

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592320

研究課題名(和文)末梢循環腫瘍血管内皮細胞を用いた転移性腎癌患者の診断・治療バイオマーカーの探索

研究課題名(英文)Discovery of diagnostic and therapeutic biomarker by circulating tumor endothelial cells in metastatic renal cell carcinoma

研究代表者

篠原 信雄 (Shinohara, Nobuo)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90250422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：転移性腎癌患者のCirculating endothelial cell (CEC)から採取したRNAを用いてこれまで共同研究室で同定してきたマウス腫瘍血管内皮マーカー (PTGIR、Biglycan、LOX、CXCR7など)の発現をreal-time PCRによって確認した。腎癌患者6症例において腎腫瘍と腎正常部より腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞をそれぞれ分離培養し、6症例ともPTGIR、Biglycan、LOX、CXCR7は有意に腫瘍血管内皮細胞での発現が亢進していた。これらの結果より腫瘍血管内皮マーカーを発現するCECが腎癌のバイオマーカー検討において有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified several markers (PTGIR, Biglycan, LOX, CXCR7 etc.) highly expressed in mouse tumor endothelial cell (TEC) by real-time PCR of circulating endothelial cell (CEC) in metastatic renal cell carcinoma(RCC). We isolated human TEC from human RCC tissues and human normal endothelial cell (NEC) from normal kidney tissues of six patients. PTGIR, Biglycan, LOX and CXCR7 expression levels were significantly higher in human TEC than in human NEC for all paired cases. These results suggested that CEC might be a useful biomarker of RCC.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：腎癌 バイオマーカー 腫瘍血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) がん治療において新規分子標的薬の開発が盛んであるが、臨床の現場ではこれらの中から患者個別に効果のある薬剤を事前に推測することはできず、治療効果を治療前後に診断し、予後予測ができるマーカーは現時点で存在しない。

(2) 従来、血管新生や血管新生阻害剤の研究には正常血管内皮細胞(Normal EC)であるヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC)が用いられるのが一般的であった。ところが近年、腫瘍血管は正常と異なり、屈曲蛇行し、内皮細胞間の結合が粗であることなどの形態学的な異常もあることが注目されてはじめてきた。しかし、腫瘍血管内皮細胞(Tumor EC)を分離培養をすることは様々な難点があったことから、それらの生物学的な性質については未だ不明な点が多い。

(3) Tumor EC は形態学的にも細胞同士の接着がルーズで、脱落しやすい状態にあり、容易に末梢血中に侵入する可能性が考えられるため、近年は末梢血中を循環する血管内皮細胞(Circulating EC)の存在が報告されはじめてきた(Endothelial progenitor cells: EPC, Circulating tumor endothelial cells: CTECを含む)。Circulating EC は末梢血液から非侵襲的に採取することができ、抗腫瘍療法である血管新生阻害療法の治療評価を目的に現実的な利用ができる細胞であるとして期待されている。

2. 研究の目的

末梢血液中に存在する循環腫瘍血管内皮細胞 (Circulating tumor endothelial cells: CTEC)を用いて転移性腎癌患者の診断・治療に有効なバイオマーカーを見いだすことである。

3. 研究の方法

(1) 転移性腎癌患者の末梢血液からシヨ糖勾配法にて赤血球を沈殿させ、単核球分画(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)を回収しフローサイトメトリーで Circulating EC(CD31(+) CD45(-))を解析の後・分離した。一部は血管内皮専用培地に播種して培養を行い、残りはさらに解析を行った。上記の方法で採取した細胞を、培養を経ずにフレッシュな状態でフローサイトメトリーにより解析した。単核球分画を CD31(+/-)、CD45(+/-)で、4 種類の分画に分類し、Circulating EC の分画 (CD31(+), CD45(-)) の fraction に、血管内皮のマーカーである CD105、CD144 などの抗原陽性、UEA-Lectin 結合や Dil-Ac-LDL 取り込みなどを確認した後、RNA を分離した。分離した RNA を用いて、これまで同定されている Tumor EC マーカーとの相関について解析した。

(2) 腎癌患者 6 症例の腎腫瘍と腎正常部よりそれぞれ腫瘍血管内皮細胞、正常血管内皮

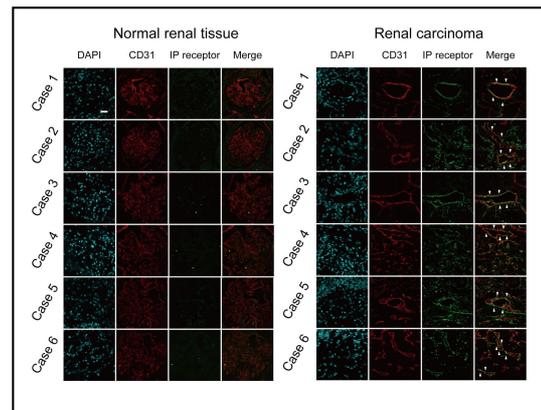
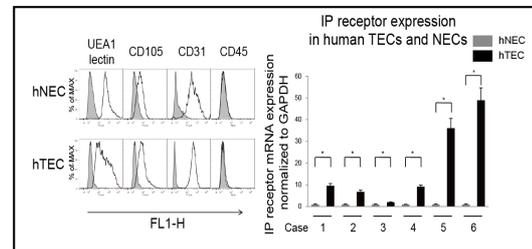
細胞を分離培養し、real-time PCR、免疫染色で PTGIR の発現を解析した。

(3) さらに Biglycan、LOX、CXCR7 の腫瘍血管における発現を検討した

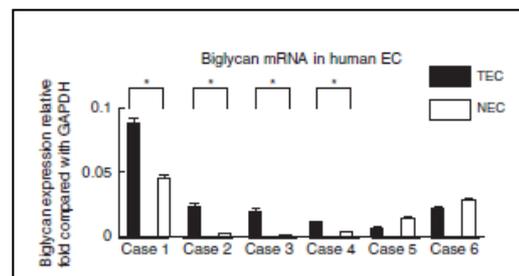
4. 研究成果

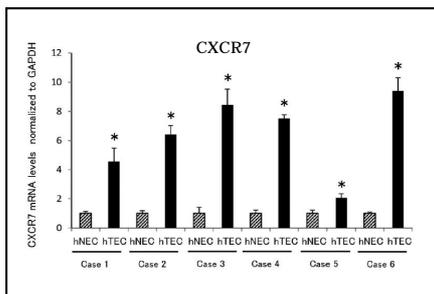
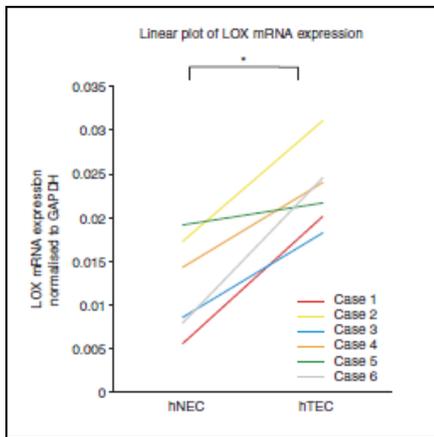
(1) 転移性腎癌患者の Circulating EC(CD31(+) CD45(-))から採取した RNA で、これまで共同研究室で同定してきたマウス腫瘍血管内皮マーカー (PTGIR、Biglycan、LOX、CXCR7 など)の発現を real-time PCR によって確認した。

(2) そのうちの PTGIR に注目しヒト腎がんにおける解析を行った。腎癌患者 6 症例の腎腫瘍と腎正常部より腫瘍血管内皮細胞を分離培養し、培養後にフローサイトメトリーで血管内皮マーカーである UEA1 レクチン、CD105、CD31 の発現の確認と単球マーカーである CD45 が陰性であることを確認した。6 症例とも real-time PCR、免疫染色で有意に腫瘍血管内皮細胞において PTGIR の発現が亢進していた。



(3) さらに、その他のマーカーとして Biglycan、LOX、CXCR7 を解析したが、どれも腫瘍血管内皮細胞において高発現の結果であった。





(4) これらの結果より腫瘍血管内皮マーカーを発現する CEC が腎癌のバイオマーカー検討において有用であることが示唆された。現在、治療開始前後に採血を行い Circulating EC を分離し CEC を用いての分子標的薬治療における治療効果判定の有用性や予後との関連を検討中である。

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 6 件)

1. Kuroda N, Tanaka A, Yamaguchi T, Kasahara K, Naruse K, Yamada Y, Chikai-Kubota K, Shinohara N, Nagashima Y, Mikami S, Oya M, Hamashima T, Michal M, Hes O: Chromophobe renal cell carcinoma, oncocytic variant: A proposal of a new variant and a critical diagnostic pitfall in diagnosing renal oncocytic tumors. *Med. Mol. Morphol.* 46(1), 49-55, 2013 (IF=1.417) (CI=1) 査読有

2. Maru S, Ishigaki Y, Shinohara N, Takata T, Tomosugi N, Nonomura K: Efficacy of ATP-competitive inhibitors of

mTORC2 on regulation of E-cadherin via HIF-2 in the renal cell carcinoma cell line 786-O. *J. Urol.* 189(5), 1921-1929, 2013 (IF=3.914) (CI=2) 査読有

3. Akiyama K, Ohga N, Maishi N, Hida Y, Kitayama K, Kawamoto T, Osawa T, Suzuki Y, Shinohara N, Nonomura K, Shindoh M, Hida K.: The F-prostaglandin receptor is a novel marker for tumor endothelial cells in renal cell carcinoma. *Pathol. Int.* 63(1), 37-44, 2013 (IF=1.657) 査読有

4. Ueda T, Uemura H, Tomita Y, Tsukamoto T, Kanayama H, Shinohara N, Tarazi J, Chen C, Kim S, Ozono S, Naito S, Akaza H: Efficacy and safety of axitinib versus sorafenib in metastatic renal cell carcinoma: subgroup analysis of Japanese patients from a randomized phase 3 AXIS trial. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 43(6), 616-628, 2013 (IF=2.063) (CI=1) 査読有

5. Osawa T, Ohga N, Hida Y, Kitayama K, Akiyama K, Onodera Y, Fujita M, Shinohara N, Nonomura K, Shindoh M, Hida K: Lysyl oxidase secreted by tumor endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis. *Br J Cancer* 109(8), 2237-2247, 2013 (IF=5.206) 査読有

6. 篠原信雄: 標準治療となった個別化治療 泌尿器腫瘍に対する個別化治療 - 転移性腎細胞がん -, *腫瘍内科* 9, 36-43, 2012 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Shinohara N, Nonomura N, Kimura G, Eto M, Minami H, Yamazaki N, Naito S: A randomized multi-center phase II trial on

efficacy of a hydrocolloid dressing containing ceramide with a low-friction external surface for hand-foot skin reaction caused by sorafenib in patients with renal cell carcinoma. The 49th ASCO Annual meeting Chicago 2013 6/1 6/5.

2. Shinohara N: Regional differences in the approach to systemic therapy for metastatic renal cell carcinoma: The Asian approach, 32th SIU annual meeting in FUKUOKA, Fukuoka, 2012 9/30 10/4.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 信雄 (SHINOHARA NOBUO)
北海道大学・医学研究科・准教授
研究者番号：90250422

(2) 研究分担者

樋田 京子 (HIDA KYOKO)
北海道大学・歯学研究科・特任准教授
研究者番号：40399952

樋田 康浩 (HIDA YASUHIRO)
北海道大学・大学病院・講師
研究者番号：30399919

野々村 克也 (NONOMURA KATSUYA)
北海道大学・大学院医学研究科・特任教授
研究者番号：60113750

(3) 連携研究者

なし