

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25年4月29日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591771

研究課題名（和文） 前立腺癌における FES の臨床病理学的意義の網羅的検討

研究課題名（英文） Investigation on clinicopathological significance of FES in prostate cancer

研究代表者

宮田 康好 (MIAYTA YASUYOSHI)

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号：60380888

研究成果の概要（和文）：c-Fes の発現は前立腺癌の悪性度と関連することを、遺伝子改変マウスを用いた研究および患者組織の研究で明らかにした。さらに、c-Fes に関連する分子や病態についても、細胞や組織などを用いた網羅的に検討により興味深い所見を見出し報告した。

研究成果の概要（英文）：Expression of c-Fes was associated with malignant potential in KIMAP and human tissues of prostate cancer. In addition, we also found interesting findings of various c-Fes-related factors and pathological phenomenon in comprehensive studies by using cell lines and tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：泌尿器学

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：c-Fes・前立腺癌・泌尿器癌・血管新生・腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

（1）我々の研究グループは、以前より血管新生の制御機序について、in vivo、in vitro 研究を進めてきた。その研究過程において、非受容体型チロシンキナーゼの 1 つである c-Fes が fibroblast growth factor (FGF) -2 を介する血管新生で重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、c-Fes の持つ細胞増殖刺激作用の着目し、血管新生がその病態に大きな影響を与える腎細胞癌について、cell line を用いて検討したところ、c-Fes が腎癌細胞の増殖を亢進させることがわかった。この研究成果は、血球系や血管内皮細胞だけではなく、ある種の癌細胞の増殖に

c-Fes が関与することを示した点で、非常にインパクトのある結果であり、本研究の発想や構想の基になった。

（2）研究開始時には、我々がノースウエスタン大学（カナダ）と共同で樹立した前立腺癌自然発生遺伝子改変マウスや前立腺癌患者の組織を用いた研究が進行中であり、c-Fes が前立腺癌において果たす臨床病理学的意義を網羅的に検討できる環境にあった。

（3）研究代表者は研究開始の直前までクイーンズ大学（カナダ）に留学しており、c-Fes が mast cell の分化や機能制御に与える影響

や、c-Fes の下流分子を同定する基礎研究に従事していたため、c-Fes の in vitro における研究の動向や最新の情報に精通していた。

また、当時、その留学先の研究室において、ある種の白血病や乳癌において、c-Fes が癌化や進行に重要な役割を果たすことを示すデータが出始めており（後に、いずれも published された）、悪性腫瘍における c-Fes の意義が注目され始めていた。

2. 研究の目的

(1) 前立腺癌における c-Fes の果たす病理学的役割を明らかにすると共に、その臨床的な意義や予後との関連を網羅的に検討。

(2) 上記(1)を検討する過程や、そこで得られたデータを基に、より詳細かつ総合的に c-Fes の役割を明らかにするために、以下に示す課題についても研究を進める。

—① c-Fes と唯一同じ family を構成する Fer について、その泌尿器科癌における発現や臨床病理学的意義を明らかにする。

—② その分化や機能制御に c-Fes が重要な役割を果たす mast cell について、泌尿器癌組織における浸潤の程度や臨床病理学的特徴との関連などを網羅的に検討。

—③ in vitro や他の癌腫で知られている c-Fes の下流分子について、泌尿器癌における病理学的役割を in vivo により網羅的に解析。

—④ 血管新生における c-Fes/Fer の果たす役割をより正確に解析するため、泌尿器癌組織における至適な半定量化法について検討。

(3) 上記(1)、(2)に用いる実験モデルを確立する過程で、prostaglandin E2 受容体 (EPs) について新たな知見を得たため、その臨床的意義を泌尿器科癌組織で検討。

3. 研究の方法

(1) 前立腺癌自然発生遺伝子改変マウス (KIMAP) を用いて、癌化に伴う c-Fes の経時的な発現変化を免疫組織学的に検討する。

(2) 前立腺癌患者の組織を用い、癌細胞と正常腺細胞における c-Fes の発現を検討し、臨床病理学的意義や予後との関連を解析する。

(3) 癌の cell lines において、sh-RNA などを用いて c-Fes の発現を制御し、より詳細な病理学的役割を明らかにする。

(4) Fer についても上記(1)-(3)と同様に検討する。また、c-Fes の癌細胞における役割を網

羅的に理解するために、前立腺癌以外の泌尿器癌においても、同様の解析を加える。

(5) Mast cell を免疫染色を用いて tryptase と chymase の含有に分類し、それぞれの組織内の密度を半定量化し、その臨床病理学的特徴との関連を解析する。

(6) c-Fes の下流分子として、cadherin、cortactin、PTP-1B 等に注目し、それらの病理学的な役割を in vivo、in vitro で検討する。

(7) Microvessel density (MVD) の算出に汎用されている CD31、CD34、CD105 について、泌尿器癌組織において、より正確に血管新生を反映する抗体を統計学的に特定する。

(8) 血管新生亢進に重要な役割を果たす PGE2 の受容体について、その泌尿器癌における病理学的意義を総合的、網羅的に検討する。

4. 研究成果

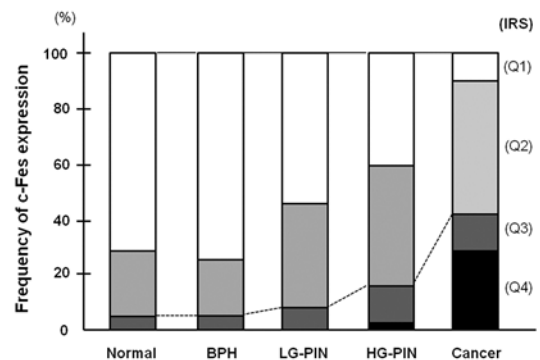
① 前立腺癌における c-Fes 発現の意義。

KIMAP において、c-Fes の発現は正常腺組織よりも前立腺癌細胞で増加おり、前立腺癌組織の全てで c-Fes の高発現を認めた。

	N	c-Fes expression (%)	
		Negative	Positive
4 – 12 weeks (n=7)			
Normal	7	7 (100.0)	0 (0.0)
PIN	7	5 (71.4)	2 (28.6)
Cancer	0	–	–
28 – 32 weeks (n=7)			
Normal	0	–	–
PIN	1	1 (100.0)	0 (0.0)
Cancer	7	0 (0.0)	7 (100.0)
Total			
Normal	7	7 (100.0)	0 (0.0)
PIN	8	6 (75.0)	2 (25.0)
Cancer	7	0 (0.0)	7 (100.0)

KIMAP: Knock-in mouse of adenocarcinoma,
PIN: prostatic intraepithelial neoplasia

また、下図に示したように、KIMAP と同様の傾向が、前立腺癌患者の組織を用いた検討でも認められた。

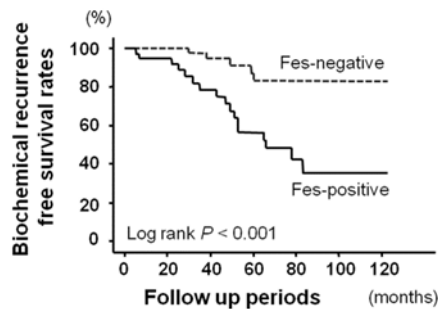


次に前立腺癌患者の臨床病理学的特徴との関連を検討したところ、pT stage や Gleason's score と正の関連を認めた。

Table II. Relationship between Fes Expression and Pathological Features in Human Prostate Cancer

	No. Pts	c-Fes expression (%)		P value
		Negative (n=57)	Positive (n=36)	
Mean (SD) age at diagnosis	93	63.5 (5.7)	62.2 (7.0)	0.317
Serum PSA level (ng/ml)	93	11.3 (10.1)	9.8 (6.3)	0.414
pT stage				< 0.001
Low (T2)	60	43 (75.0)	17 (25.0)	
High (T3)	33	12 (36.4)	21 (63.6)	
Gleason's score				0.047
Low ($\leq 3+4$)	54	36 (66.7)	17 (33.3)	
High ($\geq 4+3$)	38	17 (44.7)	21 (55.3)	

さらに、その予後とも有意に関連していた。

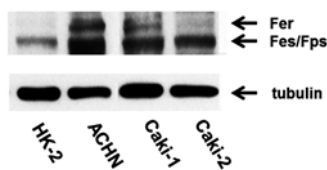


以上のように、前立腺癌において c-Fes が重要な役割を果たし、予後予測因子や治療標的として有用である可能性を報告した。

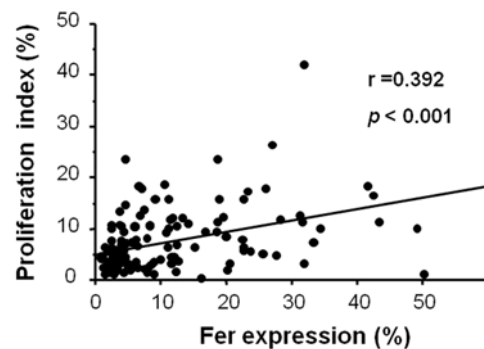
② 腎細胞癌における Fer の意義。

Fer は、腎癌 cell line に発現しており、特に、ACHN で最も発現が亢進していた。

(A) Fps QE

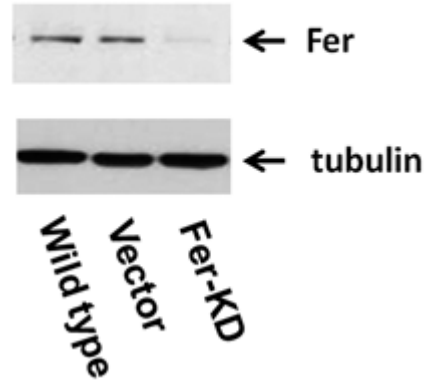


また、Fer の発現はヒト癌組織における検討で、癌細胞増殖と正の相関関係を認めた。

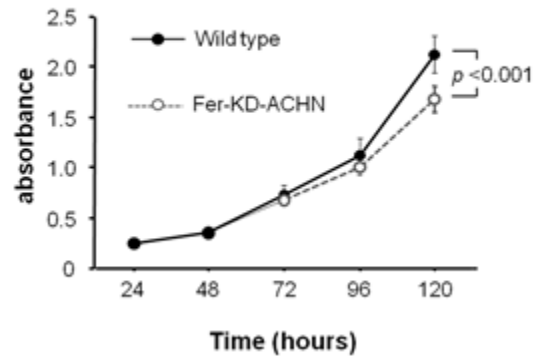


そこで、Fer の発現を sh-RNA で抑制する (A) と、その増殖は wild type より低下し (B)、前記の in vivo の結果を支持した。

A



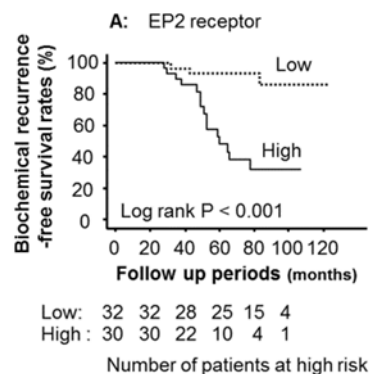
B



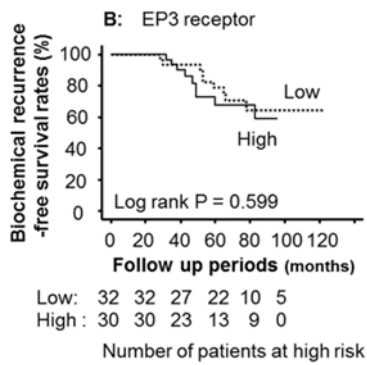
このように、Fer も腎癌細胞増殖を介して、臨床病理学的特徴と関連することが示唆され、前立腺癌でも同様の研究が進行中である。

③ 前立腺癌間質細胞での EP receptor 発現。

前立腺癌組織で、EP2R を発現した間質細胞密度は、悪性度や予後と関連していた。



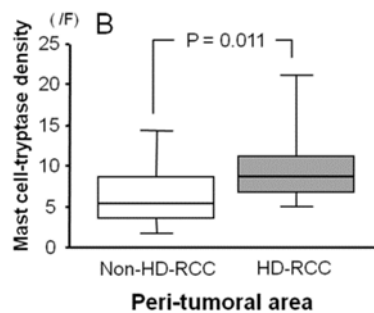
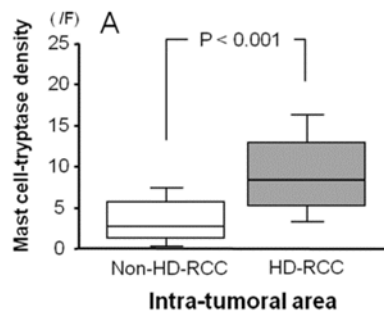
また、同様の結果は EP3R でも認められ、その機序として、血管新生やリンパ管新生を介したものである可能性が示唆された。



このように、癌の組織間質細胞が EPRs の発現様式で病理学的役割が異なる可能性が示唆された。その間質細胞のうち mast cell は c-Fes が分化成熟に重要な役割を果たしており、現在、さらに詳細に解析中である。

④ 透析腎癌における mast cell の意義。

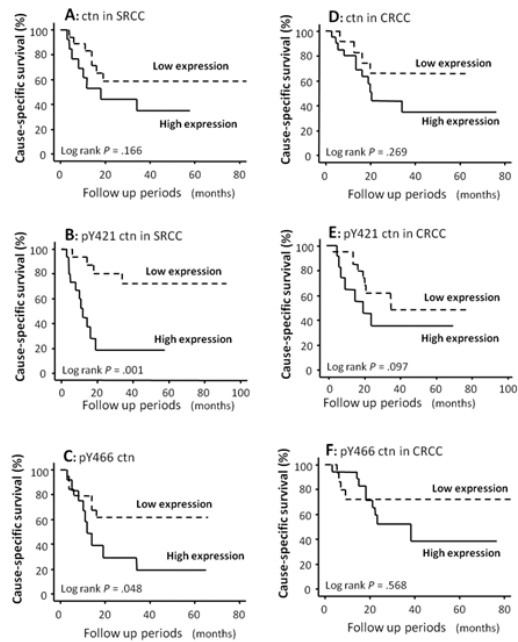
透析腎癌では、tryptase を有する mast cell 密度と、その刺激因子である stem cell factor や tryptase 受容体である protease activated receptor-2 の発現が関連している。



Mast cell の機能は外部環境に影響される可能性が示唆された。現在、このような mast cell の多様性と c-Fes の関連を検討中である。

⑤ c-Fes/Fer の下流分子の検討。

各種の分子を前立腺癌を含め各種泌尿器科癌で検討すると、cortactin が sarcomatoid 腎癌で conventional 腎癌に比し強くリン酸化が亢進し、悪性度や予後に影響していた。

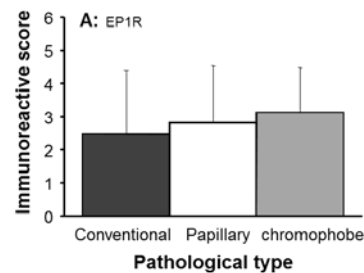


Cortactin は c-Fes / Fer の下流分子として広く知られているが、そのリン酸化が同じ癌腫でもタイプにより異なることがわかった。現在、ホルモン抵抗性前立腺癌における

c-Fes の病理学的意義を検討中であるが、併せて、cortactin や PTP-1B、E-cadherin 等についても、その関連や病理学的意義を検討中である。

⑤ 腎癌における EPRs の病理学的意義。

腎癌の組織型で EPRs 発現に差は認めなかった。以下に、EP1R の例を示す。



一方、EP2R および EP4R は、その臨床病理学的特徴と有意に関連しており、予後との関連を解析すると、いずれも有意な予後予測因子であった。

EPRs については、c-Fes とは直接的な関係は知られていないが、癌組織における血管新生の病的意義を議論する上で、いずれも必要な情報であり、c-Fes、Fer の血管新生や腫瘍関連浸潤細胞への影響を考察する上で、重要なものとなった。

⑥ 総説および図書

上記の結果や、その検討過程で得られた情報などを基に、c-Fesの抗血管新生療法において治療標的となりうる可能性や、c-Fesと直接的、間接的に関連する分子や因子について、総説や図書としてまとめた。

前立腺癌を始め、すべての癌腫は極めて複雑にその悪性度や病態は制御されており、今回の研究費によって得られた、網羅的で総合的な結果や情報は、泌尿器癌を含む多くの癌腫について議論する上で有益なものとなった。

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 9 件)

- ① Miyata Y, Watanabe S, Matsuo T, Hayashi T, Sakai H, et al. Pathological significance and predictive value for biochemical recurrence of c-Fes expression in prostate cancer. *Prostate* 2012, 72: 201-8. (査読有り)
- ② Miyata Y, Kanda S, Sakai H, et al. Feline sarcoma-related protein expression correlates with malignant aggressiveness and poor prognosis in renal cell carcinoma. *Cancer Sci*, in press. (査読有り)
- ③ Miyata Y, Ohba K, Matsuo T, Watanabe S, Hayashi T, Sakai H, et al. Tumor-associated stromal cells expressing E-prostanoid 2 or 3 receptors in prostate cancer: correlation with tumor aggressiveness and outcome by angiogenesis and lymphangiogenesis. *Urology* 2013, 81: 136-42. (査読あり)
- ④ Kanda S, Miyata Y. The c-Fes protein tyrosine kinase as a potential anti-angiogenic target in cancer. *Front Biosci* 2011, 16: 1024-35. (査読有り)
- ⑤ Watanabe S, Miyata Y, Matsuo T, Mochizuki Y, Nishikido M, Hayashi T, Sakai H. High density of tryptase-positive mast cells in patients with renal cell carcinoma on hemodialysis: correlation with expression of stem cell factor and protease activated receptor-2. *Hum Pathol* 2012, 43: 888-97. (査読有り)
- ⑥ Matsuo T, Miyata Y, Watanabe S, Ohba K, Hayashi T, Kanda S, Sakai H. Pathologic significance and prognostic value of phosphorylated cortactin expression in patients with sarcomatoid renal cell carcinoma. *Urology* 2011, 78: 476.e9-15. (査読有り)
- ⑦ Ohba K, Miyata Y, Watanabe S, Hayashi T, Kanetake H, Kanda S, Sakai H. Clinical significance and predictive value of prostaglandin E2 receptors (EP) 1 - 4 in

patients with renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2011, 31: 597-605.

(査読有り)

- ⑧ 大庭康司、宮田康好、酒井英樹. 泌尿器癌におけるEプロスタノイドレセプターとその役割。泌尿紀要、in press. (査読有り)
- ⑨ 宮田康好、渡邊慎一、松尾朋博、相良祐次、大庭康司郎、酒井英樹、神田 滋：前立腺癌におけるc-Fes発現と臨床病理学的特徴や増殖、アポトーシスとの関連。泌尿器外科 24：1245-1248, 2011. (査読有り)

[学会発表] (計 17 件)

- 1) Miyata Y, Mitsunari K, Matsuo T, Ohba K, Hideki Sakai: Cigarette smoking induces lymphangiogenesis, but not angiogenesis, and vascular endothelial growth factor-D, but not -A or -C in human bladder cancer tissues. 108th. American urological Association Annual Meeting, San Diego, CA (2013)
- 2) 宮田康好、酒井英樹、他：低グルコース環境における腎癌細胞の動態についての検討。第21回泌尿器分子・細胞研究会(2012)
- 3) 松尾朋博、宮田康好、酒井英樹、他：Tumor-associated stromal cells expressing E-prostanoid 2 or 3 receptors in prostate cancer: correlation with tumor aggressiveness and outcome via angiogenesis and lymphangiogenesis. 第64回日本泌尿器科学会西日本総会(2012)
- 4) Miyata Y, Matsuo T, Ohba K, Sakai H: Semi-quantification of angiogenesis in urothelial cancer of upper urinary tract: a comparison among three endothelial markers. 107th. American urological Association Annual Meeting, Atlanta, GA (2012).
- 5) Miyata Y, Ohba K, Matsuo T, Sakai H Tumor-associated stromal cells expressed EP2 receptor and EP3 receptor correlate with malignant aggressiveness and outcome through angiogenesis and lymphangiogenesis in prostate cancer. 27th Annual EAU Congress, 2012, Paris, France.
- 6) Miyata Y, Matsuo T, Ohba K, Sakai H: Relationships between 4N1K-containing protein and clinicopathological features, prognosis, and angiogenesis in urothelial cancer of upper urinary tract. 27th Annual EAU Congress, 2012, Paris, France.
- 7) Matsuo T, Miyata Y, Watanabe S, Ohba K, Hayashi T, Kanda S, Sakai H: Pathological significance and prognostic value of phosphorylated cortactin expression in

- patients with sarcomatoid renal cell carcinoma. 第 63 回日本泌尿器科学会西日本総会 (2011)
- 8) Ohba K, Miyata Y, Watanabe S, Hayashi T, Kanetake H, Kanda S, and Sakai H: Clinical significance and predictive value of prostaglandin E2 receptors (EPR) 1-4 in patients with renal cell carcinoma. 第 63 回日本泌尿器科学会西日本総会 (2011)
- 9) 宮田康好, 神田 滋, 酒井英樹: Fps の発現抑制は膀胱癌発癌に関与し、非浸潤性膀胱癌の悪性度の増強や尿路再発と関連する. 第 69 回日本癌学会学術総会 (2011)
- 10) Miyata Y, Kanda S, Sakai H, and Peter A. Greer: Pathological roles and predictive value for recurrence into urothelial tract of Fps expression in patients with bladder cancer. 106th. American Urological Association Annual Meeting, Washington DC (2011)
- 11) Miyata Y, Kanda S, Sakai H, Peter A. Greer: Fer is proliferative regulator of renal cancer cells and its expression was associated with pathological features and survival in patients with renal cell carcinoma. American Urological Association, Annual Meeting, Washington DC (2011).
- 12) 渡邊慎一, 宮田康好, 松尾朋博, 井川 掌, 酒井英樹: 前立腺癌組織における cortactin 発現についての検討. 第 99 回日本泌尿器科学会総会 (2011)。
- 13) 大庭康司郎, 宮田康好, 相良祐次, 林 徳真吉, 金武 洋, 神田 滋, 酒井英樹: 腎癌組織における prostaglandin E2 receptor (EPR) 1~4 の臨床的意義と予後との関連についての検討. 第 99 回日本泌尿器科学会総会 (2011)。
- 14) 宮田康好, 神田 滋, 酒井英樹, Peter A. Greer: Fps は膀胱癌の発癌に関与し、その発現は臨床病理学的特徴や尿路再発に関連している. 第 99 回日本泌尿器科学会総会 (2011)。
- 15) 相良祐次, 宮田康好, 松尾朋博, 渡邊慎一, 大庭康司郎, 望月保志, 錦戸雅春, 酒井英樹: 肉腫様膀胱癌におけるリン酸化 cortactin の臨床病理学的意義についての検討. 第 99 回日本泌尿器科学会総会 (2011)。
- 16) 宮田康好, 神田 滋, Peter A. Greer, 酒井英樹: 腎癌細胞における Fer の臨床病理学的役割. 第 20 回泌尿器科分子・細胞研究会 (2011)。
- 17) 宮田康好, 渡邊慎一, 松尾朋博, 林 徳真吉, Jim W. Xuan, Peter A. Greer, 神田 滋, 金武 洋, 酒井英樹: 前立腺癌における c-Fes 発現と臨床病理学的特徴や増殖、アポトーシスとの関連. 第 26 回前立腺シンポジウム (2010)。

〔図書〕 (計 2 件)

① Miyata Y, Sakai H, and Kanda S: BLADDER CANCER FROM BASIC SCIENCE TO ROBOTIC SURGERY. Chapter 5, Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Bladder Cancer. Edited by Abdullah E Canda. INTECH WEB. ORG., Croatia, 2012, pp117 – 128.

② Miyata Y: ETV4 (ets variant 4). Atlas of Genetics and Cytogenesis in Oncology and Hematology (<http://atlasgeneticsoncology.org>) 2011.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等
 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 康好 (MIYATA YASUYOSHI)
 長崎大学・大学病院・講師
 研究者番号 : 60380888

(2) 研究分担者

酒井 英樹 (SAKAI HIDEKI)
 長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号 : 40235122

(3) 連携研究者

該当なし