

Incremental expression of 14-3-3 protein beta/alpha in urine is correlated with advanced stage and poor survival in patient with clear cell renal cell carcinoma.

(尿中 14-3-3 protein beta/alpha の腎細胞癌マーカーとしての意義と測定法の確立)

氏名 金子 志保

【目的】

腎細胞癌 (RCC) はその約 8 割を淡明細胞癌 (clear cell RCC ; ccRCC) が占め、治療は手術が選択される事が多い。通常無症状であることが多く主に画像診断で診断されるため、検出時には約3割の症例で進行癌が認められる。早期発見のための診断マーカーが必要とされているが、現状では RCC に対する臨床的に有用な腫瘍マーカーは検出されていない。以前、我々はプロテオミクス解析の技術を用いて、嚢胞随伴性 RCC 患者の嚢胞液を分析し、14-3-3 protein beta/alpha が嚢胞液中に過剰分泌されている事を検出した (Anal Bioanal Chem 401: 245, 2011)。本蛋白は腫瘍の発育やアポトーシスとの関連が報告されており、他臓器癌との関連も報告されている。本研究では、14-3-3 protein beta/alpha の臨床応用に向けて ELISA 法による測定法を確立し、RCC 症例での尿中発現と臨床病理学的所見との関連性について検討した。更に、腎良性腫瘍である腎血管筋脂肪腫 (angiomyolipoma ; AML) 症例での尿中発現についても検討した。

【方法】

91 例の ccRCC 症例と 16 例の AML 症例、24 例の健常人の尿を用いた。全ての ccRCC 患者には手術が施行され、手術直前と術後1か月で尿を採取した。尿は比重を統一し、14-3-3 protein beta/alpha を直接吸着法による ELISA 法で計測した。ccRCC 患者における 14-3-3 protein beta/alpha の尿中発現量と病理病期、腫瘍径、異型度、リンパ節転移や遠隔転移の有無との関連性を調べ、また、予後との相関関係も検討した。更に、14-3-3 protein beta/alpha の発現箇所を探索するために手術で摘出した ccRCC 患者組織の腫瘍部と正常部、AML 患者組織について免疫染色を行った。

【結果】

尿中 14-3-3 protein beta/alpha は健常者、AML 患者と比較し、ccRCC 患者で有意に高値を認めた (125, 103.6, 285ng/ml, $p < 0.0001$, fig. 1)。腎癌患者においては尿中 14-3-3 protein beta/alpha の高発現は病理病期、リンパ節転移、遠隔転移と有意に相関していた ($p < 0.05$, table 1)。また、4cm、2.5cm以下の小径 ccRCC においても尿中 14-3-3 protein beta/alpha は健常者や (274.8、261.9 ng/ml, $p = 0.0005$, 0.0031, fig. 2)、AML 患者よりも有意に高値を示した ($p < 0.0001$ 、0.0005, fig. 2)。健常者と AML患者では尿中 14-3-3 protein beta/alpha の値に有意差は認めなかった ($p = 0.38$, fig. 1)。一方、術後の尿中14-3-3 protein beta/alpha は著名に低下した(64.3 ng/ml, $p = 0.003$, fig. 3)。尿中 14-3-3 protein beta/alpha の診断能を示す ROC 解析では、ccRCC患者と健常者ではカットオフ値261.1ng/ml、感度46.2%、特異度 95.8% (AUC 0.75, $p < 0.0005$, fig. 4A)であり、ccRCC患者と AML 患者ではカットオフ値196.1ng/ml、感度60.4%、特異度 93.8% (AUC 0.82, $p < 0.0001$, fig. 4B)であった。ccRCC 患者における Kaplan-Meier 法による生存分析では、尿中14-3-3 protein beta/alphaが中央値より高値群では有意に癌特異生存率の低下を認め ($p = 0.04$, fig. 5A)、無再発生存率は有意ではなかったが同様の傾向にあった($p = 0.056$; fig. 5B)。

免疫組織学的検討では、正常部は遠位尿細管が濃染したが糸球体は染まらなかった (fig. 6A)。ccRCC 腫瘍部では腫瘍細胞は濃染し、間質細胞は染まらなかった (fig. 6C, D)。AML 腫瘍部は薄い染まりを認めた (fig. 6B)。

【考察】

初期の RCC はほとんど症状がなく、有用なマーカーもないため発見時には進行している例も少なくない。また、転移性 RCC の5年生存率は5%であり予後は不良である。14-3-3 protein beta/alpha は細胞増殖やアポトーシス、血管新生に関与しており、肺癌や肝細胞癌などの悪性疾患でも過剰発現することが報告されているため、悪性腫瘍の増殖過程において重要な役割を果たしている事が考えられる。

我々の研究では、尿中 14-3-3 protein beta/alpha が健常者に比べ ccRCC 患者で有意に上昇してい

る事が示された。また、その値は病理病期、リンパ節転移、遠隔転移と相関し高値群の癌特異生存率は有意に低下した。

腎良性腫瘍である AML は RCC 同様症状がほとんどなく、画像にて脂肪を確認する事で診断される。通常治療の必要はないが、脂肪の含有が少ない AML では RCC との鑑別が困難となる事もあり、手術が行われる症例もある。我々の結果では ccRCC 患者の尿中 14-3-3 protein beta/alpha は AML 患者より有意に高く、尿中 14-3-3 protein beta/alpha が ccRCC と AML の鑑別においても有用である可能性が示された。

小径腎腫瘍 (Small renal mass ; SRM) は4cm以下の腎腫瘍を指し、偶然発見される腎腫瘍の66%を占めると言われている。良悪性の鑑別が困難である場合もあるため、悪性腫瘍として切除された SRM の20%が術後の組織診で良性であったとの報告もある。我々の研究では、尿中 14-3-3 protein beta/alpha は小径 ccRCC でも有意に上昇していたため、尿中 14-3-3 protein beta/alpha は SRM の良悪性の鑑別にも有用である可能性が示された。

【結語】

尿中 14-3-3 protein beta/alpha は小径腎腫瘍での良悪性の鑑別を含め、ccRCC の診断、予後マーカーとなる可能性が示唆された。

Table 1. Association of preoperative urinary 14-3-3 protein beta/alpha levels with clinical and pathological characteristics.

	No. of patients (%)	14-3-3 protein beta/alpha levels (ng/ml)	P Value*
Sex			
Male	67(74)	287.6	0.97
Female	24 (26)	278	
Pathological grade			
1	36 (39)	283.1	0.19**
2	49 (54)	265.7	
3	6 (7)	414.9	
Pathological stage			
pT1,2	75 (82)	262.5	0.0025
pT3,4	16 (18)	391	
Regional lymph nodes***			
N0	83 (95)	273.2	0.042
N1	4 (5)	457.6	
Distant metastasis			
M0	82 (92)	273.6	0.048
M1	9 (8)	386.1	

*Mann-Whitney U test.

**Kruskal-Wallis test.

***Four patients with unknown status of lymph node.

14-3-3 expression in urine (ng/ml)

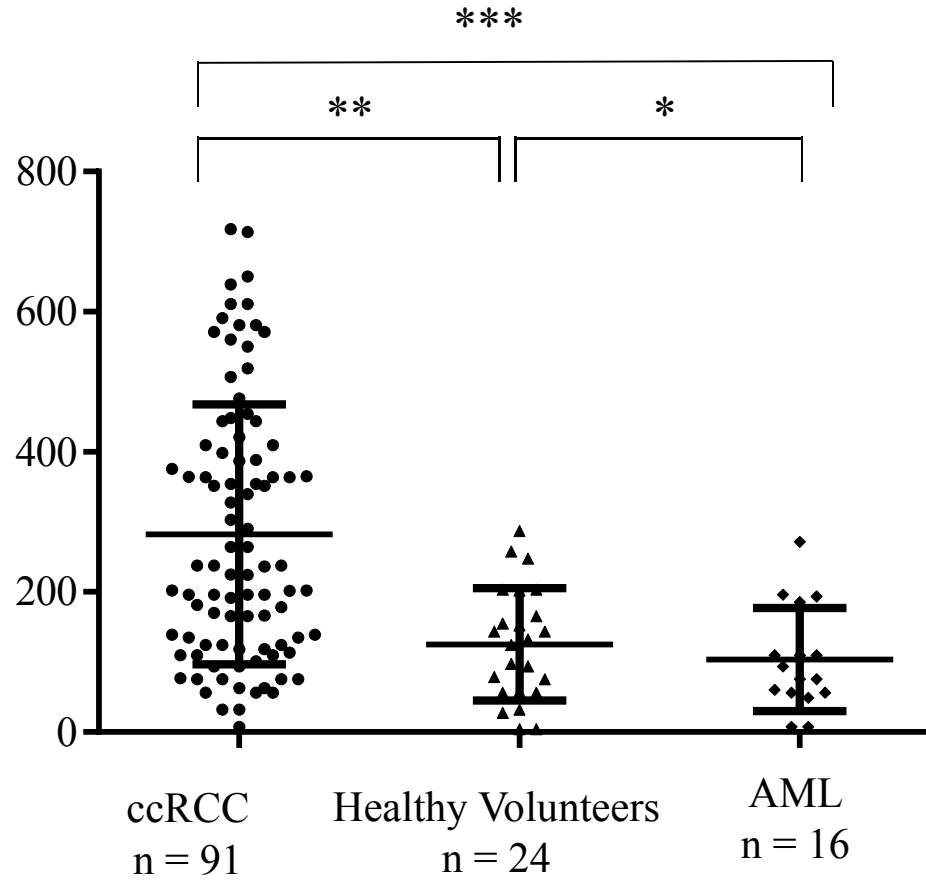


Figure 1

* $p > 0.05$
** $p = 0.0001$
*** $p < 0.0001$

14-3-3 expression in urine (ng/ml)

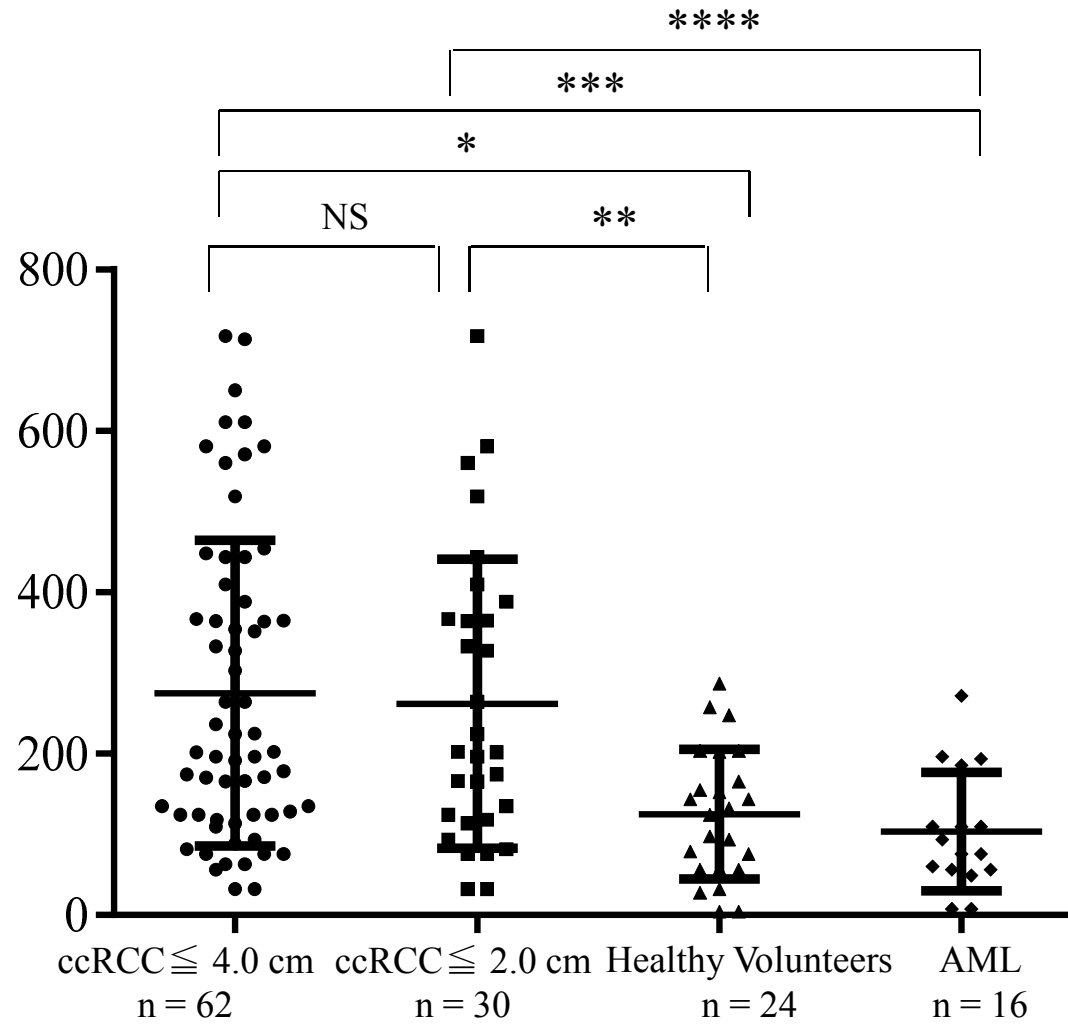


Figure 2

* p = 0.0005 ** p = 0.0031
*** p < 0.0001 **** p = 0.0005

14-3-3 expression in urine (ng/ml)

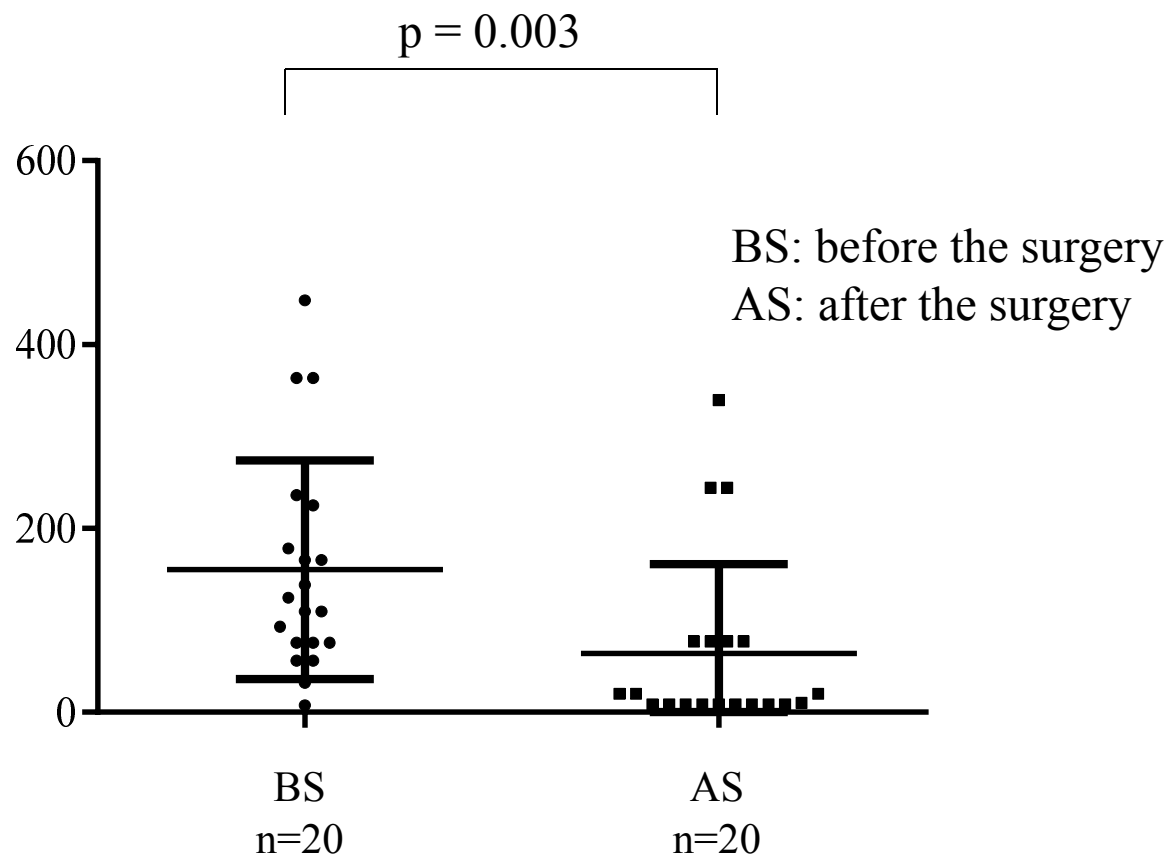


Figure 3

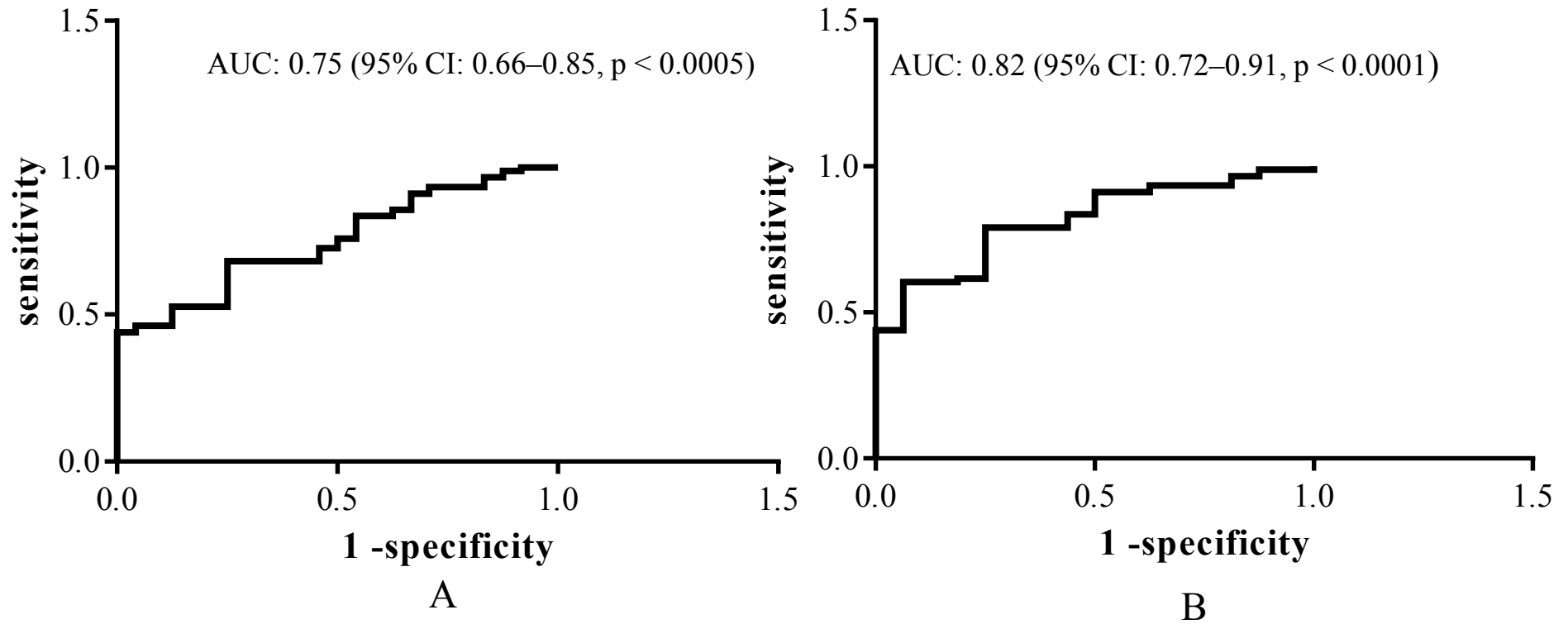
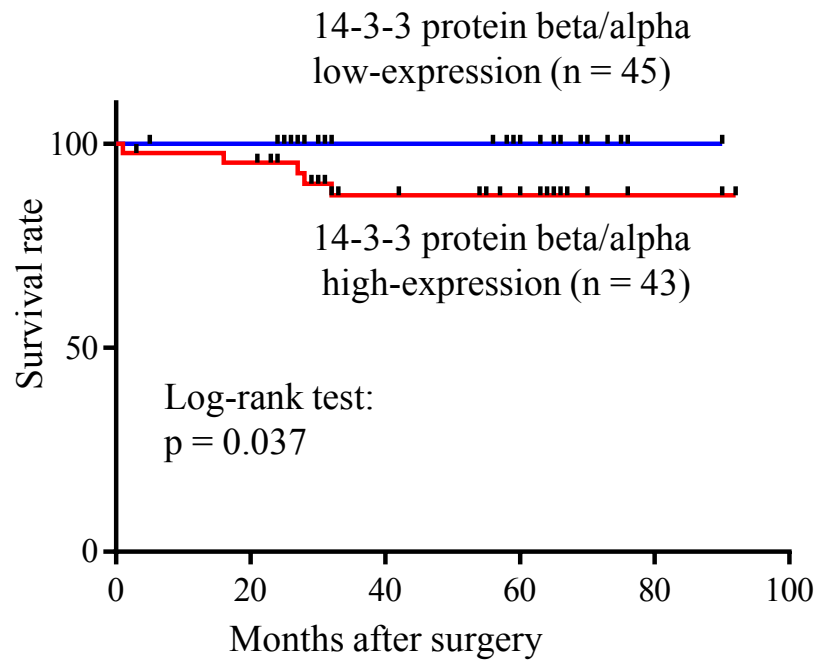
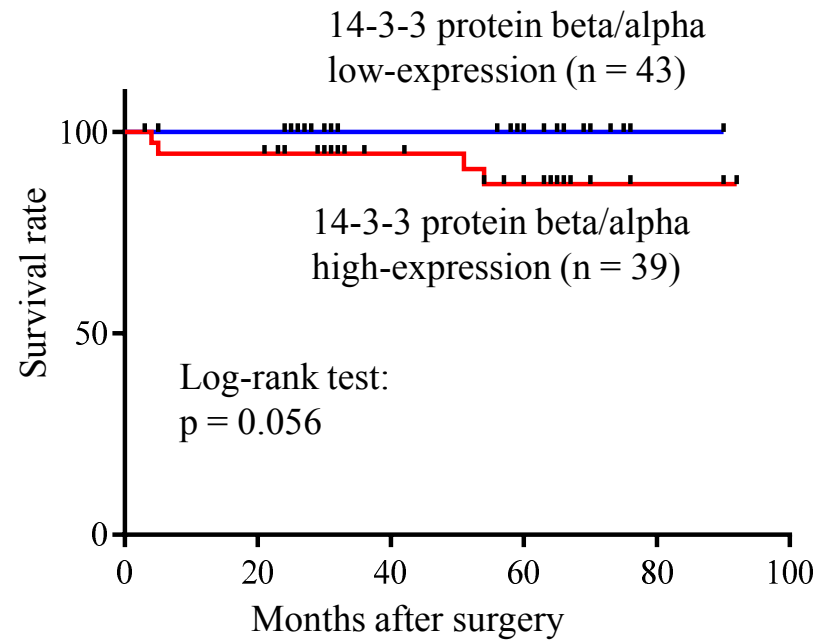


Figure 4



Cancer-Specific Survival

Figure 5A

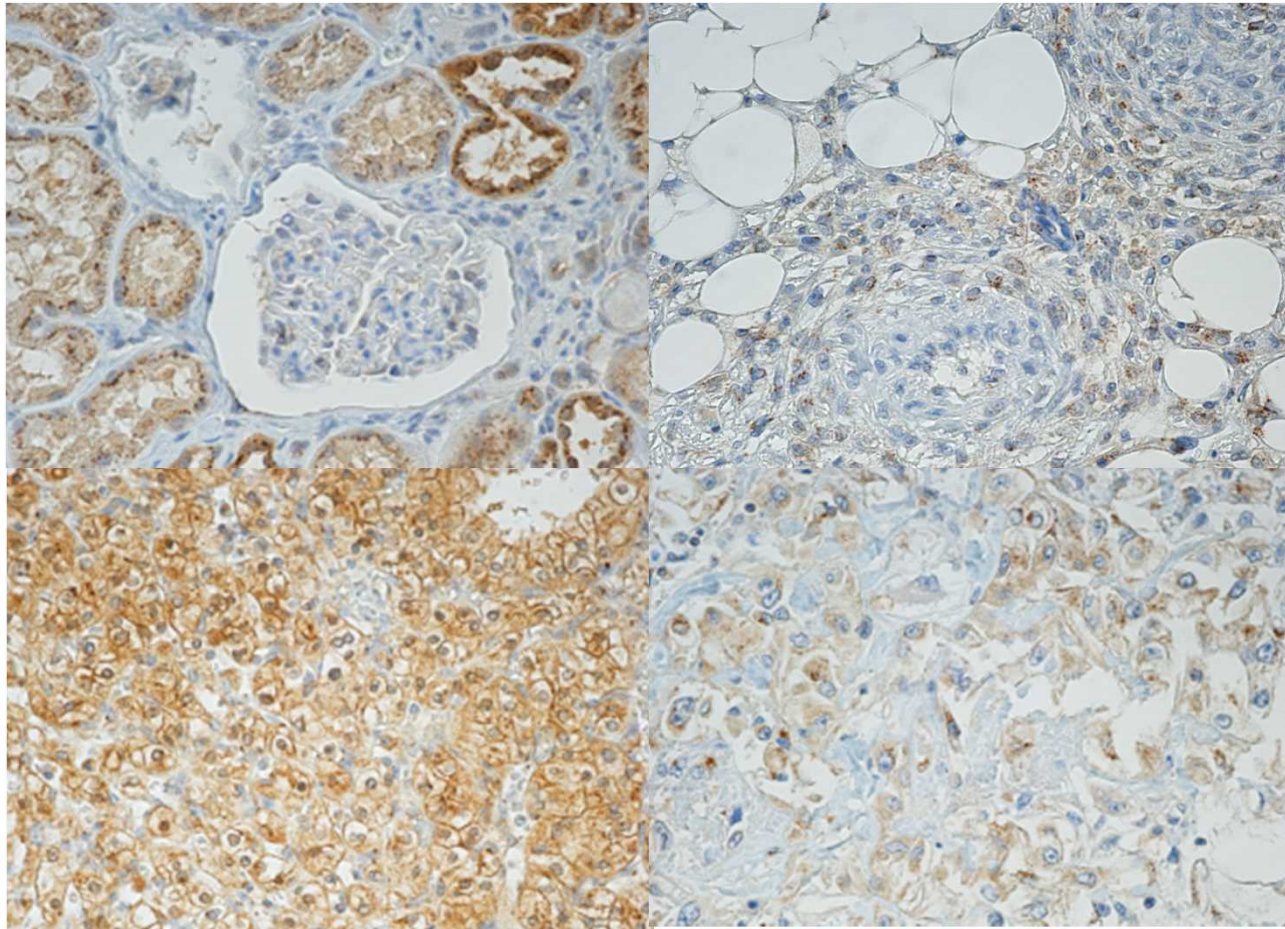


Recurrence-Free Survival

Figure 5B

A

B



C

D

Figure 6