

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791634

研究課題名(和文)肉腫様腎細胞癌の発生に関わる遺伝子異常の同定と新規分子標的治療法の開発

研究課題名(英文) Identification of characteristic gene expression and molecular target in sarcomatoid renal cell carcinoma

研究代表者

小島 崇宏 (Kojima, Takahiro)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：40626892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：肉腫様腎癌において発現の増強がみとめられた遺伝子のうち、TOP2, RAC2, VAV1に着目して研究をおこなった。同一組織の淡明型成分と肉腫様成分におけるタンパク発現を免疫染色にて比較し、肉腫様成分においてこれらの発現が亢進していることを確認した。腎癌細胞株においてsiRNAを用いて、これら標的遺伝子の発現を抑制したところ、細胞増殖が抑制された。これら遺伝子が肉腫様腎癌における新たなバイオマーカーや治療標的分子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We selected and analyzed ETV5, TOP2, RAC and VAV1 for candidate targets among up-regulated genes in sarcomatoid renal cell carcinoma. These genes were significantly up-regulated in sarcomatoid component compared with clear cell component. Suppression of these genes by siRNA resulted in suppression of cell proliferation of renal cell carcinoma cell lines. Our results may represent a novel biomarker and therapeutic target for patients with sarcomatoid renal cell carcinoma.

研究分野：泌尿器科学

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：肉腫様腎細胞癌 遺伝子異常

1. 研究開始当初の背景

(1) 肉腫様変化を伴う腎細胞癌は、腎細胞癌のすべての組織型に合併し、腎細胞癌の最も異型度の高い最終的な表現型と考えられている。肉腫様腎細胞癌には有効な治療法は確立していない。ゲムシタピンとドキソルビシンを用いた化学療法が一定の効果を示すものの、その有効性は10 - 20%程度と低い (Expert Reviews 2011; 11: 913)。転移性腎細胞癌に使用される VEGF を標的とした分子標的治療薬 (ソラフェニブ、スニチニブ、ペバシツマブ) は、肉腫様変化を伴う症例ではその有効性が低下する (J Clin Oncol 2009; 27: 235)。したがって、肉腫様腎細胞癌に特異的なシグナル伝達異常に基づいた新たな治療標的分子の同定と治療の開発が強く望まれている。

(2) 予備実験として、肉腫様腎細胞癌の凍結検体を用いてマイクロアレイによる遺伝子発現頻度解析を行った。淡明細胞癌と比べ特徴的な遺伝子発現プロファイルを示した。

2. 研究の目的

本研究は以下の2点に重点をおき、肉腫様腎細胞癌の発生機構を解明し、その知見をもとに肉腫様腎細胞癌における新たな治療法を開発を目的にしたものである。

- (1) 遺伝子発現異常に基づいた肉腫様腎細胞癌の発生機構の解明
- (2) 同定された分子やシグナル伝達異常を標的とした新規標的治療の開発

3. 研究の方法

肉腫様腎癌において発現の増強がみとめられた遺伝子のうち ETV5, TOP2, RAC2, VAV1 に着目して研究をおこなった。

- (1) これら遺伝子の mRNA の発現を定量 PCR 法にて確認した。同一組織の淡明型成分と肉腫様成分におけるタンパク発現を免疫染色にて比較した。
- (2) 淡明型腎癌細胞株において siRNA を用いて、これら標的遺伝子の発現を抑制し、細胞増殖への影響、上皮間葉マーカーとして E-cadherin の発現の変化を検討した。

4. 研究成果

- (1) 細胞株、臨床検体における発現について
TOP2
腎癌細胞株 skrc-1, skrc-52 とともに rptec (正常尿細管株) に比べ、TOP2 の高発現がみとめられた (図1)。
また、免疫染色では、淡明型成分に比べ、肉腫様成分において TOP2 発現の亢進を確認した。

ETV5

細胞株において発現の亢進はみとめられず、むしろ低下していた (図2)。

一方、淡明型腎癌組織における発現を検討したところ、非癌部に対して癌部の発現は有意に亢進していた。(n=11 (relative expression 癌部/非癌部 3.4 ± 2.3))
免疫染色では、淡明型成分に比べ、肉腫様成分において発現の亢進をみとめた。

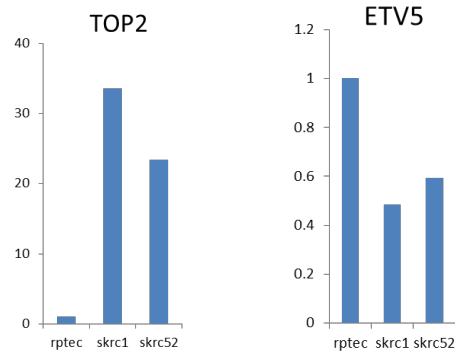


図1

図2

RAC2

skrc-1 において発現の亢進がみとめられた (図3)。組織では、淡明型腎癌において非癌部に比べて有意に発現が亢進していた。非淡明型においては発現の亢進をみとめなかった (図4)。

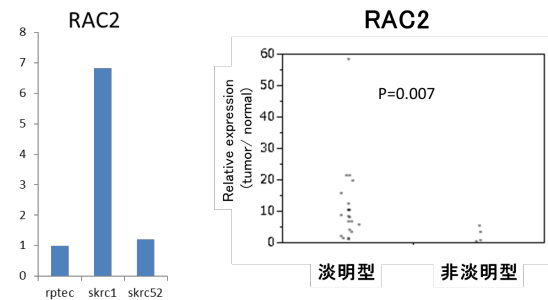


図3

図4. 腎がん組織におけるRAC2の発現

VAV1

skrc-1 において発現の亢進がみとめられた (図5)。組織では、淡明型腎癌において非癌部に比べて有意に発現が亢進していた。非淡明型においては発現の亢進をみとめなかった (図6)。
これらの遺伝子発現と淡明型腎癌またはその肉腫様変化との関連についての報告はなく、新たな知見を得ることができた。

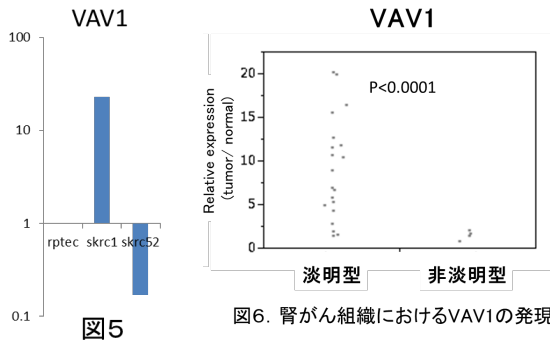


図5

図6. 腎がん組織におけるVAV1の発現

(2) 遺伝子発現抑制による細胞増殖への影響について

siRNA を用いて、これらの遺伝子の発現を抑制し、WST-8 アッセイにて増殖能への影響を検討した

ETV5, RAC2, TOP2 抑制株においてコントロール株に比べて細胞増殖の抑制がみとめられた (図 7)。

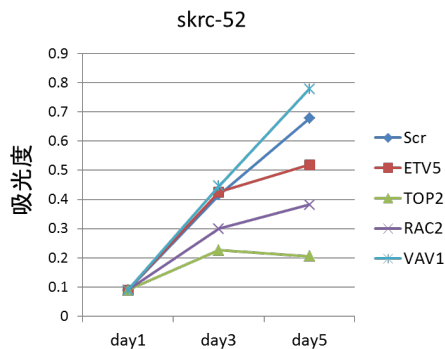


図7

これらの遺伝子が腎癌細胞株の増殖に関わることが新たに示された。

(3) RAC2, VAV1 抑制による上皮間葉転換への影響について

RAC2 高発現の skrc-1 を用いて、siRNA にて RAC2 の発現を抑制したところ、scramble 株に比べ、RAC2 抑制株において、E-cadherin の mRNA 及びタンパクレベルでの発現の上昇をみとめた (図 8)。

RAC2 が上皮間葉転換を促進することが示唆された。

VAV1 低発現の skrc-59 を用いて、VAV1 発現ベクターを用いて強制発現させたところ、コントロール株に比べ、VAV1 発現株において、E-cadherin の mRNA, タンパクレベルでの発現の低下をみとめた (図 9)。

VAV1 が上皮間葉転換を促進することが示唆された。

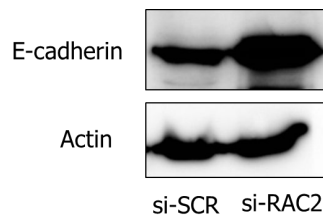
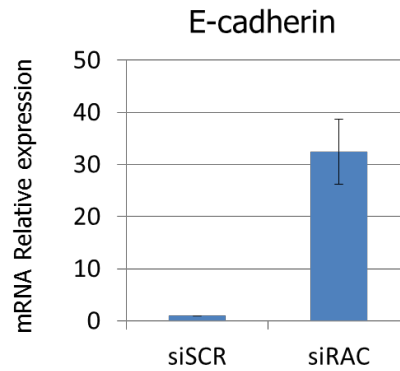


図8 RAC2抑制によるE-cadherin発現変化

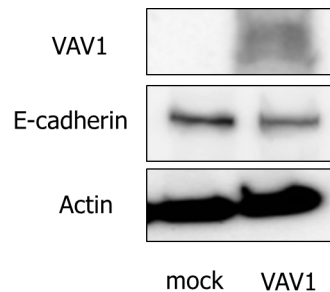


図9 VAV1抑制によるE-cadherin発現変化

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7件)

- Inai H, Kawai K, Kojima T, Joraku A, Shimazui T, Yamauchi A, Miyagawa T, Endo T, Fukuhara Y, Miyazaki J, Uchida K, Nishiyama H. Oncological outcomes of metastatic testicular cancers under centralized management through regional medical network. Jpn J Clin Oncol. 2013 Dec;43(12):1249-54. doi: 10.1093/jjco/hyt152. 査読あり
- Ikeda A, Miyagawa T, Kurobe M, Uchida M, Kojima T, Tsutsumi M, Ito S, Sugita S, Nishiyama H Case of

metastatic malignant melanoma of the urinary bladder. *Hinyokika Kyo*. 2013 Sep;59(9):579-82. 査読あり

Shimazui T, Yoshikawa K, Miyazaki J, **Kojima T**, Inai H, Ando S, Uemura H, Uchida K, Nishiyama H. Systemic transduction of p16INK4A antitumor peptide inhibits the growth of MBT-2 mouse bladder tumor cell line grafts. *Int J Oncol*. 2013 Feb;42(2):543-8. doi: 10.3892/ijo.2012.1752. 査読有

Oishi H, **Kojima T**, (他 9 人, 7 番目) Delayed cutaneous wound healing in *Fam129b/Minerva*-deficient mice. *J Biochem*. 2012 Dec;152(6):549-55. doi: 10.1093/jb/mvs100. 査読有

Management of ureteral obstruction in advanced testicular tumor with lymph node metastasis. Ikeda A, Kawai K, Ando S, Oikawa T, Inai H, Kimura T, Takaoka E, Yoshino T, Suetomi T, **Kojima T**, Miyazaki J, Nishiyama H. *Jpn J Clin Oncol*. 2012 Aug;42(8):748-52. doi: 10.1093/jjco/hys094. 査読有

A case of acute adrenal insufficiency unmasked during sunitinib treatment for metastatic renal cell carcinoma. Yoshino T, Kawai K, Miyazaki J, Kimura T, Ikeda A, Takaoka E, Suetomi T, Oikawa T, **Kojima T**, Iwasaki H, Shimano H, Nishiyama H. *Jpn J Clin Oncol*. 2012 Aug;42(8):764-6. doi: 10.1093/jjco/hys070. 査読有

Takase H, **Kojima T**, (他 11 人, 9 番目) Genome-wide identification of endothelial cell-enriched genes in the

mouse embryo. *Blood*. 2012 Jul 26;120(4):914-23. doi: 10.1182/blood-2011-12-398156. 査読有

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小島 崇宏 (KOJIMA TAKAHIRO)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：40626892