

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791742

研究課題名(和文) 癌・精巣抗原～腎細胞癌バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Cancer/Testis Antigens ~The Novel Biomarker for Renal Cell Carcinoma

研究代表者

巢山 貴仁 (Suyama, Takahito)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60400925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：腎細胞癌における癌精巣抗原の一つであると考えられるCXCR3およびそのリガンドについて検討を行った。CXCR3およびそのリガンドが癌細胞で強く発現していることを示した。CXCR3/リガンドaxisが腎癌の転移に関し重要な役割の一つを果たしていることを、臨床検体を用いた検討、ならびに腎がん細胞株を用いた検討で示した。同時にCXCR3の発現が低酸素状態によって誘導されている可能性を示し、以上の内容を学術論文で発表した。さらには腎癌患者血清中でCXCR3のリガンドの測定が可能であり、現時点では有用な腫瘍マーカーがない腎癌において、腫瘍の状況や腫瘍の存在を示す有用なマーカーになる可能性も示された。

研究成果の概要(英文)：Renal cell carcinoma (RCC) is known to express CXCR3. CXCR3 can be considered as one of the Cancer/Testis Antigens. The function of CXCR3 on RCC has not been clarified. The aims of this study were to reveal the function of CXCR3. Fifty-six clinical samples of clear cell RCC and corresponding normal renal tissue samples were used. CXCR3 and its ligands were abundant in RCC samples compared with corresponding normal kidney samples. CXCL10 treatment induced 786-O cell migration and invasion. In clinical samples, the expressions of CXCR3 and CXCR3-A were significantly higher in metastatic RCC than in non-metastatic RCC. Finally, the expression of CXCR3-A and hypoxia-inducible factor 1 alpha were significantly correlated in the clinical samples. Regarding 786-O, treatment with cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>) up-regulated CXCR3 expression 4.5-fold. We showed the association of CXCR3 and RCC metastasis. The expression of CXCR3 may be regulated by hypoxia.

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：腎細胞癌 腫瘍マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

腎癌は泌尿器癌の中で発生率が3番目に高く、また、この20年で患者数が3倍になるなど、泌尿器科領域においては発症頻度の高い癌の一つである。治療方法については放射線照射、抗がん剤による化学療法が無効であり、手術療法が治療の中心であるが、進行癌で発見されるケースも増え、非常に治療に難渋する症例が増えている。進行癌に対しては現在分子標的薬が次々に開発され注目を集めている。分子標的薬は従来より行われてきたインターフェロン療法と比べ有意な対腫瘍効果、延命効果を認めているものの、非常に高額な治療であり、医療経済的に今後問題となることが予想されると同時に、その強い副作用が臨床的に非常にしばしば問題になっている。

一方で腎癌の重要な特徴として晩期再発があげられる。腎癌の場合は手術後10年、15年以上経過したのちに転移、再発を認める晩期再発が稀ではない。そのため手術患者のフォローが長期に渡る特徴がある。更には腎癌に対する臨床的に有用な腫瘍マーカーが皆無であるために、繰り返しCTなどの画像検査を受けなければならない負担や、発見の遅れ、また治療効果を正確に評価することが難しい場合があるなど、術後、治療後の患者の経過観察について数々の困難が存在する。腫瘍マーカーの開発が待望され続けている所以である。

一方、癌/精巣抗原(Cancer Testis Antigen/CTA)であるが、これは成人では性腺細胞と癌細胞のみに発現している特殊な分子であり、現在160種以上が知られている。精巣でしか発現を認めないこれら分子の一部は、進行癌に対するワクチン療法の良いターゲットとなり、メラノーマなどでの研究が進んでいる(Adams et al. *J Immunol.* 2008 Jul 1;181(1):776-84.)他方、乳癌における検討では、治療抵抗性の癌において発現の上昇を認

め、癌の治療効果を予測するためのマーカーとして期待の持てる結果が示されている(Grigoriadis et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 11;106(32):13493-8)。その他にも肝細胞癌、卵巣癌、尿路上皮癌でも幾つかのCTAがバイオマーカーの可能性を持っていることが示されている。更に実際に我々の前立腺がんを用いた検討では、いくつかのCTAの発現が、転移部のみに強く認められ、正常前立腺組織、限局癌では発現が認められない一方、他のCTAは限局癌のみで発現していて、転移部では発現していないことが明らかになった。これら幾つかのCTAを組み合わせることで、より悪性度の高い転移しやすい癌をそうでないものから区別できる可能性が示唆され、新たな腫瘍マーカーになりうるものとしておおきに期待が持てることを示した(Suyama et al. *Prostate* 2010 Jun, Shiraishi, Suyama et al. *J Transl Med* 2011 Sep)。

一方でCTAのうちの多くの分子が精子形成の過程や、未分化な幹細胞の分化の過程において重要な働きをしていることが示されており、生物の分化、発生に極めて重要であることが分かってきている。癌化の過程は分化が未分化に向かう、発生とは反対方向のプロセスであるが、癌でのみ発現しているCTAは癌化、癌の増殖、浸潤、転移形成にも重要な役割を果たしていることが示されている。実際我々は、MAGEA2というCTAが、前立腺がんの増殖、抗がん剤の感受性にかかわっていることを示した(Suyama et al. *Prostate* 2010 Jun)。

## 2. 研究の目的

腎癌は現在臨床的に有用な腫瘍マーカーが皆無であり、その出現が待望され続けている。一方、癌/精巣抗原(Cancer Testis Antigen/CTA)は性腺細胞と腫瘍でのみ発現しており、腫瘍マーカー、治療ターゲットとして近年注目が集まっている。

今回の研究の目的は、一つには腎癌の腫瘍マ

ーカーとなりうる CTA を見つけること。2 つ目には治療反応の良好な腎癌とそうでない腎癌を区別できるマーカーを見つけること。3 つ目は腎癌での分子標的治療の対象となるような CTA の機能を解析すること、である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 腎癌組織を用いた癌/精巣抗原 (Cancer Testis Antigen/CTA) 発現の検討。

我々が考案した (Suyama et al. *Prostate 2010 Jun*) CTA に特化したマイクロアレイを使用し、腎細胞癌の腫瘍部/非腫瘍部での CTA の発現を調べた。腫瘍検体 5 検体と非腫瘍検体 5 検体を用いた検討を行った。それにより、腫瘍で発現が増強しており、腫瘍マーカーの候補となりうる CTA をいくつかピックアップする予定であったが、予想に反して腎臓非腫瘍で発現が増強している CTA も多く、一方で腫瘍部のみで強発現しているものをいくつかピックアップしてみたものの、それらの発現は腫瘍によって大きく異なり、一定の傾向を網羅的に探索するのは難しいと考えられた。当初は CTA の発現 Signature のようないくつかの CTA を組み合わせることでより精度の高い腫瘍マーカーの構築を考えていたが、この時点でそれは難しいと判断し、CTA を絞り込み、その機能解析を行う方針に切り替えた。そこで、精巣の発生過程で発現し、種々の癌でも発現の増強が報告されている CXCR3 という 7 回膜貫通型の G タンパク共役型の分子が腎癌でも強く発現していることが報告されているため、CXCR3 は CTA の一種であると判断、これが一般的な腎癌の腫瘍マーカー、あるいは治療反応性を判断するための腫瘍マーカー、さらには治療対象となりうるものなのかどうか、検討を行うこととした。まず、腎細胞癌の細胞株を用いて CXCR3、その splice variant である CXCR3-A/B の発

現を確認した。

次いで臨床検体を用いて CXCR3A/B の発現、およびそのリガンドである CXCL9、CXCL10、CXCL11 の発現を腫瘍部、非腫瘍部で検討した。

いずれも mRNA、タンパクレベルでの検討を行った。

#### (2) CTA の機能解析

癌で高発現している CXCR3 の機能解析を開始した。はじめは腎癌細胞株を用い、まずは *in vitro* にて RNAi を用いた Knock down の系と Over expression の系、両方を試みたが、トランスフェクション効率が極めて悪く、安定した高発現株、および低発現株が樹立できないのみでなく、Transient な導入株の作成も困難であった。当初は Caki-1、ACHN を用いていたが、CXCR3 の発現が臨床形態と比較して強いとは言えず、CXCR3 強発現株である 786-O を用いた検討に切り替えた。機能解析としては 786-O は CXCR3 の高発現株であるため、強制的な Over expression はナンセンスであり、レセプターを中和する中和抗体を使用することで Knock down 系実験の変わりとした。

CXCR3 を CXCL10 で刺激することにより起こる変化を、増殖能、遊走能、浸潤能について検討した。

また、臨床検体を用いて、腫瘍部での CXCR 発現の強さと、病理組織学的な因子、また臨床病期などとの相関を検討した。

いずれの結果も、CXCR3 が腎癌に対し転移促進的に働くことが示されたため、その原因を探るべく、腫瘍の転移、浸潤に関する因子の検討を行った。具体的には MMP9 の発現の検討、RhoA の発現、およびそのリン酸化の検討などを施行した。また、臨床検体を用いた検討から、CXCR3 の発現が、低酸素 (腎癌の進行・

治療にきわめて重要な因子の一つである)状態と関係している可能性が示唆された。そこで、細胞株を用いた検討を行い、低酸素状態を塩化コバルトを用いて模しながら CXCR3 と低酸素状態との関係の検討を行った。

また、さらにヒトの血漿で CXCR3 を測定できないかとの検討を行った。これに関しては臨床検体を用いた検討で CXCR3 の発現と CXCL10 の発現が強く相関していることから、CXCL10 の腫瘍マーカーとしての可能性を探るものである。10 症例ほどの血漿を用い、ELISA 法にて CXCL10 の発現を確認したところ、多くの症例で、実験に用いていたと同程度の濃度での CXCL10 の発現が確認できた。こちらに関してはさらに症例数を増やし、病状を反映するマーカーとなりうるか検討を行う予定である。

#### 4. 研究成果

腎細胞癌における癌精巢抗原の一つであると考えられる CXCR3 およびそのリガンドについて検討を行った。CXCR3 およびそのリガンドが癌細胞で強く発現していることを示した。CXCR3/CXCL10 axis が腎癌の転移に関し重要な役割の一つを果たしていることを、臨床検体を用いた検討、ならびに腎癌細胞株を用いた検討で示した。同時に CXCR3 の発現が低酸素状態によって誘導されている可能性を示し、以上の内容を学術論文で発表した。さらには腎癌患者血清中で CXCR3 のリガンドである CXCL10 の測定が可能であり、現時点では有用な腫瘍マーカーがない腎癌において、腫瘍の状況や腫瘍の存在を示す有用なマーカーになる可能性も示された。

以上より当初掲げていた目標が達成できたかを検討すると、まず、一つ目の腎癌の腫瘍マーカーとなりうる CTA を見つけること、これは当初予定していた CTA 発現 Signature とは違った形になったが、候補は特定できたと

考える。2 つ目は、治療反応の良い腎癌とそうでないものを見分ける腫瘍マーカーを見つけないこと、を目標としていた。これに関しては血漿を用いた検討で現在も検討中であるが、治療反応性ではないものの、より浸潤度の高い転移しやすい腎癌を特定するマーカー候補を見つけたことである程度成果は挙げられたものと考えられる。3 つ目の目的は、腎癌での分子標的治療の対象となるような CTA の機能を解析すること、であったが、腎癌転移を促進する CXCR3 は十分治療標的となりうる可能性を秘めていると思われる。

#### 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 1 件)

The Association of CXCR3 and Renal Cell Carcinoma Metastasis.

Utsumi T, Suyama T, Imamura Y, Fuse M, Sakamoto S, Nihei N, Ueda T, Suzuki H, Seki N, Ichikawa T. *J Urol.* 2014 Feb 8.

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2014.01.100>

査読あり

{ 学会発表 } (計 1 件)

第 22 回泌尿器科分子細胞研究会

腎細胞癌におけるケモカイン受容体 CXCR3 の転移機構への関与の検討

内海孝信、巢山貴仁、今村有祐、坂本信一、仲村和芳、二瓶直樹、植田健、市川 智彦

2013 年 3 月 9 日

発表場所；高知

{ 図書 } (計 0 件)

{ 産業財産権 }

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

巢山 貴仁 (Takahito Suyama)

千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：60400925