

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659757

研究課題名（和文） 腎癌の腫瘍血管における骨髄由来細胞の役割の検討

研究課題名（英文） The role of bone marrow-derived cells in the development of tumor vessels in renal cell carcinoma

研究代表者

中井 康友（NAKAI YASUTOMO）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20432479

研究成果の概要（和文）：

腎癌の進行には腫瘍血管新生が重要な役割を持っており、腫瘍血管新生のメカニズムを知ることは極めて重要である。本研究で、コラゲナーゼ産生刺激活性を持つ extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) が腎癌の腫瘍血管新生に役割を持っている可能性があることを明らかにした。本研究では骨髄由来の血管内皮前駆細胞（EPC）の腎癌での腫瘍血管新生の役割についての直接的に検討することはできなかったが、EMMPRIN により腎癌周囲の環境が変化することにより、骨髄由来の EPC が腫瘍血管新生に関与していることも考えられ、今後の研究テーマある。

研究成果の概要（英文）：

It is quite important to understand the nature of tumor vessels in the treatment of renal cell cancer (RCC). In this study, we found that EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer), which enhances production of collagenase, have an important role in angiogenesis in RCC. Unfortunately, we were not able to clarify the role of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPC) in the development of tumor vessels, however, it might be possible that in the microenvironment which is modified by expression of EMMPRIN by RCC, EPC plays some role in angiogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,200,000	660,000	2,860,000

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：腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

かつては、転移性腎癌に対する治療薬としては、インターフェロンなどの免疫治療しかなかったなか、2008年からは本邦でも分子標的薬が使用できるようになり、腎癌の治療成績は大きく改善するものと期待された。しかしながら、腫瘍が著明に縮小する

ものは高々10-30%程度であり、生存期間の延長も数ヶ月と大きなものではなく、更なる治療成績の改善が切望されている。

腎癌に対する分子標的薬の作用メカニズムとしては、腎癌細胞に直接作用し、癌細胞を死滅させる直接作用の他に、腎癌で豊富な腫瘍血管の増殖をターゲットとするこ

とで、腫瘍血管を死滅させ、癌組織を虚血状態に導き、癌細胞を死滅させる間接作用が言われているが、腎癌における腫瘍血管の特徴、増殖のメカニズムなどは十分に研究されていない。また、腫瘍血管の形成には骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (EPC) が関与している可能性があることも報告されているが、腎癌の腫瘍血管の形成における EPC の役割は全く知られていなかった。腎癌治療における腫瘍血管の形成のメカニズムを理解することは、腎癌のさらなる治療成績の改善に必要なである。

2. 研究の目的

腎癌治療における腫瘍血管の役割を検討することを目的に、以下のような個別の目標を立てた。

- (1) ヒト腎癌の臨床検体における腫瘍血管の形態を詳細に検討し、予後との関連を検討する
- (2) 腎癌動物モデルを用いて腫瘍血管形成における骨髄由来細胞の役割を検討する
- (3) 細胞外基質の破壊に対して重要なコラーゲナーゼ産生刺激活性を持つ extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) は腫瘍血管の新生促進を介して腎癌の進行や治療抵抗性に関与する可能性が考えられる。EMMPRIN の腫瘍細胞での発現と腫瘍血管形成の関連、予後との関連、治療標的の可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 2002 年から 2004 年までに大阪大学医学部附属病院で腎癌に対して腎摘除術を受けた 50 例の腎癌検体を用いて腫瘍血管と予後の検討を行った。腫瘍血管と正常血管

と厳密に区別するため、腫瘍血管は壁細胞の裏打ちのない血管、すなわち、SMA (smooth muscle actin) 陰性、CD (cluster of differentiation) 34 陽性の血管を腫瘍血管として定義した。微小血管面積 (MVA) と微小血管濃度 (MVD) は KEYENCE 社の BZ-9000 Analyzer を用いて評価した。

(2) ノードマウス (BALB/C-nu/nu) の骨髄を、全身に放射線照射することで破壊した後、GFP マウスより採取した骨髄細胞を尾静脈注射することで骨髄移植を行う。骨髄移植 3 週間後に骨髄細胞が GFP 陽性の骨髄細胞に置き換わったノードマウスにマウス腎癌細胞株である RENCA 細胞あるいは、VHL 遺伝子に変異を持つヒト腎癌細胞株 786-O 細胞をそれぞれ 1×10^5 個ずつ腎被膜下 1ml のマトリゲル™ とともに移植することで同所性移植を行い、骨髄細胞が GFP 陽性細胞に置換された腎癌モデル動物 (骨髄移植腎癌モデル) を作成する。成長した腎癌組織の腫瘍血管における骨髄由来細胞の寄与を、GFP をマーカーとして検討する。

- (3) ①(1) で評価した臨床検体を用いて、EMMPRIN の発現と予後、腫瘍血管の MVA との相関を検討する。
 - ② EMMPRIN を siRNA でノックダウンした腎癌細胞株を作成し、血管新生因子の発現を検討する。
 - ③ EMMPRIN を強制発現させた腎癌細胞株を作成し、ノードマウスに移植し、腫瘍の大きさと、腫瘍血管新生について検討する。

4. 研究成果

(1) 腎癌の臨床検体において、壁細胞の裏打ちのない腫瘍血管の MVA や、MVD が大きい症例は全生存期間や無再発生存期間が有意に長く、特に MVA で大きくその傾向が見られた (図 1)。また、腫瘍血管の MVA

は再発への独立した危険因子であることが明らかとなった。このことから、腎癌における腫瘍血管は腫瘍の進展などに関与し、腫瘍血管を標的とする治療の重要性が改めて確認された。

図1口

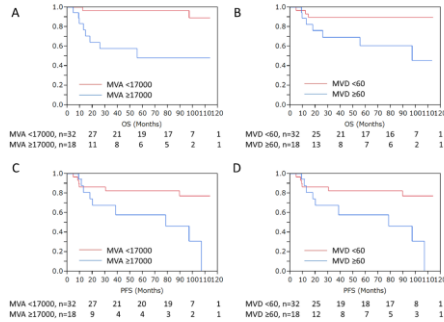


図1. 腫瘍血管のMVAとMVDは夜ごと相関している。A. MVAと全生存率 B. MVDと全生存率 C. MVAと非再発生存率 D. MVDと非再発生存率

(2) ノードマウスに全身放射線照射を行い、GFP マウスの骨髄細胞を静脈注射することで骨髄移植を行ったが、全てのマウスが骨髄移植後の1-3週間の間に死亡した。移植した骨髄細胞が生着しない、あるいはGVHDによるものと思われ、動物愛護の観点からこれ以上骨髄移植実験を行うことは不適切と判断し、骨髄移植実験は中止した。

(3) ①腎癌でのEMMPRINの発現は腫瘍血管のMVAと有意な正の相関が認められ、EMMPRINの発現が高い症例の方が有意に予後不良であった(図2、3)。

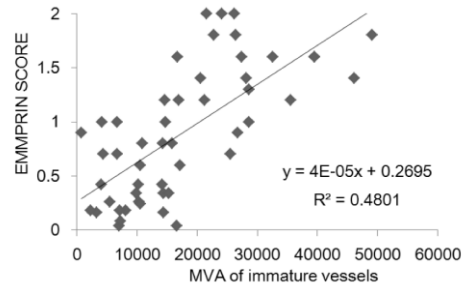


図2. EMMPRINの発現は腫瘍血管のMVAと相関している。

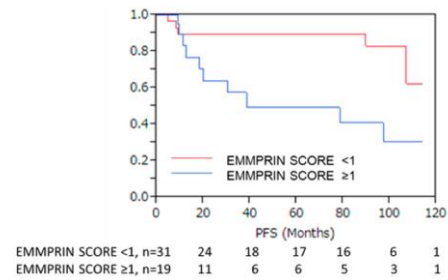


図3. EMMPRINの発現が高い症例は非再発期間が短い

② 腎癌細胞株786-0のEMMPRINをsiRNAでノックダウンすると、VEGFやbFGFなどの血管新生因子の産生が抑制された。

③ 腎癌細胞株Caki-1にEMMPRINを強制発現させ、ノードマウスの皮下に移植すると、腫瘍体積はコントロールに比べて有意に大きく(図4)、また、腫瘍血管のMVAもコントロールに比べて有意に高く、EMMPRINは腫瘍血管新生の亢進を介して腎癌の進行に関与していることが考えられた。

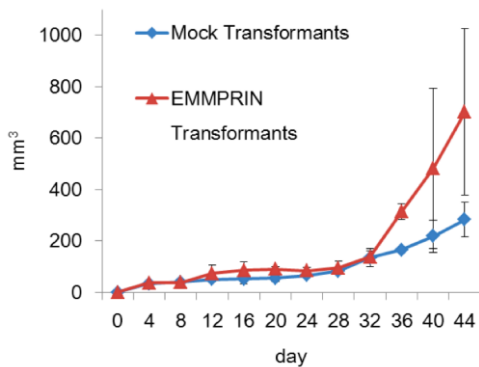


図 4. EMMPRIN を強制発現させると腫瘍は増大する

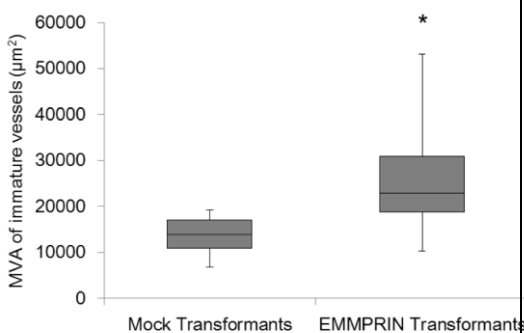


図 5. EMMPRIN を強制発現した腫瘍では MVA が高い

本研究では骨髄由来の EPC の腫瘍血管新生の役割についての検討まではできなかったが、EMMPRIN により腎癌周囲の環境が変化することにより、腫瘍血管新生が亢進し、そのような新生血管に EPC が関与しているか検討することは今後行う予定である。

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)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Mototaka Sato, Yasutomo Nakai, Correlation of microvessel area and density with prognostic factors in renal cell carcinoma. 第 70 回日本癌学会総会、2011.9.20、名古屋

- ② 佐藤元孝、中井康友、腎癌における微小血管面積、微小血管濃度と予後因子との相関. 第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012.4.21、東京
- ③ Mototaka Sato, Yasutomo Nakai, Correlation of microvessel area and microvessel density with prognostic factors in renal cell carcinoma. AUA annual meeting, 2012.5.21, Atlanta
- ④ Mototaka Sato, Yasutomo Nakai, Quantification of angiogenesis in renal cell carcinoma. 32nd Congress of the Societe Internationale d'Urologie, 2012.10.1, Fukuoka
- ⑤ 佐藤元孝、中井康友、腎細胞癌における EMMPRIN の発現とその機能解析、第 22 回泌尿器科分子・細胞研究会、2013.3.9、高知
- ⑥ 佐藤元孝、中井康友、EMMPRIN は腎細胞癌細胞の血管新生、増殖、浸潤を促進し、その予後規定因子となる. 第 101 回日本泌尿器科学会総会、2013.4.26、札幌
- ⑦ Mototaka Sato, Yasutomo Nakai, EMMPRIN promotes tumor cell angiogenesis, proliferation, invasion and predicts patient outcome in renal cell carcinoma. AUA annual meeting, 2013.5.5, San Diego

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
中井 康友 (NAKAI YASUTOMO)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20432479