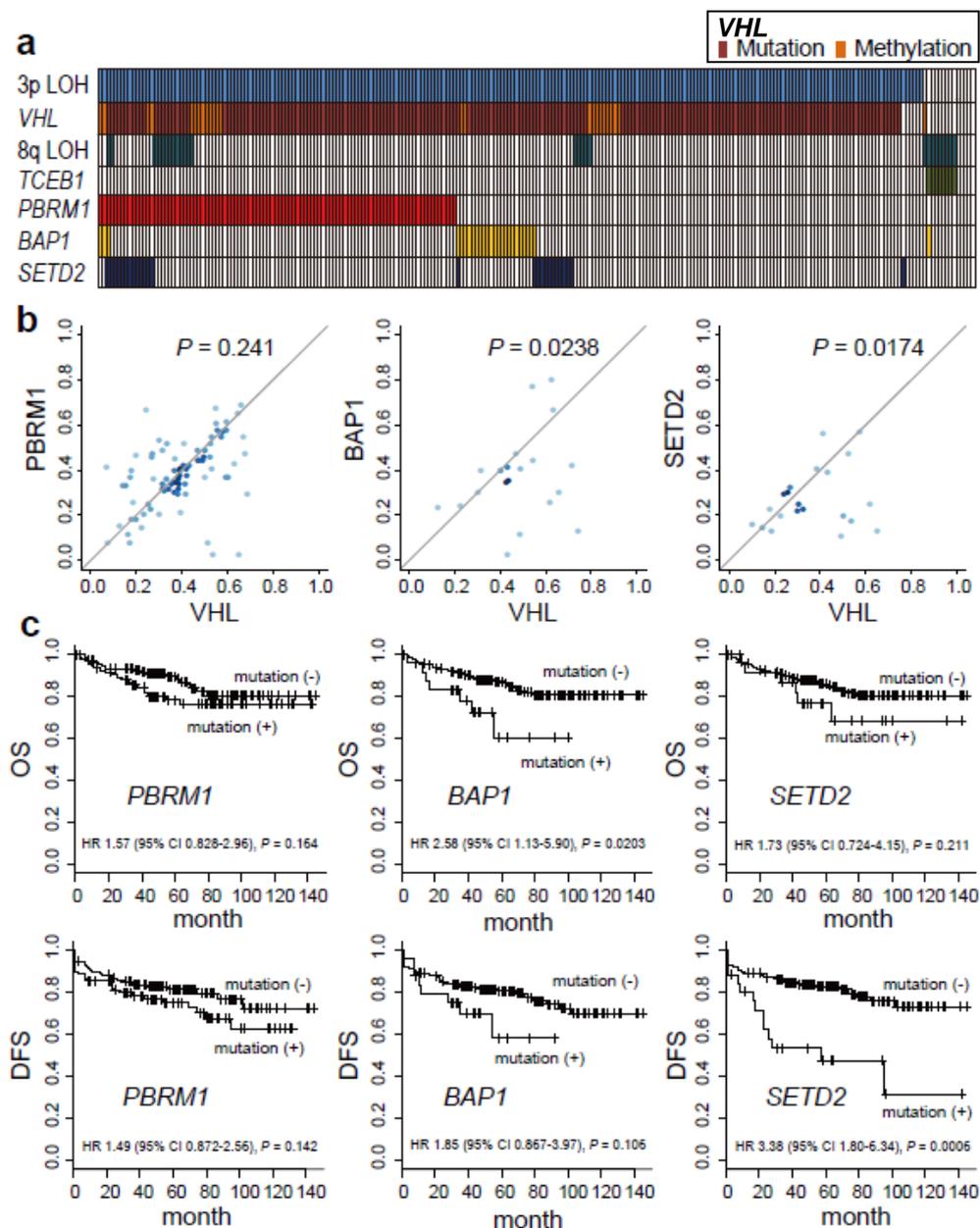


図 7 主要な遺伝子変異と予後との関連

(a) 240 症例において、コピー数解析で検出された 3p ならびに 8q LOH の有無と、主要な遺伝子の変異の有無をそれぞれの色で示す。VHL 遺伝子はプロモーターのメチル化の有無も示す。約 90% の症例で VHL の不活化が見られた。また PBRM1 変異と BAP1 変異は排他的に生じていた。

(b) PBRM1・BAP1・SETD2 変異について、変異アリアル頻度を VHL 変異のアリアル頻度と比較したプロットを示す。P 値は Paired t test にて計算した。PBRM1 変異と VHL 変異にはアリアル頻度の差はなかったが、BAP1 変異と SETD2 変異は VHL 変異よりも有意にアリアル頻度が低かった。

(c) 変異の有無が、全生存率 (OS) および無病生存率 (DFS) に及ぼす影響を検討した。BAP1 変異例は有意に OS が低く、SETD2 変異例は DFS が低かった。

たしており、無病生存率が有意に低かったが(HR = 3.38, 95% CI =1.80–6.34; $P = 6.00 \times 10^{-4}$)、全生存率においては有意差を認めなかった (図 7c)。

【ccRCC における *TCEB1* 変異】

前述の、3p に存在する 4 遺伝子とならんで、有意に高頻度に変異を生じていたのが *TCEB1* であった。*TCEB1* は 8q に存在し、Elongin C タンパクをコードしている²⁹。Elongin C は、Elongin A および Elongin B とともに RNA polymerase II Elongin complex を形成し、mRNA の伸長に関わっていると言われていたが、それに加え VHL および Elongin B とともに、VHL complex の重要な構成要素であることも知られている。VHL complex は、RBX1 および CUL2 とともに HIF のユビキチン化を促している¹⁰ (図 8a)。240 症例を対象に、*TCEB1*、*TCEB2* (Elongin B をコードする遺伝子)、*RBX1* および *CUL2* の変異解析を行ったところ、8 例 (3.3%) に *TCEB1* の変異を認めた。*TCEB2*、*RBX1*、*CUL2* の変異は認めなかった。*VHL* の変異/メチル化と *TCEB1* 変異は完全に排他的に生じており、両者を合計すると 240 例中 229 例(95.4%)に VHL complex の異常を認めた (図 7a)。このことは、ccRCC の分子病態において、VHL complex の不活化が果たす役割を、さらに強調するものと考えられた。*VHL* の変異およびメチル化は、3p LOH と関連して生じていたが、*TCEB1* 変異例は常に 8q LOH、すなわち野生型の *TCEB1*

アリの消失を伴っていた (図 7a)。しかしながら、*VHL* の変異がナンセンス変異やフレームシフト変異など、タンパクの完全な機能喪失をきたす変異が高頻度に見られたのに対し、*TCEB1* の変異は Tyr79 (7 例) および Ala100 (1 例) の 2 か所のアミノ酸に対応する塩基の SNV のみが見られ、前者アミノ酸に hot spot を形成していた (図 8b)。注目すべきことに、この 2 つのアミノ酸は、Elongin C と *VHL* の結合部位付近に位置していた (図 8c)。Tyr79 は水分子を介して *VHL* の Pro154 と水素結合を (図 8d)、Ala100 は *VHL* の Val165 ならびに Val166 と疎水性相互作用をしており (図 8e)、*VHL* との結合に重要な役割を果たしていると考えられた。したがって、*TCEB1* 変異によるこの 2 つのアミノ酸の置換 (Tyr79Cys、Tyr79Ser、Ala100Pro) により、Elongin C と *VHL* の間の相互作用が阻害され、その結果 HIF がユビキチン化されず蓄積すると予測された (図 8f-h)。

このことを検証するために、まず HEK293T 細胞に野生型ならびに変異型 (Tyr79Cys、Ala100Pro) の Elongin C (HA 配列をタグ付け) を発現させ、*VHL* と複合体を形成しているかどうか検討した。細胞からタンパク溶液を回収し、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行い、引き続き抗 HA、抗 *VHL*、抗 Elongin B、抗 CUL3 抗体にてウエスタンブロットを行った。その結果、野生型の Elongin C は *VHL* ならびに CUL3 と複合体を形成していることが確認されたが、変異型の Elongin C と *VHL*・CUL3 との相互作用は顕著に低下していた (図 9a)。次に野

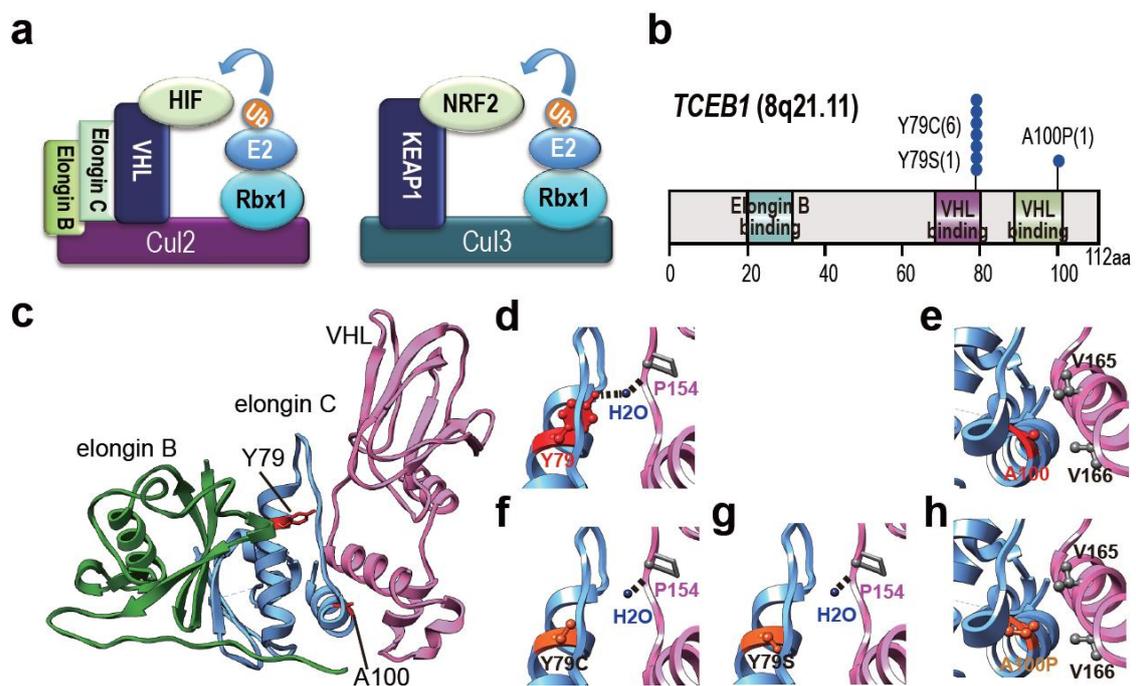


図 8 ccRCC における *TCEB1* 変異

(a) VHL 複合体と KEAP1-NRF2 複合体の模式図を示す。いずれも CUL2/3 および RBX1 を介して基質タンパク (HIF/NRF2) をユビキチン化し、プロテアソームでの分解を促す。

(b) 240 例中 8 例に *TCEB1* 変異を認めた。変異の分布を示す。変異は Y79 および A100 の 2 か所のアミノ酸に生じており、前者では hot spot を形成していた。

(c) VHL、Elongin B、Elongin C の結晶構造を示す。Elongin C で変異を生じる Y79 および A100 (赤で表示) は VHL との結合部位に位置していた。

(d-h) Y79 は水分子を介して VHL の P154 と水素結合を形成しており (d)、A100 は VHL の V165/V166 と疎水性相互作用を形成している。これらのアミノ酸の置換により (f-h)、結合が阻害されると考えられた。

野生型・変異型の Elongin C を発現させた HeLa 細胞を用いて、HIF の分解・蓄積に対する影響について検討した。単純に野生型・変異型の Elongin C を外因性に発現させたのみでは HIF の蓄積は見られなかったが、siRNA を用いて内因性に発現している Elongin C を knock-down した場合には、野生型の Elongin C を発現させた HeLa 細胞では HIF が蓄積しなかったのに対し、Mock および変異型の

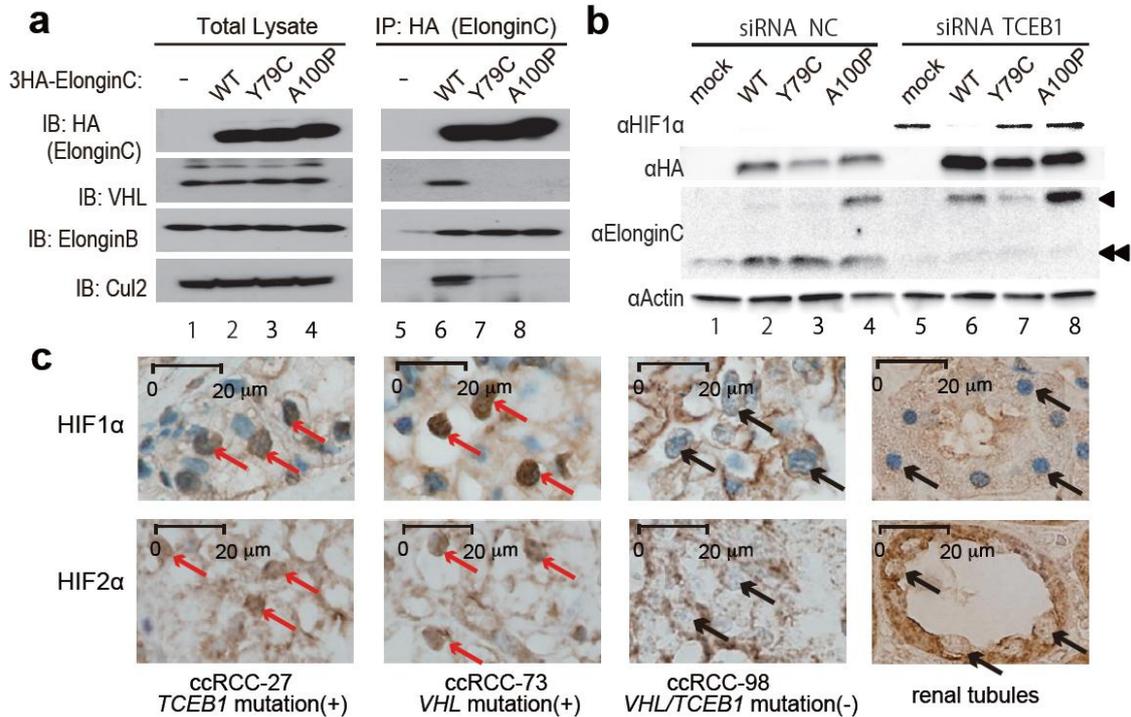


図9 変異型 Elongin C の機能解析

(a) 293T 細胞に、HA でタグ付けした野生型ならびに変異型 Elongin C を発現させた。各細胞において、それぞれのタンパクの細胞内での発現量の差がないことを確認した (左側のパネル)。抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行い、それぞれのタンパクに対する抗体で、イムノブロット解析を行ったところ、野生型 Elongin C は VHL/Elongin B/CUL3 と複合体を形成しているのに対し、変異型 Elongin C は VHL および CUL3 との結合が阻害されていることが確認された (右側のパネル)。

(b) HeLa 細胞に野生型ならびに変異型 Elongin C を発現させ、HIF の蓄積を検討した。細胞に変異型 Elongin C を発現させるのみでは HIF は蓄積しなかったが (左側のパネル)、内因性の Elongin C を siRNA を用いて knock down したうえで (◀◀)、外因性に変異型の Elongin C を発現させると (◀)、HIF が蓄積した (右側のパネル)。

(c) 手術検体における HIF の免疫染色の結果を示す。TCEB1 変異例および VHL 変異例では腫瘍細胞の核内の濃染が見られ、HIF の蓄積が示された (赤矢印)。一方、VHL/TCEB1 のどちらも以上がない例や、正常尿細管上皮においては、核の染色は見られなかった (黒矢印)。

Elongin C を発現させた HeLa 細胞では、HIF の蓄積が認められた (図 9b)。これ

らの結果から、TCEB1 の変異により Elongin C は VHL complex の形成に関する

機能を喪失するが、HIFが蓄積するためには両アリの不活性化が必要であることが明らかとなった。このことは、TCEB1変異例において、常に8q LOHが見られることと合致すると考えられた。

TCEB1変異によるこれらの効果が、実際にccRCCで生じていることを確認するために、Exome-cohortの手術検体を用いてHIFの免疫染色を行った。Exome-cohortのうちTCEB1変異例は5例あったが、全例において、VHL変異例と同様にHIFの発現が認められた(図9c)。

【その他のドライバー変異】

TCEB1 の他には、*TET2*、*KEAP1* および *MTOR* の変異が ccRCC で生じていることが明らかとなった (図 10)。

TET2 は α -ketoglutarate-dependent oxygenase をコードしており、造血器腫瘍において高頻度に変異・不活化していることが知られている^{30,31}。このタンパクは 5-methylcytosine から 5-hydroxymethylcytosine への変換を触媒しており、DNA の脱メチル化の際の重要な酵素と考えられている。これまでに固形腫瘍における *TET2* 変異は、大腸癌で低頻度 (214 例中 5 例、2.3%) に認められているのみであるが³²、今回の ccRCC においては 106 例中 6 例 (5.7%) に変異が認められた (図 11)。SNP アレイによるコピー数解析においても、*TET2* は有意に欠失が生じている領域 (4q24、11 例) に含まれていた (図 12)。両者を合わせると、17 例 (16.0%) において *TET2* は変異または欠失していたが、両アレルが不活化している症例は 1 例もなく、ccRCC の分子病態における *TET2* の haploinsufficiency が示唆された。

KEAP1 は *NRF2* (*NFE2L2*) と結合することで、*NRF2* のユビキチン化と分解を促しており³³ (図 8a)、*CUL3* とともに酸化ストレス応答において重要な役割を果たしていると言われている。これまでに肺癌をはじめとするいくつかの固形腫瘍において、*KEAP1* や *NRF2* が変異することにより両者の結合が阻害され、

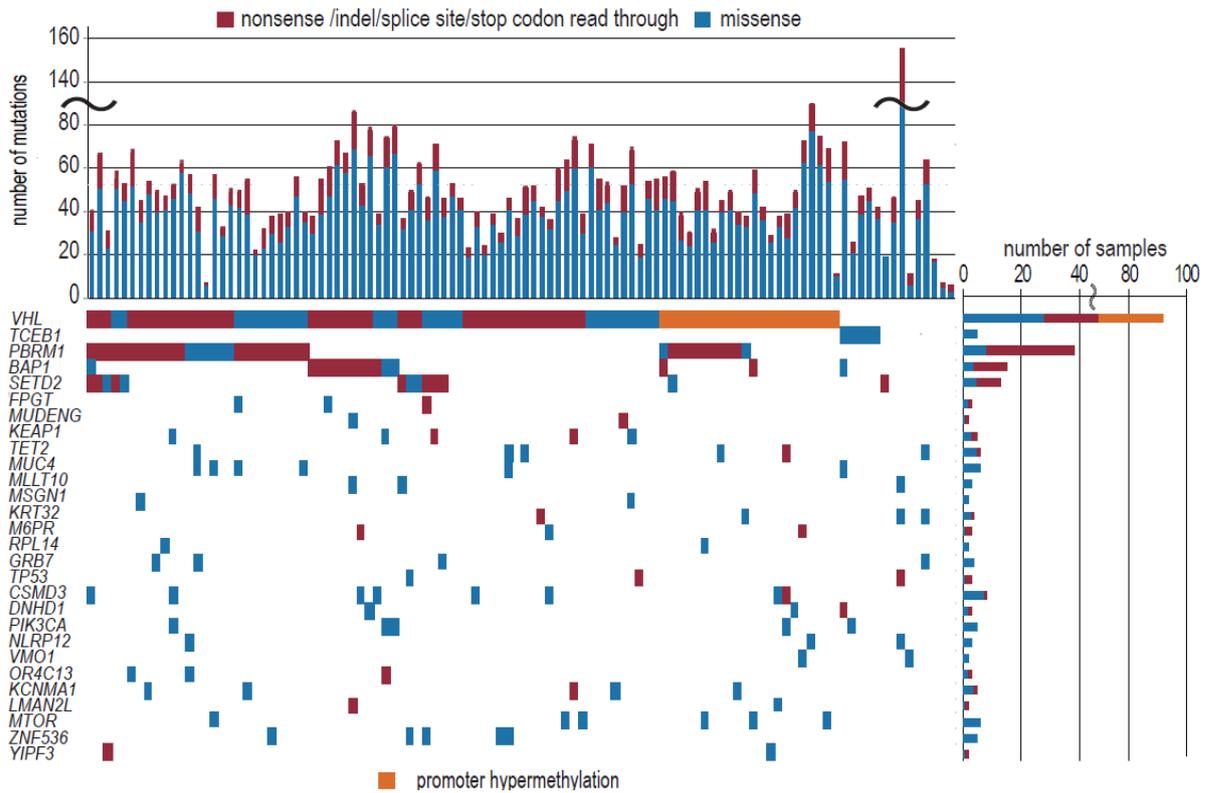


図 10 全エクソンシーケンシングにより検出された変異

全エクソンシーケンシングの結果、バックグラウンドの変異頻度に対して有意に変異を生じている遺伝子について、106 症例の変異の分布を示す。上部には症例ごとの変異数を、右側には遺伝子ごとの変異頻度を棒グラフにて示す。

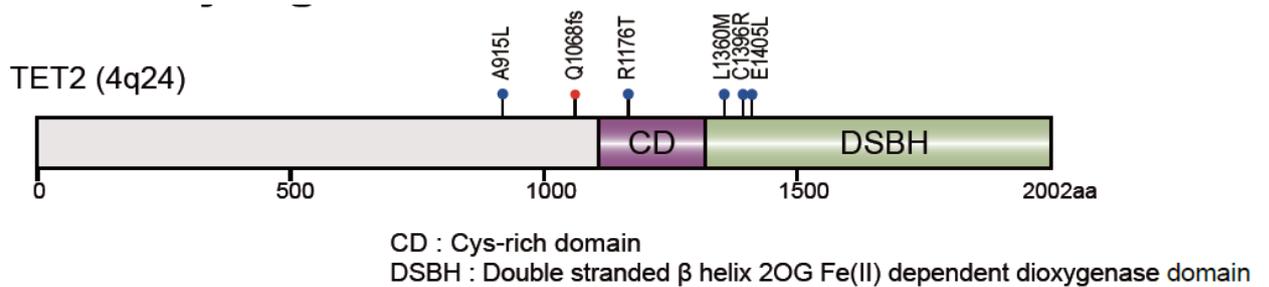


図 11 *TET2* 変異

全エクソンシーケンシングによって、106 例中 6 例に *TET2* の変異を検出した。検出した変異の分布を図に示す。ミスセンス変異は青丸で、フレームシフト変異は赤丸で示す。ミスセンス変異 5 例中 4 例は、機能ドメインに生じていた。

NRF2 が蓄積して異常な転写活性が引き起こされることが知られている³⁴⁻³⁶。今回の ccRCC においては、106 例中に *KEAP1* の変異を 5 例、*NRF2* と *CUL3* の変異をそれぞれ 1 例に認め、これらの変異は排他的に生じていた (合計 7 例、6.6%)。また、これらの変異がない症例のうち 11 例 (10.4%) において *CUL3* の領域 (2q36) の欠失を認めた (図 12)。最近の研究で、2 型乳頭状腎細胞癌 (pRCC2) において *NRF2* および *CUL3* の変異が報告されているため³⁷、*KEAP1/NRF2/CUL3* の変異例について病理像の見直しを行ったが、pRCC2 を思わせるような所見はなく、ccRCC の診断に変更はないと考えられた。

また、106 例中 6 例 (5.7%) に *MTOR* の変異が認められた (図 13a)。*PTEN* (2 例)、*PIK3CA* (5 例)、*PIK3CG* (2 例)、*RPS6KA2* (3 例)、*TSC1/TSC2* (2 例) およびその他の関連遺伝子を合わせ、合計 28 例 (26.0%) に PI3K-AKT-mTOR シグナリングに関わる遺伝子の変異を認めた (図 13b)。これらの変異は、*PTEN* と *AKT2* の両者が変異していた 2 症例を除き、排他的に生じていた。このパスウェイの異常が ccRCC の分子病態において重要な位置を占めていることは、The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA) による最近の報告においても述べられている³⁸。*mTOR* 阻害薬は既に ccRCC に対して使用されており、今回の結果は ccRCC の治療における *mTOR* 阻害薬の役割について、新たな視点を与えるものと考えられる。

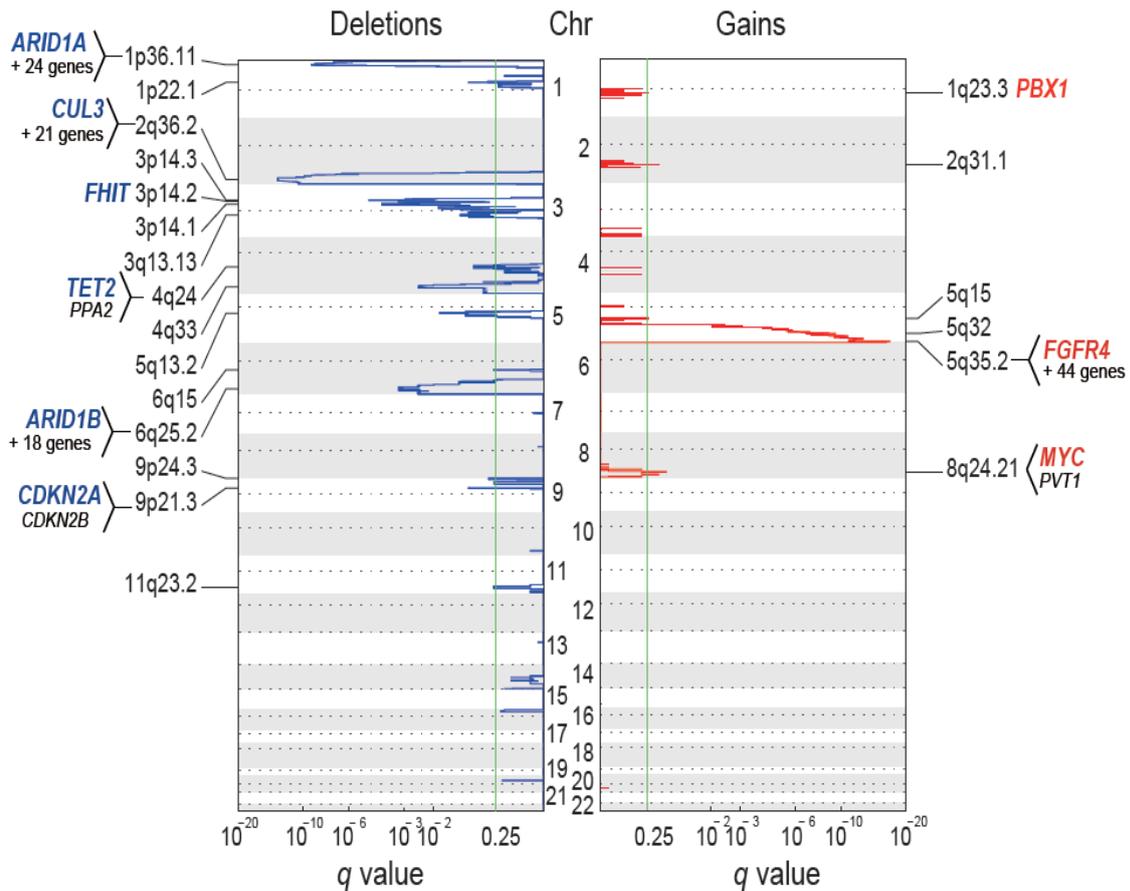


図 12 有意にコピー数異常を生じていた領域

SNPアレイによるコピー数解析によって決定した240症例のコピー数データを用いて、GISTIC2.0による解析を行った。バックグラウンドのコピー数異常の頻度に対して、有意に ($q < 0.25$) コピー数異常を生じていた領域を検出した。検出された領域内に、既知の癌遺伝子・癌抑制遺伝子が含まれていた場合は、これを記載した。

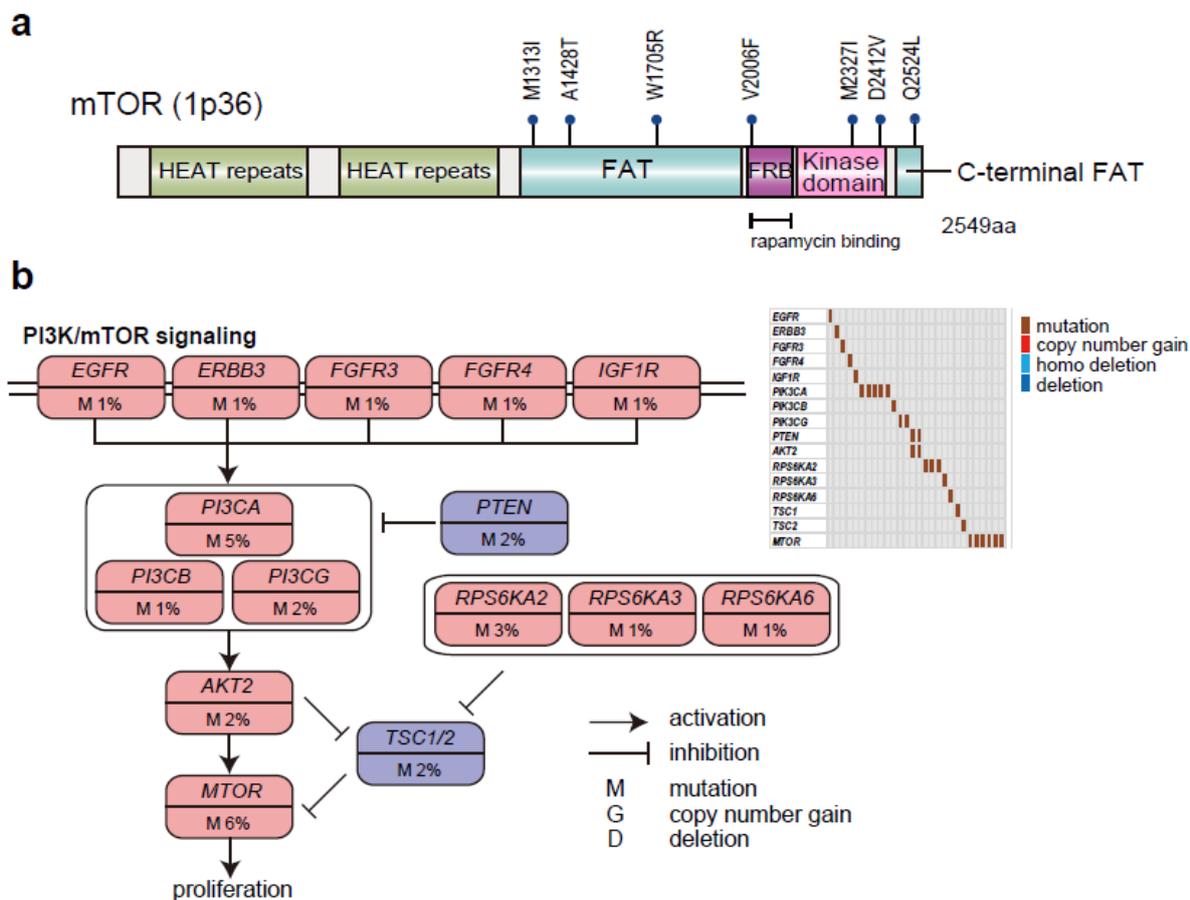


図 13 ccRCC における PI3K-AKT-mTOR シグナリングの異常

(a) 全エクソンシーケンシングにて 106 例中 7 例に *MTOR* の変異を検出した。検出した変異の分布を示す。いずれの変異もミスセンス変異であった。機能ドメインをボックスで示す。

(b) 全エクソンシーケンシングにて、26%の症例に PI3K-AKT-mTOR シグナリングに関する遺伝子の変異を認めた。タンパクの機能上、癌遺伝子であることが想定されるものは赤で、癌抑制遺伝子であることが想定されるものは青で示す。各遺伝子の変異頻度を、遺伝子名の下に示す。*PTEN* 変異と *AKT2* 変異が重複していた 2 例を除き、これらの遺伝子変異は排他的に生じていた。

【ゲノムコピー数異常】

240 症例を対象に SNP アレイによるコピー数解析を行い、ccRCC の分子病態に寄与していると考えられる遺伝子の検出を試みた。ccRCC では focal な欠失や高度増幅は少なく、大部分のコピー数異常は染色体または染色体腕全体を含むような、広い範囲の増幅・欠失であった。ほとんどの症例で 3p LOH (94%) を認めたほか、5q gain (65%)、7q gain (41%)、8p LOH (20%)、9p LOH (15%)、14q LOH (27%)、18q LOH (11%) が高頻度に観察された (図 14)。また、多倍体化した腫瘍 (ploidy > 2.5 と定義) を 42 例 (17.5%) に認めた。これらの症例は他の症例と比べて、高頻度に再発・転移をきたし ($P = 2.98 \times 10^{-5}$)、有意に予後が不良であった ($P = 3.93 \times 10^{-2}$)。

GISTIC 2.0 を用いた解析では、有意に増幅または欠失していた領域を 21 か所検出した (増幅 6 か所、欠失 15 か所) (図 12)。これらの中には、*ARID1A* (1p36.11)、*CUL3* (2q36.2)、*FHIT* (3p14.2)、*TET2* (4q24)、*ARID1B* (6q25.2)、*CDKN2A/CDKN2B* (9p21.3)、*PBX1* (1q23.3)、*FGFR4* (5q35.2)、*MYC* (8q24) など、既知の癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子が含まれていた。

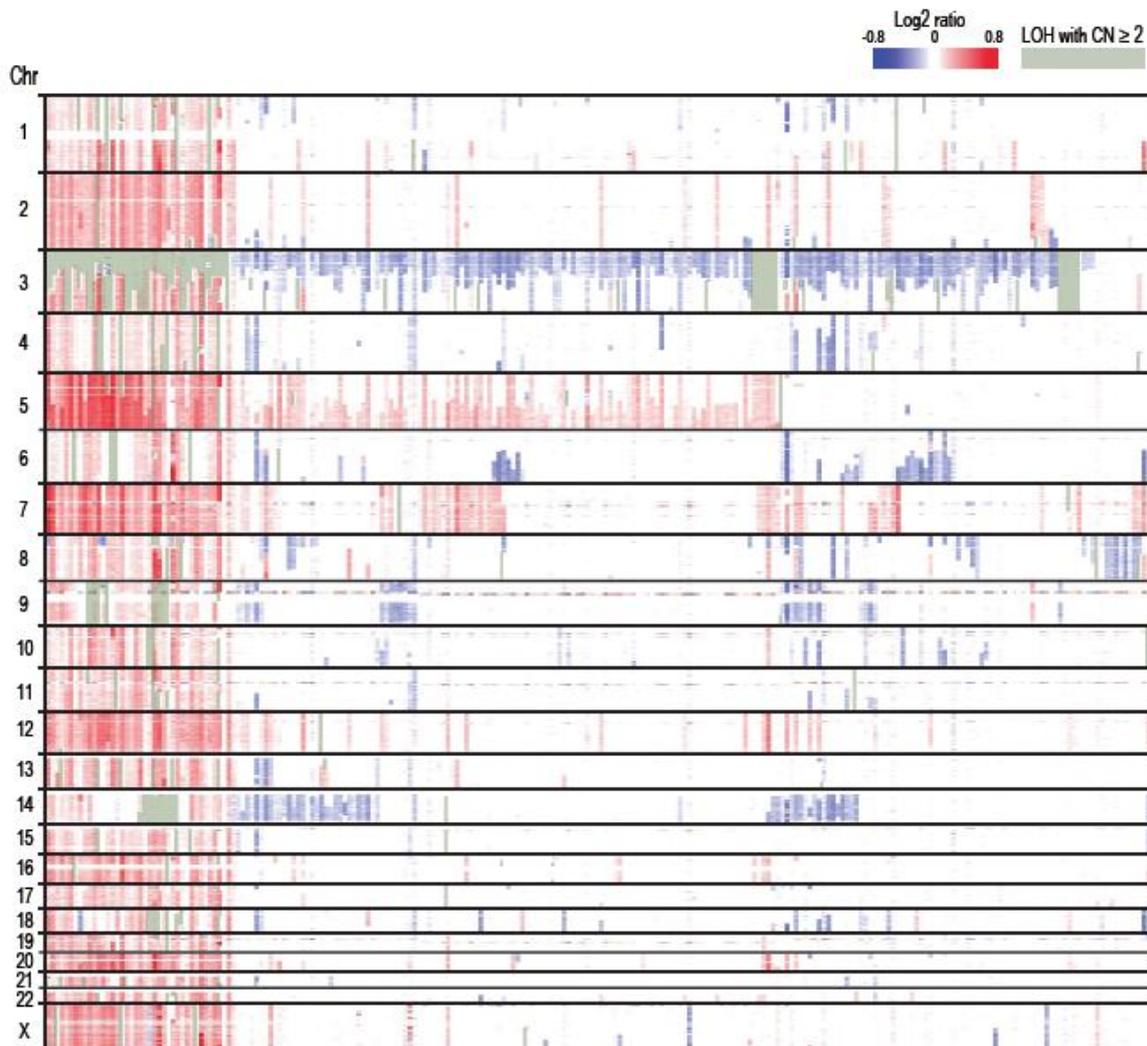


図 14 ccRCC におけるコピー数プロファイル

240 例に対して SNP アレイによるコピー数解析と LOH の検出を行った。横軸に症例を並べ、縦軸は染色体上の位置とし、コピー数が増加していた領域を赤の、減少していた領域を青のグラジエントで示す。コピー数異常の伴わない LOH (UPD) を緑で示す。左側に、ほとんどの染色体でコピー数が増加した、多倍体化した腫瘍を認める。

【ccRCC において異常をきたしているパスウェイ】

全エクソン解析にて検出された体細胞性変異のうち、RNA シーケンシング

においても認められた変異は約 40%であり、半数以上の変異は発現していなかった。発現の見られない変異は、ccRCC の病態に寄与している可能性が低いと考え、パスウェイ解析からは除外した。データベース (the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)、BioCarta、Reactome、Sigma-Aldrich、Signaling Transduction KE) に登録されているパスウェイについて、バックグラウンドの変異頻度と比較して有意に変異を生じているものを抽出したところ ($q < 0.01$)、前述の PI3K-AKT-mTOR シグナリングに加え、p53 シグナリング/cell cycle checkpoint、mRNA processing、SWI/SNF complex に関する遺伝子に、高頻度に変異が生じていた。TP53 の変異を生じていたのは 106 例中 3 例のみであったが、ATM (2 例)、CHEK2 (1 例)、MDM2 (1 例)、E2F3 (1 例) の変異例に加え、CDKN2A (9p21) の欠失例 (17 例、うち 4 例はホモ欠失) と MYC (8q24) の増幅例 (24 例) を加えると、合計 42 例 (40%) の症例において、p53 シグナリング/cell cycle checkpoint に関する遺伝子の異常を認めた (図 15a)。

mRNA processing に関する遺伝子の異常は、ccRCC ではこれまで報告されていない。スプライシングに関わる遺伝子が高頻度に変異していることが、MDS や他の造血器腫瘍で知られているが、それらの変異遺伝子はいずれも mRNA 合成の初期段階である、3'スプライスサイトの認識に関わる遺伝子である³⁹。一方、ccRCC において変異している遺伝子は、イントロンの放出、3'末端の合成、mRNA

の細胞質への輸送など、より後のステップに関わるものであった (図 16)。

PBRM1 は ccRCC において 2 番目に高頻度に変異している遺伝子であり、SWI/SNF complex の構成要素である BAF180 をコードしている。SWI/SNF complex は、ATP 依存的にヌクレオソームをリモデリングすることで、クロマチ

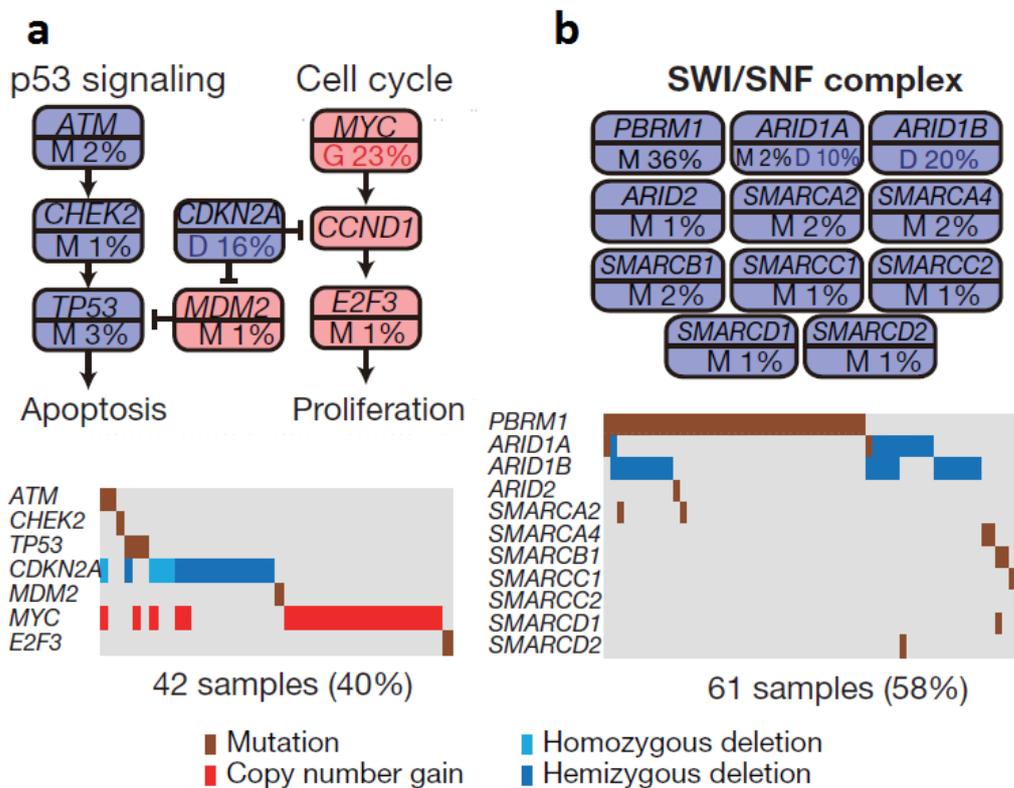


図 15 ccRCC において高頻度に異常を生じていたパスウェイ

(a) 全エクソンシーケンシングで検出された変異と、コピー数解析で検出されたコピー数異常を合わせ、40%の症例に p53 シグナリング/cell cycle checkpoint に関する遺伝子のゲノム異常を認めた (下のパネル)。癌遺伝子と想定されるものは赤で、癌抑制遺伝子と想定されるものは青で示し、遺伝子名の下に変異およびコピー数異常の頻度を示す (上のパネル)。

(b) 全エクソンシーケンシングで検出された変異と、コピー数解析で検出されたコピー数異常を合わせ、58%の症例に SWI/SNF complex を構成する遺伝子のゲノム異常を認めた (下のパネル)。これらの遺伝子は、癌抑制遺伝子として働いていると考えられている。遺伝子名の下に変異およびコピー数異常の頻度を示す (上のパネル)。

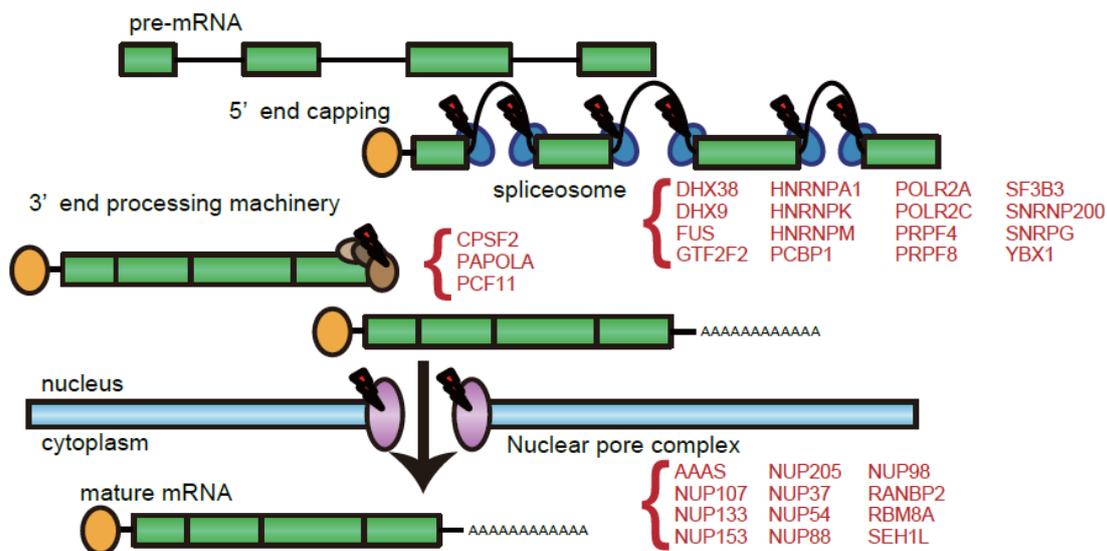


図 16 ccRCC における RNA スプライシング関連遺伝子の変異

全エクソンシーケンシングにて変異が検出された、RNA スプライシング関連遺伝子を、mRNA の生合成に関する模式図とともに示す。変異遺伝子は主に、イントロンの放出、3'末端の合成、mRNA の細胞質への輸送などのステップに関わるものであった。

ン構造の制御を行っている。様々な悪性腫瘍において、SWI/SNF complex の遺伝子異常が生じていることが知られているが、ccRCC においては *PBRM1* 以外に *ARID1A* (2 例)、*SMARCA2* (2 例)、*SMARCA4* (2 例)、*SMARCB1* (2 例) などの変異が見られた。また、*ARID1A* (1p36) および *ARID1B* (6q25) は、コピー数解析において、有意に欠失を生じている領域に含まれていた (図 12)。これらを合計すると、61 例 (58%) において SWI/SNF complex の異常が検出された (図 15b)。これらの遺伝子異常は、必ずしも排他的に生じているわけではなく、5 症例では 2 つ以上の遺伝子に変異が生じていた。このような現象は、他の癌腫においても報告されている⁴⁰。これらの 5 症例は、他の症例と比較して、有意に予

後が不良であり (HR = 5.40, 95%CI = 1.56–14.5; P = 0.0113)、SWI/SNF complex を構成する遺伝子に複数の変異が生じると、悪性度の高い癌となる可能性が考えられた。

【RNA シークエンシングによる癒合遺伝子の検出】

Exome-cohort 106 例のうち 100 例に対して RNA シークエンシングを行い、25 症例において 44 個の癒合遺伝子を検出した。このうち in frame だったのは、14 個であった。複数症例において共通して生じていたものはなく、ccRCC の分子病態には、癒合遺伝子の寄与は少ないものと考えられた。*NONO-TFE3* の癒合を

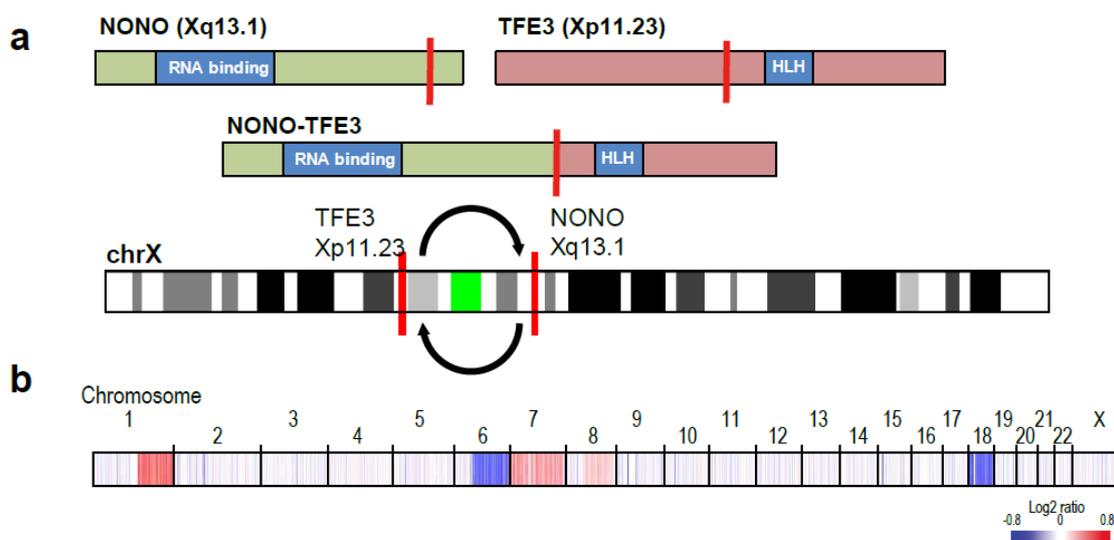


図 17 RNA シークエンシングで検出された *NONO-TFE3* 癒合遺伝子

(a) RNA シークエンシングを行った 100 例のうち 1 例に、*NONO-TFE3* 癒合遺伝子を検出した。NONO, TFE3 および癒合遺伝子の機能ドメインを青のボックスで示し、切断点を赤線で示す (上のパネル)。*TFE3* は Xp11.23 に、*NONO* は Xq13.1 に位置しており、X 染色体の逆位が生じていると考えられた (下のパネル)。

(b) *NONO-TFE3* 癒合遺伝子を認めた症例のコピー数プロファイルを示す。コピー数増加は赤で、減少は青で示す。この症例では、3p LOH や 5q gain など ccRCC に特徴的なコピー数異常を欠いていた。

1例に認めたが（図 17a）、これは Xp11 translocation RCC に生じる癒合遺伝子の 1 つとして知られている。*TFE3* は Xp11 に位置しており、転写因子として知られているが、染色体転座や逆位により、*NONO* を含めいくつかの遺伝子と癒合し、腎癌の発生に関与すると言われている^{41,42}。本症例は、乳頭状構造など Xp11 translocation RCC に特徴的とされる病理所見を欠いており、通常の ccRCC の病理像との区別は困難であった。しかしながら、免疫染色を施行したところ *TFE3* が強く染まり、また *VHL* や *TCEB1* の変異は見られず、コピー数異常のパターンも、典型的な ccRCC のものとは全く異なっていた（図 17b）。*TFE3* に関連した癒合遺伝子を有しながら病理像は ccRCC と区別がつかないケースは、他のグループからも報告されており⁴³、腎癌を診断するうえで、十分に留意すべき点と考えられる。

【ccRCCにおける統合的な分子解析】

ccRCC は、遺伝子発現のパターンにより、血管新生に関する遺伝子の発現が亢進した ccA と、細胞周期の進行に関する遺伝子の発現が亢進した ccB の 2 つのサブグループに分類されることが知られているが²³、今回の症例においても同様の分類が可能であった (図 18)。また、*PBRM1* 変異例と *BAP1* 変異例の発現プロファイルを、GSEA を用いて比較したところ、前者では低酸素環境下にて発現が誘導される遺伝子が高発現していたのに対し、後者では polycomb repressive complex 2 (PRC2) の標的遺伝子の発現低下が特徴的であった (図 19)。

DNA メチル化の状態にもとづいて症例をクラスタリングしたところ、3 つのサブグループに分類された (図 20)。この 3 つのサブグループの間で、全体の DNA メチル化の程度に有意な差がみられたことから (図 21)、それぞれを高メチル化群、中メチル化群、低メチル化群と定義した。クラスタリングに使用された 3,562 のプローブのうち 1,672 プローブ (1,228 遺伝子) は、高メチル化群と低メチル化群の間でメチル化の程度 (β -value) に有意差を認めた。この 1,228 遺伝子について、The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)⁴⁴ を用いて、どのような機能の遺伝子の DNA がメチル化されているかを検討したところ、高メチル化群ではホメオボックス遺伝子群が強くメチル化されていることが明らかとなった (表 3)。また GSEA を用いた解析では、高メ

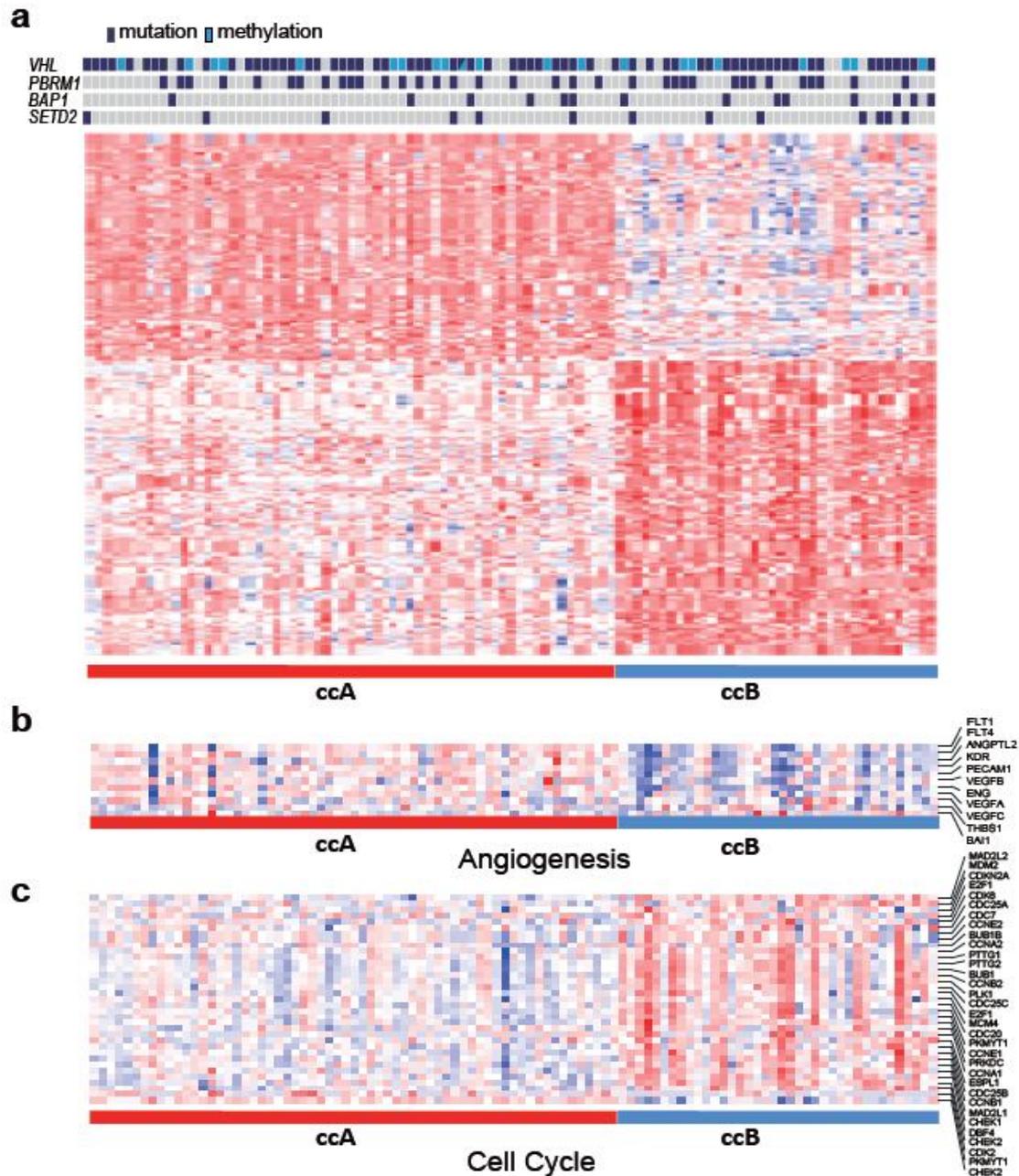


図 18 発現プロファイルによる ccRCC の分類

(a) K-means クラスタ法を用いて、101 例の ccRCC を発現プロファイルに基づいて ccA および ccB の 2 つのサブグループに分類した。横軸に症例を、縦軸に遺伝子を並べ、発現が高いものを赤で、低いものを青で示す。上に主要な遺伝子の変異ならびにメチル化の有無を示す。ccA あるいは ccB に偏って生じている変異は見られなかった。

(b) 血管新生に関する遺伝子の発現を示す。右側に遺伝子名を示す。ccA では ccB に比べてこれらの遺伝子の発現が亢進していた。

(c) 細胞周期の進行に関する遺伝子の発現を示す。右側に遺伝子名を示す。ccB では ccA に比べてこれらの遺伝子の発現が亢進していた。

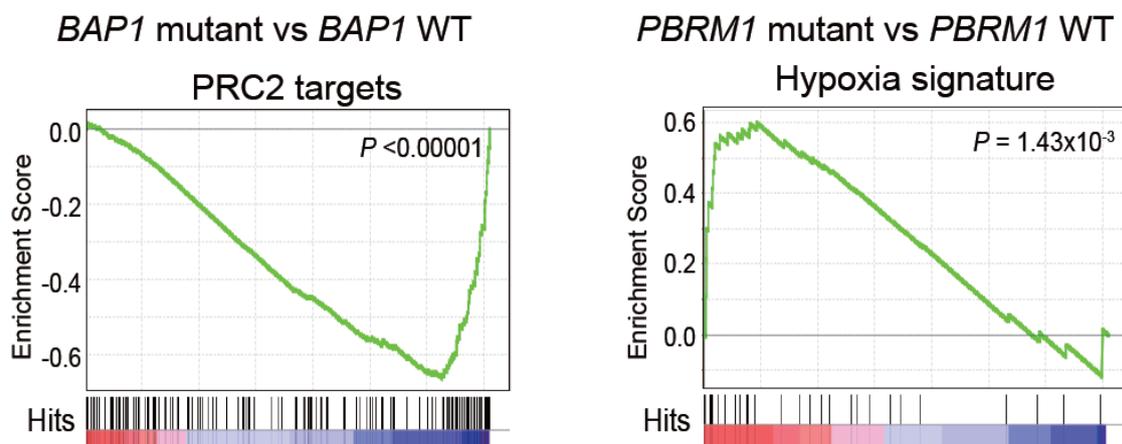


図 19 *BAP1* 変異例と *PBRM1* 変異例の発現プロファイルの違い

BAP1 変異例および *PBRM1* 変異例において、発現プロファイルにどのような特徴があるかを検討するために、GSEA を用いて解析を行った。*BAP1* 変異例では PRC2 の標的遺伝子の発現が低下していたのに対し（左パネル）、*PBRM1* 変異例では低酸素環境下に誘導される遺伝子の発現亢進が特徴的であった（右パネル）。

チル化群で有意にメチル化されている遺伝子には、PRC2 の標的遺伝子が濃縮されていた。さらに、高メチル化群では、*BAP1* の変異頻度が有意に高かったほか

（ $P = 5.22 \times 10^{-3}$, Cochran-Armitage trend test）、*BAP1* の発現が有意に低く（ $P = 2.11 \times 10^{-2}$, t-test）、*EZH2* の発現が有意に高かった（ $P = 1.57 \times 10^{-5}$, t-test）（図 22）。

PRC2 は、ヒストン H3K27 をメチル化することにより、ホメオボックス遺伝子群をはじめとする標的遺伝子のサイレンシングに関わっている。この機能は、未分化性の維持や、発生の過程において重要な役割を担っていると考えられており、PRC2 の重要な構成要素である *EZH2* の変異や発現の異常が、いくつかの悪性腫瘍で報告されている。今回の結果からは、ccRCC では高メチル化群にお

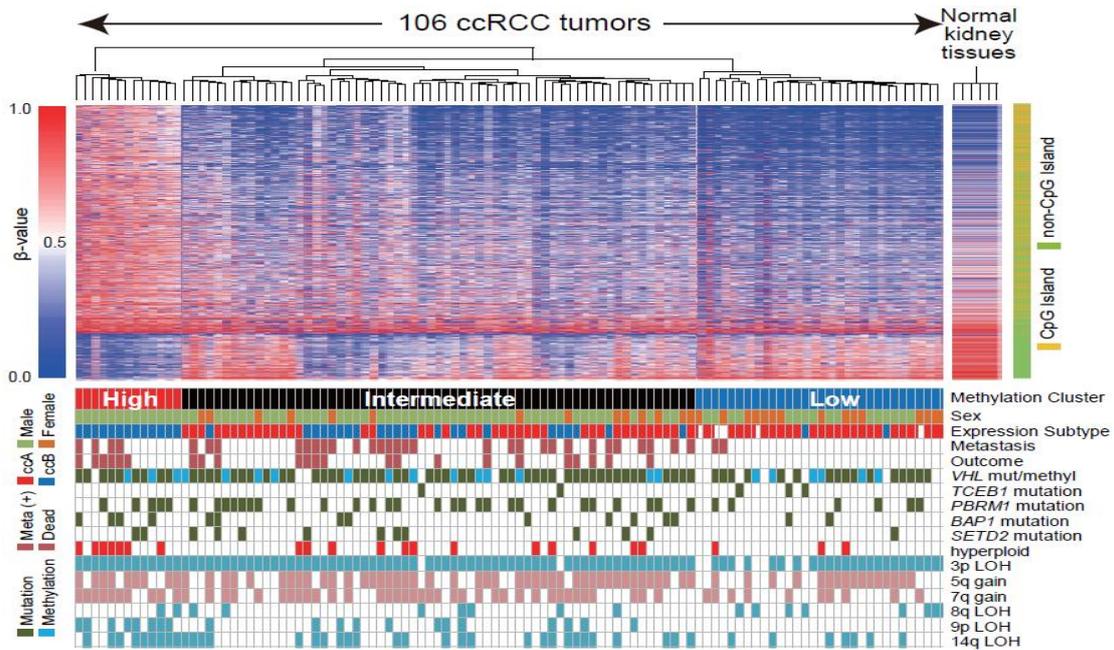


図 20 DNA メチル化のプロファイルによる症例の分類

横軸に症例を、縦軸に遺伝子を並べ、DNA メチル化の状態 (β -value) にもとづいて、106 例をクラスタリングした結果を示す。メチル化された遺伝子は赤で、されていない遺伝子は青で示す。クラスタリングは症例間の分散の大きい遺伝子を用いて行った。クラスタリングによって3群に分類された (左から、高メチル化群、中メチル化群、低メチル化群)。各症例における、臨床情報ならびに主要な遺伝子変異・コピー数異常を下に示す。

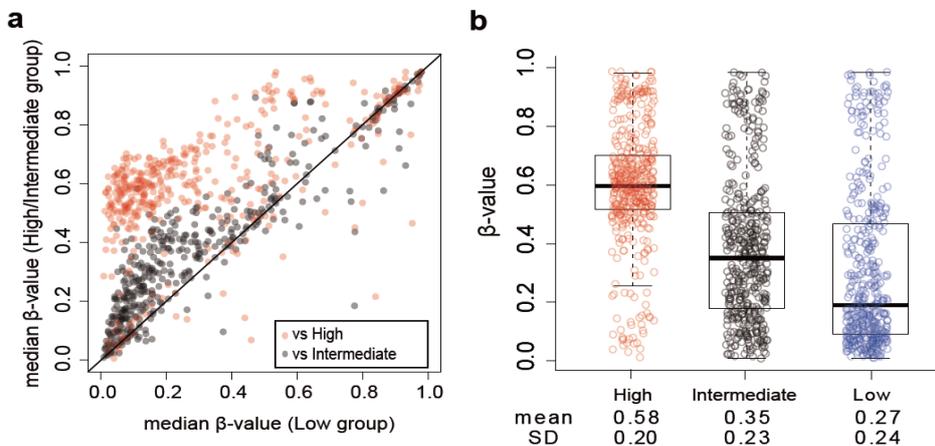


図 21 サブグループ間におけるメチル化レベルの違い

(a) CpG アイランド上のプローブの β -value をサブグループ間で比較したプロットを示す。低メチル化群と中メチル化群の比較を黒、低メチル化群と高メチル化群の比較を赤でしめす。いずれも横軸に低メチル化群をおいた。

(b) 各群における CpG アイランド上のプローブの β -value のプロットを示す。高メチル化群に強くメチル化されているプローブが多いことが分かる。

表3 高メチル化群においてメチル化されていた遺伝子群

| Annotation Cluster | Enrichment Score | Database | Term | Genes involved in the term | Percentage | P value | Fold Enrichment | BH adjusted P(q) |
|-----------------------|------------------|----------------|---------------------------------------|----------------------------|------------|-----------|-----------------|------------------|
| Homeobox | 18.6 | INTERPRO | Homeobox, conserved site | 63 | 5.21 | 1.11.E-23 | 4.40 | 7.76.E-21 |
| | | SP_PIR_KEYWORD | Homeobox | 63 | 5.21 | 1.79.E-23 | 4.39 | 9.56.E-21 |
| | | INTERPRO | Homeobox | 63 | 5.21 | 2.33.E-23 | 4.34 | 1.09.E-20 |
| | | UP_SEQ_FEATURE | Homeobox | 54 | 4.46 | 5.21.E-22 | 4.77 | 1.65.E-18 |
| | | INTERPRO | Homeodomain-related | 61 | 5.04 | 1.48.E-21 | 4.15 | 5.17.E-19 |
| | | GOTERM_MF_FAT | transcription factor activity | 142 | 11.74 | 4.73.E-21 | 2.26 | 3.93.E-18 |
| | | GOTERM_MF_FAT | sequence-specific DNA binding | 105 | 8.68 | 5.68.E-21 | 2.68 | 2.36.E-18 |
| | | SMART | HOX | 63 | 5.21 | 2.36.E-18 | 3.41 | 7.09.E-16 |
| | | GOTERM_BP_FAT | pattern specification process | 58 | 4.79 | 1.35.E-16 | 3.44 | 3.29.E-13 |
| | | GOTERM_BP_FAT | regionalization | 48 | 3.97 | 9.66.E-16 | 3.86 | 7.41.E-13 |
| SP_PIR_KEYWORD | DNA binding | 41 | 3.39 | 2.78.E-05 | 2.03 | 1.14.E-03 | | |
| Cell Adhesion | 16.8 | INTERPRO | Cadherin, N-terminal | 33 | 2.73 | 5.49.E-24 | 9.21 | 7.69.E-21 |
| | | INTERPRO | Protocadherin gamma | 19 | 1.57 | 2.61.E-21 | 16.19 | 7.31.E-19 |
| | | UP_SEQ_FEATURE | domain:Cadherin 6 | 33 | 2.73 | 1.80.E-20 | 7.59 | 2.85.E-17 |
| | | UP_SEQ_FEATURE | domain:Cadherin 5 | 37 | 3.06 | 2.75.E-20 | 6.54 | 2.90.E-17 |
| | | UP_SEQ_FEATURE | domain:Cadherin 3 | 37 | 3.06 | 4.29.E-19 | 6.09 | 3.40.E-16 |
| | | UP_SEQ_FEATURE | domain:Cadherin 4 | 37 | 3.06 | 4.29.E-19 | 6.09 | 3.40.E-16 |
| | | UP_SEQ_FEATURE | domain:Cadherin 1 | 37 | 3.06 | 1.28.E-18 | 5.91 | 8.13.E-16 |
| | | UP_SEQ_FEATURE | domain:Cadherin 2 | 37 | 3.06 | 1.28.E-18 | 5.91 | 8.13.E-16 |
| | | INTERPRO | Cadherin | 38 | 3.14 | 1.35.E-18 | 5.70 | 3.14.E-16 |
| | | GOTERM_BP_FAT | homophilic cell adhesion | 39 | 3.22 | 5.96.E-16 | 4.71 | 5.49.E-13 |
| | | SMART | CA | 38 | 3.14 | 2.87.E-15 | 4.47 | 4.34.E-13 |
| | | GOTERM_BP_FAT | cell-cell adhesion | 56 | 4.63 | 1.35.E-14 | 3.21 | 6.70.E-12 |
| | | GOTERM_BP_FAT | cell adhesion | 99 | 8.18 | 3.28.E-14 | 2.24 | 1.21.E-11 |
| | | GOTERM_BP_FAT | biological adhesion | 99 | 8.18 | 3.53.E-14 | 2.23 | 1.16.E-11 |
| | | SP_PIR_KEYWORD | cell adhesion | 68 | 5.62 | 1.24.E-13 | 2.72 | 1.66.E-11 |
| | | SP_PIR_KEYWORD | calcium | 100 | 8.26 | 2.34.E-12 | 2.10 | 2.50.E-10 |
| Embryonic Development | 13.3 | GOTERM_BP_FAT | pattern specification process | 58 | 4.79 | 1.35.E-16 | 3.44 | 3.29.E-13 |
| | | GOTERM_BP_FAT | regionalization | 48 | 3.97 | 9.66.E-16 | 3.86 | 7.41.E-13 |
| | | GOTERM_BP_FAT | embryonic morphogenesis | 58 | 4.79 | 1.08.E-13 | 2.99 | 3.21.E-11 |
| | | GOTERM_BP_FAT | anterior/posterior pattern formation | 37 | 3.06 | 2.00.E-13 | 4.18 | 5.38.E-11 |
| | | GOTERM_BP_FAT | embryonic development ending in birth | 59 | 4.88 | 1.26.E-12 | 2.79 | 2.87.E-10 |
| | | GOTERM_BP_FAT | chordate embryonic development | 58 | 4.79 | 2.82.E-12 | 2.77 | 5.98.E-10 |
| | | GOTERM_MF_FAT | transcription factor activity | 142 | 11.74 | 4.73.E-21 | 2.26 | 3.93.E-18 |
| Transcription | 12.9 | GOTERM_MF_FAT | sequence-specific DNA binding | 105 | 8.68 | 5.68.E-21 | 2.68 | 2.36.E-18 |
| | | GOTERM_MF_FAT | transcription regulator activity | 184 | 15.21 | 1.27.E-18 | 1.89 | 3.50.E-16 |
| | | SP_PIR_KEYWORD | dna-binding | 197 | 16.28 | 4.45.E-16 | 1.78 | 7.92.E-14 |
| | | GOTERM_BP_FAT | regulation of transcription, DNA- | 196 | 16.20 | 5.02.E-16 | 1.75 | 8.23.E-13 |
| | | GOTERM_BP_FAT | regulation of RNA metabolic process | 196 | 16.20 | 5.43.E-15 | 1.71 | 3.23.E-12 |
| | | GOTERM_BP_FAT | regulation of transcription | 250 | 20.66 | 3.04.E-13 | 1.52 | 7.50.E-11 |
| | | SP_PIR_KEYWORD | transcription regulation | 193 | 15.95 | 1.46.E-11 | 1.61 | 1.30.E-09 |
| | | SP_PIR_KEYWORD | Transcription | 189 | 15.62 | 9.18.E-10 | 1.54 | 7.01.E-08 |
| | | GOTERM_MF_FAT | DNA binding | 217 | 17.93 | 3.12.E-09 | 1.44 | 5.18.E-07 |
| | | GOTERM_BP_FAT | transcription | 193 | 15.95 | 2.08.E-08 | 1.45 | 2.46.E-06 |
| | | SP_PIR_KEYWORD | nucleus | 298 | 24.63 | 1.05.E-03 | 1.17 | 2.32.E-02 |

いて PRC2 の機能が亢進していることが、強く示唆された。

その他、高メチル化群では、全エクソンシーケンシングにおける変異数が有意に多く ($P = 1.66 \times 10^{-6}$, t-test)、多倍体化の症例 ($P = 1.57 \times 10^{-3}$, Cochran-Armitage trend test)、14q LOH ($P = 2.00 \times 10^{-4}$, Cochran-Armitage trend test)、9p LOH ($P = 1.57 \times 10^{-3}$, Cochran-Armitage trend test)、遺伝子発現プロファイルにおける ccB の症例 ($P = 2.46 \times 10^{-10}$, Fischer's exact test) が多く含まれていた。また、高メチル化群は予後不良であり、中・低メチル化群と比較して全生存率

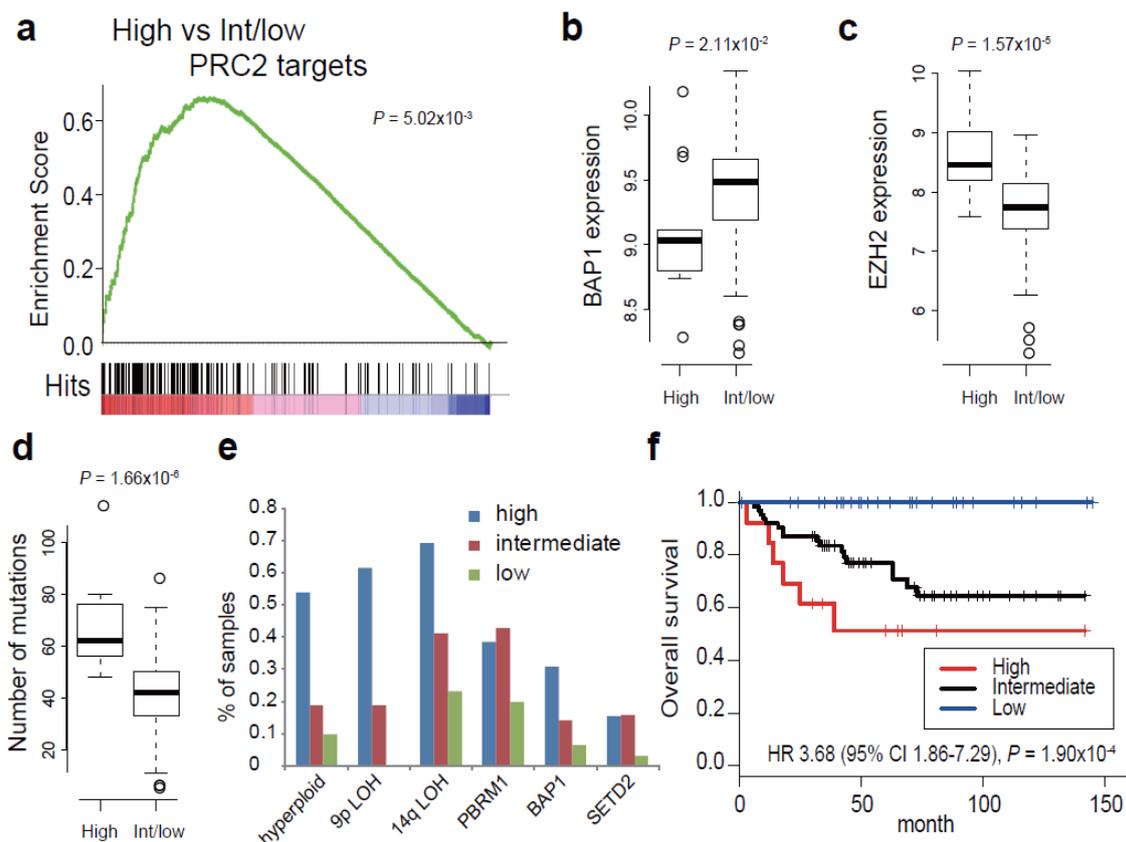


図 22 DNA メチル化のプロファイルと他のゲノム異常および予後との関連性
DNA メチル化のプロファイルと他のゲノム異常を比較することにより見出された特徴を示す。

- (a) 高メチル化群と他の群の間におけるメチル化遺伝子の違いを検討するために GSEA による解析を行ったところ、高メチル化群では、PRC2 の標的遺伝子が高度にメチル化されていた。
- (b) 高メチル化群では、有意に BAP1 の発現が低かった。(t-test)
- (c) 高メチル化群では、有意に EZH2 の発現が高かった。(t-test)
- (d) 高メチル化群では、有意に体細胞性変異の数が多かった。(t-test)
- (e) 高メチル化群では、多倍体化した腫瘍、9p LOH、14q LOH、BAP1 変異例が多かった。(Cochran-Armitage trend test)
- (f) 高メチル化群では、中および低メチル化群に対するハザード比が 3.68 と高く、全生存率が有意に低かった。

(HR = 3.68, 95% CI = 1.86–7.29; $P = 1.90 \times 10^{-4}$) が有意に低かった (図 22)。こ

のことから、高メチル化群では、PRC2 による遺伝子サイレンシングの制御の破綻が悪性度の高い癌の発生に関与していることが示唆された。

考察

本研究では、106例の ccRCC を対象に、全エクソンシーケンシングによる遺伝子変異の同定だけでなく、ゲノムコピー数、遺伝子発現、DNA メチル化も含めた網羅的かつ多方面からのアプローチにより、ccRCC で生じているゲノム異常のプロファイルを詳細に明らかにした。他の癌腫と同様に、ccRCC の発生・進展には、多数の遺伝子変異とコピー数異常を伴うが、多くの症例に共通して生じるもの (*VHL*、*PBRM1*、*BAP1*、*SETD2* の変異や 3p LOH、5q gain、9p LOH、14q LOH) はごく一部であり、より低頻度に生じるものが大多数を占めていた。ただし、パスウェイ解析などにより、PI3K-AKT-mTOR シグナリング、KEAP1-NRF2 システム、p53 シグナリング/cell cycle checkpoint などには、1つ1つの遺伝子の変異頻度は低くても、パスウェイ全体としては高頻度に異常をきたしていることを見出した。

ccRCC の最も基本的な特徴は、変異やプロモーターのメチル化、染色体の欠失により、*VHL* が非常に高頻度に不活化され、HIF が蓄積することである。この観点からは、*VHL* に異常のない症例において *TCEB1* 変異と 8q LOH が生じていたことは、本研究の中で最も注目すべき発見であると言える。*VHL* に異常の見られない ccRCC 症例が一定の頻度で存在することは、以前から知られており、そのような症例で *VHL* の不活化に代わるゲノム異常がどのようなものであるか、

長く注目されていた。この発見により、VHL complex の機能喪失と HIF の蓄積に関する新しいメカニズムが明らかとなり、ccRCC の分子病態における VHL complex の重要性が一層強調される結果となった。VHL complex の異常は ccRCC の発生においてほぼ必須のイベントであることが分かり、HIF の蓄積という観点からは、VHL および TCEB1 のどちらが変異しても同様の結果が生じることが示された一方、それ以外の面については変異によってどのような影響が生じるのかは明らかでない。TCEB1 変異例では VHL 変異例と比較して、分子生物学的、病理組織学的そして臨床的にどのような特徴があるのを明らかにすることは、今後の検討課題である。

また、VHL と異なり TCEB1 にはナンセンス変異やフレームシフト変異は 1 例も見られなかった。このことから、Elongin C の機能が完全に喪失してしまうことは、何らかの理由により腫瘍細胞にとって不利となることが推測された。

Elongin C は VHL の他にも、RNA polymerase II Elongin complex を形成する際の Elongin A や、他の BC-box タンパク (SOCS3、FEM1B、LRR1 など) とともに相互作用することが知られているが、今回明らかとなった TCEB1 の変異により、VHL だけでなく、これらのタンパクとの結合も阻害されていた。変異型の Elongin C には、腫瘍細胞の生存に必須となる機能 (例えば、まだ知られていない分子との相互作用) が残存しているのかどうか、さらなる検討が必要である。

今回の検討で、*VHL*および*TCEB1*のどちらにも異常が見られなかった症例は、240例中11例であった。このうち3p LOHが見られる6例については、本研究で使用したプラットフォームでは検出できない何らかの異常が*VHL*に生じていた可能性が考慮しうる。これに対し、3p LOHの見られない5例については、*NONO-TFE3*癒合遺伝子が検出された例に代表されるように、全く異なる分子病態が存在しているものと推測される。将来的に、分子病態に基づいてRCCCの診断・分類を検討するのであれば、これらの症例はccRCCとは別のエントリーとする必要性もありうると考えられる。

治療薬との関連という観点からは、mTORシグナリングパスウェイに関する遺伝子の変異が高頻度に見られたことは、今後の治療戦略を考えるうえで非常に重要な点であると考えられる。mTOR阻害薬は、血管新生阻害薬による治療が無効になった症例を中心として、既にccRCCの診療現場で広く使用されているものの、効果を予測する因子は明らかとされていない。今回のコホートでは、mTOR阻害薬を使用した症例がほとんどなく、その有効性とゲノム異常との関連を検討するには至らなかった。今後追跡調査あるいはmTOR阻害薬使用例をコホートに組み込むことで、mTORシグナリングパスウェイの遺伝子変異の状態により、mTOR阻害薬の有効性が予測しうるかどうか検討することは、今後のccRCCの診療の発展につながる可能性があると考えられる。

網羅的かつ多方面からの解析を統合することによって、体細胞性変異、ゲノムコピー数、遺伝子発現、DNAメチル化の、それぞれのプロファイルの間に、特徴的な関連を見出すことができた。また、これらのゲノム異常プロファイルが、遠隔転移の頻度や予後などの臨床像と密接に関わっていることも明らかとなった。これまでにccRCCの予後と関連が認められるゲノム異常としては、コピー数解析における9p LOH⁴⁵や14q LOH⁴⁶、あるいは発現解析におけるccBプロファイル²³が知られていたが、新たにBAP1変異およびDNAメチル化解析における高メチル化群が明らかとされた。これらの結果から、ゲノム異常に基づいて症例を分類することにより、予後の予測や治療方針の検討に有用となりうることが示唆された。しかしながら、ゲノム異常による分類を診療の場面で運用していくためには、これらの知見をより集約させていく必要があると考えられる。その点において、DNAメチル化のプロファイリングによる分類は、他の予後不良因子の頻度と相関が見られる点、高メチル化群と低メチル化群の生存率の差が大きい点から、臨床的に非常に意義深いものと考えられる。今後、高メチル化群が生じる直接の原因となるような遺伝子異常を解明すること、より簡便にDNAメチル化のプロファイリングを決定する方法を見出すこと、さらには独立したコホートにおいて、結果が再現されるかどうか検討することが必要と考えられる。

悪性腫瘍がゲノム異常によって引き起こされるのであれば、その診断や分類、治療の際の判断も、可能な限りゲノム異常に基づいてなされるのが合理的ではないかと思われる。本研究で得られた知見を礎として、ccRCC の診療に関連した研究の進展、さらには予後の改善や個別化医療の実現への展開を期待したい。

引用文献

- 1 Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. & Parkin, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127**, 2893-2917 (2010).
- 2 公益財団法人がん研究振興財団. がんの統計 '13. (2013).
- 3 Rini, B. I., Campbell, S. C. & Escudier, B. Renal cell carcinoma. *Lancet* **373**, 1119-1132 (2009).
- 4 Ljungberg, B., Cowan, N. C., Hanbury, D. C., Hora, M., Kuczyk, M. A., Merseburger, A. S., Patard, J. J., Mulders, P. F. & Sinescu, I. C. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Eur Urol* **58**, 398-406 (2010).
- 5 Gnarra, J. R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M. H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., Duh, F. M. & et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* **7**, 85-90 (1994).
- 6 Gallou, C., Joly, D., Mejean, A., Staroz, F., Martin, N., Tarlet, G., Orfanelli, M. T., Bouvier, R., Droz, D., Chretien, Y., Marechal, J. M., Richard, S., Junien, C. & Beroud, C. Mutations of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: definition of a risk factor for VHL patients to develop an RCC. *Hum Mutat* **13**, 464-475 (1999).
- 7 Schraml, P., Struckmann, K., Hatz, F., Sonnet, S., Kully, C., Gasser, T., Sauter, G., Mihatsch, M. J. & Moch, H. VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol* **196**, 186-193 (2002).
- 8 Herman, J. G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M. I., Zbar, B., Liu, S., Samid, D., Duan, D. S., Gnarra, J. R., Linehan, W. M. & et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9700-9704 (1994).
- 9 Stebbins, C. E., Kaelin, W. G., Jr. & Pavletich, N. P. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* **284**, 455-461 (1999).
- 10 Kamura, T., Sato, S., Iwai, K., Czyzyk-Krzeska, M., Conaway, R. C. & Conaway, J. W. Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10430-10435 (2000).
- 11 Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S. & Kaelin, W. G., Jr. HIF1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* **292**,

- 464-468 (2001).
- 12 Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468-472 (2001).
 - 13 Wiesener, M. S., Munchenhagen, P. M., Berger, I., Morgan, N. V., Roigas, J., Schwartz, A., Jurgensen, J. S., Gruber, G., Maxwell, P. H., Loning, S. A., Frei, U., Maher, E. R., Grone, H. J. & Eckardt, K. U. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α in clear cell renal carcinomas. *Cancer research* **61**, 5215-5222 (2001).
 - 14 Zhang, T., Niu, X., Liao, L., Cho, E. A. & Yang, H. The Contributions of HIF-Target Genes to Tumor Growth in RCC. *PLoS One* **8**, e80544 (2013).
 - 15 Dalgliesh, G. L., Furge, K., Greenman, C., Chen, L., Bignell, G., Butler, A., Davies, H., Edkins, S., Hardy, C., Latimer, C., Teague, J., Andrews, J., Barthorpe, S., Beare, D., Buck, G., Campbell, P. J., Forbes, S., Jia, M., Jones, D., Knott, H., Kok, C. Y., Lau, K. W., Leroy, C., Lin, M. L., McBride, D. J., Maddison, M., Maguire, S., McLay, K., Menzies, A., Mironenko, T., Mulderrig, L., Mudie, L., O'Meara, S., Pleasance, E., Rajasingham, A., Shepherd, R., Smith, R., Stebbings, L., Stephens, P., Tang, G., Tarpey, P. S., Turrell, K., Dykema, K. J., Khoo, S. K., Petillo, D., Wondergem, B., Anema, J., Kahnoski, R. J., Teh, B. T., Stratton, M. R. & Futreal, P. A. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature* **463**, 360-363 (2010).
 - 16 Varela, I., Tarpey, P., Raine, K., Huang, D., Ong, C. K., Stephens, P., Davies, H., Jones, D., Lin, M. L., Teague, J., Bignell, G., Butler, A., Cho, J., Dalgliesh, G. L., Galappaththige, D., Greenman, C., Hardy, C., Jia, M., Latimer, C., Lau, K. W., Marshall, J., McLaren, S., Menzies, A., Mudie, L., Stebbings, L., Largaespada, D. A., Wessels, L. F., Richard, S., Kahnoski, R. J., Anema, J., Tuveson, D. A., Perez-Mancera, P. A., Mustonen, V., Fischer, A., Adams, D. J., Rust, A., Chan-on, W., Subimerb, C., Dykema, K., Furge, K., Campbell, P. J., Teh, B. T., Stratton, M. R. & Futreal, P. A. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature* **469**, 539-542 (2011).
 - 17 Pena-Llopis, S., Vega-Rubin-de-Celis, S., Liao, A., Leng, N., Pavia-Jimenez, A., Wang, S., Yamasaki, T., Zhrebker, L., Sivanand, S., Spence, P., Kinch, L., Hambuch, T., Jain, S., Lotan, Y., Margulis, V., Sagalowsky, A. I., Summerour, P.

- B., Kabbani, W., Wong, S. W., Grishin, N., Laurent, M., Xie, X. J., Haudenschild, C. D., Ross, M. T., Bentley, D. R., Kapur, P. & Brugarolas, J. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet* **44**, 751-759 (2012).
- 18 Guo, G., Gui, Y., Gao, S., Tang, A., Hu, X., Huang, Y., Jia, W., Li, Z., He, M., Sun, L., Song, P., Sun, X., Zhao, X., Yang, S., Liang, C., Wan, S., Zhou, F., Chen, C., Zhu, J., Li, X., Jian, M., Zhou, L., Ye, R., Huang, P., Chen, J., Jiang, T., Liu, X., Wang, Y., Zou, J., Jiang, Z., Wu, R., Wu, S., Fan, F., Zhang, Z., Liu, L., Yang, R., Wu, H., Yin, W., Liu, Y., Peng, H., Jiang, B., Feng, Q., Li, C., Xie, J., Lu, J., Kristiansen, K., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Wang, J., Yang, H. & Cai, Z. Frequent mutations of genes encoding ubiquitin-mediated proteolysis pathway components in clear cell renal cell carcinoma. *Nat Genet* **44**, 17-19 (2012).
- 19 Shiraishi, Y., Sato, Y., Chiba, K., Okuno, Y., Nagata, Y., Yoshida, K., Shiba, N., Hayashi, Y., Kume, H., Homma, Y., Sanada, M., Ogawa, S. & Miyano, S. An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. *Nucleic Acids Res* **41**, e89 (2013).
- 20 Nannya, Y., Sanada, M., Nakazaki, K., Hosoya, N., Wang, L., Hangaishi, A., Kurokawa, M., Chiba, S., Bailey, D. K., Kennedy, G. C. & Ogawa, S. A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer research* **65**, 6071-6079 (2005).
- 21 Yamamoto, G., Nannya, Y., Kato, M., Sanada, M., Levine, R. L., Kawamata, N., Hangaishi, A., Kurokawa, M., Chiba, S., Gilliland, D. G., Koeffler, H. P. & Ogawa, S. Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. *American journal of human genetics* **81**, 114-126 (2007).
- 22 Mermel, C. H., Schumacher, S. E., Hill, B., Meyerson, M. L., Beroukhi, R. & Getz, G. GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. *Genome Biol* **12**, R41 (2011).
- 23 Brannon, A. R., Reddy, A., Seiler, M., Arreola, A., Moore, D. T., Pruthi, R. S., Wallen, E. M., Nielsen, M. E., Liu, H., Nathanson, K. L., Ljungberg, B., Zhao, H., Brooks, J. D., Ganesan, S., Bhanot, G. & Rathmell, W. K. Molecular Stratification of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Consensus Clustering Reveals Distinct Subtypes and Survival Patterns. *Genes Cancer* **1**, 152-163 (2010).
- 24 Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G.,

- Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Edkins, S., O'Meara, S., Vastrik, I., Schmidt, E. E., Avis, T., Barthorpe, S., Bhamra, G., Buck, G., Choudhury, B., Clements, J., Cole, J., Dicks, E., Forbes, S., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J., Jenkinson, A., Jones, D., Menzies, A., Mironenko, T., Perry, J., Raine, K., Richardson, D., Shepherd, R., Small, A., Tofts, C., Varian, J., Webb, T., West, S., Widaa, S., Yates, A., Cahill, D. P., Louis, D. N., Goldstraw, P., Nicholson, A. G., Brasseur, F., Looijenga, L., Weber, B. L., Chiew, Y. E., DeFazio, A., Greaves, M. F., Green, A. R., Campbell, P., Birney, E., Easton, D. F., Chenevix-Trench, G., Tan, M. H., Khoo, S. K., Teh, B. T., Yuen, S. T., Leung, S. Y., Wooster, R., Futreal, P. A. & Stratton, M. R. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **446**, 153-158 (2007).
- 25 Fujimoto, A., Totoki, Y., Abe, T., Boroevich, K. A., Hosoda, F., Nguyen, H. H., Aoki, M., Hosono, N., Kubo, M., Miya, F., Arai, Y., Takahashi, H., Shirakihara, T., Nagasaki, M., Shibuya, T., Nakano, K., Watanabe-Makino, K., Tanaka, H., Nakamura, H., Kusuda, J., Ojima, H., Shimada, K., Okusaka, T., Ueno, M., Shigekawa, Y., Kawakami, Y., Arihiro, K., Ohdan, H., Gotoh, K., Ishikawa, O., Ariizumi, S., Yamamoto, M., Yamada, T., Chayama, K., Kosuge, T., Yamaue, H., Kamatani, N., Miyano, S., Nakagama, H., Nakamura, Y., Tsunoda, T., Shibata, T. & Nakagawa, H. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet* **44**, 760-764 (2012).
- 26 Hakimi, A. A., Chen, Y. B., Wren, J., Gonen, M., Abdel-Wahab, O., Heguy, A., Liu, H., Takeda, S., Tickoo, S. K., Reuter, V. E., Voss, M. H., Motzer, R. J., Coleman, J. A., Cheng, E. H., Russo, P. & Hsieh, J. J. Clinical and pathologic impact of select chromatin-modulating tumor suppressors in clear cell renal cell carcinoma. *Eur Urol* **63**, 848-854 (2013).
- 27 Hakimi, A. A., Ostrovnaya, I., Reva, B. A., Schultz, N., Chen, Y. B., Gonen, M., Liu, H., Takeda, S., Voss, M. H., Tickoo, S. K., Reuter, V. E., Russo, P., Cheng, E. H., Sander, C., Motzer, R. J. & Hsieh, J. J. Adverse Outcomes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma with Mutations of 3p21 Epigenetic Regulators BAP1 and SETD2: a Report by MSKCC and the KIRC TCGA Research Network. *Clin Cancer Res* (2013).
- 28 Kapur, P., Pena-Llopis, S., Christie, A., Zhrebker, L., Pavia-Jimenez, A., Rathmell, W. K., Xie, X. J. & Brugarolas, J. Effects on survival of BAP1 and PBRM1 mutations in sporadic clear-cell renal-cell carcinoma: a retrospective analysis with independent validation. *Lancet Oncol* **14**, 159-167 (2013).
- 29 Aso, T., Lane, W. S., Conaway, J. W. & Conaway, R. C. Elongin (SIII): a

- multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II. *Science* **269**, 1439-1443 (1995).
- 30 Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Masse, A., Kosmider, O., Le Couedic, J. P., Robert, F., Alberdi, A., Lecluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F. J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S. P., Dessen, P., Soulier, J., Viguie, F., Fontenay, M., Vainchenker, W. & Bernard, O. A. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* **360**, 2289-2301 (2009).
- 31 Langemeijer, S. M., Kuiper, R. P., Berends, M., Knops, R., Aslanyan, M. G., Massop, M., Stevens-Linders, E., van Hoogen, P., van Kessel, A. G., Raymakers, R. A., Kamping, E. J., Verhoef, G. E., Verburch, E., Hagemeijer, A., Vandenberghe, P., de Witte, T., van der Reijden, B. A. & Jansen, J. H. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* **41**, 838-842 (2009).
- 32 The_Cancer_Genome_Atlas_Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, 330-337 (2012).
- 33 Zimmerman, E. S., Schulman, B. A. & Zheng, N. Structural assembly of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 714-721 (2010).
- 34 Padmanabhan, B., Tong, K. I., Ohta, T., Nakamura, Y., Scharlock, M., Ohtsuji, M., Kang, M. I., Kobayashi, A., Yokoyama, S. & Yamamoto, M. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell* **21**, 689-700 (2006).
- 35 Shibata, T., Ohta, T., Tong, K. I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., Asamura, H., Yamamoto, M. & Hirohashi, S. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13568-13573 (2008).
- 36 Kim, Y. R., Oh, J. E., Kim, M. S., Kang, M. R., Park, S. W., Han, J. Y., Eom, H. S., Yoo, N. J. & Lee, S. H. Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *J Pathol* **220**, 446-451 (2010).
- 37 Ooi, A., Dykema, K., Ansari, A., Petillo, D., Snider, J., Kahnoski, R., Anema, J., Craig, D., Carpten, J., Teh, B. T. & Furge, K. A. CUL3 and NRF2 mutations confer an NRF2 activation phenotype in a sporadic form of papillary renal cell carcinoma. *Cancer research* **73**, 2044-2051 (2013).
- 38 Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* **499**, 43-49 (2013).
- 39 Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nowak, D., Nagata, Y., Yamamoto, R., Sato, Y., Sato-Otsubo, A., Kon, A., Nagasaki, M., Chalkidis, G., Suzuki, Y.,

- Shiosaka, M., Kawahata, R., Yamaguchi, T., Otsu, M., Obara, N., Sakata-Yanagimoto, M., Ishiyama, K., Mori, H., Nolte, F., Hofmann, W. K., Miyawaki, S., Sugano, S., Haferlach, C., Koefler, H. P., Shih, L. Y., Haferlach, T., Chiba, S., Nakauchi, H., Miyano, S. & Ogawa, S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64-69 (2011).
- 40 Kadoch, C., Hargreaves, D. C., Hodges, C., Elias, L., Ho, L., Ranish, J. & Crabtree, G. R. Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. *Nat Genet* (2013).
- 41 Clark, J., Lu, Y. J., Sidhar, S. K., Parker, C., Gill, S., Smedley, D., Hamoudi, R., Linehan, W. M., Shipley, J. & Cooper, C. S. Fusion of splicing factor genes PSF and NonO (p54nrb) to the TFE3 gene in papillary renal cell carcinoma. *Oncogene* **15**, 2233-2239 (1997).
- 42 Ross, H. & Argani, P. Xp11 translocation renal cell carcinoma. *Pathology* **42**, 369-373 (2010).
- 43 Kuroda, N., Mikami, S., Pan, C. C., Cohen, R. J., Hes, O., Michal, M., Nagashima, Y., Tanaka, Y., Inoue, K., Shuin, T. & Lee, G. H. Review of renal carcinoma associated with Xp11.2 translocations/TFE3 gene fusions with focus on pathobiological aspect. *Histol Histopathol* **27**, 133-140 (2012).
- 44 Huang da, W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44-57 (2009).
- 45 Moch, H., Presti, J. C., Jr., Sauter, G., Buchholz, N., Jordan, P., Mihatsch, M. J. & Waldman, F. M. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer research* **56**, 27-30 (1996).
- 46 Wu, S. Q., Hafez, G. R., Xing, W., Newton, M., Chen, X. R. & Messing, E. The correlation between the loss of chromosome 14q with histologic tumor grade, pathologic stage, and outcome of patients with nonpapillary renal cell carcinoma. *Cancer* **77**, 1154-1160 (1996).

謝辞

本研究の遂行におきましてご指導をいただきました京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座の小川誠司先生、眞田昌先生に深謝いたします。

本研究の遂行におきまして、技術面でのご指導をいただきました、京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座の吉里哲一先生、佐藤亜以子先生、吉田健一先生、永田安伸先生、鈴木啓道先生、昆彩奈先生、東京大学がんゲノミクスプロジェクトの奥野友介先生、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターの白石友一先生、島村徹平先生、千葉健一先生、田中洋子先生、新井田厚司先生、宮野悟先生、名古屋大学大学院理学研究科の嘉村巧先生、東京大学先端科学技術研究センターの永江玄太先生、油谷浩幸先生、東京大学大学院新領域創成科学研究科の鈴木穰先生、菅野純夫先生、東京大学大学院医学系研究科病理学講座の森川鉄平先生、前田大地先生、深山正久先生、理化学研究所ゲノム医科学研究センターの藤本明洋先生、角田達彦先生、東京大学大学院医学系研究科泌尿器外科学講座の前川滋克先生、久米春喜先生に深謝いたします。

最後に、本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました、指導教官である東京大学大学院医学系研究科泌尿器外科学講座の本間之夫教授に深く感謝しております。博士課程入学以前から多くのご指導

をしていただき、また私にこのような研究の機会を与えて下さったこと、研究の遂行にあたり叱咤激励して下さったことは、私にとって今後の糧となるものです。ここに深い感謝の意を表して、謝辞といたします。