

腎細胞癌標的抗原 MN/CA IX の臨床的意義

奈良県立医科大学泌尿器科学教室 (主任: 平尾佳彦教授)

植村 天受, 趙 順規, 仲川 嘉紀, 清水 一宏

吉川 元祥, 金 聖哲, 平尾 佳彦

MN/CA IX ANTIGEN AS A POTENTIAL TARGET
FOR RENAL CELL CARCINOMA

Hirotsugu UEMURA, Masaki CHO, Yoshinori NAKAGAWA, Kazuhiro SHIMIZU,

Motoyoshi YOSHIKAWA, Song-Chul KIM and Yoshihiko HIRAO

From the Department of Urology, Nara Medical University

MN/CA IX is considered as a carbonic anhydrase isoenzyme expressed in the normal alimentary tract in a tissue-specific manner. This antigen is activated in the majority of renal cell carcinomas (RCC) but not in the normal kidney tissues. Our previous study revealed that increase of malignant potential is related to down-regulation of *MN/CA9*. To investigate the mechanism of MN activation in RCC, we examined the methylation status of this gene (*MN/CA9*) in RCC cell lines (SKRC-1, 6, 10, 12, 14, 44, 59). Moreover, we analyzed the circulating blood of patients for the presence of RCC cells by RT-PCR, to determine whether detection of circulating RCC cells could be useful as a biomarker.

CpG methylation was investigated at 7 CpG sites in the *MN/CA9* 5' region. Clear mRNA signals were observed in 5 cell lines (SKRC-1, 6, 10, 44, 59), e.g., *MN/CA9* positive. These 5 MN-positive cell lines showed hypomethylation in the 5' region. In contrast, all CpG sites were methylated in the remaining 2 lines and 3 normal kidney tissue samples. These results suggest that hypomethylation in the 5' region may play an important role in the expression of *MN/CA9* in RCC. RT-PCR analysis of blood samples from RCC patients revealed the presence of circulating MN-positive cancer cells in the blood. Although a significant correlation with tumor stage and grade was not observed, the analysis of blood samples from patients with metastases resulted in a high detection rate of 82%. These findings suggest the usefulness of MN/CA IX as a potential diagnostic marker for detection of RCC.

(Acta Urol. Jpn. 46 : 745-748, 2000)

Key words: Renal cell carcinoma, *MN/CA9*, DNA methylation, RT-PCR

緒 言

腎細胞癌 (RCC) は泌尿器癌の中でも手術療法を除いて有効な治療法はないといっても過言ではない。近年, 診断技術の進歩に伴い, 早期発見, 早期治療される症例が増加し, 治療成績も幾分向上したといえる。しかしながら, 有転移症例や再発例などの進行腎癌はほとんど救命することはできない。また, RCC は術後転移巣の spontaneous regression や10年以上経過して再発転移する long dormancy など宿主免疫能に深く関係した unique な生物学的特性をもっている¹⁾

最近, 分子生物学的手法の発達に伴い, 癌自身の持つ生物学的特性が徐々にではあるが解明されつつある。例えば癌の進展転移について癌抑制遺伝子の異常, 癌遺伝子の強発現, 接着分子の down regulation などが, 癌細胞の malignant potential の増強に寄与しているのではないかと考えられている。RCC にお

いても, 第3染色体短腕の LOH 解析より高率に遺伝子異常が認められ, なかでも *VHL* gene は重要な tumor suppressor gene と考えられ, sporadic の clear cell type RCC と深い関係にあるといえる²⁾。これまでにわかっている *VHL* (wt) 蛋白の機能は target 遺伝子の転写伸長阻害, mRNA の不安定化や細胞周期からの逸脱であり, target gene としては *VEGF*, *HGF- α* gene などがある。最近 *VHL* 遺伝子変異に伴う RCC 細胞に導入された正常 *VHL* (wt) が *MN/CA9* の発現を抑制することが報告され, *MN/CA9* gene も *VHL* 蛋白の target 遺伝子であることが示された³⁾

MN/CA IX 抗原は細胞膜および核に存在する糖蛋白で, 炭酸脱水素酵素の isoenzyme と考えられており⁴⁾, RCC において高率に発現している癌関連抗原である。また, この抗原は正常組織においては消化器系上皮で特異的に発現しており, 正常腎組織では発現していない。*MN/CA IX* の機能および発現の機序に

については、これまでのところほとんど解明されていない。mAbG250 は MN/CA IX 抗原を認識するマウスモノクローナル抗体で、われわれが以前に行った免疫染色の結果では、clear cell type のほぼ全例 (99%) において MN/CA IX が強発現しており、VHL の異常を伴わない granular cell type においても約半数 (48%) で発現していることがわかった⁵⁾ このことより、RCC において VHL gene の異常を介さない MN/CA9 の発現機構が存在することが示唆された。

一般的な遺伝子の発現調節機構の1つにいわゆるプロモータ領域における DNA メチル化の変化がある。多くの組織特異的遺伝子の発現調節に関与していることが示されており、その機序としてメチル化 CpG が転写因子の DNA への結合を阻害すること、あるいはクロマチン構造を転写不活性な構造にすることが考えられている。癌においては、調節領域のメチル化による Rb, p16, VHL, カドヘリンなどの癌抑制遺伝子、転写抑制遺伝子の不活性化、調節領域の脱メチル化による fos, myc, MEGE-1 などの癌遺伝子、癌関連遺伝子の活性化が知られている。そこで、われわれは MN/CA9 遺伝子が組織特異的であることに着目し、RCC における MN/CA9 遺伝子発現と DNA メチル化の関係について検討することで RCC の進展機序に関して考察すると共に、循環血液中の MN/CA9 陽性細胞の検出を試み、転移進展の予知因子としての可能性について検討した。

対象および方法

1. 材料：培養細胞は RCC 細胞として SKRC-1, -6, -10, -12, -14, -44, -59 の7種を用い、コントロールとして小さな RCC の腎摘除術で得られた非癌部正常腎組織3サンプルを用いた。臨床標本は、奈良県立医科大学泌尿器科および関連施設において腎摘除術を施行した RCC 患者より得られた腎細胞癌、正常

腎組織の新鮮凍結標本および血液サンプルを対象とした。

2. 血液サンプル：採血は抗凝固剤を用いて 10 ml 行い、10 ml PBS 倍希釈とした後、リンパ球分離溶液を用いて、30分間遠心分離する。Buffy coat を注意深く採取し再び PBS を加え遠心分離する。pellet を PBS にて2度洗浄後、guanidine thiocyanate に resuspend し、後の RNA extraction のために 1.5 ml の micro-centrifuge tube にて -80°C で保存しておく。

3. PCR amplification：Total RNA は SV Total RNA Isolation System により抽出し、RNA の cDNA への逆転写は cDNA synthesis kit を用いた。amplification は Fig. 1 に示すごとくプライマーを設定し、スタンダード PCR は35サイクルで、nested RT-PCR は outer 30サイクル、inner 25サイクルにて施行した。

4 DNA メチル化：ゲノム DNA は DNA 抽出 Kit を用いて各培養細胞から抽出し、Clark ら⁶⁾の方法 (Bisulfite genomic sequencing protocol) に準じ、ゲノム DNA を制限酵素 *EcoRI* で切断後、metabisulfite で16時間処理した。続いて MN/CA9 遺伝子 5' 領域を nested PCR 法で増幅し、direct sequencing の上、塩基配列を調べ7カ所の CpG のメチル化状態を判定した (Fig. 2)。

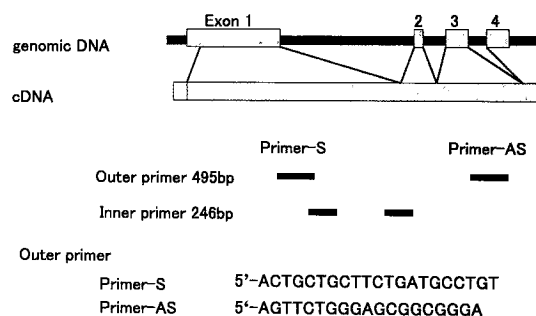
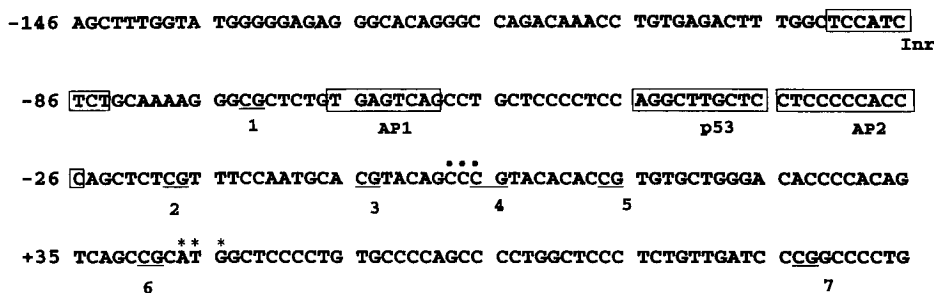


Fig. 1. Primer sets of RT-PCR analysis.



(Opavsky et al, *Genomics*, 1996より引用)

□: イニシエーター, 転写因子のコンセンサス配列

...: 転写開始点

***: 翻訳開始点

Fig. 2. 5' region of the MN/CA9 gene.

結 果

MN/CA9 遺伝子発現

スタンダード RT-PCR (30サイクル) にて RCC 培養細胞 7 株中 5 株 (SKRC-1, 6, 10, 44, 59) に MN/CA9 の発現が認められた. SKRC-12 および SKRC-14 において MN/CA9 は発現していなかった. またコントロールの正常腎 3 サンプルも発現を認めなかった (Fig. 3).

MN/CA9 遺伝子 CpG メチル化

MN/CA9 転写開始点より上流には TATA box や CpG island はなく, API, AP2 や p53 などの転写因子が存在していた (Fig. 2). この領域にプロモータ活性があるといわれており, 転写開始点より上下流約 160 bp 間に存在する 7 カ所の CpG site について bisulfite genomic sequencing protocol 法にてメチル化状態を調べた (Table 1). MN/CA9 の発現していない SKRC-12, 14 およびコントロール 3 サンプルでは, 7 カ所すべての CpG site がメチル化状態であった. 一方 MN 陽性細胞株においては SKRC-1, 10, 44 の 3 株で 7 カ所すべての site が非メチル化状態であり, 他の 2 株 (SKRC-6, 59) では半分以上の CpG site が非メチル化状態であった (Table 1). 次に, メチル化阻害剤 5-Aza-2'-Deoxycytidine 含有培養液にて MN 陰性 RCC 株 SKR-12 および -14 を 7 日間培養すると, いずれも MN/CA9 の発現が誘導され 2~4 個の CpG site で脱メチル化していることが

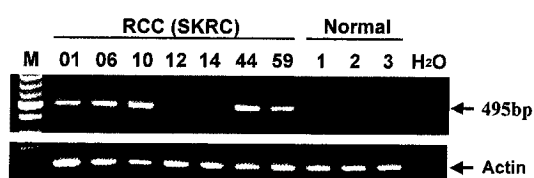


Fig. 3. MN/CA9 expression of human renal cell carcinoma cell lines.

Table 1. Methylation status of 5' region and expression of MN/CA9 gene

	CPG sites							MN 発現
	1	2	3	4	5	6	7	
SKRC-01	-	-	-	-	-	-	-	有
SKRC-06	-	-	-	+	-	±	+	有
SKRC-10	-	-	-	-	-	-	-	有
SKRC-12	+	±	+	+	+	+	+	無
SKRC-14	+	+	+	+	+	+	+	無
SKRC-44	-	-	-	-	-	-	-	有
SKRC-59	-	-	±	-	-	+	+	有
Normal 1	+	+	+	+	+	+	+	無
Normal 2	+	+	+	+	+	+	+	無
Normal 3	+	+	+	+	+	+	+	無

+ : メチル化あり, - : メチル化なし

認められた (data not shown). 以上より MN/CA9 の発現は 5' 領域の低メチル化と相関があると考えられた.

循環血液中 MN/CA9 陽性細胞の検出

担癌状態の RCC 患者 76 例中 48 例 63% に血液中 MN 陽性細胞が検出された. 検出例について Stage, grade の相関を検討したが, 一定の傾向は認めなかった (Table 2). 次に, 有転移症例 11 例中 9 例 82% に血中 MN 陽性細胞が検出され, 術後経過観察中に転移の出現した 4 症例中 3 例に MN 陽性細胞が検出された. 以上から転移の予知因子として有望であると思われる.

考 察

腎細胞癌 (RCC) は近年の超音波断層法の routine 化や CT 検査の popular 化によりサイズの小さな偶発癌が症候癌より多く発現されるようになり, 生存率もやや改善した. しかしながら腫瘍径 4 cm 以上の症例では 4 cm 以下の症例に比し著明に予後が悪く, その半数近くは救命できない. これまでの臨床病理学的な解析により, 進展, 転移のパラメータとして腫瘍サイズ, growing type, 脈管浸潤の有無などが報告されている⁷⁾. 分子生物学的なレベルでは, 第 3 染色体短腕なかでも VHL の変異が重要であると考えられる⁸⁾. Sporadic な clear cell type RCC の半数以上に VHL の変異が報告されているのは周知のごとくである. VHL 蛋白は elongin などと複合体を形成し, 転写因子の分解に作用するといわれており, 最近の研究では異なったメカニズムの報告も散見されるが, 一般には遺伝子変異による VHL 蛋白の不活性化が RCC の発生および進展に必要な蛋白発現の増加を起こしているものと考えられている. 発現が増加する蛋白としては VEGF, PDGF-β, TGF-α などの growth factor や癌関連抗原 MN/CA IX などがある. また逆に発現が減弱するものとしては CD44, カドヘリン-6 などの接着因子や転移抑制遺伝子と考えられている nm-23 などがある⁹⁾. MN/CA IX は RCC を抗原として作製された抗体 mAbG250 の認識する細胞膜および核に存在する糖蛋白 (54KD) で, 子宮癌, 消化器癌など種々の癌で発現している癌関連抗原である.

Table 2. Detection of circulating MN-positive cells according to tumor stage and grade

	pT1	pT2	pT3	pT4	Total
G1	4	8	4	0	16
G2	2	8	8	3	21
G3	0	4	4	3	11
	6	20	16	6	48

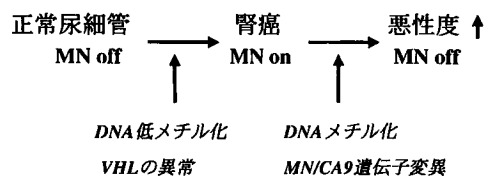


Fig. 4. Hypothesis of disease progression and MN/CA9 in renal cell carcinoma.

以前のわれわれの検討より, RCC においては原発巣の約90%で発現しており正常腎組織では発現を認めない. また clear cell type では96例中95例 (99%) とほとんどの症例で強発現していた. 病期および悪性度との関連をみると, high stage, high grade になるほど, すなわち malignant potential が増すに伴い MN/CA IX の発現が減弱する傾向を認めた ($p < 0.001$). MN/CA IX 蛋白の機能や VHL 遺伝子との関連については非常に興味深いところである. 最近, VHL の変異を伴う RCC 培養細胞に VHL wild type を導入することにより MN/CA9 の down regulation が起こるという報告があり, MN/CA9 もまた VHL の target 遺伝子の1つであることが示唆された³⁾

多くの組織特異的遺伝子の発現調節に, プロモーター領域の DNA メチル化の変化が関与していることが示されている. 癌においてはメチル化による *Rb*, *VHL* などの癌抑制遺伝子の不活性化, 脱メチル化による *myc*, *MEGE-1* などの癌 (関連) 遺伝子の活性化が報告されている. 今回, MN/CA9 が組織特異的遺伝子であることに着目し, RCC の MN/CA9 遺伝子発現と DNA メチル化の関係について検討したところ, RCC における MN/CA9 遺伝子発現は 5' 領域 (プロモーター領域) の低メチル化が関与していると思われる. また, 悪性度の高い RCC では MN/CA9 gene の発現が消失あるいは減弱することから, Fig. 4 に示すごとく hypothesis が考えられる. すなわち, MN/CA9 gene の発現は RCC の発癌過程では VHL gene, DNA 低メチル化が関与しており, 進展過程 (malignant potential up) では DNA メチル化, MN/CA9 の遺伝子変異などが発現消出および低下に関与しているのではないかと示唆される.

最近, PCR 法を用いて非常に微量な分子の存在が診断できるようになり, 結核菌やクラミジアの存在診断など泌尿器科の臨床においても貢献している. MN/CA IX 抗原は RCC において非常に高率に発現しており, 正常腎組織では発現していないことから, 診断および治療の標的分子として有用であると考えられる. そこで高感度 RT-PCR 法を考案し, 循環血液中の MN/CA9 陽性腎癌細胞の検出が可能となった⁵⁾ 今回の検討では, PCR 条件設定が存在診断目的であり, stage や grade との関係を見る限り, 有用な prognostic factor とは言えない. しかし, 術後転移の出

現した時点で MN 陽性細胞が検出されたことより, disease progression の indicator としての有用性が示唆される. 今後, 定量可能な PCR 条件設定により, 術後のモニタリングなど早期診断に寄与するものと期待したい.

結 語

腎細胞癌の進展機序に関して癌関連抗原 MN/CA IX 抗原発現について解析した. 腎細胞癌の進展と共に MN/CA9 の発現の減弱傾向が認められ, その原因としてプロモーター領域の DNA メチル化や MN/CA9 遺伝子の変異の関与が示唆された. 腎細胞癌の予後因子として循環血液中 MN/CA9 陽性細胞の検出は今後有望であると思われる.

本研究の一部は, 文部省科学研究費基盤研究 C (09671643, 10671490, 11670224, 11671576) によって行われた.

文 献

- 1) Ritchie AWS and deKernion JB: The natural history and clinical features of renal carcinoma. *Semin Nephrol* **7**: 131-139, 1987
- 2) Zbar B, Brauch H, Talmadge C, et al.: Loss of alleles of loci on short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature* **327**: 751-724, 1987
- 3) Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH, et al.: Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12596-12601, 1998
- 4) Pastorek J, Pastoreková S, Callebaut I, et al.: Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene* **9**: 2877-2888, 1994
- 5) Uemura H, Nakagawa Y, Yoshida K, et al.: MN/CA IX/G250 as a potential target for immunotherapy of renal cell carcinomas. *Br J Cancer* **81**: 741-746, 1999
- 6) Clark SJ, Harrison J, Paul CL, et al.: High-sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* **22**: 2990-2997, 1994
- 7) Cho M, Grabmaier K, Kitahori Y, et al.: Activation of the MN/CA9 gene is associated with hypomethylation in human renal cell carcinoma cell lines. *Mol Carcinog* **27**: 184-189, 2000
- 8) 大西哲郎: 腎細胞癌—臨床病理学的病態と今後の展望. *日泌尿会誌* **88**: 1-23, 1997
- 9) Nakagawa Y, Tsumatani K, Kurumatani N, et al.: Prognostic value of nm23 protein expression in renal cell carcinomas. *Oncology* **55**: 370-376, 1998

(Received on September 11, 2000)
(Accepted on September 11, 2000)