

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 5 月 23 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791526

研究課題名（和文） 二重免疫染色法を用いた血管周皮細胞の検討と腎細胞癌の予後との関連

研究課題名（英文） Pericyte coverage of differentiated microvessels in clear cell renal cell carcinoma correlates with poorer prognosis

研究代表者

松田 大介（MATSUDA DAISUKE）

北里大学・医学部・助教

研究者番号：50348570

研究成果の概要（和文）：

研究の目的： 血管壁の主要な構造物である血管周皮細胞は、血管の成熟に重要な働きをもつが、腫瘍組織内での状態・働きは、未だ多くの点で明らかでない。淡明腎細胞癌における、血管周皮細胞の状態、腫瘍進展・転移との関連を解明する事を目的とする。

研究の目的： 根治的腎摘出術を施行した 162 人より得られた淡明腎細胞癌組織、転移巣切除を施行した 20 人より得られた転移性淡明腎細胞癌組織を対象とした。検体を血管周皮細胞マーカーである anti-SMA 抗体と、血管内皮細胞マーカーである anti-CD34 抗体で 2 重免疫染色した。Nuance Multispectral Imaging を用いて、血管内皮細胞と血管周皮細胞を識別・定量化し、血管周皮細胞の状態と淡明腎細胞癌の臨床的特長（悪性度、転移の有無、生存率）との関連につき検討した。

研究成果： 血管周皮細胞の含有率が高い血管（成熟度が高い血管）をもつ腫瘍では、血管周皮細胞の含有率が低い血管（成熟度が低い血管）をもつ腫瘍に比較して、生存率が優位に高かった。成熟度の低い血管をもつ腫瘍は、腫瘍悪性度、転移との関連が示唆された。血管の成熟度は淡明腎細胞癌の進行に重要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Purpose: The clinical significance of vascular maturation, which is marked by the presence of the pericytes, is still unclear. In the present study, we evaluated the correlation between vascular maturation and patients' prognosis in CCRCC.

Experimental Design: We analyzed formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections from 162 primary and 20 metastatic CCRCC patients. The sections were double-stained with pericyte marker anti-SMA antibody as an indicator of vascular maturation and the differentiated blood vessel marker anti-CD34 antibody. The Nuance Multispectral Imaging System was used to quantify those two cell types. We investigated the relationship between pericyte coverage (PC) and the clinicopathological parameters such as tumor grades, metastasis status, and patient survival.

Results: Lower PC were significantly correlated with higher tumor grades and poorer patient's prognosis. Lower PC was also significantly correlated with metastasis. More matured differentiated blood vessels seem to indicate better prognosis. The present study suggested that vascular maturation in CCRCC was important.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：淡明腎細胞癌、血管周皮細胞

1. 研究開始当初の背景

淡明腎細胞癌は腎臓に発生する腫瘍で、その発生率は近年増加傾向にある。しかし、いくつかの新しい治療方が提案されているにもかかわらず、死亡率は増加傾向にある。悪性度が高く、早期進行する腫瘍を識別できれば、症例にあった治療が選択できるが、その臨床的性質は、未だ多く点で解明されていない。

腫瘍周囲では、血管新生が盛んであるが、正常血管に比較して、腫瘍血管は、構造的・機能的に異常を示すことが知られている。血管壁の主要な構造物である血管周皮細胞は、血管の成長、安定、変性、生存、再構成等に重要な働きをもつが、腎細胞癌での血管周皮細胞の状態、腫瘍進展・転移との関連は未だ不明である。

2. 研究の目的

淡明腎細胞癌における、血管周皮細胞の状態、腫瘍進展・転移との関連を解明する事を目的とする。

3. 研究の方法

①検体

1980年～2006年に、根治的腎摘出術を施行し得られた162人分の淡明細胞癌組織を対象とした。また2003年～2007年に、転移巣切除を施行し得られた20人分の腫瘍組織を対象とした。

②2重免疫染色

パラフィン固定した腫瘍組織標本（薄さ4- μ m）に、血管内皮細胞のマーカーである anti-CD34 抗体と、血管周皮細胞のマーカーである anti-SMA 抗体を用いて2重免疫染色した。CD34 と SMA はそれぞれ、

3,3-diaminobenzidine (DAB) (茶色) と alkaline phosphatase (AP) (赤色) で標識した。またヘマトキシリンで、細胞核を対比染色した。免疫染色は Ventana Medical Systems 社 (Ventana Medical Systems, INC., Tucson, Arizona) の Discovery XT System を用いて施行した。

③画像解析

各標本で、腫瘍周辺部（腫瘍辺縁より2.4mm以内）の血管の最も豊富な部位を5カ所、腫瘍中心部（腫瘍辺縁より2.4mm以上内側）の血管の最も豊富な部位を5カ所、それぞれ対物200倍のデジタル画像を撮影した。光学的特性により DAB、AP、ヘマトキシリンをそれぞれ識別し、さらに各組織を定量化するために、Nuance multispectral imaging system を用いて pseudo-fluorescent 画像に変換した。得られた pseudo-fluoresce 画像を、Van Andel Institute で開発したソフトウェアを用いて、定量解析した。

④統計学的検討

Rank correlation analyses を用いて、血管周皮細胞含有率と組織学的悪性度の関連につき検討した。

Two-tailed Student's t test を用いて、腫瘍周辺部と腫瘍内側部の血管周皮細胞の含有率を比較検討した。また同 Test を用いて、原発巣組織と転移巣組織の血管周皮細胞含有率を比較検討した。

Kaplan-Meier 法を用いて、生存期間を検討した。

Cox proportional hazard regression models を用いて、単変量解析および多変量解析を行った。

4. 研究成果

①臨床病理学的特徴

原発巣症例の平均年齢は 59.3 ± 11.6 歳 (range 30 ~ 87) (男性 108 人、女性 54 人)、転移巣症例の平均年齢は 60.5 ± 7.3 歳 (range 48 ~ 77) (男性 15 人、女性 5) であった。

162 症例中、内側部位が観察されたものは 138 症例、外側部位が観察されたものは 118 症例、内側部位、外側部位両方が観察されたものは 92 症例であった。

転移性淡明腎細胞癌 20 症例の転移巣の内訳は、骨転移 7 例、肺転移 3 例、脳転移 2 例、肝転移 2 例、皮膚転移 2 例、リンパ節転移 2 例、甲状腺転移 1 例、副腎転移 1 例であった。

②CD34 と SMA による 2 重免疫染色像

Fig 1A、1B に 2 重免疫染色像を示す。CD34 (血管内皮細胞：茶色) と SMA (血管周皮細胞：赤色) がはっきり区別されて染色されているのがわかる。また、肉眼的にはっきり確認できなくても、Nuance Imaging system によって血管の存在を確認できる。

Fig 1A: 二重免疫染色 (低悪性度腫瘍)

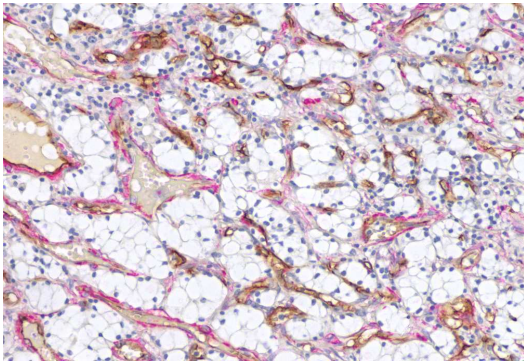
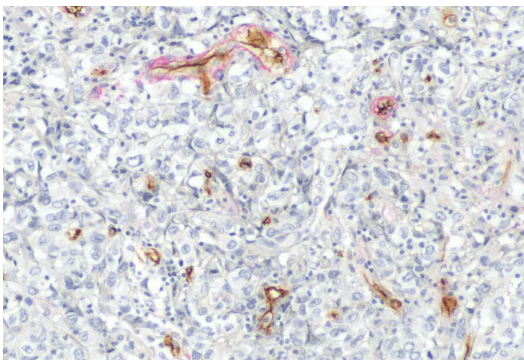


Fig 1B: 二重免疫染色 (高悪性度腫瘍)



CD34、SMA を定量測定するために、Fig 1A、1B を Nuance Imaging system によって pseudo-fluorescent 画像に変換した像を示す (Fig 2A、2B)。CD34 が赤色に、SMA が緑色に、核が青色に確認できる。

Fig 2A: pseudo-fluorescent 画像 (低悪性度腫瘍)

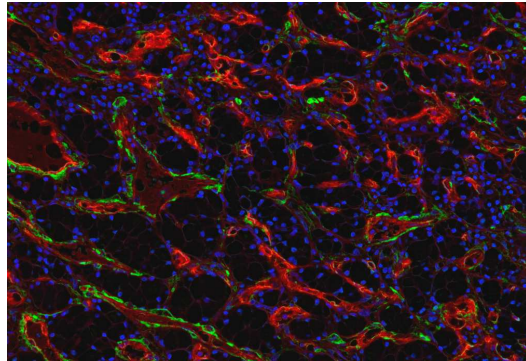
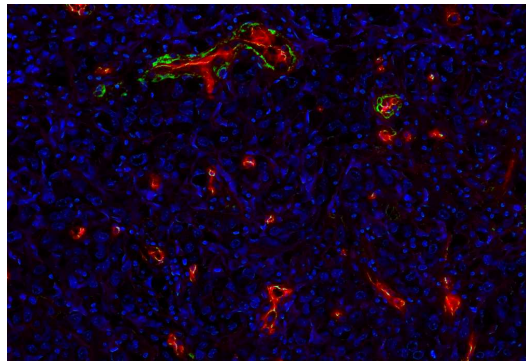


Fig 2B: pseudo-fluorescent 画像 (高悪性度腫瘍)



さらに Fig 2 より、CD34 および核を削除し、SMA のみが確認できる像を示す (Fig 3A、3B)

Fig 3A: pseudo-fluorescent 画像 (低悪性度腫瘍) SAM のみ

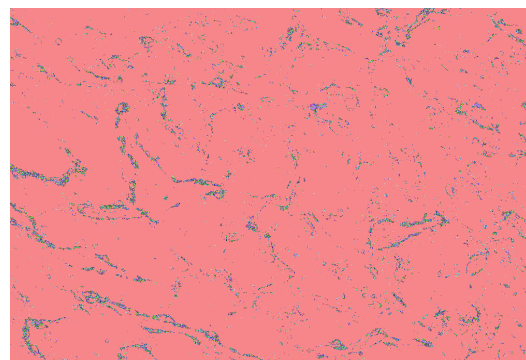
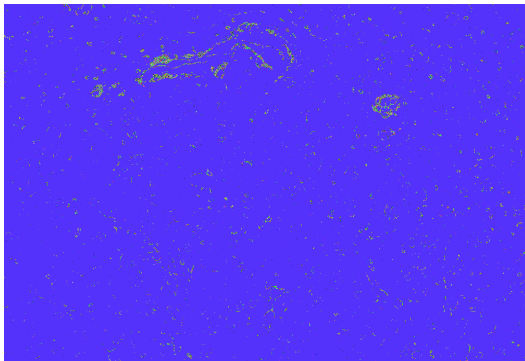


Fig 3B : pseudo-fluorescent 画像
(高悪性度腫瘍) SAM のみ



③組織学的悪性度別の血管周皮細胞含有率

Fig 3A、3B より、低悪性度腫瘍では、高悪性度腫瘍に比較して、血管周皮細胞の含有率が高いことがわかる。

④腫瘍周辺部、腫瘍内側部での血管周皮細胞含有率

Fig 4A、4B に、同一検体中の腫瘍周辺部および腫瘍内側部の pseudo-fluorescent 画像を示す。腫瘍周辺部では、腫瘍内側部に比較して血管周皮細胞の含有率が高いことがわかる。

Fig 4A : pseudo-fluorescent 画像
(腫瘍周辺部) SAM のみ

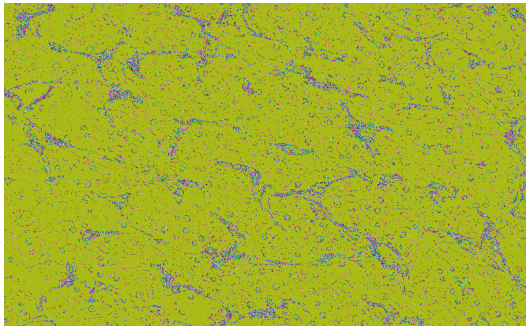
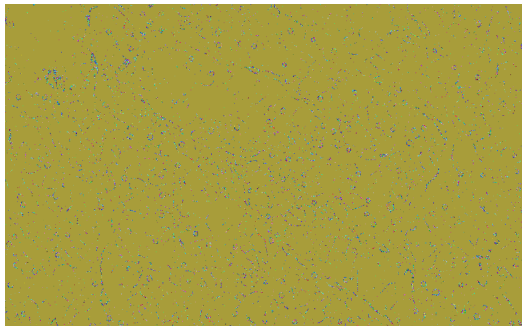


Fig 4B : pseudo-fluorescent 画像
(腫瘍内側部) SAM のみ



⑤組織学的悪性度別、部位別の血管周皮細胞平均含有率

<腫瘍内側部>

Grade 1 2.40 % (range 0.53 to 4.57),
Grade 2 1.81 % (range 0.86 to 5.1),
Grade 3 1.11 % (range 0.22 to 3.88),
Grade 4 0.52 % (range 0.02 to 1.67)

<腫瘍周辺部>

Grade 1 3.71 % (range 0.70 to 10.9),
Grade 2 2.25 % (range 0.78 to 5.27),
Grade 3 1.29 % (range 0.17 to 4.44),
Grade 4 1.09 % (range 0.17 to 5.55)

組織学的悪性度が高くなるにつれて、血管周皮細胞の含有率が低くなる傾向にあり、これは統計学的有意差を認めた ($P < 0.001$)。この傾向は腫瘍周辺部、腫瘍内側部の両方で認められた。

⑤転移巣での血管周皮細胞の含有率

転移のある症例では、転移のない症例と比較して、腫瘍周辺部 と腫瘍内側部の両方で、血管周皮細胞の含有率が優位に低かった。さらに悪性度の高い症例と比較して、転移巣では血管周皮細胞の含有率が優位に低かった。

⑥血管周皮細胞の含有率と生存期間との関連

血管周皮細胞の含有率と生存率との関連につき、Univariate Cox proportional hazard analyses を用いて検討した。血管周皮細胞の含有率が高い症例では、低い症例に比較して、生存期間が長いことが示された。

Variables	Coefficient	P Value
Univariate Analysis		
Grade	0.909	<0.0001
InnerPC	-7.56	<0.0001
PeripheralP		<0.0001
C	-8.16	
Multivariate Analysis		
Grade	0.427	0.032

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7件)

1. Matsuda, D., Iwamura, M., Baba, S., :
Cavernous hemangioma of the adrenal gland.
Int J Urol.16:424.2009
2. Matsuda, D., Iwamura, M., Baba, S., :
Multicentric hyaline-vascular Castleman's disease treated by laparoscopic resection. Int J Urol.16:336.2009
- 3: Daisuke Matsuda, Sok Kean Khoo, Aaron Massie, Masatsugu Iwamura, Jindong Chen, David Petillo, Bill Wondergem, Michael Avallone, Stephanie J. Kloostra, Min-Han Tan, Julie Koeman, Zhongfa Zhang, Richard J. Kahnoski, The French Kidney Cancer Study Group, Shiro Baba, Bin Tean The:
Identification of copy number alterations and its association with pathological features in clear cell and papillary RCC
CANCER LETTERS, 272/2, 260-7, 2008.12
- 4: Zhang ZF, Matsuda D, Khoo SK, Buzzitta K, Block E, Petillo D, Richard S, Anema J, Furge KA, Teh BT.
A comparison study reveals important features of agreement and disagreement between summarized DNA and RNA data obtained from renal cell carcinoma
MUTATION RESEARCH-GENETIC TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL MUTAGENESIS, 657/1, 77-83
- 5: Koeman JM, Russell RC, Tan MH, Petillo D, Westphal M, Koelzer K, Metcalf JL, Zhang Z, Matsuda D, Dykema KJ, Houseman HL, Kort EJ, Furge LL, Kahnoski RJ, Richard S, Vieillefond A, Swiatek PJ, Teh BT, Ohh M, Furge KA.
Somatic pairing of chromosome 19 in renal oncocytoma is associated with deregulated ELGN2-mediated oxygen-sensing response
PloS GENETICS, 5/4, 9):e1000176

6: Tan MH, Wong CF, Tan HL, Yang XJ, Ditlev J, Matsuda D, Khoo SK, Sugimura J, Fujioka T, Furge KA, Kort E, Giraud S, Ferlicot S, Vielh P, Amsellem-Ouazana D, Debré B, Flam T, Thiounn N, Zerbib M, Benoît G, Droupy S, Molinié V, Vieillefond A, Tan PH, Richard S, Teh BT. : Genomic expression and single-nucleotide polymorphism profiling discriminates chromophobe renal cell carcinoma and oncocytoma., BMC Cancer. 2010 May 12;10:196.

7: Satoh T, Ishiyama H, Matsumoto K, Tabata K, Kitano M, Iwamura M, Kimura M, Minamida S, Yamashita H, Matsuda D, Kotani S, Niibe Y, Uemae M, Hayakawa K, Baba S. : Cost comparison of curative therapies for localized prostate cancer in Japan: a single-institution experience., Jpn J Radiol. 2009 Nov;27(9):348-54. Epub 2009 Nov 27.

[学会発表] (計3件)

1. 松田 大介, 岩村正嗣, 土田 繭美, 木村将貴, 藤田哲夫, 佐藤威文, 馬場志郎:
Identification of copy number alteration in clear cell and papillary RCC、第97回日本泌尿器科学会総会、2009年4月16日、岡山
 - 2: 松田 大介、岩村 正嗣、佐藤 威文、山田 泰史、土田 繭美、田畑 健一、松本 和将、馬場 志郎:
Distribution of the positive surgical margin in laparoscopic prostatectomized specimens、26th World Congress of Endourology & SWL 2008.11.30 上海
 - 3: 松田 大介、岩村 正嗣、土田 繭美、佐藤 威文、山田 泰史、田畑 健一、松本 和将、馬場 志郎:
腹腔鏡下根治的前立腺摘除術における外科的切除縁陽性例と陽性部位の検討
第22回 日本 Endourology and ESWL 学会、2008.11.11 大阪
6. 研究組織
(1)研究代表者
松田 大介 (Matsuda Daisuke)
北里大学、医学部、助教
研究者番号: 50348570