

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ~ 2008

課題番号：19790268

研究課題名 (和文) 腎細胞癌による破骨細胞誘導因子 RANKL 発現と骨転移

研究課題名 (英文) Expression of RANKL in renal cell carcinoma
and its association with bone metastasis

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：腎細胞癌 96 例における RANKL, RANK, OPG 発現を検討した結果、RANKL, RANK 高発現・OPG 低発現例が高頻度に骨転移をきたすことが判明した。さらに腎細胞癌由来細胞株 Caki-1 に RANKL 蛋白を添加して培養すると migration が亢進した。この作用は OPG を添加することで抑制された。RANKL, RANK 高発現・OPG 低発現例は骨のみでなく他臓器に転移しやすいこともわかったので、RANKL, RANK, OPG system は migration を制御することにより骨および他臓器への転移にかかわっていると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：腎細胞癌、骨転移、RANKL、RANK、OPG

1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌は高率に骨転移を合併する。骨転移を合併すると著しく患者の QOL が低下し、最終的には死に至る。腎細胞癌の骨転移の機構はいまだに殆ど解明されていないのが実情である。そのため、腎細胞癌の骨転移機構が解明されれば、有効な治療法の開発につながる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

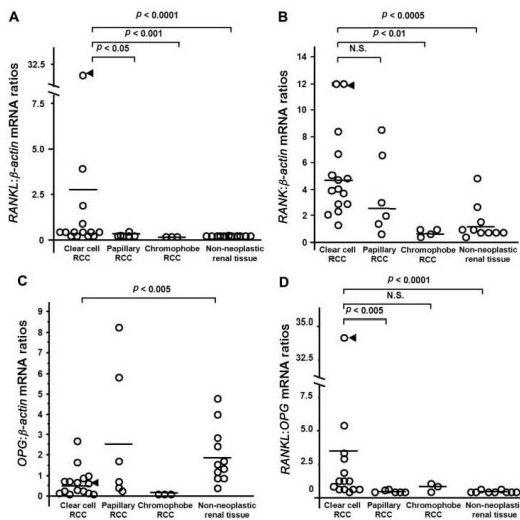
腎細胞癌における破骨細胞誘導因子 RANKL, その受容体 RANK、decoy receptor である OPG 発現および機能を解析し、その意義を解明することが本研究の目的である

3. 研究の方法

96 例の原発性腎細胞癌を対象にパラフィン切片を用いて免疫組織学的に RANKL, RANK, OPG 発現の検討を行うとともに、骨転移・予後との相関を統計学的に解析した。

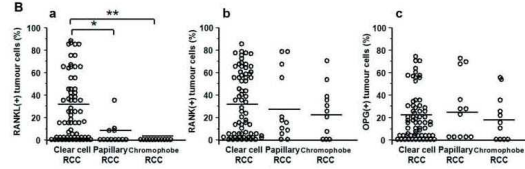
4. 研究成果

(1) 腎細胞癌組織における RANKL, RANK, OPG mRNA 発現を調べたところ、RANKL mRNA は淡明細胞癌において高発現していた。RANKL mRNA 発現が最も高値を示した症例 (図の矢印) は 2 年後に骨転移を併発した。淡明細胞癌における RANK mRNA 発現は嫌色素細胞癌、非腫瘍部腎組織に比べ有意に高値を示していた。OPG mRNA 発現は非腫瘍部腎組織において高かった。また、RANKL/OPG 比は淡明細胞癌において高く、最高値を示した症例は上記の 2 年後に骨転移を併発した症例である (矢印)。



(2) 96 例の腎細胞癌切除検体における

RANKL, RANK, OPG 蛋白発現を免疫組織学的に検討したところ、淡明細胞癌では RANKL 蛋白の陽性率が乳頭癌、嫌色素細胞癌よりも高い傾向にあった。尚、RANK, OPG 発現と組織型の間には有意な相関はみられなかった。



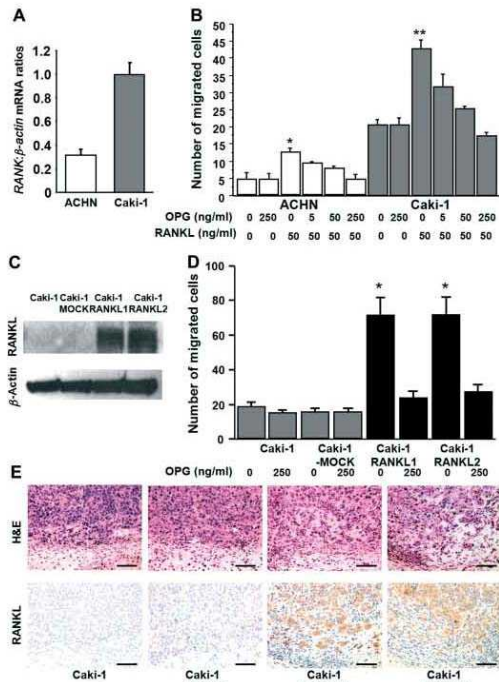
(3) RANKL, RANK, OPG 蛋白発現と臨床病理学的因子の関連を統計学的に調べたところ、RANKL 蛋白発現は pathological tumor stage, distant metastasis, histological grade と関連していた (表 1)。RANK 蛋白発現は pathological tumor stage と関連していた。また、OPG 蛋白発現は pathological

Table 1. Relationship between RANKL, RANK, OPG expression and clinicopathological parameters

	RANKL-positive tumour cells (%) (mean ± SD)	RANK-positive tumour cells (%) (mean ± SD)	OPG-positive tumour cells (%) (mean ± SD)
Gender			
Male (n = 77)	24.2 ± 38.5	28.7 ± 25.8	21.5 ± 22.6
Female (n = 19)	18.4 ± 23.4	39.1 ± 31.0	26.5 ± 24.6
p	0.505	0.121	0.370
Age (years)			
Median or less (<= 59) (n = 45)	25.0 ± 30.0	31.2 ± 26.7	17.0 ± 17.5
Over median (> 59) (n = 51)	21.4 ± 25.4	30.3 ± 31.2	27.3 ± 26.2
p	0.889	0.863	0.101
Pathological tumour stage			
pT1, 2 (n = 69)	16.6 ± 22.7	27.4 ± 27.2	25.7 ± 23.7
pT3, 4 (n = 27)	29.7 ± 22.1	39.3 ± 25.4	14.1 ± 19.0
p	0.010	0.026	0.032
Lymph node metastasis			
Negative (n = 90)	22.5 ± 27.4	31.3 ± 27.4	23.6 ± 23.2
Positive (n = 6)	0.482	0.560	5.0 ± 7.8
p	0.482	0.560	0.037
Distant metastasis			
pM0 (n = 86)	19.7 ± 24.6	31.0 ± 27.2	24.0 ± 23.5
pM1 (n = 10)	52.1 ± 35.9	28.5 ± 27.4	9.2 ± 12.9
p	0.008	0.924	0.069
Histological grade			
G1, 2 (n = 64)	18.4 ± 24.5	28.8 ± 27.7	23.5 ± 22.7
G3, 4 (n = 32)	32.4 ± 31.3	34.5 ± 25.8	20.3 ± 23.9
p	0.032	0.245	0.395
Venous invasion			
Negative (n = 45)	18.6 ± 23.8	29.4 ± 27.6	26.8 ± 23.7
Positive (n = 31)	32.5 ± 22.6	33.6 ± 26.3	13.4 ± 18.6
p	0.101	0.454	0.005

tumor stage, lymph node metastasis, venous invasion と関連していた。

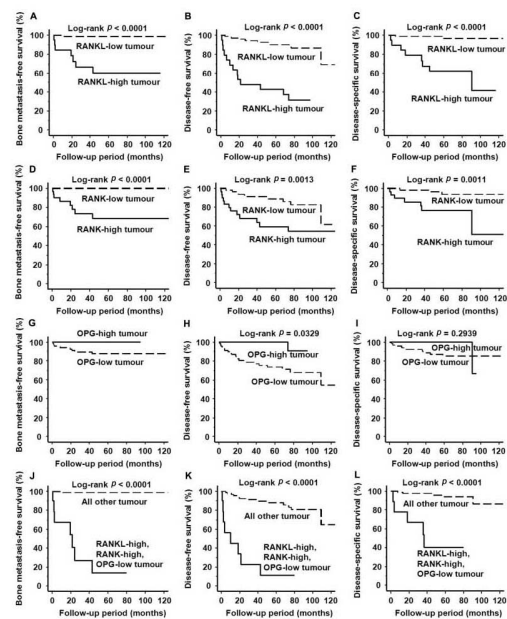
(4) 腎細胞癌由来の細胞株 Caki-1, ACHN cells は RANK を発現しているが RANKL は発現していない (次頁図 A)。



これらの細胞にRANKL蛋白を添加して培養すると遊走能が亢進し、RANKL蛋白の作用はOPG蛋白を添加することで抑制された(図B)。同様にCaki-1 cellsにRANKL cDNAを導入すると遊走能の亢進がみられ、培養系にOPGを添加するとその作用が抑制された(図C, D)。さらにRANKLを導入したCaki-1 cellsをnude mouseに移植するとparental cellsおよびvectorのみを導入したCaki-1 cellsと比較すると辺縁部での結合性が低下しており、遊走能および浸潤能の亢進が示唆された(前頁図E)。

(5) RANKL, RANK, OPG発現と予後の関連を統計的に検討したところ、RANKL高発現例では、骨転移、再発、死亡率がいずれも有意に高い傾向が認められた(図)。RANK高発現例も骨転移、再発、死亡率がいずれも有意に高い傾向があった(図)。また、OPG

高発現例は再発しにくい傾向があった(図)。



(6) RANKL, RANK, OPG発現および臨床病理学的因子を用いて多変量解析を行った結果、RANKL高発現、RANK高発現、OPG低発現例が有意に骨転移、再発、死亡率が高いことが分かった(表2)。

Table 2. Cox regression analysis of bone metastasis-free survival (A), progression-free survival (B), and disease-specific survival (C)

Risk factors	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	p
A. Bone metastasis-free survival				
Pathological tumour stage pT3, 4	22.831 (2.7%–186.424)	0.0035	20.128 (0.861–470.755)	0.0619
Distant metastasis Positive	3.099 (0.624–15.380)	0.1663	0.396 (0.049–3.176)	0.3834
Histological grade G3, 4	17.742 (2.178–144.528)	0.0072	12.015 (0.772–187.055)	0.0759
Venous invasion Positive	4.152 (0.989–17.430)	0.0517	1.365 (0.187–9.959)	0.7590
RANKL–RANK–OPG High–high–low	114548 (1.8228–948.904)	<0.0012	124.786 (7.903–1970.411)	0.0006
B. Progression-free survival				
Pathological tumour stage pT3, 4	15.881 (5.293–47.649)	<0.0001	5.830 (1.421–23.915)	0.0144
Distant metastasis Positive	5.791 (2.341–14.324)	0.0001	0.973 (0.344–2.750)	0.9584
Histological grade G3, 4	9.448 (3.392–26.321)	<0.0001	3.175 (0.998–10.104)	0.0504
Venous invasion Positive	7.042 (2.706–18.323)	<0.0001	2.079 (0.582–7.422)	0.2597
RANKL–RANK–OPG High–high–low	13.665 (5.464–34.176)	<0.0001	8.089 (2.734–23.933)	0.0002
C. Disease-specific survival				
Pathological tumour stage pT3, 4	27.078 (3.406–215.297)	0.0018	2.542 (0.211–30.555)	0.4621
Distant metastasis Positive	9.060 (2.703–30.373)	0.0004	2.347 (0.642–8.587)	0.1972
Histological grade G3, 4	24.498 (3.074–195.243)	0.0025	5.535 (0.596–51.372)	0.1322
Venous invasion Positive	21.414 (2.701–169.780)	0.0037	5.126 (0.499–52.630)	0.1690
RANKL–RANK–OPG High–high–low	16.935 (4.463–64.263)	<0.0001	6.989 (1.607–30.401)	0.0095

OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval.

この様にRANKL/RANK/OPG systemは骨転移のみではなく、腎細胞癌の遊走・浸潤に関わっていることが示唆されたため、RANKLを特異的に抑制することが腎細胞癌

の効果的な新規治療法の開発につながる可能性があることが分かった。

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)

Mikami S, Katsube K, Oya M, Ishida M, Kosaka T, Mochizuki S, Ikeda T, Mukai M, Okada Y.

Increased RANKL expression is related to tumor migration and metastasis of renal cell carcinomas.

Journal of Pathology, 2009, in press

査読有

[学会発表] (計 1 件)

Mikami S, Katsube K, Oya M, Mochizuki M, Shimoda M, Mizuno R, Ishida M, Ikeda T, Mukai M and Okada Y

RANKL EXPRESSION IN CLEAR CELL RENAL CELL CARCINOMAS AND ITS ASSOCIATION WITH BONE METASTASIS AND CANCER CELL MIGRATION

American Urological Association

2008 Annual Meeting May 18, 2008 Orland, Florida, USA

[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]

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

三上 修治 (SHUJI MIKAMI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号:20338180

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者