

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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790417

研究課題名（和文） EMT 誘導因子をターゲットとした腎細胞癌の分子標的治療

研究課題名（英文） EMT-targeted molecular therapy for renal cell carcinoma

研究代表者

三上 修治 (MIKAMI SHUJI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20338180

研究成果の概要（和文）：

本研究では、TNF- α が腎細胞癌細胞株の上皮-間葉転換(EMT)誘導により癌細胞の浸潤能を高め、癌幹細胞マーカーである CD44 発現を誘導することを明らかにした。腎細胞癌切除検体では、TNF- α 、CD44 発現が癌の進展・予後と相関し、分子標的薬スニチニブ治療後に残存している治療耐性癌細胞は TNF- α 、CD44 を高発現していた。以上のデータより、TNF- α /CD44 経路は、腎細胞癌の増殖・浸潤・転移に重要な役割を果たすのみならず、分子標的薬に対する治療耐性に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

TNF- α and CD44 were expressed in carcinoma cells of high-grade clear cell renal cell carcinomas (ccRCCs) and the expression levels showed positive correlation with primary tumor stage and distant metastasis. Elevated expression of TNF- α and CD44 was predictors of progression-free and overall survivals. TNF- α induced EMT and expression of CD44 in ccRCC cells. In sunitinib-treated ccRCCs, TNF- α and CD44 were strongly expressed by residual cancer cells. Our data suggest that TNF- α plays an important role in progression of ccRCCs by inducing EMT and CD44 expression, and that CD44 may be involved in the resistance to the sunitinib treatment.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：人体病理

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：上皮-間葉転換、腎細胞癌、TNF- α 、転移、分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌は根治術後でも高率に再発することが知られている。転移性腎細胞癌には抗癌化学療法や放射線治療の効果はなくインターフェロン- α やインターロイキン-2等の免疫療法が行われてきたが、奏効率は10～20%に留まっている。近年、転移性腎細胞癌に対し血管新生阻害薬スニチニブ等の分子標的薬による治療が導入され腫瘍縮小効果が得られているものの、抗腫瘍効果は未だ不十分であり、大部分の症例で治療耐性になること

が問題となっている。しかし、耐性機構の解明につながる基礎的研究は殆ど行われていないのが実情である。

研究代表者は外科病理診断を通じてスニチニブ治療後の腎細胞癌組織では、脱分化傾向の顕著な紡錘細胞癌の残存を確認している形態学的に通常型の腎細胞癌から紡錘細胞癌への移行は上皮-間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)と考えられ、腎細胞癌ではEMTがスニチニブ治療に対する耐性獲得に関与していると

考えられる。そのため、腎細胞癌の EMT 誘導機構が特定出来れば、根治療法の開発につながる事が期待されるため、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

Tumor necrosis factor- α (TNF- α)は当初腫瘍壊死因子として発見されたが、近年低用量の TNF- α はむしろ腫瘍の増殖を促進することが報告されている。また、TNF- α は transforming growth factor- β (TGF- β)とともに主要な EMT 誘導因子である。また、乳癌では癌幹細胞マーカーである CD44 を TNF- α が誘導することも知られている。しかし、腎細胞癌における TNF- α 発現と臨床病理学的因子や予後との相関についての報告はない。本研究では、腎細胞癌細胞株における TNF- α による EMT 誘導機構を解析するとともに、癌幹細胞マーカーである CD44 の誘導を解析した。腎細胞癌外科切除検体における TNF- α 、CD44 発現を免疫組織学的に解析し、臨床病理学的因子、予後との関連を調べた。さらに、分子標的薬治療前後の腎細胞癌切除検体における TNF- α 、CD44 発現を検討し、治療耐性との関連を検討した。

3. 研究の方法

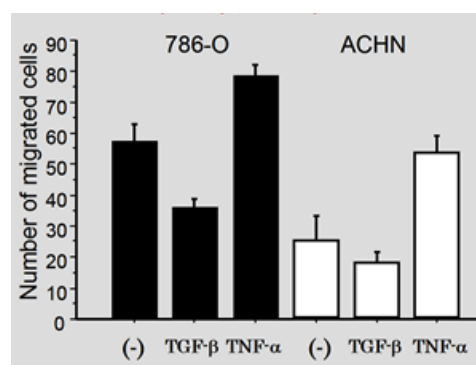
- (1) 腎細胞癌外科切除検体における TNF- α 、CD44 発現の解析: 原発性淡明細胞型腎細胞癌 113 例のパラフィン切片を用いて TNF- α 、CD44 発現を免疫組織学的に検討し、臨床病理学的因子および予後との関連を統計学的に解析した。
- (2) TNF- α による腎細胞癌由来細胞株の EMT 誘導機構の解析: 腎細胞がん由来細胞株である 786-O と ACHN の培養系に主要な EMT 誘導因子である TNF- α と TGF- β を添加し、trans-well culture insert や Matrigel invasion chamber を用いて遊走能と浸潤能の変化を測定するとともに、E-cadherin、matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)、TNF- α 発現の変化を定量 PCR 法で測定した。
- (3) TNF- α による CD44 発現の誘導: TNF- α を 786-O と ACHN の培養系に加えた際の CD44 発現の変化を定量 PCR 法と免疫ブロット法によって検討した。
- (4) スニチニブ治療後残存癌細胞における TNF- α 、CD44 発現解析: スニチニブ治療によるがん細胞の形質変化を検討するため、上記の原発性腎細胞癌 113 例に加え、スニチニブ治療後の原発性腎細胞がん 4 例および転移性腎細胞癌 (未治療 12 例とスニチニブ治療後 10 例) にお

ける TNF- α 、CD44 発現を調べ治療との相関を検討した。

- (5) 腎細胞癌外科切除検体における血管密度の測定: スニチニブ治療による血管新生抑制効果を調べるため、CD34 染色を行って微小血管密度を測定した。
- (6) 倫理面への配慮: ヒト癌患者の組織を用いた解析にあたっては、患者本人のインフォームドコンセントを得た上で用い、慶應義塾大学倫理委員会の承認のもと、厚生労働省の倫理指針を遵守して行った。

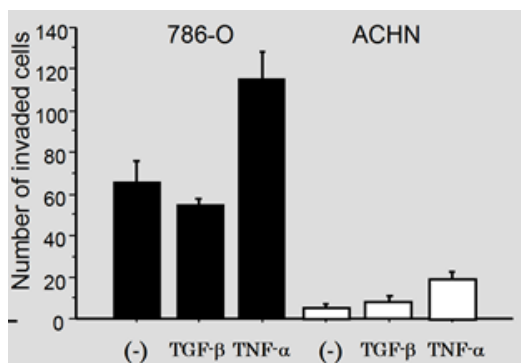
4. 研究成果

- (1) 腎細胞癌における TNF- α 、CD44 の発現と臨床病理学的因子の相関: TNF- α 、CD44 発現は腎細胞がんの原発巣の進展度、遠隔転移、組織学的異型度と相関していた。また、TNF- α 、CD44 高発現例は低発現例に比べ、早期に再発し、死亡率が高いことがわかった。
- (2) 腎細胞癌における TNF- α 、CD44 発現の関連: TNF- α 高発現症例は低発現例に比べ有意に CD44 発現が高い傾向がみられ、腎細胞癌組織において TNF- α が CD44 発現を誘導していることが示唆された。
- (3) TNF- α による 786-O と ACHN の EMT 誘導: TNF- α を添加して 786-O と ACHN を培養すると E-cadherin 発現が低下し、vimentin と MMP-9 発現が上昇するとともに、*in vitro*における遊走能と浸潤能が亢進した (下図)。また、



興味深いことに TNF- α 投与によりがん細胞の TNF- α mRNA 発現が誘導された。

- (4) TNF- α による CD44 発現の誘導: TNF- α 投与により癌細胞の CD44 mRNA 発現が上昇した。免疫ブロット法により CD44 蛋白発現の上昇も確認された。

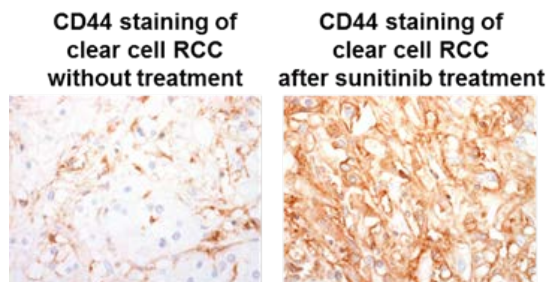


- (5) スニチニブ治療後癌組織における CD44 発現の相関: スニチニブ治療後の腎細胞癌原発巣では未治療組織に比べ、有意に CD44 発現が上昇していた。同様にスニチニブ治療後の転移性腎細胞がん組織は未治療の症例に比べ CD44 陽性細胞の比率が有為に増加していた (右上図)。
- (6) スニチニブ治療と微小血管密度の相関: スニチニブ治療と微小血管密度の間には有意な関連は認めなかった。
- (7) 考察: EMT は癌細胞の浸潤・転移の重要なステップであり、EMT では E-cadherin の低下により細胞接着能が低下し、MMP の誘導により浸潤能が亢進することが重要と考えられている。本研究により TNF-α が腎細胞癌の EMT を誘導し、E-cadherin 発現の抑制および vimentin と MMP-9 発現の誘導によってがん細胞の遊走能と浸潤能を高めていることが明らかとなった。

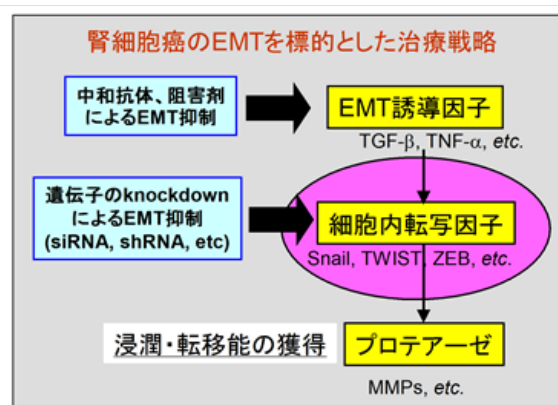
転移性腎細胞癌に対するスニチニブ治療は従来の免疫療法と比較すると有意に生存期間が延長するとされているが、多くの患者において治療耐性となり、最終的に患者は死亡する。そのため、スニチニブ治療後に残存する耐性癌細胞の形質を解析することは極めて重要である。癌の治療抵抗性にはがん幹細胞が関与していると考えられ、EMT と癌幹細胞の分子機構には共通点が多いことが最近明らかとなってきている。スニチニブ治療後の腎細胞癌組織は、未治療の組織に比べ有意に CD44 陽性の癌細胞の比率が上昇していた。CD44 は化学療法に対する治療抵抗性に関与していることが報告されており、CD44 を標的とした治療がスニチニブ抵抗性腎細胞がんに対する効果的な新規治療法の開発につながることを期待される。

スニチニブは VEGF receptor の作用を阻害し血管新生を抑制することで治療効果を発揮していると考えられている。本研究ではスニチニブ治療の有無と

微小血管密度の関連を検討したが、治療後癌組織での有意な微小血管密度の低下を認めなかった。スニチニブ治療を 2 クール後早期に摘出した腎細胞がん組



織では有意な血管密度低下が報告されている。スニチニブ治療により当初は血管密度が低下すると考えられるが、多くの症例では耐性となり、血管新生の再活性化により、長期治療後癌組織では血管密度の低下がみられなくなると推定された。



- (8) 結論: 腎細胞癌では、TNF-α が EMT および癌幹細胞マーカーである CD44 発現を誘導した。また、TNF-α、CD44 を高発現している腎細胞癌は早期に再発し、死亡率が高いことが明らかとなった。スニチニブ治療後に残存している癌細胞では CD44 が過剰発現していた。TNF-α による CD44 発現の誘導が腎細胞がんの浸潤・転移及び治療耐性に関与していると考えられ、TNF-α/CD44 経路の特異的な阻害が既存の分子標的治療に耐性となった腎細胞癌の新規治療標的になることが示唆された。

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 11 件) すべて査読あり

- (1) Miyazaki Y, Kosaka T, Mikami S, Kikuchi E, Tanaka N, Maeda T, Ishida

- M, Miyajima A, Nakagawa K, Okada Y, Sato Y, Oya M: The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 18; 4145-53, 2012
- (2) Takeda T, Kikuchi E, Mikami S, Suzuki E, Matsumoto K, Miyajima A, Okada Y, Oya M: Prognostic role of KiSS-1 and possibility of therapeutic modality of metastatin, the final peptide of the KiSS-1 gene, in urothelial carcinoma. *Mol Cancer Ther* 11; 853-63, 2012
- (3) Endo M, Nakano M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Kuroda H, Mikami S, Hato T, Aoi J, Horiguchi H, Miyata K, Odagiri H, Masuda T, Harada M, Horio H, Hishima T, Nomori H, Ito T, Yamamoto Y, Minami T, Okada S, Takahashi T, Mochizuki N, Iwase H, Oike Y: Tumor cell-derived angiopoietin-like protein ANGPTL2 is a critical driver of metastasis. *Cancer Res*. 72(7):1784-94, 2012
- (4) Shirotake S, Miyajima A, Kosaka T, Tanaka N, Kikuchi E, Mikami S, Okada Y, Oya M: Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 through angiotensin II type 1 receptor in prostate cancer. *Am J Pathol*. 180:1008-16, 2012
- (5) Suzuki K, Mizuno R, Mikami S, Tanaka N, Kanao K, Kikuchi E, Miyajima A, Nakagawa K, Oya M: Prognostic significance of high nuclear grade in patients with pathologic T1a renal cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 42; 831-5, 2012
- (6) Kuroda N, Ohe C, Mikami S, Inoue K, Nagashima Y, Cohen R, Pan CC, Michal M, Hes O: Multilocular cystic renal cell carcinoma with focus on clinical and pathobiological aspects. *Histol Histopathol*. 27(8):969-74, 2012
- (7) Mizuno R, Asano K, Mikami S, Nagata H, Kaneko G, Oya M: Patterns of interstitial lung disease during everolimus treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 42:442-6, 2012
- (8) Mikami S, Katsube K, Oya M, Ishida M, Kosaka T, Mizuno R, Mukai M, Okada Y: Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis. *Lab Invest* 91; 1443-58, 2011
- (9) Mikami S, Kikunaga H, Kameyama K, Mukai M. Clear cell adenocarcinoma arising in endometrial adenofibroma. *Pathol Int*. 61(3):167-70, 2011
- (10) Hayakawa N, Kikuchi E, Mikami S, Matsumoto K, Miyajima A, Oya M. The Clinical Impact of the Classification of Carcinoma In Situ on Tumor Recurrence and their Clinical Course in Patients with Bladder Tumor. *Jpn. J Clin Oncol*. 41(3):424-9, 2011
- (11) Takahashi S, Mikami S, Akiyama T, Kawase T. Intra-sellar Salivary Gland-like Pleomorphic Adenoma. *Neurosurgery* 68(2):562-5, 2011.
- [学会発表] (計 2 件)
- (1) 三上修治、大家基嗣、勝部憲一、向井万起男、岡田保典：腎細胞癌の異型性と浸潤・転移。第 4 4 回日本臨床分子形態学会総会。シンポジウム：腎がん研究の分子形態学的アプローチ。2012 年 9 月 28 日-29 日、高知。
- (2) 三上修治、大家基嗣、石田勝、水野隆一、向井万起男、岡田保典：腎細胞癌における ADAM17 発現の意義。第 101 回日本病理学会総会。2012 年 4 月 26 日-4 月 28 日、東京。
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
三上 修治 (MIKAMI SHUJI)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：20338180