

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18791124

研究課題名（和文） 腎細胞癌のコレステロール蓄積機構の解明

研究課題名（英文） The mechanisms of cholesterol accumulation in renal cell carcinoma

研究代表者

松本 賢士（MATSUMOTO KENSHI）

熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教

研究者番号：50336228

研究成果の概要：

ヒト腎細胞癌において ACAT のアイソザイムの 1 つである ACAT-1 の発現上昇、それにともなう ACAT 活性の上昇を報告した。更に臨床的悪性度との相関では、腫瘍サイズや転移の有無、臨床病期との相関は認めなかった。組織学的悪性度とは ACAT-1 の発現、ACAT 活性ともに正の相関を認めた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,000,000	0	1,000,000
2007 年度	700,000	0	700,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	150,000	2,350,000

研究分野：医学薬学

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：癌、脂質、酵素

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 腎細胞癌は、化学療法、放射線療法に抵抗性を示す癌であり、主要な細胞型として淡明細胞型（clear cell type）があげられる。この淡明細胞癌は、細胞内にコレステロールの脂肪酸エステルであるコレステロールエステル（CE）が蓄積していることが知られている。CE 蓄積の

みられる細胞としては副腎皮質細胞や動脈硬化病変の泡沫細胞があげられるが癌細胞には他に例がなく、極めて特異なコレステロール代謝様式を有している。しかしながら、その CE 蓄積機構および病態生理学的意義、特に癌の増殖活性との関連性などについては、現時点で全く不明である。腎癌細胞内の CE 蓄積

が亢進する原因には4つの可能性が考えられる。LDL受容体の発現の亢進。

HMG-CoA還元酵素の活性の上昇。

Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT)の活性の上昇。

コレステロールエステラーゼの活性の低下。この内、1993年ヒトACATのクローニングがなされ、正常ヒト組織でのACAT発現が検討された。その報告の中で、腎細胞癌の発生母地である尿管上皮は強いACAT抗体染色性を呈することが明らかにされている(Sakashita et al. Am. J. Pathol. 1999)。我々の予備的な免疫組織学および生化学的検討では、興味のあることに、腎細胞癌患者の癌組織ではその正常尿管よりさらに顕著なACAT抗体陽性像を示した。更に、腎細胞癌の生物学的悪性度が高い程、ACATの発現は亢進していた。以上から、腎細胞癌とACATとの密接な関連を想起し、薬物によって腎細胞癌のコレステロール代謝を制御することによって、癌細胞そのものの増殖活性を制御できるのではないかと予想した。

## 2. 研究の目的

本研究の第一段階は腎細胞癌のコレステロールエステル蓄積機構を明らかにすることを目標とし、特にACATの発現に注目する。またコレステロールの供給源が外因性のリポ蛋白質に由来するのか、内因性のコレステロール生合成に由来するのかを明らかにする。外因性のリポ蛋白質に依存する場合、その経路はどの様なリポ蛋白質レセプターを介しているかを明らかにする。第二段階として、明らかになったコレステロール代謝の特性に着目し、その制御機構を解明する。最近インターフェロンがACATのプロモーター領域に作用してそ

の発現を調整していることが報告されている(Yang et al. J. Biol. Chem. 2001)。インターフェロンは免疫療法として進行腎細胞癌の治療に使用されている。その主要な作用機序は免疫賦活作用であるとされている。しかし、本研究で想定されるように腎細胞癌でACAT発現が亢進していて、CE蓄積が癌細胞の増殖に必須であるとすると、これらのサイトカインが直接癌細胞のACATプロモーター領域に作用し、ACAT発現を抑えることで癌細胞の増殖抑制に作用している可能性も考えられる。そこで、ACATのプロモーター領域と腎細胞癌増殖に関係するサイトカインとの関係を明らかにする。さらにACAT阻害剤の腎細胞癌増殖抑制効果を検討し新しい化学療法の可能性を模索する。これまで腎細胞癌のコレステロールエステル蓄積に関する分子レベルでのメカニズムは全く不明であったが、ACATに注目することにより、その重要な側面が明らかになる可能性が高い。またコレステロールを標的とした癌化学療法という発想は極めて独創性が高く、癌治療戦略に新たな視点を与える可能性がある。

## 3. 研究の方法

腎細胞癌手術症例から癌組織と正常組織を得、ヒトACAT特異抗体を用いた免疫組織学的手法にて腎細胞癌におけるACAT発現を定性的に検討し、細胞内の局在を明らかにする。生化学的手法としてまず、腎細胞癌および正常腎組織におけるACAT活性をリポゾーム再構成法にて比較検討する。次に特異抗体を用いたイムノプロット法にて腎細胞癌におけるACATタンパクの発現を定量的に検討する。遺伝子レベルの検索としてRT-PCR法にてACAT mRNAの発現を検討する。更に腎細胞癌におけるACAT発現と組織形態、生物学的悪

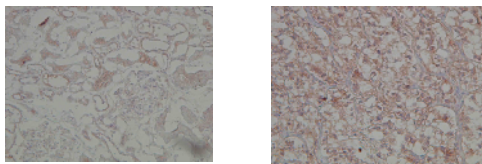
性度、臨床的悪性度との関連を統計学的に検討する。

内因性コレステロール合成系の指標として、コレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA

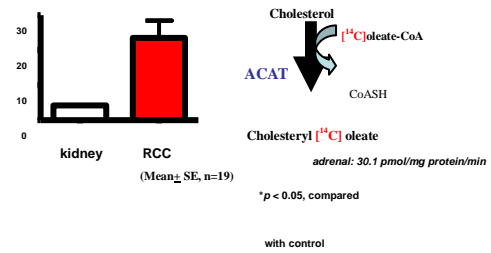
( 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase ) の腎細胞癌組織における酵素活性を測定する。外因性経路を検討するために、腎細胞癌におけるリポ蛋白質受容体の発現を免疫組織学的手法、生化学的手法 ( イムノブロット法、ノザンブロット法 ) にて検討する。リポ蛋白質と腎細胞癌の相互作用を検討するには、確立された細胞株を使用するのが実際的である。すでに市販されている各種不活化腎細胞癌細胞株を培養し、細胞のコレステロールエステル ( CE ) 含量を酵素蛍光法にて測定して、CE 蓄積という表現型を維持した細胞株を選択する。血漿から遠心分離して得られた LDL の CE を放射性同位元素標識コレステロールリノレン酸で標識し、培養細胞株へのコレステロールの移行を検討する。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) 抗 ACAT1 抗体を用いた免疫染色では下図 ( 右 : 正常腎 左 : 腎細胞癌 ) に示すように腎細胞癌において ACAT-1 の高い発現を認めた。



( 2 )



上図に示すように腎細胞癌では正常腎と比較して ACAT の高い活性を認めた。

( 3 )

**Table 2** Correlation of the acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) activity in clear cell type renal cell carcinoma (RCC) with several clinicopathological factors

	No. of patients	ACAT activity (pmol/mg protein per min)	P
Sex			
Male	16	21.3 ± 5.2	0.12
Female	3	34.7 ± 12.1	
Age (years)			0.07
-60	4	33.4 ± 9.8	
60-	15	18.4 ± 3.8	
Stage pT			0.36
pT1a	14	23.4 ± 6.5	
pT1b-	5	19.7 ± 8.0	
Grade			0.007
1	6	7.2 ± 1.7	
2 or 3	13	33.5 ± 5.8	

上記 table に示すように、ACAT 活性は細胞学的悪性度と正の相関を認めた。

( 4 )

**Table 3** Correlation of the expression level of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) protein in clear cell type renal cell carcinoma (RCC) with several clinicopathological factors

	No. of patients	Intensity of ACAT-1 immunoreactive band	P
Sex			
Male	16	3.0 ± 0.4	0.27
Female	3	2.6 ± 0.2	
Age (years)			0.16
-60	4	3.2 ± 0.3	
60-	15	2.7 ± 0.4	
Stage pT			0.08
pT1a	14	2.6 ± 0.3	
pT1b-	5	3.4 ± 0.5	
Grade			0.01
1	6	2.0 ± 0.3	
2 or 3	13	3.3 ± 0.3	

The intensity of the ACAT-1-immunoreactive band was normalized against the intensity of the control samples.

上記 table に示すように、ACAT-1 の発現は細胞学的悪性度と正の相関を認めた。

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)

Kenshi Matsumoto, Yukio Fujiwara,  
Ryoji Nagai, Masaki Yoshida and  
Shoichi Ueda Expression of two  
isozymes of acyl-coenzyme A:  
cholesterol acyltransferase-1 and  
-2 in clear cell type renal cell  
carcinoma. International Journal of  
Urology, 15, 166-70, 2008 有

[学会発表](計 2件)

松本賢士, 第97回日本泌尿器科学会総会  
平成21年4月17日  
岡山コンベンションセンター  
腎細胞癌における scavenger receptor  
family (SR-A, CD36)発現の検討

松本賢士, 第96回日本泌尿器科学会総会  
平成20年4月25日  
パシフィコ横浜  
腎細胞癌における acyl-coenzyme A  
cholesterol acyltransferase 発現の検  
討ー臨床パラメーターとの相関

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 賢士 (MATSUMOTO KENSHI)  
熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教  
研究者番号: 50336228

(2)研究分担者

(3)連携研究者