

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860401

研究課題名(和文) CXCR3の機能解析による腎癌進展機構の解明と新規腫瘍マーカー探索

研究課題名(英文) Investigation of progression in renal cell carcinoma by functional analysis of CXCR3: exploration of novel tumor markers

研究代表者

内海 孝信 (UTSUMI, Takanobu)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：80594275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腎細胞癌においてCXCR3AおよびCXCR3Bの発現が転移や進展において重要な役割を果たしていることを明らかにした。手術時に転移のある患者ではCXCR3A/CXCR3Bの発現比が高く、CXCR3AおよびCXCR3BのリガンドであるCXCL10の添加により腎癌細胞株において遊走および浸潤作用が上昇することを確認した。また、スニチニブ治療中の転移のある腎細胞癌患者においては、リガンドのCXCL9やCXCL10を血清で測定すると、病状を反映する症例が多いことを確認した。将来の治療に関するバイオマーカーの可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study clarified that the expression of CXCR3A and CXCR3B play an important role in progression and metastasis in renal cell carcinoma (RCC). The ratio of CXCR3A/CXCR3B was significantly higher in patients with metastatic RCC at the time of surgery. The RCC cell line, 786-0, which has a higher ratio of CXCR3A/CXCR3B significantly increased in migration and invasion function by addition of the ligand CXCL10. Furthermore, the ligands, CXCL9 and CXCL10, might be able to reflect the condition of a disease in metastatic RCC patients who took sunitinib. CXCL9 and CXCL10 show the possibility as a new tumor biomarker, when the patients with metastatic RCC receive the molecular targeted therapy.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌 転移 バイオマーカー CXCR3

## 1. 研究開始当初の背景

CT やMRI などの画像診断の発展により腎癌は早期発見できるようになったが、未だに進行期で発見される症例は腎癌患者の約30%存在すると報告されている (Chow et al. *Cancer J.* 2008;14: 288-301)。

がん細胞は原発巣から転移臓器まで血管やリンパ管などを介して移動するが、転移は非常に複雑な機序で制御され、各がん細胞のもっている特性やがん細胞周囲の微小環境に由来する分子に依存している。微小環境はがん組織の中や周辺に血管やリンパ管を提供し、また免疫細胞や増殖因子を供給することでがんが増殖するための足場としての細胞外間質を提供する。がんの微小環境を構成するものの中で、血管とリンパ管はがんの増殖や転移に直接的に関わるものとして挙げられるが、腎癌では特に血管新生が重要な因子となっている。

我々は既に腎癌手術検体を用いて、従来血管新生を抑制すると報告されていたELR-CXCケモカインが、腎癌では腫瘍血管及びpericyte に発現し、その受容体であるCXCR3が腎癌の非腫瘍部に比して腫瘍部に高く発現していることを報告し、CXCR3 及びELR-CXCケモカインが腎癌の微小環境を構成する重要な因子であると推察している (Suyama et al. *Cancer.* 2005;103: 258-67.)。

近年CXCR3 には、細胞増殖を促進するCXCR3A と細胞増殖を抑制するCXCR3B のvariant が存在し、variant により正反対の作用を持っていることが報告されている (Lasagni L, et al. *J Exp Med.* 2003; 197: 1537-49.)。また、CXCR3B は、抗アポトーシス作用のあるhemoxygenase-1 をdown-regulate することにより、腎癌細胞内の腫瘍増殖抑制作用を発揮していることも報告されている (Datta et al. *J Biol Chem.* 2010; 285: 36842-8.)。

しかしながら、腎癌細胞株を用いた実験系ではDatta et al.の報告以外にはなく、特に腫瘍増殖を促進するCXCR3A のシグナル伝達経路や機能は腎癌に関する報告が現在までに存在しない。

## 2. 研究の目的

ケモカイン受容体CXCR3 (CXCR3A 及びCXCR3B) のシグナル伝達経路や機能は不明な部分も未だに多く、本研究では腎癌の臨床検体や細胞株を用いてCXCR3 (CXCR3A 及びCXCR3B) の解析を行い、腎癌の進展に与える影響を明らかにすることを主たる目的とする。

### (1) 臨床情報との関係性

文章による同意の得られた腎癌の手術検体を用いて、CXCR3 (CXCR3A及びCXCR3B) 及びCXCL9、CXCL10、CXCL11のmRNA及びタンパク質レベルでの発現を確認し、臨床情報 (TNM分類

や核異型度、組織型など)との関連性を統計学的に解析する。

### (2) 腎癌細胞株における機能解析

(1)で得られた結果を基に、腎癌細胞株を用いてCXCR3の機能解析を行う。機能解析は、遊走能及び増殖能、浸潤能を対象とする。

### (3) 腎癌細胞株におけるシグナル伝達解析

(2)で得られた結果を基に、各機能を裏付けするシグナル伝達の解析を行う。

### (4) 臨床検体でのバイオマーカーの探索

文章による同意の得られた腎癌患者の血清検体を用いて、リガンドであるCXCL9及びCXCL10、CXCL11が手術や分子標的薬治療における病勢や予後に関するバイオマーカーになり得るか検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床検体との関係性

2000年から2011年の間に根治的腎摘除術を受けて病理組織学的に淡明細胞型腎細胞癌と診断された56症例を対象とした。全症例において、術前に文章による同意取得がなされていることは確認した。

手術検体の腫瘍部及び非腫瘍部の凍結組織からRNA抽出を行いリアルタイムPCRによりmRNAの発現量を求め、腫瘍部及び非腫瘍部における相対的な発現量を検証した。

また、その発現比のデータを基に、臨床情報との関連性を統計学的に解析した。

### (2) 腎癌細胞株における機能解析

腎癌細胞株 (786-O 及びACHN、Caki-1) を用いてCXCR3の発現量を確認した後に、リガンドであるCXCL9及びCXCL10、CXCL11作用時における機能解析 (遊走能及び増殖能、浸潤能) に関する実験を行った。

### (3) 腎癌細胞株におけるシグナル伝達解析

(2)の機能解析の結果を基に、細胞内におけるCXCR3を介したシグナル伝達の解析を行った。遊走能に関しては、RhoAのリン酸化の発現を確認し、浸潤能に関しては、pro/active MMP-9の発現を確認する実験を行った。

### (4) 臨床検体でのバイオマーカーの探索

腎癌手術前後、転移性腎癌におけるsunitinib治療前後における血清を採取し、手術前後及びsunitinib治療前後におけるCXCL9及びCXCL10、CXCL11をELISAにて測定して挙動を観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 臨床検体との関係性

mRNA の相対的な発現量は、CXCR3(CXCR3A 及び CXCR3B)、CXCL9、CXCL10、CXCL11 いずれも有意に腫瘍部で発現が高いことが確認された。

臨床情報との関係性を統計学的に解析したところ、手術時に転移のある症例で腫瘍部の CXCR3 の発現量が有意に高く ( $P=0.020$ )、腫瘍内部における CXCR3A/CXCR3B の発現比も有意に高い ( $P=0.048$ ) ことが確認された。

以上より、CXCR3、特に腫瘍促進作用のある CXCR3A は腎癌の転移機構に関与している可能性が示唆された。

##### (2) 腎癌細胞株における機能解析

腎癌細胞株 786-0 及び ACHN、Caki-1 を用いて CXCR3 の発現量を確認した。mRNA はリアルタイム PCR を用い、タンパク質はウェスタンブロットを用いた。いずれの発現量も 786-0 が最も高く、後述する機能解析での反応性も最も高かったため、以降は 786-0 の結果を代表的な結果として示す。

また、リガンドである CXCL9 及び CXCL10、CXCL11 作用時の反応性が最も高かった CXCL10 を代表的な結果として示す。

###### 遊走能の解析

CXCL10 を作用させたときに濃度依存的に遊走能は上昇するが、100ng/ml をピークに上昇作用が横ばいになることが確認された。以降の実験では、CXCL10 の濃度は全て 100ng/ml としている。

100ng/ml CXCL10 を作用させたときに遊走能は上昇するが、その作用は CXCR3 の中和抗体にて阻害されることが確認された。

###### 増殖能の解析

50ng/ml ~ 1000ng/ml の濃度で CXCL10 を作用させ、24 時間後、48 時間後、72 時間後、96 時間後の増殖細胞数を測定したが、コントロール群と比較して、有意な増殖能の上昇は認められなかった。

###### 浸潤能の解析

100ng/ml CXCL10 を作用させたときに浸潤能は上昇するが、その作用は CXCR3 の中和抗体にて阻害されることが確認された。

以上より、CXCR3/CXCL10 系は、腎癌細胞株 786-0 において遊走能及び浸潤能の上昇に関与していると考えられた。

##### (3) 腎癌細胞株におけるシグナル伝達解析

###### 遊走能に関与するシグナル

786-0 に 100ng/ml CXCL10 を作用させ、タイムコース (0 分、2 分、5 分、10 分、15 分、30 分) で氷上にてタンパク質抽出を行った。抽出されたタンパク質でウェスタンブロットを行い、RhoA 及び P-RhoA (Ser188) の発現量の比較を行った。その結果、P-RhoA

(Ser188) は 5 分後をピークに発現量が高まり、その後は一定化することが確認された。

###### 浸潤能に関与するシグナル

786-0 に 100ng/ml 及び 200ng/ml、300ng/ml の CXCL10 を作用させ培養してから、培養液の上清を採取した。その上清を用いて、ウェスタンブロットを行い、pro/active MMP-9 の発現を確認した。ネガティブ・コントロールと比較して、CXCL10 を作用させたときに pro/active MMP-9 の存在が確認された。

(1) ~ (3) の結果より、腎細胞癌において、CXCR3/CXCL10 系は、腫瘍の遊走能・浸潤能を上昇させ、転移に関与していると考えられた。遊走能上昇の機序としては、CXCR3/CXCL10 系のシグナルで RhoA がリン酸化・活性化すると、遊走能が上昇すると考えられ、浸潤能上昇の機序としては、CXCR3/CXCL10 系が MMP-9 産生を誘導し、浸潤能を上昇させていると考えられた。

##### (4) 臨床検体でのバイオマーカーの探索

###### 手術前後の血清における挙動

手術前後の血清を用いて ELISA を施行したが、転移の有無に関わらず、各リガンド濃度に一定の傾向は認められなかった。

###### sunitinib 治療前後の血清における挙動

初回 sunitinib 治療患者において CXCL9 及び CXCL10 は、多くの患者で治療開始後に一過性に上昇傾向を認めるが、その後治療に反応して低下することが確認された。また、病状の進行とともに上昇に転ずる傾向が認められた。

##### (5) 今後の展望

今後の展望として、腎癌における複数のケモカイン受容体による機序について検証した。

CXCR3 とリガンドを共有するケモカイン受容体 CXCR4 の発現量を前述の手術検体で確認し、腎癌腫瘍部で発現が亢進していることをリアルタイム PCR にて確認した。また、786-0 株を用いた機能解析で、CXCL10 と CXCR4 に対応するリガンド CXCL12 を作用させると、遊走能がそれぞれの単独投与時よりも上昇することが確認された。

一つのケモカイン受容体だけではなく、複数の受容体が複合的に関与して腎癌の機能亢進に関与している可能性が示唆される結果であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Utsumi T, Suyama T, Imamura Y, Fuse M, Sakamoto S, Nihei N, Ueda T, Suzuki H, Seki N, Ichikawa T., The association of CXCR3 and renal cell carcinoma metastasis., Journal of Urology, 査読あり, 192 巻, 2014, 567-74, doi: 10.1016/j.juro.2014.01.100.

〔学会発表〕(計4件)

内海 孝信、巢山 貴仁、遠藤 匠、矢野 仁、坂本 信一、上島 修一、神谷直人、関 直彦、市川 智彦、鈴木 啓悦、CXCR3/CXCL10系を介した腎細胞癌の転移機構、第25回泌尿器科分子・細胞研究会、2016年2月27日、ATCコンベンションルーム(大阪府大阪市)

内海 孝信、今村 有佑、坂本 信一、上島 修一、神谷 直人、植田 健、関直彦、市川 智彦、鈴木 啓悦、腎癌におけるCXCR3/CXCL10 axisの機能解析、第24回泌尿器科分子・細胞研究会、2015年2月28日、JPタワー&カンファレンス(東京都千代田区)

内海 孝信、巢山 貴仁、今村 有佑、坂本 信一、上島 修一、神谷 直人、関 直彦、植田 健、市川 智彦、鈴木 啓悦、CXCR3/CXCL10 axisを介した腎細胞癌の転移機構の解明、第23回泌尿器科分子・細胞研究会、2014年3月15日、霞城セントラル(山形県山形市)

内海 孝信、遠藤 匠、仲村 和芳、矢野 仁、坂本 信一、巢山 貴仁、神谷直人、関 直彦、二瓶 直樹、植田 健、市川 智彦、鈴木 啓悦、CXCR3/CXCL10 axisを介した腎細胞癌の転移機構の解明、第63回日本泌尿器科学会中部総会、2013年11月30日、愛知県産業労働センター(愛知県・名古屋市)

〔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

内海 孝信(UTSUMI, Takanobu)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号: 80594275