

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592396

研究課題名(和文) 乳頭状腎癌関連因子 pCAM による新たな分子病理学的分類と分化誘導療法の確立

研究課題名(英文) The role of pCAM, papillary renal cell carcinoma-related factor for developing novel molecular pathologic classification and differentiation-inducing therapy

研究代表者

辛島 尚 (KARASHIMA, Takashi)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：60304672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：乳頭状腎癌関連因子 papillary cell adhesion molecule (pCAM) は、神経や内分泌組織に分布し、細胞間接着や細胞・細胞外基質間接着を担う因子である。本研究は、pCAM が乳頭状腎癌における分子病理学的な腫瘍構築因子である証明を目的とした。pCAM を高発現する未分化腎淡明細胞癌細胞において pCAM の発現抑制を行ったところ、高分化な乳頭状腎癌に形態変化をした。続いて、pCAM を再発現させると再び未分化腎淡明細胞癌に回帰した。この現象に伴い、上皮間葉転換 (EMT) 関連因子の変動があった。以上の結果より、pCAM は腎癌において乳頭状構築を制御する因子であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Papillary cell adhesion molecule (pCAM) is a adhesion molecule of cell-cell and cell-basal lamina and expressing in only neuroendocrine tissue. We examined whether the pCAM was a key molecule of cell differentiation and pathological architecture in papillary renal cell carcinoma (RCC). A human RCC cell line, 786-0 highly expressing pCAM was undifferentiated clear cell RCC. Downregulation of the pCAM expression made the 786-0 tumor to be well differentiated papillary RCC in the kidney of athymic nude mouse. Re-expression of pCAM by site-directed mutagenesis method returned 786-0 tumor to be undifferentiated clear cell RCC. We demonstrated the architectural transformation accompanied with changing epithelial mesenchymal transition (EMT) factors by PCR array 7860. In conclusions, the pCAM is a key molecule for papillary formation of RCC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腎癌 細胞接着因子 乳頭状腎癌

## 1. 研究開始当初の背景

乳頭状細胞接着分子 papillary cell adhesion molecule (pCAM) は、主に内分泌組織や神経に分布し、細胞間接着や細胞・細胞外基質間接着を担う因子として報告されている。我々は、腎癌における網羅的解析において pCAM 発現の差異に注目した。pCAM の発現制御により、未分化な淡明細胞癌が乳頭状腎癌に分化することを確認した。pCAM が乳頭状腎癌の直接関連因子であることを証明し、乳頭状腎癌の分子病理学的分類を再考する。また、pCAM 発現制御による分化誘導療法の可能性について探求する。

pCAM は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する糖蛋白質であり、単一遺伝子から mRNA の選択的スプライシングおよび翻訳後の修飾により多様なアイソフォームを形成する。発達期や器官形成時には、翻訳後に糖鎖であるポリシアル酸 (polysialic acid) が付加した PSA-pCAM となり、成体に向けての調節を行っている。pCAM は主に内分泌や神経組織での役割が報告されており、悪性腫瘍における役割は不明な点が多く、こと腎癌における報告はほとんどない。我々は、腎淡明細胞癌における von Hippel-Lindau 癌抑制遺伝子変異に伴う網羅的解析において、pCAM の発現に大きな違いがあることを見出した。pCAM 高発現腎淡明細胞癌株 786-0 細胞において、shRNA により pCAM 発現を抑制した。786-0 細胞を含め、pCAM を高発現する腎癌細胞株を認めた。一方、正常近位尿細管細胞には pCAM の発現は認められなかった。

786-0 細胞において、shRNA による pCAM 発現抑制により、3 次元培養における細胞増殖抑制と細胞形態の変化を認めた。

shRNA により pCAM 発現抑制クローンを製作し、ヌードマウスの腎臓に同所移植を行った。未分化な腎淡明細胞癌である 786-0 細胞が、Type-1 と分類される高度に分化した乳頭状腎癌に変化することを病理組織学的に発見した。

以上の結果から、pCAM は分化や構築に影響する乳頭状腎癌の直接関連因子である可能性が高い。pCAM の発現は、乳頭状腎癌を含む非淡明細胞癌の分子病理学的分類に影響する因子と考えられる。また、これらの現象は間葉→上皮転換 (Mesenchymal→Epithelial Transition) ととらえることができる。分化調節因子として pCAM ならびに PSA-pCAM 制御による、分化誘導療法に展開し得る。

## 2. 研究の目的

腎癌において

- (1) pCAM の乳頭状腎癌関連因子としての証明と機能解析

- (2) 臨床検体における NCAM ならびに PSA-pCAM 発現と組織分類の解析

- (3) 分化誘導療法の確立を本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) 各種腎癌細胞株における pCAM タンパク発現を検討した。786-0 細胞の pCAM 発現調節を shRNA ならびに mutagenesis によりおこない、安定細胞株 786-0-pCAM-KO1 と KO2、ならびに 786-0-pCAM-mut1 と mut2 を製作した。これらの細胞株を胸腺無形性ヌードマウスの腎臓に同所移植を行い、腫瘍形態の変化を検討した。

- (2) 各種細胞の 3 次元 (3D) 増殖速度の測定 3D コラーゲン培養による各種細胞の増殖速度を Cell counter で測定した。

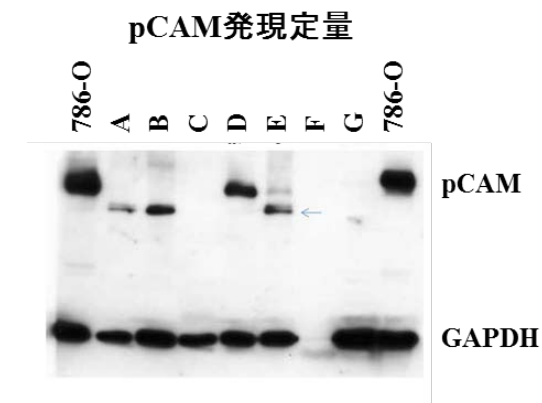
- (3) 各種細胞の 3D 細胞形態を比較検討した。

- (4) 各種細胞の遊走能を 3D Migration assay にて比較検討した。

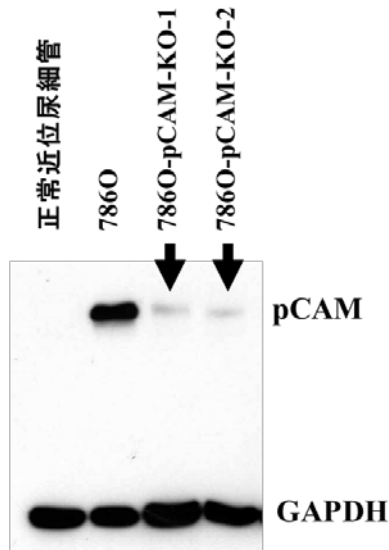
- (5) 上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal transition; EMT) マーカーの発現を PCR array にて検討した。

## 4. 研究成果

- (1)



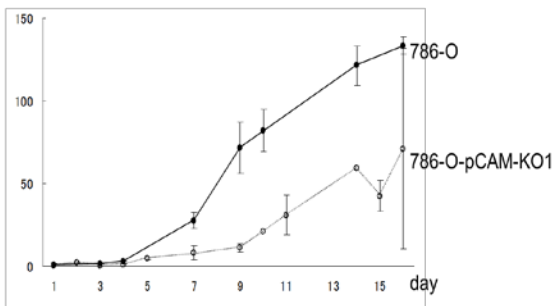
複数の腎癌細胞株において pCAM が高発現していた。特に、未分化腎淡明細胞癌 786-0 細胞にて、その発現は高かった。分子量は、120-180kDa の種々のアイソフォームが存在し、各細胞株において、その発現は様々であった。



786-O-pCAM-KO 細胞における shRNA による pCAM の発現抑制が、ウェスタンブロットにて確認された。これらは、stable clone として製作され、後の動物実験に使用された。ちなみに、正常腎近位尿管上皮においては、pCAM 発現は検出されなかった。

(2)

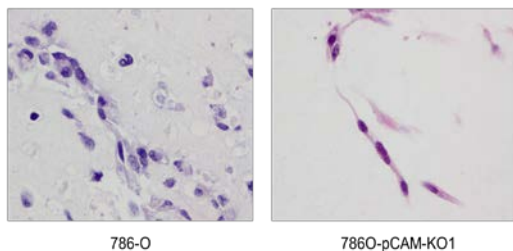
#### 786-Oと786O-pCAM-KO1の3D培養増殖



3D培養による各細胞の増殖速度が検討された。pCAM発現を抑制された 786-O-pCAM-KO1 細胞は、pCAM高発現の 786-O細胞と比較して、増殖速度が低下した。

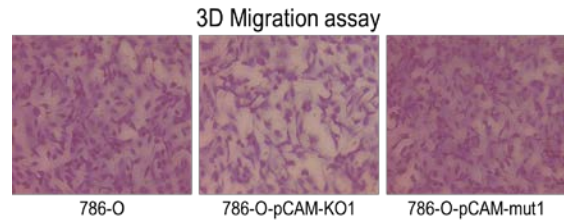
(3)

#### 3D-培養



3D培養による各細胞の形態変化が検討された。pCAM高発現細胞 786-Oと比較して、pCAMが発現抑制された 786-O-pCAM-KO1 細胞において、細胞は進展し、紡錘形を呈した。またあたかも管腔を形成する様相が認められた。

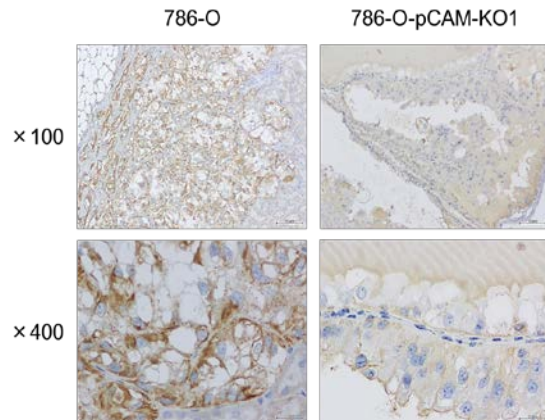
(4)



3D 培養による各細胞の遊走能が、Migration assay にて検討された。pCAM 高発現細胞 786-O と比較して、pCAM 発現抑制をされた 786-O-pCAM-KO1 細胞において、遊走能は低下した。さらに、pCAM を再発現させた 786-O-pCAM-mut1 細胞において、その遊走能は再亢進した。

(5)

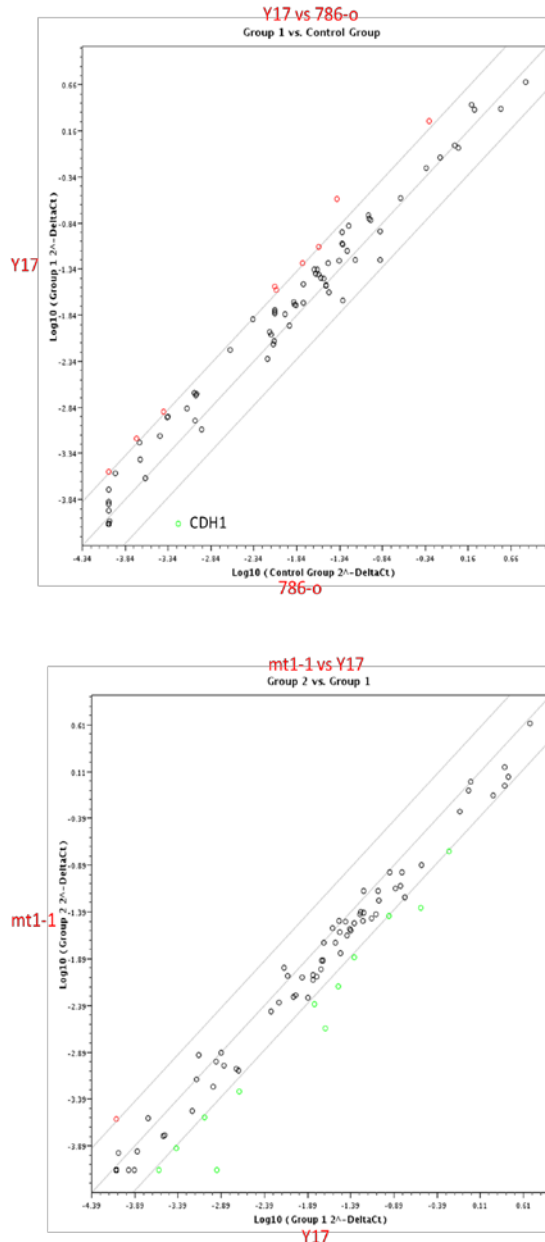
#### Vimentin染色



各々、 $1 \times 10^6$  個の 786-O 細胞と 786-O-pCAM-KO1 細胞が、胸腺無形性ヌードマウスの腎臓に同所移植された。移植 12 週後に腎臓は摘出され、病理組織学的ならびに免疫組織学的に検討された。形態学的に 786-O 腫瘍は未分化な淡明細胞癌を呈しており、786-O-pCAM-KO1 腫瘍は乳頭状ないし管状に増殖しており、各異型も低く、分化した乳頭状腎癌の組織像を呈していた。

抗 Vimentin 抗体による腫瘍組織の免疫組織学的解析が行われた。pCAM 高発現細胞 786-O と比較して、pCAM 発現抑制をされた 786-O-pCAM-KO1 細胞において、Vimentin の発現は低下していた。

(6)



各細胞は3D培養され、mRNAが採取された。84種のEMT関連マーカーの発現が、RT-PCRにて定量的に測定され、比較検討された。

上段図において、786-0-pCAM-K01/786-0、下段において

786-0-pCAM-mut1/786-0-pCAM-K01 (比)が検討され、有意差をもって3倍以上の発現差があった分子が、赤○発現亢進、緑○発現低下で表記されている。

786-0-pCAM-K01/786-0において、9個の分子が発現亢進していた。一方、786-0-pCAM-mut1/786-0-pCAM-K01において、12個の分子が発現低下していた。1分子において、発現亢進が認められた。

本研究において、発現に変動がみられたEMTマーカーを厳選し、そのメカニズムを解明する。

pCAMは、シアル酸化にてその作用を制御され

ていることがわかっている。腎臓明細胞癌や乳頭状腎癌、特にタイプ1や2の分類別に見たpCAMの発現とシアル酸化の程度を検索し、予後や治療経過との関係を検討する。

以上のことから、pCAMの発現による新たな腎癌の分子学的な分類を試みるとともに、pCAM発現制御による、分化誘導療法の可能性を検証する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

1. **Karashima T**, Fukuhara H, Tamura K, Ashida S, Kamada M, Inoue K, Taguchi T, Kuroda N, Shuin T. Expression of angiogenesis-related gene profiles and development of resistance to tyrosine-kinase inhibitor in advanced renal cell carcinoma: characterization of sorafenib-resistant cells derived from a cutaneous metastasis. *Int J Urol.* 2013;20(9):923-30. doi: 10.1111/iju.12084.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

辛島 尚 (KARASHIMA, Takashi)  
高知大学・教育研究部医療学系・講師  
研究者番号: 60304672

(2) 研究分担者

執印 太郎 (SHUIN, Taro)  
高知大学・教育研究部医療学系・教授  
研究者番号: 70128601

鎌田 雅行 (KAMADA, Masayuki)  
高知大学・教育研究部医療学系・講師  
研究者番号: 90304683