

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390374

研究課題名(和文)腎細胞癌における上皮間葉転換に着目した新規標的分子の探索

研究課題名(英文)Elucidation of molecular targets based on epithelial-mesenchymal transition for the treatment of renal cell carcinoma

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：転移を伴う腎細胞癌に対しては分子標的薬が治療の中心となり、治療成績は向上した。しかし、根治が難しいのは薬に効かないがん細胞が残存するからである。我々はこの残存するがん細胞の特徴として、形態学的には肉腫瘍の変化を伴い、上皮間葉転換をきたしており、機序として癌幹細胞のマーカーであるCD44の高発現とTumor Necrosis Factor (TNF)-によるCD44発現の誘導を発見した。

研究成果の概要(英文)：Molecular targeted agents are widely used and better survival benefits are shown for the treatment of metastatic renal cell carcinoma (RCC). However, there are still hurdles to conquer RCC because survival cancer cells survive. The phenotype survival cancer cells look like sarcoma suggesting epithelial- mesenchymal transition. We found out that CD44 is up-regulated in the cells where Tumor Necrosis Factor (TNF)- induces the expression.

研究分野：泌尿器科学、腫瘍学、腎臓病学、透析医学

キーワード：腎細胞癌 分子標的治療 薬剤耐性 CD44 mTOR

1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌は泌尿器癌の中でも難治性のがんである。抗癌化学療法で効果のある薬剤はなく、インターフェロン α あるいはインターロイキン2を中心としたサイトカイン治療が広く行われてきた。しかし、奏効率は10-20%程度に留まり、より有効な新しい治療薬が期待されていた。2008年に血管新生阻害薬である分子標的薬、sorafenib(ネクサバル[®])とsunitinib(スーテント[®])が相次いで承認され、腎細胞癌治療は大きな変革を遂げた。さらにmTOR(mammalian target of Rapamycin)阻害薬であるeverolimus(アフィニトール[®])とtemsirolimus(トーリセル[®])も2010年に承認された。これら新規の分子標的治療薬はサイトカイン治療に比べると優れた腫瘍縮小効果が得られるものの、未だ不十分であり、更に耐性を獲得することが問題となっており、更なる治療効果の向上に向けた研究は喫緊の課題である。耐性機構の解明は喫緊の課題であるが、この課題への研究アプローチ法が考えられて来なかった。このような状況で我々は、sunitinibを処方していた患者が急激な腹痛を来し、緊急手術を施行した症例を経験し、その経験から以下の興味深い知見を得たことから、本研究申請テーマを着想した。その症例での手術所見では小腸が穿孔しており、原因は小腸転移巣がsunitinibに反応し、壊死をきたした結果と考えられた。病理所見では癌は殆どの部位が死滅しているものの、一部の癌が生存しており、原発巣の組織と比較して形態の悪性度は増して、細胞は紡錘型の脱分化傾向を示していることを発見した。これら残存生存細胞を解析したところ、E-cadherinの発現の減少と、SNAILの発現上昇を認めたことから、Epithelial-mesenchymal transition(EMT)を起こしている可能性が示唆された。この現象は分子標的薬の治療の結果として遺伝的変異やエピジェネシスの変化の蓄積などを伴って結果として選択・出現したフェノタイプ(表現型)なのか、元来耐性を呈する少数の癌細胞の集団から形成された集団で、癌幹細胞性や、高い転移能を有する一次的な薬剤耐性なのであるか?この疑問を解明するために、腎細胞癌の原発巣を新規視点から、詳細に解析することで標準化する必要があると考えた。我々はこれまでに腎細胞癌のEMTの研究を行い、腎細胞癌の組織を解析し、病期の進行例や核異型度が高い腎癌組織においては、EMT関連転写因子SNAILの発現が有意に高い傾向にあることを世界で初めて報告した(Mikami S. et al 2011 Lab. Invest.)。この知見をもとに、分子標的薬での耐性の機序としてこの生き残った細胞の分子・細胞生物学的特質を明らかにすることが、上述した推定される耐性の機序の解明に繋がると考え、分子標的薬の使用後の摘出腎癌組織を蛋白レベルでの免疫組織化学的発現の解析することによって、耐性因子を検索

することを着想した。

2. 研究の目的

進行腎細胞癌の薬物療法は、分子標的薬による治療へと大きく進歩した。新規の分子標的治療薬はサイトカイン治療に比べると、優れた腫瘍縮小効果が得られるものの、未だ不十分であり、更には耐性を獲得することが、現在日常臨床上の問題となっている。実際の分子標的治療薬の使用経験症例の解析を通して、上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition:EMT)によって癌転移・浸潤が生じ、この過程において癌幹細胞性と分子標的治療薬の薬剤耐性が、微小環境に相互に誘導される可能性があると考えた。本研究は、EMTと癌幹細胞性に着目し、分子標的治療薬の使用前後の臨床検体を用いて、時空間に沿った解析を施行し、耐性機構の解明と新規治療標的分子の検索を目的とする。

3. 研究の方法

腎細胞癌における分子標的治療耐性のメカニズムを、EMTによる浸潤・転移能獲得と、癌幹細胞性との相互関係性を以下の計画・方法で解析する。癌組織の時空間的な系統性にに基づき解析するために今回、早期癌組織、局所進行癌、転移巣、また分子標的治療薬使用前後の腎細胞癌の手術症例を対象として、EMT関連因子、癌幹細胞性マーカーの発現を主に免疫組織化学的に検討し、発現の相互・相関関係性を解析する。ヒト腎癌細胞株を対象としたin vitroの解析にて、各種成長因子の添加によるE-カドヘリンの発現抑制、Snail/Slugの発現亢進、浸潤能を指標に検索する。分子標的薬の作用の個人差や薬剤耐性を癌・間質を取り巻く微小環境の相互作用、血管の異質性という観点から解析するため、血管内皮の異質性を内因性血管抑制因子VASH1/2を指標に、CD31とCD34の発現との相関性を解析し、分子標的薬治療後の残存血管の特徴づけを施行する。

4. 研究成果

(1) EMT・癌幹細胞と治療耐性(腎細胞癌におけるTNF- α 発現の意義)

Tumor necrosis factor- α (TNF- α)は上皮間葉転換(EMT)および癌幹細胞マーカーであるCD44発現を誘導する。本研究は腎細胞癌におけるTNF- α およびCD44発現の意義を明確にするために行われた。免疫組織学的に淡明細胞型腎細胞癌切除組織120例におけるTNF- α 、CD44発現を検討し、腎細胞癌細胞株におけるTNF- α のEMTおよびCD44発現誘導をEMT関連遺伝子・CD44およびMatrigel invasion assayを用いて調べた。TNF- α 、CD44は主に高異型度の腎細胞癌に発現しており、TNF- α とCD44発現には正の相関がみられた。また、TNF- α 、CD44高発現は原発巣の進展度、遠隔転移、不良予後と関連していた。TNF- α は腎癌細胞におけるE-cadherin発現を低下

させ MMP9, CD44 発現を亢進させるとともに癌細胞の遊走・浸潤を促進した。腎細胞癌に TNF- α を投与すると癌細胞自身の TNF- α 発現が上昇した (autocrine)。転移性腎細胞癌に対してスニチニブ治療を 25 症例に施行したが、CD44 高発現例は予後不良であった。さらにスニチニブ治療後残存癌組織では、CD44 が未治療組織に比べ有意に高発現していた。本研究により TNF- α が腎細胞癌の EMT および CD44 発現を誘導することおよび TNF- α により誘導された CD44 がスニチニブに対する治療耐性に関与していることが示唆された (Miami S, Oya M, et al, *Int J Cancer*, 136(7), 1504-1514, 2014)

(2) 腫瘍血管の異質性の検討 (腎細胞癌における VASH1 発現亢進と転移・不良予後の相関)

血管新生は腫瘍増殖・遠隔転移に必須の過程である。腫瘍組織内における微小血管密度は多くの腫瘍で悪性度と相関しているものの、腎細胞癌における微小血管密度と予後の関連については相反する結果が報告されている。VASH1 は新規に同定された血管内皮細胞に発現する血管制御因子であるが、腎細胞癌における VASH1 発現の意義は不明瞭である。本研究は腎細胞癌における VASH1 発現の意義を明確にするために行われた。淡明細胞型腎細胞癌 116 例における VASH1 発現および CD34 染色を用いた微小血管密度を測定した。その結果、腫瘍組織内の血管内皮細胞は散発性に VASH1 陽性であったが、非腫瘍性腎組織では VASH1 発現はみられなかった。一方、CD34 は腫瘍組織・非腫瘍性組織のすべての血管内皮細胞において陽性であった。VASH1 密度は遠隔転移・静脈侵襲と正の相関を示したが、微小血管密度は遠隔転移・静脈侵襲の逆相関を示した。多変量解析の結果、VASH1 密度は独立した予後因子であったが、微小血管密度は独立した予後因子ではなかった。また、スニチニブ治療後残存癌組織では、微小血管密度が低下しているものの、VASH1 密度は逆に増加していた。VASH1 は真の血管増殖能を反映していると考えられ、VASH1 がスニチニブに対する治療耐性に関与していることが示唆された。

本研究の学術的な特徴・独創的な点と意義

近年、多数の転移性腎細胞癌症例に分子標的治療が行われているが、治療効果判定は臨床症状や画像診断等に基づいており、正確な治療効果判定基準や治療に伴う分子の発現情報はない。本研究データにより分子標的薬における治療効果の形態学的な特徴・分子マーカーの同定とともに、その分子機構を解明した点で本研究は画期的かつ独創的である。

癌の再発・転移および薬物耐性には EMT および癌幹細胞が重要な役割を果たすと考えられているものの、細胞株や実験動物を用いた研究が主体であり、ヒト癌組織での報告はほとんどない。本研究によってヒト癌細胞における耐性癌細胞と EMT や癌幹細胞の関連が

明らかにできるとともに、治療効果を予測する分子マーカーの同定や新規標的分子が明らかとなり、TKI 阻害剤等の分子標的薬に対する治療耐性を克服することが期待される。

耐性機序を組織学的に解明しようとする研究は臨床データおよび腎細胞癌の形態学的解析、転移・浸潤の分子機構の解析を統合的に行う必要がある。申請者は分子標的治療後の腎細胞癌組織を臨床情報に基づいて病理医と一緒に検討した経験から、本研究テーマの解析には治療前の腎細胞癌組織と治療後の転移巣組織を系統的に検討することが必須である。分子標的薬を使用したにも関わらず、生き残る癌細胞の特徴を発見したことは、今後の腎細胞癌の標的分子を示唆するとともに、それを誘導する環境因子や変化する癌細胞の代謝メカニズムに対する研究を加速させるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

1. Ishida M, Mikami S, Shinojima T, Kosaka T, Mizuno R, Kikuchi E, Miyajima A, Okada Y, Oya M: Activation of aryl hydrocarbon receptor promotes invasion of clear cell renal cell carcinoma and is associated with poor prognosis and cigarette smoke: *Int J Cancer*, 査読有, 137(2), 2014, 299-310. doi: 10.1002/ijc.29398

2. Mikami S, Mizuno R, Kosaka T, Saya H, Oya M, Okada Y: Expression of TNF- α and CD44 is implicated in poor prognosis, cancer cell invasion, metastasis and resistance to the sunitinib treatment in clear cell renal cell carcinomas: *Int J Cancer*, 査読有, 136(7), 2014, 1504-1514. doi: 10.1002/ijc.29137

[学会発表](計 13 件)

1. Mizuno R, Kosaka T, Mikami S, Oya M: Efficacy of axitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma previously treated with both VEGFR-TKI and mTORI: 2014 ASCO Annual Meeting, 2014.5.30, Chicago, The United States of America.

2. Mikami S, Mizuno R, Kosaka T, Saya H, Oya M, Okada Y: Prognostic significance of TNF- α and CD44 expression in clear cell renal cell carcinomas: implication of cancer invasion, metastasis, and resistance to sunitinib treatment: AUA Annual Meeting, 2014.5.18, Orlando, The United States of America.

3. Ishida M, Mikami S, Kosaka T, Mizuno R, Kikuchi E, Miyajima A, Nakagawa K, Okada Y, Oya M: Increased expression of aryl

hydrocarbon receptor in clear cell renal cell carcinoma and infiltrating lymphocytes: Implications for cancer invasion, prognosis and tumor immunity: AUA Annual Meeting, 2014.5.18, Orlando, The United States of America.

4.Oya M: Resistance to angiogenesis inhibitors in metastatic renal cell carcinoma: The 11th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology, 2013.8.30, Miyagi, Japan.

5.Miyazaki Y, Kosaka T, Mikami S, Kikuchi E, Tanaka N, Maeda T, Ishida M, Miyajima A, Nakagawa K, Okada Y, Sato Y, Oya M: The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma: The108th American Urological Association Annual Meeting, 2013.5.5, San Diego, The United States of America.

6.Oya M, Mikami S, Mizuno R, Kosaka T, Saya H, Mukai M, Okada Y: Tumor necrosis factor-alpha induces epithelial-mesenchymal transition and expression of CD44 in renal cell carcinoma: implications for cancer invasion,metastasis and resistance to the sunitinib treatment: 28th Annual Urological Research Society Meeting, 2012.10.04, Osaka, Japan.

〔図書〕(計8件)

1.水野隆一、大家基嗣、癌と化学療法社、腎細胞癌の分子標的治療におけるバイオマーカー、2012年、39-42.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

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 Shuji)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：20338180

菊地 栄次 (Kikuchi Eiji)

慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：10286552

中川 健 (Nakagawa Ken)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：50227740

水野 隆一 (Mizuno Ryuichi)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：60383824

浅沼 宏 (Asanuma Hiroshi)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：70245570

宮嶋 哲 (Miyajima Akira)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：90245572

長田 浩彦 (Nagata Hirohiko)
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号：90265900