

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790365

研究課題名(和文)

腎細胞癌における上皮-間葉転換の分子機構

研究課題名(英文)

Molecular mechanism of epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinomas

研究代表者

三上 修治 (MIKAMI SHUJI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20338180

研究成果の概要(和文)：

Snail は E-cadherin 発現を抑制し、matrix metalloproteinase (MMP) 発現を誘導する上皮-間葉転換(EMT)の主要な転写因子である。原発性腎細胞癌 97 例を対象に Snail と E-cadherin 発現を免疫組織学的に検討した。Snail は G3 の腎細胞癌において高発現しており、G1・G2 の腎細胞癌では発現が低く、Snail 高発現・E-cadherin 低発現例は再発率が高く、予後不良であった。腎細胞癌由来の細胞株 786-0 の Snail 発現を siRNA によって抑制した結果、E-cadherin 発現の上昇と MMP9 発現抑制を認め、浸潤能が低下した。Snail が腎細胞癌の EMT に重要な役割を果たしており、Snail の抑制が腎細胞癌の治療標的になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

The transcriptional factor Snail has been proposed as an important mediator of epithelial-mesenchymal transition because of its role in down-regulation of E-cadherin and up-regulation of matrix metalloproteinases (MMPs). Ninety-seven primary RCCs were analyzed for the protein expression of Snail and E-cadherin by immunohistochemistry. The expression level of Snail was significantly higher in high-grade RCCs than in low-grade RCCs. The patients with Snail-high/E-cadherin-low RCCs had poor prognosis. Targeting the Snail expression in 786-0 cells with siRNA caused down-regulation of the gene expression of Snail, MMP9, but up-regulated the E-cadherin. Invasion of the cells through Matrigel *in vitro* was inhibited under this condition. In conclusions, these data suggest that Snail plays an important role in invasion and metastasis, and that silencing the gene may be a potential therapeutic target in RCCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：人体病理

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：上皮-間葉転換、腎細胞癌、Snail、転移、浸潤、紡錘形細胞癌

1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌は腎癌の最も多くを占める癌であり、約30%の症例が術後に転移を合併する。転移性腎細胞癌には放射線、化学療法が無効であり、根治を困難とする要因となっている。根治的外科治療が行われた腎細胞癌の約20-30%は術後に転移することが知られており、治療を困難にする要因である。癌が転移する際にはmatrix metalloproteinase (MMP)が基底膜・細胞外マトリックスの主要な構成要素を分解することが知られており、腎細胞癌では、MMP2, MMP9の発現亢進が病期と相関することが知られている。

上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT)は上皮細胞が肉腫様形態へ変化することであり、悪性腫瘍の進展・転移に重要であると考えられている。E-cadherin発現の消失がEMTの主要な指標であることが知られており、SnailはE-cadherinを抑制することでEMTを起こし、腫瘍の浸潤性・転移に関与すると考えられている。特に紡錘形細胞癌は最も低分化な腎細胞癌であり、少量でも紡錘形細胞癌を合併すると早期に転移を来し、予後不良であることが知られている。また、腎細胞癌ではE-cadherin発現の消失が転移とかかわっており、*in vitro*の研究ではSnailが腎癌のEMTに関与していることが示唆されている。しかし、*in vivo*におけるSnailと腎癌のEMTに関する報告はされていない。

2. 研究の目的

本研究では、通常分化型腎細胞癌から低分化な紡錘形細胞癌への移行が形態学的に上皮-間葉転換と考えられることに着目した。

前記の様にSnailはE-cadherin発現を抑制し、matrix metalloproteinase (MMP)発現を誘導するepithelial-mesenchymal transition (EMT)の主要な転写因子であるため、本研究では腎細胞癌におけるSnail発現の臨床病理学的因子や予後との関連を検討するとともに、*in vitro*におけるSnailの機能解析を行った。

3. 研究の方法

腎細胞癌30例、非腫瘍性腎組織7例については凍結切片からRNAを抽出し、Snail, E-cadherin発現を定量PCRによって測定した。腎細胞癌97例(淡明細胞癌83例、乳頭状腎細胞癌10例、嫌色素性腎細胞癌4例)および転移性腎癌(すべて淡明細胞癌)7例におけるSnail, E-cadherin発現を免疫組織学的に調べた。Snailは核における発現の陽性率、E-cadherinは細胞表面における陽性率を定量的に評価した。また、いずれも50%以上の腫瘍細胞が陽性である症例を高発現例と分類した。

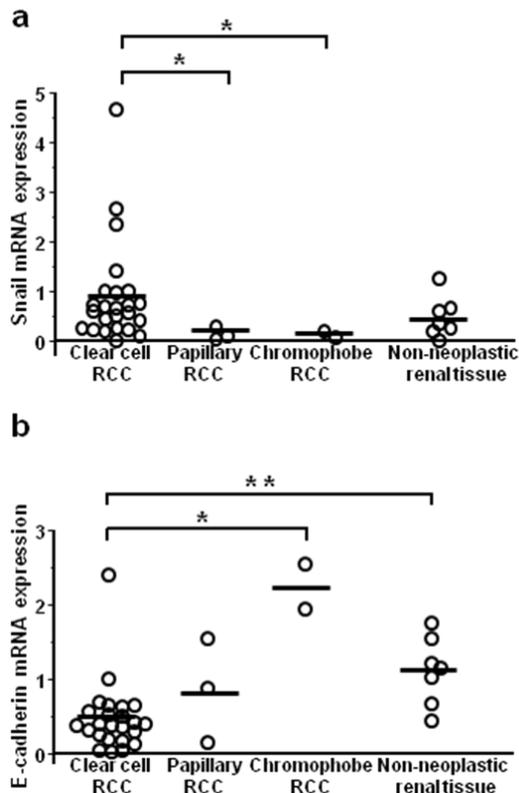
腎細胞癌由来の細胞株786-O, ACHNを*in vitro*の実験に用いた。Snail発現を抑制するために2種のsiRNAを細胞株にtransfectした。細胞株におけるSnail, E-cadherin, MMP発現は定量PCRによって測定した。Transwell culture insertを用いてmigrationを、Matrigelを用いて浸潤能を測定した。

4. 研究成果

淡明細胞癌では、乳頭状腎細胞癌、嫌色素性腎細胞癌に比べ有意にSnail mRNAが高値を示していた。一方、淡明細胞癌では、嫌色素

性細胞癌、非腫瘍性腎組織よりも E-cadherin 発現が低い傾向がみられた (図 1)。

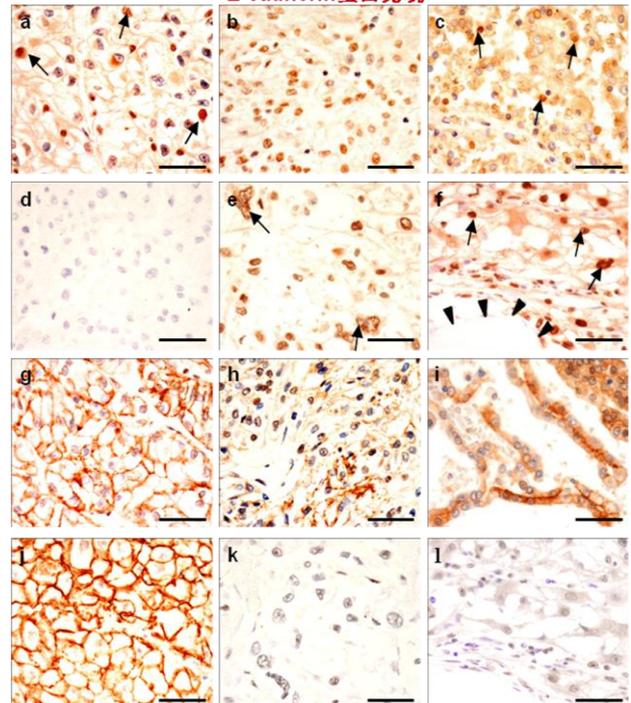
図 1. 腎細胞癌、非腫瘍性腎組織における Snail (a), E-cadherin (b) mRNA 発現



免疫組織学的に淡明細胞癌, G2 では、一部の癌細胞の核に Snail 発現がみられたが(図 2a)、淡明細胞癌, G3 ではびまん性に核における Snail 発現が確認された(図 2b)。乳頭状腎細胞癌では一部の核に Snail 発現がみられ(図 2c)、嫌色素性細胞癌では Snail 発現が見られなかった(図 2d)。一部の淡明細胞癌では、肉腫様腎細胞癌の合併がみられ、肉腫様腎細胞癌ではびまん性に Snail 発現が確認された(図 2e)。また、転移性腎細胞癌全例で強い Snail 発現がみられた(図 2f)。淡明細胞癌, G2 では、細胞膜に E-cadherin は発現がみられるが(Figure 2g)、淡明細胞

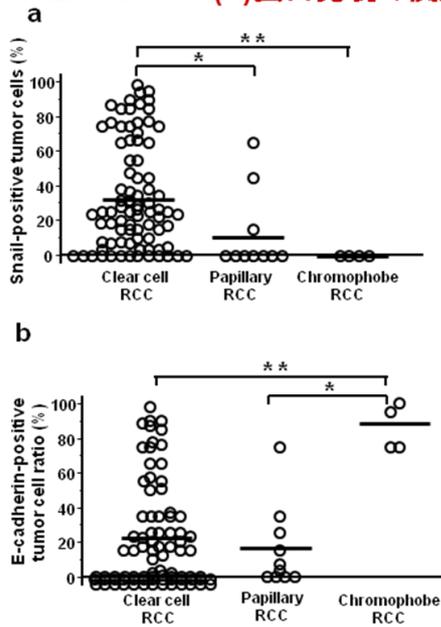
癌, G3 では E-cadherin 発現は大部分で消失していた (Figure 2h)。乳頭状腎細胞癌 (Figure 2i), 嫌色素性腎細胞癌 (Figure 2j) では E-cadherin 発現が確認された。肉腫様腎細胞癌では E-cadherin 発現は明らかではなく (Figure 2k)、転移性腎細胞癌でも E-cadherin 発現は著明に減少していた (Figure 2l)。

図 2. 腎細胞癌および非腫瘍性腎組織における Snail, E-cadherin 蛋白発現



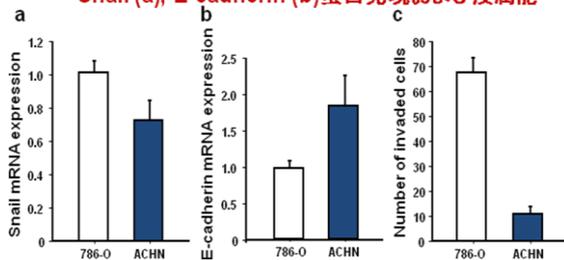
淡明細胞癌では Snail 陽性率が乳頭状腎細胞癌・嫌色素性腎細胞癌よりも高い傾向があった(図 3a)。また、淡明細胞癌、乳頭状腎細胞癌は嫌色素性腎細胞癌よりも E-cadherin 発現が低い傾向があった(図 3b)。

図3. 腎細胞癌の組織型とSnail (a), E-cadherin (b)蛋白発現の関連



腎細胞癌由来の細胞株 786-0, ACHN について Snail, E-cadherin 発現を定量 PCR を用いて調べたところ、786-0 は ACHN に比べて、Snail 発現が高く (図 4a)、E-cadherin 発現が低い傾向にあった (図 4b)。また、786-0 は ACHN よりも浸潤能が高かった (図 4c)。そのため、以降の siRNA の実験には 786-0 を用いた。

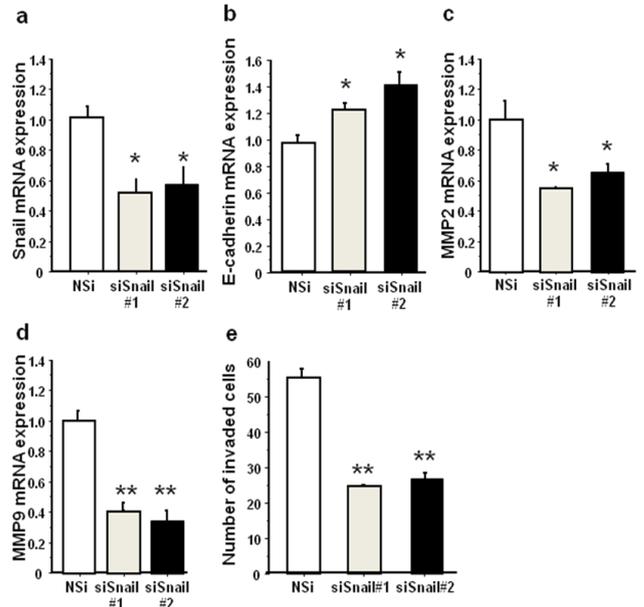
図4. 腎細胞癌由来細胞株786-0, ACHNにおける Snail (a), E-cadherin (b)蛋白発現および浸潤能



2 種類の Snail に対する siRNA を 786-0 に transfect したところ、いずれも Snail 発現を有意に抑制し (図 5a)、E-cadherin 発現を上昇させ (図 5b)、MMP2 (図 5c)、MMP9 (図

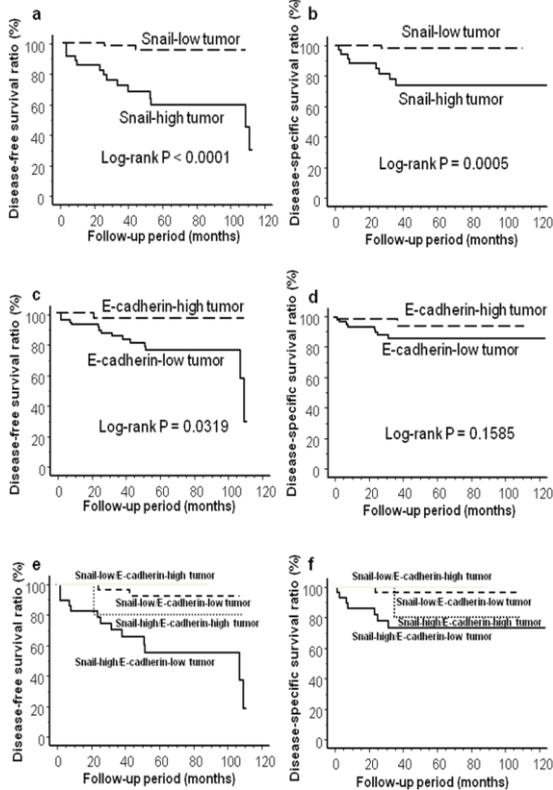
5d) 発現を抑制した。また、上記 siRNA は細胞の浸潤能 (図 5e) を抑制した。

図5. 786-0にSnailに対するsiRNAをtransfectした際のSnail (a), E-cadherin (b), MMP2 (c), MMP9(d)発現および浸潤能の変化



Snail 高発現例は低発現例にくらべ、再発率 (図 6a) および死亡率 (図 6b) が高い傾向がみられた。一方、E-cadherin 高発現例は低発現例にくらべ、再発率が低いものの (図 6c)、死亡率との関連は有意ではなかった (図 6d)。続いて Snail, E-cadherin 両方と予後との関連をみると Snail 高発現・E-cadherin 低発現例がもっとも再発率が高く、Snail 低発現例・E-cadherin 高発現例では、再発はみられなかった (図 6e)。Snail, E-cadherin と死亡率にも同様の傾向がみられた (図 6f)。

図6. Snail, E-cadherin発現と腎細胞癌の予後の関連

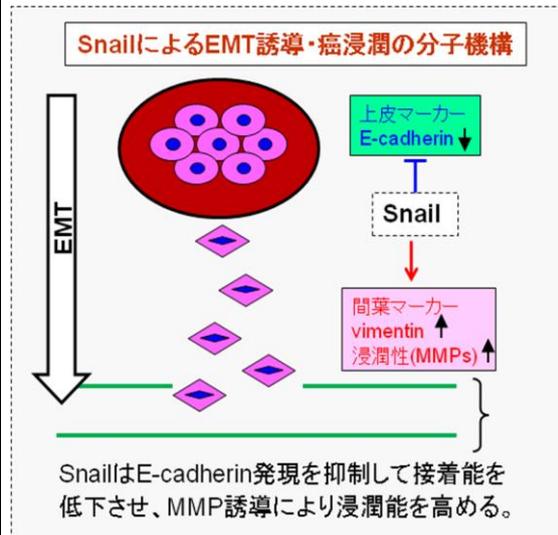


*in vitro*の研究ではVHLの不活化が腎細胞癌におけるEMTを誘導するとされている。しかし、実際の腎細胞癌ではVHLの不活化が早期に起こるにもかかわらず、早期腎細胞癌は上皮様形態を示し、E-cadherin発現もみられる。本研究によって腎細胞癌ではSnail発現レベルが原発巣の進展や肉腫様腎細胞癌の有無と相関することが判明した。また、Snail高発現・E-cadherin低発現は有意な独立した予後因子であった。

形態学的には肉腫様腎細胞癌は通常の腎細胞癌からhigh-gradeな腎細胞癌へのtransformationと考えられ、肉腫様腎細胞癌は進行期腎細胞癌で見られることが多い。通常の腎細胞癌から肉腫様腎細胞癌への移行は形態学的には腎細胞癌におけるEMTと考えられるため、本研究では、腎細胞癌におけるSnailおよびE-cadherin発現を調べた。その結果、すべての肉腫様腎細胞癌では高度の

Snail発現がみられ、E-cadherin発現はみられなかった。Snail, E-cadherinの逆相関関係は統計学的にも、*in vitro*の実験でも示されており、Snailが腎細胞癌のEMTに関与し、肉腫瘍腎細胞癌への形態学的変化にかかわっていることが示唆された。これらの結果から、Snailは腎細胞癌のE-cadherin発現を抑制することで悪性化にかかわっていると考えられた。

我々はSnail, E-cadherinの組み合わせと予後の関連を統計学的に検討したところ、Snail高発現・E-cadherin低発現例がもっとも再発率・死亡率が高く、独立した予後因子であることが判明した。



腎細胞癌細胞株のSnailをsiRNAで抑制すると浸潤能が低下したが、これはE-cadherin発現の上昇したため細胞間接着が回復したためと考えられる(上図)。Snailの抑制は細胞株の浸潤能も低下させた。癌細胞の浸潤にはMMPによる基底膜や細胞外マトリクス構成要素の分解が重要であり、特にMMP2, MMP9が癌細胞の浸潤に主要な役割を果たしていると考えられている。本研究では、Snail発現の抑制がMMP2, MMP9発現を抑制し、浸潤能を低下させたため(上図)、SnailはMMP2, MMP9発現を制御して癌の浸潤にかかわって

いることが示唆された。

本研究では、Snail は high-grade な腎細胞癌において高発現を示しており、Snail 高発現は E-cadherin 発現の抑制・腎細胞癌の悪性度と関連していた。さらに、Snail 発現の抑制することが MMP2, MMP9 の抑制および浸潤能の低下につながった。これらの結果から、Snail は E-cadherin 発現の抑制・MMP 発現の亢進によって腎細胞癌の悪性化にかかわっていることがわかり、Snail が腎細胞癌の治療標的になり得ることが示唆された。

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)

Shuji Mikami, Ken-ichi Katsube, Mototsugu Oya, Masaru Ishida, Takeo Kosaka, Ryuichi Mizuno, Makio Mukai, and Yasunori Okada.

Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis.

Laboratory Investigation, 2011, in press.
査読有

[学会発表] (計 1 件)

三上修治, 勝部憲一, 大家基嗣, 石田勝, 小坂威男, 水野隆一, 向井万起男, 岡田保典。

腎細胞癌における Snail 発現の意義および機能解析。

日本病理学会総会(2010.4.27, 東京)

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上 修治 (MIKAMI SHUJI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 20338180

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし