

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592337

研究課題名(和文)腎癌におけるアノイクス抵抗性獲得因子の網羅的解析と予後予測や治療標的としての検討

研究課題名(英文) Analysis of anoikis resistance acquisition, and studies of prognostic predictor and therapeutic target in renal cell carcinoma

研究代表者

大庭 康司郎(Ohba, Kojiro)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：20593825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎細胞癌におけるアノイクス抵抗性獲得機序は複雑であり十分には解明できなかったが、その検討の過程において転写因子であるTWISTの働きを解析することができた。腎細胞癌においてTWISTは、癌の浸潤や転移などの悪性度獲得において重要な役割を担い、その発現は予後と関連していた。またTWISTはMMP-2の発現や腫瘍関連マクロファージの誘導を促進することにより腎細胞癌の増悪を促す可能性があり、腎細胞癌の治療標的となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have determined the pathological roles and clinical significance of Twist that was the transcription factor (in the process of the examination), although the mechanism of the anoikis resistance acquisition in the renal cell carcinoma (RCC) is complex and not interpretable. Twist expression is speculated to play important roles in the gain of malignant potential and malignant aggressiveness, including cancer cell invasion and metastasis, and is associated with cause-specific survival in patients with RCC. Multi-variate analyses showed that the up-regulation of Twist influences tumor progression in patients with RCC via the acceleration of MMP2 expression, and the recruitment of macrophages. We suggest that Twist is useful predictor and potential therapeutic target for the treatment of RCC.

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：アノイクス 腎細胞癌 TWIST Fer

1. 研究開始当初の背景

腎がん治療においては原発巣切除が基本である。それゆえ腎がん患者の治療の多くは、診断時から存在する、あるいは手術後新たに出現した転移に対して行われている、と言える。また転移の状況が生命予後を規定する最大の要素とも言える。これまでに腎細胞癌の転移成立について、多くの研究から多種多様な因子が関与することがわかっており、我々も癌細胞増殖促進とアポトーシスの抑制、血管新生・リンパ管新生による栄養路や転移経路の増加、細胞接着分子の異常制御・移動の亢進などを報告してきた。しかし、これらに加えて、癌細胞が細胞や間質組織から遊離し、細胞接着からの生存に必要なシグナルが減弱しても生存が可能になる「アノキス抵抗性の獲得」が転移成立には必要と考え、その検討を行う必要があると考えた。

2. 研究の目的

腎癌細胞や組織を用いてアノキス獲得機序やその意義について、網羅的な検討を行い、その生命予後も含めた臨床病理学的特徴との関連を明らかにすることを目的とした。さらに、アノキス抵抗性獲得の関連因子が治療標的となる可能性やアノキス再誘導を基盤とした新たな治療戦略の構築を目指す上で有益な情報を提供することが最終的な目的である。

また今回の研究で、アノキス抵抗性獲得において重要な役割を果たすと思われる上皮間葉移行 (EMT) に関連する転写因子: TWIST について、腎細胞癌における発現を検討し、その病理学的意義や治療標的となる可能性についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 腎癌の cell line におけるアノキス誘導状況確認とアノキス抵抗性獲得関連因子の選定

ACHN、Caki-1、Caki-2 について、培養皿を poly-Hema (poly 2-hydroxyethyl

methacrylate, SIGMA, P3932) でコートすることでアノキスを誘導した。さらに、その条件で培養を継続した場合の経時的な細胞死の変化を計測した。そして、最終的に、その経時的な蛋白発現の変化を癌の生存やアポトーシス、さらには、細胞接着やグルコースの取り込みなどに関与する分子 (COX-2、PGE2 関連、MMP-2、マクロファージ、アポトーシス関連因子、EMT 関連因子、Fer 関連など) まで網羅的に Western blot で解析した。

(2) 腎癌細胞のヌードマウスへの移植

上記 (1) の研究成果を踏まえて ACHN と Caki-2 をヌードマウスの腎皮膜下に接種した。その経時的な変化を 4 週間にわたりエコーで観察した。なお、本研究の一部は共同研究者が以前所属していたクイーンズ大学 (カナダ)、癌研究所の協力のもとで共同研究として行った。

(3) ヒト腎細胞癌における TWIST の発現と細胞増殖、血管新生、アポトーシス、MMP-2、マクロファージとの関連

腎細胞癌の診断で根治的腎摘除術を受けた 156 例を対象として、TWIST、MMP2 の発現を免疫組織化学的に検討した。同様に、ki-67 陽性細胞数の割合を増殖細胞指数 (%)、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end-labeling (TUNEL) 陽性細胞数の割合をアポトーシス指数 (%)、CD31 陽性血管数を microvessel density (MVD)、CD68 陽性細胞数を tumor-associated macrophage (TAM) として測定した。臨床病理学的因子とともに多変量解析を行い、TWIST 発現とこれらの因子との関連について検討した。

(4) ヒト腎細胞癌における TWIST の発現と臨床病理学的特徴との関連

腎細胞癌 156 症例の性別、年齢、病理病期、転移の有無、組織学的診断 (組織学

的悪性度、病理組織型、肉腫様変化の有無)とTWIST発現との関連を、カイ2乗検定で検討した。

(5) ヒト腎細胞癌における TWIST の発現と予後との関連

腎細胞癌 156 症例における TWIST 発現別の癌特異生存率を Kaplan-Meier 曲線を用いて比較し、その有意差検定には log-rank 検定を用いた。

4. 研究成果

(1) 腎癌の cell line におけるアノキス誘導状況確認とアノキス抵抗性獲得関連因子の選定

Poly-Hema コートによるアノキス誘導の結果、すべての cell lines で細胞死が誘導された。一方、その条件で培養を継続すると ACHN は他の cell lines に比しアノキスによる細胞死への誘導が経時的に低下することがわかった。そこで、アノキスが誘導された ACHN において経時的な蛋白発現の変化を網羅的に解析したところ、非受容体型チロシンキナーゼである Fer、cortactin と細胞接着因子である E-cadherin の発現が増加してくることがわかった。

(2) 腎癌細胞のヌードマウスへの移植

腎皮膜下の腫瘍は、接種3週後より ACHN では Caki-2 に比し有意な増大を認めた。このことがアノキス抵抗性を直接反映するものなのか、単なる増殖・アポトーシスの差なのかを、現在検討中である。

(3) ヒト腎細胞癌における TWIST の発現と細胞増殖、血管新生、アポトーシス、MMP-2、マクロファージとの関連

TWIST 陽性例では、有意に MMP2 発現陽性例が多く、TAM、MVD、増殖細胞指数が高かったが、TWIST とアポトーシス指数との関連はみられなかった。さらに臨床病理学的因子を含めた多変量解析において、TWIST の発現は MMP2 および TAM と独立した相関関係を認めた(表1)。

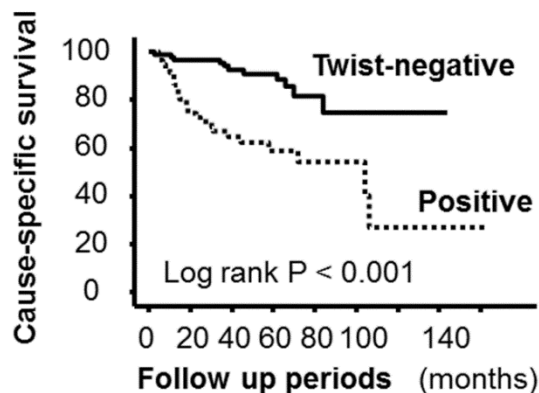
(4) ヒト腎細胞癌における TWIST の発現と臨床病理学的特徴との関連

TWIST は腎細胞癌の主に細胞質に発現しており、60例(38.5%)で陽性であった。特に腫瘍辺縁(浸潤)部において染色性が強い印象であった。TWIST の発現と年齢、性別、組織型との間に関連性はみられなかったが、臨床病期の進行例や、肉腫様変化を含む組織学的悪性度の高い症例で有意に TWIST 陽性例が多かった(表2)。

(5) ヒト腎細胞癌における TWIST の発現と予後との関連

癌特異生存率は有意に TWIST 陽性症例が不良であった(図2)。ただし、臨床病理学的因子を含めた多変量解析においては、組織学的悪性度(HR = 2.47, 95% CI = 1.02-6.02, P = 0.046) および転移の存在(HR = 4.66, 95% CI = 1.59-13.65, p = 0.005) は独立した予後因子であったが、TWIST 陽性は独立した予後因子にはならなかった(HR = 0.70, 95% CI = 0.23-2.15, p = 0.537)。

図2 癌特異的生存率



Negative	96	81	61	36	15	5	1
Positive	60	39	27	17	7	4	1
	Number of patients at risk						

表 1. TWIST と細胞増殖、血管新生、アポトーシス、MMP-2、マクロファージとの関連

	多変量解析		
	オッズ比	95% 信頼区間	P 値
細胞増殖指数	0.80	0.33 - 1.93	0.613
MVD	2.06	0.83 - 5.04	0.115
MMP 2	4.60	1.85 - 11.48	<0.001
TAM	5.83	2.31 - 14.74	<0.001

表 2. Twist の発現と臨床病理学的特徴

	例数	Twist		P 値
		陰性 (96 例)	陽性 (60 例)	
性別				0.869
男性	108	66 (61.1)	42 (38.9)	
女性	48	30 (62.5)	18 (37.5)	
年齢				0.510
63 歳未満	78	46 (59.0)	32 (41.0)	
63 歳以上	78	50 (64.1)	28 (35.9)	
組織学的悪性度				<0.001
1	63	51 (81.0)	12 (19.0)	
2	68	41 (60.3)	27 (39.7)	
3+4	25	4 (16.0)	21 (84.0)	
病理病期				<0.001
pT1	98	79 (80.6)	19 (31.7)	
pT2	22	12 (54.5)	10 (45.5)	
pT3	31	4 (12.9)	27 (87.1)	
pT4	5	1 (20.0)	4 (80.0)	
転移				<0.001
なし	133	95 (71.4)	1 (4.3)	
あり	23	38 (28.6)	22 (95.7)	
病理組織型				0.238
淡明細胞癌	135	84 (62.2)	51 (37.8)	
乳頭状腎癌	12	5 (41.7)	7 (58.3)	
嫌色素性腎癌	10	7 (70.0)	3 (30.0)	
肉腫様変化				<0.001
なし	141	94 (66.7)	47 (33.3)	
あり	15	2 (13.3)	13 (86.7)	

(6) 研究成果の総括

Cell lines を用いた検討において、ACHN におけるアノキス抵抗性の獲得に Fer や E-cadherin が関与する可能性が示唆された。

また、腎癌患者における検討では、転写因子の一つである TWIST の発現は、腎細胞癌における臨床病理学的悪性所見と有意に相関していた。また TWIST の組織学的特徴として、癌浸潤部により多く発現しており、さらには癌細胞の浸潤において重要とされる MMP-2 や、様々なサイトカインや癌関連因子を放出する TAM の発現と強い関連性を認めた。以上より、TWIST は MMP2 や腫瘍関連マクロファージの誘導を促進することにより腎細胞癌の増悪を促す可能性があり、腎細胞癌の治療標的となりうることを示唆された。

一方、腎細胞癌におけるアノキス抵抗性獲得機序は複雑であり、まだ不明な点が多いが、Fer や E-cadherin、TWIST を含めさらに検討を進めたい。

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 5 件)

大庭, 康司郎, 宮田, 康好, 酒井, 英樹
泌尿器系癌における E プロスタノイドレセプターとその役割 泌尿器科紀要 59(2): 83-89, 2013 (査読あり)
Matsuo T, Miyata Y, Watanabe S, Sagara Y, Ohba K, Hayashi T, Kanda S, Sakai H. Pathological significance and prognostic value of phosphorylated cortactin expression in patients with sarcomatoid renal cell carcinoma. Urology 78: 476e9-e16, 2011 (査読あり)
Miyata Y, Kanda S, Sakai H, Greer P. Fer is proliferative regulator of renal

cancer cells and its expression was associated with pathological features and survival in patients with renal cell carcinoma. J Urol 185: e154, 2011 (査読あり)

Miyata Y, Kanda S, Sakai H, Greer P. Feline sarcoma-related protein expression correlates with malignant aggressiveness and poor prognosis in renal cell carcinoma. Cancer Sci 104: 681-686, 2013 (査読あり)

Ohba K, Miyata Y, Matsuo T, Asai A, Mitsunari K, Shida Y, Kanda S, Sakai H. High expression of Twist is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with renal cell carcinoma: its correlation with cell proliferation, angiogenesis, matrix metalloproteinase-2 expression, and macrophage recruitment. Int J Clin Exp Pathol, 2014 in press (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

大庭 康司郎 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年4月21~24日(名古屋市)

Miyata Y Fer is proliferative regulator of renal cancer cells and its expression was associated with pathological features and survival in patients with renal cell carcinoma. AUA Annual Meeting, 2011.5.14-19, Washington, DC

Ohba K Clinical significance and predictive value of prostaglandin E2 receptor (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 ヤングウロロジャーリサーチコンテスト、2011年11月10日

12日(久留米市)

松尾朋博 低グルコース環境下での腎癌細胞のアノキス抵抗性の獲得についての検討 第23回泌尿器科分子・細胞研究会、2014年3月14-15日

〔図書〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者
大庭 康司郎(OHBA KOJIRO)
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：20593825

(2)研究分担者
宮田 康好(MIYATA YASUYOSHI)
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：60380888

(3)連携研究者
松尾 朋博(MATSUO TOMOHIRO)
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：60622024