

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462415

研究課題名(和文)腎癌細胞と癌間質組織におけるHO-1の病理学的な役割の解析と新たな治療戦略の構築

研究課題名(英文)Analysis of the pathological role of HO-1 in kidney cancer cells and cancer interstitial tissue and construction of new therapeutic strategies

研究代表者

松尾 朋博 (MATSUO, Tomohiro)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：60622024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、腎細胞癌の癌間質組織におけるHO-1の病理学的な役割の解析を進めていたが最終的に期間内に完遂することはできなかった。しかしながら研究の過程で、ヒトにおける表在性膀胱癌に関して、HO-1の発現に病理学的な特徴があることを見出した。HO-1は表在性膀胱癌において、high gradeやT1病変に多く発現し、細胞増殖、リンパ管増生、COX-2の発現に関連していた。HO-1の発現が強い患者では疾患特異的生存率および無転移生存率は悪かった。多変量解析においてもHO-1の発現は疾患特異的生存率に関連するものであった。HO-1の発現が表在性膀胱癌における治療のターゲットになる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated the association between HO-1 expression levels and the pathological features, clinical outcomes and other associated factors in patients with non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC). HO-1 expression levels in high-grade and pT1 tumors were significantly higher compared with low-grade and pTa tumors, and were correlated with the proliferation index, lymph vessel density and COX-2 expression levels. Kaplan-Meier survival curves associated HO-1 expression with a poor prognosis in metastasis-free and cause-specific survival. Furthermore, HO-1 expression was identified by multivariate analysis to be a significant predictor for cause-specific survival. HO-1-associated activities are regulated by cancer cell proliferation, lymphangiogenesis and COX-2. HO-1 may be a potential therapeutic target and a useful predictive prognostic factor in patients with NMIBC.

研究分野：泌尿器科学、腫瘍学

キーワード：泌尿器癌 表在性膀胱癌 HO-1

1. 研究開始当初の背景

(1) 膀胱癌は泌尿器癌の中でも比較的多くみられる。しかしながら、その約半数が数年間で再発を認め、さらには比較的早期に他臓器やリンパ節に転移を認めやすく、治療に難渋する症例も多々存在する。

(2) H0-1 は Heme の分解を制御するのが主な働きであるが Heme の分解の時、Fe 以外に一酸化炭素 (CO) や biliverdin を遊離させる。そして、その遊離された Fe や biliverdin は、DNA 合成などを通して細胞の生存や炎症・免疫反応の制御に関与し、CO は血管内皮細胞や血管拡張に作用して微小循環に生理的、病理的影響を与える。特に、そのサブタイプである H0-1 については、炎症や免疫応答、血管新生の重要な制御因子として研究が進められてきた。

H0-1 が持つ細胞増殖や微小循環に与える影響は、悪性腫瘍の進展でも重要な役割を果たすが、近年、それに加え様々な因子の産生や活性化に H0-1 が関与することがわかってきた。

また、細胞を取り巻く環境の変化や、サイトカインや増殖因子による刺激が H0-1 の発現を制御する事や、H0-1 がマクロファージ等の間質細胞だけでなく、ある種の癌細胞にも存在することがわかってきた。

このような H0-1 によって産生された因子は、様々な癌腫で、腫瘍の増大、アポトーシス、血管新生、浸潤・転移関連因子の制御に密接に関与している。事実、これらは、前立腺癌をはじめ、肺癌、乳癌、膵癌、悪性黒色腫や肉腫など、多くの悪性腫瘍の進展や予後と関連している。ただし、その臨床病理学的意義については、同じ癌腫でも転移を促進するなど相反する報告もあり、H0-1 の発現や機能が複雑に制御されることが推測されている。しかしながら膀胱悪性腫瘍、特に表在性膀胱癌における H0-1 の臨床的、病理学的意義に関する網羅的検討の報告は未だになかった。

2. 研究の目的

様々な浸潤・転移関連分子の発現や免疫機能の制御、各種ケモカインの産生に重要な役割を果たす heme oxygenase (H0)-1 について、表在性膀胱癌における病理学的な役割を解析することであった。

3. 研究の方法

(1) 患者および癌組織の採取

当院で表在性膀胱癌との診断のもと 1993 年から 2005 年までの間に経尿道的膀胱腫瘍切除術を施行された 147 症例と対象とした。以前に抗がん剤投与を受けていたもの、膀胱上皮内癌、扁平上皮癌、腺癌の併発があったも

のは除外した。

長崎大学病院の倫理委員会の承認のもと本実験は施行された。

(2) 免疫組織染色

標本はパラフィン包埋ブロックとし、5 μ m に薄切し使用した。免疫組織染色に使用した各抗体を以下に示す。Anti-H0-1 (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA; #AD1-SPA-896-F; dilution, 1:200); anti-Ki-67 (Dako, Glostrup, Denmark; #M7240; dilution, 1:100); anti-CD34 (Dako; #M7145); anti D2-40 (Dako; #M3619; dilution, 1:50); anti-VEGF-A (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA; #sc-152; dilution, 1:120); anti-VEGF-C (Zymed; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA; #18-2255; dilution, 1:70); anti-VEGF-D (R&D systems Europe, Ltd., Abingdon, UK; #MAB286; dilution, 1:100); and anti-COX-2 (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Gunma, Japan; #18515; dilution, 1:40)。

(3) 評価

免疫組織染色における染色強度および範囲にて半定量化し、H0-1 陽性群、陰性群の 2 群に分け、そのデータと患者の臨床所見とを比較検討した。 Kaplan-Meier 生存曲線および多変量解析モデルも用い、H0-1 の発現と臨床病理学的特徴および予後との関連を解析した。

(4) 統計学的解析方法

2 群間の比較には Student's *t*-test、マンホイットニー U テストを使用し、生存に関するデータには Kaplan-Meier 法およびロジックテストを用いた。また多変量解析にはコックス比例ハザードモデルを使用した。

4. 研究成果

(1) H0-1 の発現と臨床病理学的な特徴

H0-1 は細胞質で主に発現していた (図 1)。147 例のうち 72 例 (49.0%) で H0-1 陽性と判断された。

また、表 1 に示すように H0-1 は核異形度が high grade の症例 (41/71; 57.7%) の方が low grade の症例 (31/76; 40.8%) よりも優位に発現していた ($P = 0.040$)。またステージ別に見てみると、pT1 (50/89; 56.2%) の方が pTa (22/58; 37.9%) の症例に比べ H0-1 は有意に発現していた。

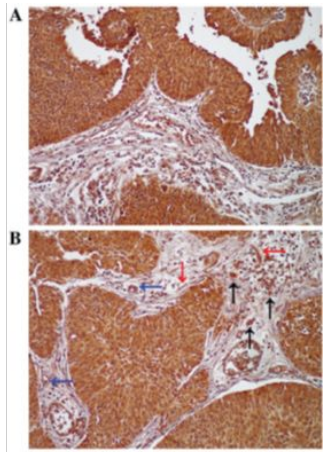


図1 HO-1免疫組織染色

表1 HO-1の発現と臨床病理学的な特徴との関係

Category	All patients	HO-1 expression		P-value
		Negative	Positive	
Total number	147	75	72	-
Age, years, mean ± SD		66.9±13.0	70.5±11.5	0.077*
Gender, n (%)				0.377*
Male	116	57 (49.1)	59 (50.9)	
Female	31	18 (58.1)	13 (41.9)	
Grade, n (%)				0.040*
Low	76	45 (59.2)	31 (40.8)	
High	71	30 (42.3)	41 (57.7)	
pT stage, n (%)				0.031*
T _a	58	36 (62.1)	22 (37.9)	
T ₁	89	39 (43.8)	50 (56.2)	

*Analyzed by Student's t-test; †analyzed by χ^2 test. Samples with percentages of positively stained cancer cells. median and >median values were considered negative and positive, respectively. HO-1, heme oxygenase 1; SD, standard deviation; pT stage, pathological tumor stage.

(2) HO-1の発現と癌関連因子との関連
Microvessel density(MDV)、lymph vessel density(LVD)、proliferation index(PI)、COX-2の発現、vascular endothelial growth factor(VEGF)の発現と HO-1 の発現との関連を表2に示す。

表2 HO-1の発現と癌関連因子との関連

Category	HO-1 expression		P-value ^a	Multivariate analysis ^b		
	Negative	Positive		OR	95% CI	P-value ^c
VEGF-A, %	30.8±13.0	31.2±12.9	0.839	-	-	-
VEGF-C, %	29.4±14.3	30.7±13.7	0.568	-	-	-
VEGF-D, %	29.6±12.9	33.3±13.3	0.081	-	-	-
COX-2, %	18.2±8.3	22.2±8.0	0.003	2.24	1.10-6.13	0.027
MDV, no./HPF	58.8±19.9	63.4±18.0	0.100	-	-	-
LVD, no./HPF	24.5±10.3	28.9±12.4	0.021	1.17	0.59-2.31	0.659
PI, %	19.8±7.0	24.1±7.9	<0.001	2.64	1.34-5.23	0.005

Data are presented as the mean ± standard deviation. ^aAnalyzed by Student's t-test; ^badjusted by pT stage and grade; ^canalyzed by Cox regression analysis. HO-1, heme oxygenase 1; OR, odds ratio; CI, confidence interval; VEGF, vascular endothelial growth factor; COX-2, cyclooxygenase-2; MDV, microvessel density; LVD, lymph vessel density; PI, proliferation index; pT stage, pathological tumor stage; no./HPF, number per high-power field (×200 magnification).

HO-1の発現はCOX-2の発現、LVD、PIとの関連はあったが各種VEGFとの関連はなかった。多変量解析においてもHO-1の発現はCOX-2の発現の独立した関連因子であった。

(3) HO-1の発現状況と予後との関連
 Kaplan-Meier生存曲線を用いHO-1の発現の程度と膀胱癌の再発に関して分析してみたが明らかな関連はなかった(P = 0.231、図2A)。しかしながらHO-1の発現は転移性病変の出現と関連があり(P = 0.047、図2B)、

疾患特異的生存率とも関連を認めた(P = 0.017、図2C)。さらにHO-1の発現は多変量解析においても疾患特異的生存率の独立したリスク因子であることが分かった(表3)。

プランマイヤー法を用いた各種生存曲線

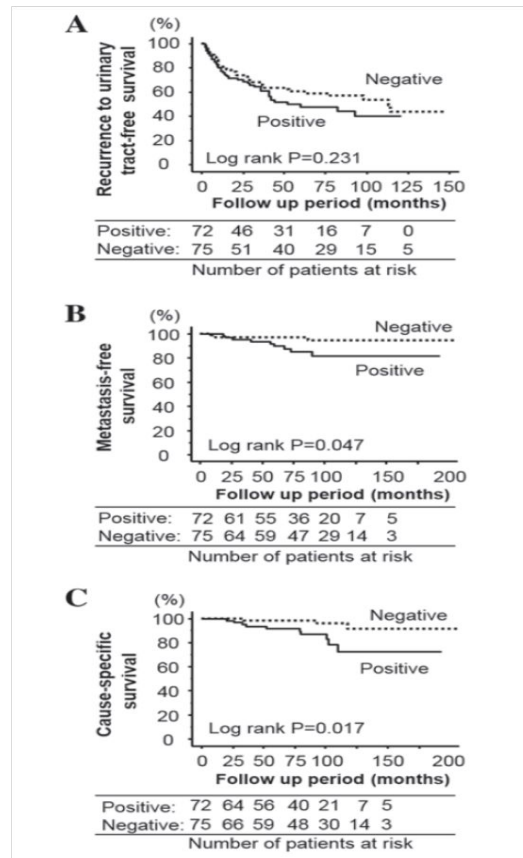


表3 コックス比例ハザードモデルを用いた膀胱癌の転移および疾患特異的生存率に及ぼす各種因子の影響

Category	Metastasis			Cause-specific survival		
	HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
Gender (male vs. female)	2.88	0.37-22.61	0.314	1.98	0.25-15.77	0.517
pT stage (high vs. low)	1.32	0.40-4.47	0.649	2.63	0.70-9.93	0.153
Grade (high vs. low)	4.81	1.31-17.69	0.018	9.16	1.97-42.56	0.005
Adjuvant treatment (performed vs. not performed)	2.16	0.27-17.07	0.216	1.57	0.19-12.86	0.673
HO-1 (positive vs. negative)	2.17	0.66-7.11	0.217	4.08	1.06-15.66	0.040

HR, hazard ratio; CI, confidence interval; pT stage, pathological tumor stage; HO-1, heme oxygenase 1.

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2件)

1. Matsuo T, Miyata Y, Mitsunari K et al.

Pathological significance and prognostic implications of heme oxygenase 1

expression in non-muscle-invasive bladder cancer: Correlation with cell proliferation, angiogenesis, lymphangiogenesis and expression of VEGFs and COX-2. *Oncol Lett.* 2017 Jan; 13(1): 275-280. doi: 10.3892/ol.2016.5416. (査読あり)

2. Miyata Y, Asai A, Mitsunari K, Matsuo T, Ohba K, Mochizuki Y, Sakai H. Met in urological cancers. *Cancers (Basel)*. 2014 Dec 16;6(4):2387-403. doi:10.3390/cancers6042387. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 宮田 康好、浅井 昭宏、松尾 朋博、大庭 康司郎、酒井 英樹．尿路上皮がんの集学的治療 緑茶摂取量が尿路癌の予後に与える影響 喫煙状況および癌細胞 HuR との関連に注目して．日本癌治療学会．2016年10月20日～22日．パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

松尾 朋博 (MATSUO, Tomohiro)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：60622024

(2)研究分担者

望月 保志 (MOCHIZUKI, Yasushi)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：40404256

宮田 康好 (MIYATA, Yasuyoshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・

准教授

研究者番号： 60380888