

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390445

研究課題名（和文） 微小環境と臓器特異的転移に着目した泌尿器がんの発がん・進展のメカニズムの解明

研究課題名（英文） Microenvironment and organ specific metastases in urological cancers as tools to elucidate molecular mechanism of carcinogenesis and tumor development.

研究代表者

大家 基嗣（OYA MOTOTSUGU）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：00213885

研究成果の概要（和文）：

微小環境での癌の浸潤性と形態変化

腎細胞癌 97 例を用いて EMT の指標である E-cadherin 発現を抑制する転写因子 Snail の発現を免疫組織学的に調べた。その結果、Snail 発現は原発巣の進展度、組織学的異型度および肉腫様腎細胞癌の合併の有無と相関していた。Snail 高発現例は低発現例に比べ、再発率および死亡率が高い傾向がみられた。

Snail 発現と癌細胞の浸潤・転移能の関係を調べるため、腎細胞癌由来の細胞株 786-O、ACHN における Snail 発現を small interfering RNA (siRNA) を用いて抑制し、E-cadherin および細胞外マトリックス分解酵素である matrix metalloproteinase (MMP)-2、MMP-9 発現を定量 PCR 法およびイムノプロット法により測定した。その結果、siRNA により Snail 発現を抑制すると E-cadherin 発現が上昇するとともに、MMP-2 と MMP-9 の発現が低下し、in vitro での癌細胞の遊走能、浸潤能が低下した。Snail は腎細胞癌の浮腫胞および進展に関連していることが示唆された。

骨転移巣における微小環境

腎細胞癌 96 例を対象に原発巣の RANKL 発現を調べた。RANKL 陽性細胞の比率は原発巣の進展度、遠隔転移と相関していた。骨転移巣に限らず、リンパ節、肝臓、皮下組織の転移巣でも RANKL、RANK が高発現していた。RANKL、RANK の作用は骨転移における臓器特異的転移に相関するというよりも臓器に関わらず転移に関わっていることが示唆された。

腎細胞癌細胞株 Caki-1 にリコンビナント RANKL を添加して培養すると癌細胞の遊走能が亢進し、その作用は RANKL の decoy receptor である OPG を添加することで抑制された。RANKL と RANK は癌細胞の遊走能を亢進し、骨転移のみではなく他臓器への転移に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Ninety-seven primary (renal cell carcinomas) RCCs were analyzed for the protein expression of Snail, Slug, MMP2 and MMP9 by immunohistochemistry. Snail protein expression level was positively correlated with pathological tumor stage, histological grade and the presence of sarcomatoid carcinoma. Because Snail was positively associated with malignant potential of RCCs, involvement of Snail in the invasiveness of an RCC cell lines 786-O and ACHN were examined in the Matrigel invasion assay by down-regulating the gene expression with small interfering RNA (siRNA). Invasion of the cells through Matrigel in vitro was inhibited under this condition. Furthermore, expression levels of MMP2 and MMP9 were positively correlated with pathological tumor stage and the presence of sarcomatoid carcinoma. In conclusion, these data suggest that Snail has an important role in invasion and metastasis, and that silencing the gene may be a potential therapeutic target in RCCs.

Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and its receptor, receptor activator of NF- κ B (RANK), play a key role in osteoclastogenesis RANKL protein expression level

showed positive correlations with the primary tumour stage and distant metastasis. RANKL and RANK expression was observed in metastatic RCCs in the bone and other organs, suggesting that they play a role in metastasis to the bone and other organs. Recombinant RANKL protein stimulated migration of a clear cell RCC cell line, Caki-1, *in vitro*, and this enhanced migration was inhibited by the administration of recombinant OPG protein. These data suggest that the RANKL-RANK-OPG system is involved not only in the bone metastasis of RCCs but also in metastasis to other organs through the stimulation of cancer cell migration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：医歯薬学

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：腎細胞癌・分子標的治療・上皮 間葉転換・Snail

1. 研究開始当初の背景

何故、転移・浸潤性の進行癌は難治なのか？この疑問に対し、我々は、腎細胞癌における肺・骨という好発転移部位の存在、転移部位による治療への反応性の違いに着目し、微小環境を考慮して転移・浸潤のメカニズムを明らかにしようとした。好発転移部位の存在は、癌の進展に有利な微小環境が、癌種によって異なることを示唆し、転移部位による抗がん剤治療の反応性の差は、それぞれの微小環境での癌の増殖制御の違いや、癌の細胞生物学的な不均一性 (heterogeneity) やがん幹細胞の性質を示唆している。しかし、腎細胞癌の原発巣や転移巣における微小環境に着目した浸潤・転移機構についての報告はなかった。

2. 研究の目的

(1) 微小環境でのがんの浸潤性と形態変化
腎細胞癌は主に淡明型細胞癌、乳頭型細胞癌、嫌色素型細胞癌の3つの組織型が存在する。発がんの分子機構は異なっているものの、ひとつの特徴がある。それは、悪性度の強い亜型として各々に肉腫様変化 (sarcomatoid variant) が存在することである。この亜型は浸潤性が強く、予後不良である。近年、上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) が生じることががんの浸潤・転移をきたすメカニズムであることが指摘されている。確かに間葉系への変化をきたした肉腫様腎癌の強い浸潤性はこの理論を指示する。原発巣の微小環境の検索として、腫瘍の浸潤部を詳細に観察すると、中心部が腺がんとしての形態を維持していても腫瘍の先進部では間葉系様細胞の部位がある症例があることを既に確認している。EMTの

存在を各種マーカーである Snail と Slug を指標に検討する。

(2) 骨転移巣における微小環境

骨転移巣の微小環境は、骨芽細胞、破骨細胞、免疫担当細胞が構成する骨・骨髄組織にがん細胞が加わることによって、複雑な細胞間ネットワークが形成されていることが特徴である。増殖因子あるいはサイトカインが細胞間の情報交換に重要な役割を果たす。この微小環境の検索には骨転移巣の切除標本が必要である。整形外科との連携により豊富な切除検体を使用し、微小環境における破骨細胞の活性化の機序を RANK, RANKL, OPG を中心に検索する。

3. 研究の方法

微小環境でのがんの浸潤性と形態変化

腎細胞癌はこれまでの応募者の解析により、様々な増殖因子やサイトカインを産生する腫瘍であることがわかっている (Oya M et al: Clin. Cancer Res., 9, 1021-1027, 2003)。

a) EMT を誘導する液性因子の同定と抑制による浸潤性の抑制

in vitro の実験として腎癌細胞株を使用して、TGF- β , FGF, EGF, PDGF, TNF- α 等の添加による EMT を E-カドヘリンの発現抑制、ビメンチンの発現亢進を指標に検索する。

b) EMT の誘導に関する転写因子の腎細胞癌組織における発現

Snail, TWIST, Slug, ZEB1, ZEB2 等 EMT に関与する転写因子の解析を腎細胞癌組織を用いて、免疫組織化学的に検索する。発現と病理学的パラメータ、つまり腫瘍の病期と悪性度、浸潤性、血管浸潤、リンパ管浸潤との相関を検索する。さらに、肺、骨等の転移巣

での発現を検討し、臓器特異的転移との関連も合わせて検討する。

骨転移巣における微小環境

a) 骨転移巣における破骨細胞活性化因子の検討

骨転移巣での RANKL の発現を検討し、原発巣との比較を行う。RANKL を発現しているクローンが骨転移を形成することができたかどうか、つまり、臓器特異的転移のメカニズムかどうかを検討する。

b) RANKL の強制発現による浸潤性増強の検討

RANKL をクローニングし、腎細胞癌に発現するクローンを作成し、マトリジェルを用いた浸潤性試験 (invasion assay) を行い、浸潤性の増加が生じるかどうかを検討する。

4. 研究成果

微小環境での癌の浸潤性と形態変化

腎細胞癌の病理組織では腫瘍の浸潤部に紡錘形の脱分化を示唆する細胞塊が存在することを我々は発見した。このことは腎細胞癌進展において上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が生じていることを示唆する。Snail は細胞接着因子である E-cadherin 発現を抑制し、細胞外マトリックス分解酵素である matrix metalloproteinase (MMP) 発現を誘導する EMT に関与する転写因子である。本研究では腎細胞癌における Snail の発現を検討し、臨床病理学的因子や予後との相関を検討し、さらに siRNA を用いて in vitro における Snail の機能解析を行った。原発性腎細胞癌 97 例 (淡明細胞癌 83 例、乳頭癌 10 例、嫌色素細胞癌 4 例) を対象に Snail と E-cadherin 発現を免疫組織学的に検討した。腎細胞癌由来の細胞株 786-O を使用し、Snail 発現を siRNA によって抑制し、E-cadherin と MMP 発現の変化を定量 PCR によって測定するとともに、マトリジェル法を用いて浸潤能を測定した。Snail は G3 の淡明細胞癌において高発現しており、G1 あるいは G2 の淡明細胞癌、乳頭癌、嫌色素性細胞癌では発現が低かった。E-cadherin 発現は嫌色素細胞癌において高く、他の組織型では低かった。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。Snail 発現を抑制すると、E-cadherin 発現の上昇と MMP9 発現抑制を認め、マトリジェル上での浸潤能が低下した。Snail は E-cadherin 発現を抑制することによって細胞接着を低下させ、さらに MMP 発現を誘導し細胞外マトリックスの分解を促進することによって癌細胞の浸潤能を亢進することが示唆された。

骨転移巣における微小環境

腎細胞癌の浸潤・転移に関わる微小環境の研究を骨転移巣を中心に解析した。破骨細胞

誘導因子 RANKL およびその受容体 RANK は骨破壊に重要な働きをしている。高頻度に骨転移を来す腎細胞癌における RANKL と RANK の発現を免疫組織学的に調べ臨床病理学的因子、骨転移や予後との相関を検討するとともに、その分子機構を解析した。

腎細胞癌は大きく 3 つの組織型に分類される。すなわち、淡明細胞癌、乳頭状細胞癌、嫌色素性細胞癌である。腎細胞癌 96 例を対象に RANKL 発現を調べたところ、乳頭状細胞癌、嫌色素性細胞癌では RANKL 蛋白発現が低く、淡明細胞癌において RANKL が高発現していることが確認された。RANKL 陽性細胞の比率は原発巣の進展度、遠隔転移と相関していた。骨転移巣に限らず、リンパ節、肝臓、皮下組織の転移巣でも RANKL, RANK が高発現していた。RANKL, RANK の作用は骨転移における臓器特異的転移に相関するというよりも臓器に関わらず転移に関わっていることが示唆された。

In vitro の実験では、淡明細胞癌由来の腎細胞癌細胞株 Caki-1 にリコンビナント RANKL を添加して培養すると癌細胞の遊走能が亢進し、その作用は RANKL の decoy receptor である OPG を添加することで抑制された。また、統計学的に RANKL, RANK 発現が亢進し、OPG 発現が低い例では高頻度に骨および他臓器転移を来し、予後不良であることが分かった。

以上の結果より、RANKL と RANK は癌細胞の遊走能を亢進し、骨転移のみではなく他臓器への転移に関与していることが示唆された。破骨細胞が存在しない、骨以外の臓器での RANKL と RANK の役割は不明であり、増殖に関連するのか、それともさらなる他臓器への転移に関連するのか今後の検討課題と考えられた。

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 3 件)

Mizuno R, Asano K, Oya M, et al. Patterns of Interstitial Lung Disease During Everolimus Treatment in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma, Jpn J Clin Oncol, 査読有、Epub, 2012

Mikami S, Katsube K, Oya M, et al. Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis., Lab Invest, 査読有、91(10), 2011, 1443-58

Mikami S, Katsube K, Oya M, et al. Increased RANKL expression is related

to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas.、J Pathol、査読有、218(4)、2009、530-9

〔学会発表〕(計2件)

Suzuki K, Oya M, et al.
High nuclear grade has strong prognostic significance in patients with pathologic T1a renal cell carcinoma, 27th Annual EAU Congress, 27 February 2012, Paris

Oya M, Mikami S, et al.
Expression of E-cadherin repressor Snail in renal cell carcinoma: Implication for cancer invasion and prognosis、22nd Urological Research Society Conference, September 24th, 2011, Oxford

〔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

泌尿器科学教室ホームページ

<http://www.keio-urology.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大家 基嗣 (OYA MOTOTSUGU)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：00213885

(2) 研究分担者

三上 修治 (MIKAMI SYUUJI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20338180

中川 健 (NAKAGAWA KEN)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：50227740

宮嶋 哲 (MIYAJIMA AKIRA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90245572

菊地 栄次 (KIKUCHI EIJI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10286552

(3) 連携研究者

なし