

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 11 日現在

機関番号：17501  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21791512  
 研究課題名（和文） 腎癌増殖・骨転移における $\beta 2$ ミクログロブリン刺激伝導系の影響に関する研究  
 研究課題名（英文） Analysis of  $\beta 2$ -microglobulin mediated signaling in renal cell carcinoma growth and its bone metastasis  
 研究代表者  
 野村 威雄（NOMURA TAKEO）  
 大分大学 医学部 講師  
 研究者番号：40347034

研究成果の概要（和文）：腎細胞癌において $\beta 2$ ミクログロブリン( $\beta 2M$ )は上皮間葉系変化を生じることで、骨転移を促進し致死性を高めた。抗 $\beta 2M$ 中和抗体投与により転移能及び致死性は改善することから、 $\beta 2M$ およびその下流のシグナル伝達系は新たな治療標的となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrates for the first time how  $\beta 2$ -microglobulin ( $\beta 2$ -M) supports lethal metastasis in vivo in human renal cancer cells (SN12C).  $\beta 2$ -M mediates this process by activating epithelial to mesenchymal transition (EMT) to promote lethal bone and soft tissue metastases in host mice. These results demonstrate the role of  $\beta 2$ -M in renal cancer metastasis and lethality. Thus,  $\beta 2$ -M and its downstream signaling pathways are promising prognostic markers of renal cancer metastases and novel therapeutic targets for cancer therapy using anti- $\beta 2$ -M antibody.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1900000	570000	2470000
2010年度	1000000	300000	1300000
2011年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
総計	3400000	1020000	4420000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

画像診断技術の進歩により、腎癌の早期発見・治療が実現しつつあるが、急速に進行し浸潤転移する症例の有効な治療法は未だ確立していない。また分子標的薬が臨床応用されたが、腎細胞癌骨転移巣への有効性は不定であり、骨転移巣への有効な治療法を確立す

るためには、腎癌の増殖・浸潤さらには骨転移機構の分子細胞生物学的解明が不可欠である。われわれはこれまでに housekeeping gene である $\beta 2$ ミクログロブリン( $\beta 2M$ )が前立腺癌において成長促進因子として機能し、特に骨転移巣での増殖に関係することを報告した(Cancer Res, 66: 9108-16, 2006)。さ

らに腎癌においては、 $\beta 2M$  が腎癌細胞から分泌され、可溶性蛋白として Protein kinase A (PKA)-cyclic AMP responsive element-binding protein (CREB) シグナル伝達系の最上流に位置し、細胞外から PKA-CREB シグナル伝達系を活性化することで、血管新生因子である Vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現を亢進し、その結果として血管新生に加えて、phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) および mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達系が活性化されるために腎癌細胞が増殖・浸潤することを動物モデルで証明した (Clin Cancer Res, 12: 7294-7305, 2006)。さらに培養腎癌細胞において抗 $\beta 2M$  中和抗体を作用させ、上記シグナル伝達系を阻害すると、VEGF 発現が抑制されるだけでなく、PI3K/Akt および MAPK シグナル伝達系が抑制される結果、Bad リン酸化 (Ser 136/Ser 112) が抑制され、また c-jun N-terminal kinase (JNK) シグナル伝達系が活性化され Bcl-2 リン酸化 (Ser 70) が亢進し、最終的にアポトーシスが誘導されることを報告した (J Urol, 178: 292-300, 2007)。 $\beta 2M$  はすべての真核細胞に発現しており、MHC class I 抗原重鎖の一部を構成し、細胞障害性 T 細胞によって識別される細胞表面抗原としての機能を有することが知られているが (Annu Rev Biochem, 59: 253-88, 1990)、 $\beta 2M$  の表面抗原以外の機能解析は皆無であり、白血病細胞の増殖分裂に関与することが報告されているが、固形癌 (前立腺癌、腎癌) での細胞増殖に関係するシグナル伝達系の活性化因子としての機能解析はわれわれの報告のみである (Cancer Res, 66: 9108-16, 2006, Clin Cancer Res, 12: 7294-7305, 2006, Clin Genitourin Cancer, 5: 162-70, 2006, J Urol, 178: 292-300, 2007, Clin Cancer Res, 14: 5341-7, 2008)。

## 2. 研究の目的

本研究においては、 $\beta 2M$  シグナル伝達系活性化腎癌細胞に認められた増殖・浸潤能獲得の分子学的メカニズムを PI3K/Akt および MAPK シグナル伝達系とクロストークすると考えられる上皮間葉系変化 (Epithelial-mesenchym transition, EMT) を中心に解析し、動物モデルにおいてその転移能および致死性を評価したのち、抗 $\beta 2M$  中和抗体を用いて、その治療効果および有害事象を明らかにする。

## 3. 研究の方法

$\beta 2M$  刺激伝達系による腎癌細胞の増殖・浸潤および骨転移機構を明らかにするために、 $\beta 2M$  安定過剰発現腎癌細胞株 (SN12C/ $\beta 2M$ ) における EMT について分子細胞生物学的に

解析する。EMT 関連分子群に加えて、その転写因子である Snail の発現およびその細胞内局在を検出し、さらに Snail 活性化に Stat3 およびそのシグナル調節に働く可能性のある Zinc transporter である LIV1 の関係について阻害剤を使用して、PI3K/Akt および MAPK シグナル伝達系とのクロストークとともに解析する。同時に抗 $\beta 2M$  中和抗体による EMT 関連分子の変化を解析する。次にヌードマウスを用いて SN12C/ $\beta 2M$  細胞全身転移モデルを作成し、 $\beta 2M$  シグナル活性化腎癌細胞の転移能および致死性について、コントロール細胞と比較する。さらに、抗 $\beta 2M$  中和抗体を全身転移マウスに全身投与し、転移巣における治療成績および有害事象の発生を検討する。最終的にはヒト腎癌摘出標本を用いて  $\beta 2M$  発現とその悪性度および病期との関係を統計学的に解析する。併せて腎癌患者での血中および尿中  $\beta 2M$  濃度が腫瘍増悪因子あるいは予後因子となり得るか臨床病期と比較検討する。

## 4. 研究成果

$\beta 2M$  シグナル伝達系が活性化された高浸潤能腎癌細胞： $\beta 2M$  安定高発現腎癌細胞株 (SN12C/ $\beta 2M$ ) は、形態的に上皮細胞の形態を喪失し、紡錘形の間葉細胞様を呈していた。免疫ブロット法で解析したところ、SN12C/ $\beta 2M$  細胞では EMT 関連分子のうち、E-cadherin 発現が減少し、N-cadherin および Vimentin 発現が増加していた。EMT 関連分子の転写因子として唯一確立している Snail の細胞内局在の変化および発現量の変化を SN12C/N 細胞 (コントロール細胞) と SN12C/ $\beta 2M$  細胞とで比較したところ、SN12C/ $\beta 2M$  細胞では Snail は細胞質から核内に移動しており、その発現量は SN12C/N 細胞では細胞質が優位に高発現し、SN12C/ $\beta 2M$  細胞では核に高発現していた。Stat3 の癌細胞における EMT への関与に関しては詳細な研究はないが、本研究では Stat3-LIV1-Snail シグナル伝達系が腎癌細胞における EMT に関係し、さらには  $\beta 2M$  がこのシグナル伝達系の上流に位置して、腎癌細胞での EMT を制御していることを解析した。抗 $\beta 2M$  中和抗体を用いて  $\beta 2M$ -Stat3-LIV1-Snail シグナル伝達系を阻害すると、Stat3 のリン酸化が抑制され、LIV1 発現が低下し、Snail の核内への移動が抑制された。同時に細胞質における Snail の発現低下を認めた。また抗 $\beta 2M$  中和抗体を作用させることで、mRNA および蛋白レベルで E-cadherin 発現は増加し、N-cadherin および Vimentin は発現低下していた。以上の結果から、 $\beta 2M$ -Stat3-LIV1-Snail シグナル伝達系が腎癌細胞において EMT を制御し、さらには浸潤能獲得に EMT 関連分子の変化が関連する

可能性があることが示唆された。

SN12C/ $\beta$ 2M -Luc 細胞を全身投与した腎癌転移マウスに、抗 $\beta$ 2M 中和抗体あるいはコントロール IgG を尾静脈より全身投与(3 日連続×4 週)し、2 群間での転移巣発生率を比較した。中和抗体による治療群では有意に骨転移率が低下した。剖検で採取した骨転移巣組織はTUNEL染色にてアポトーシス細胞の増加を認めた。

次に腎細胞癌から手術的に採取した腎癌摘出標本パラフィン包埋切片を用いて、 $\beta$ 2M 発現を酵素抗体法を用いた免疫組織染色法にて評価した。 $\beta$ 2M 発現量を正常尿細管上皮細胞と比較したところ、腎癌細胞では有意な $\beta$ 2M の高発現を認めた。さらに臨床病期分類に加えて Grade、血管浸潤との関係を統計学的に解析した。 $\beta$ 2M の染色強度と臨床病期分類の間には相関性は認められなかったが、Grade および血管浸潤の間には有意な正相関を認めた。血管新生因子の代表である VEGF と CD31 免疫染色では、VEGF と CD31 は正相関し、基礎研究で観察された $\beta$ 2M が VEGF を誘導することが、腎癌摘出標本でも確認された。また手術前後に採取した血液および尿検体における $\beta$ 2M 濃度を ELISA 法にて測定した。血液中 $\beta$ 2M 濃度は手術前後で有意な変化を認めなかったが、尿中 $\beta$ 2M 濃度は手術後有意に低下した。腎癌組織での $\beta$ 2M 発現量と血液および尿検体における $\beta$ 2M 濃度には相関関係は認められなかった。また臨床病期分類と手術前尿中 $\beta$ 2M 濃度は正相関しており、尿中 $\beta$ 2M 濃度は術後に低下することから、尿中 $\beta$ 2M 濃度は腎癌負荷を反映していると考えられた。以上の結果から尿中 $\beta$ 2M 濃度が腎細胞癌の腫瘍増悪因子あるいは予後因子となる可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Josson S, Nomura T, et al.  
 $\beta$ 2-microglobulin induces epithelial to mesenchymal transition and confers cancer lethality and bone metastasis in human cancer cells. *Cancer Res*, 71: 2600-2610, 2011

② 野村威雄, 三股浩光.  
 $\beta$ 2-ミクログロブリンによる腫瘍細胞増殖とその制御. *臨床検査* 55(1)27-35, 2011

[学会発表] (計 2 件)

① Advancements in Urology 2011  
Anti-beta2-microglobulin antibody is a

novel therapeutic agent for human renal cell carcinoma

Takeo Nomura, Wen-Chin Huang, Leland W.K.Chung, Hiromitsu Mimata

② 2009 年度 第 97 回日本泌尿器科学会総会  
 $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2M) シグナル伝達系を標的とした腎細胞癌治療法の検討  
野村威雄, Leland W. K. Chung, 三股浩光

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○ 取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 威雄 (NOMURA TAKEO)  
大分大学 医学部 講師  
研究者番号 : 40347034