

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460422

研究課題名(和文)腎細胞癌の分子標的薬による治療効果の病理学的解析と耐性機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of effect and resistance of molecular-targeted therapy in renal cell carcinoma

研究代表者

三上 修治 (Mikami, Shuji)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20338180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は腎細胞癌の分子標的治療効果の解析・耐性機構を解明するために行われた。腎細胞癌では腫瘍壊死因子(TNF-)および癌幹細胞マーカーCD44発現が原発巣の進展度、遠隔転移、不良予後と相関した。TNF- はE-cadherin発現を抑制、MMP9, CD44発現を亢進させることで遊走・浸潤を促進した(EMTおよび癌幹細胞の誘導)。分子標的薬スニチニブ治療を行った場合、CD44高発現が治療抵抗性と関連していた。また、スニチニブ治療後の転移性腎細胞癌組織は未治療癌組織に比べCD44が高発現していた。TNF- はEMTおよび癌幹細胞を誘導により腎細胞癌の進展・治療抵抗性に関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to clarify the significance of TNF- and CD44 in clear cell renal cell carcinomas (ccRCCs). Co-upregulation of TNF- and CD44 was associated with primary tumor stage, distant metastasis, and poor prognosis. TNF- enhanced migration and invasion of ccRCC cells together with down-regulation of E-cadherin expression and up-regulation of matrix MMP9 and CD44 expression. Among ccRCC patients treated with sunitinib for metastatic disease, high CD44 expression was associated with poor treatment outcome. Importantly, residual carcinoma cells in the sunitinib-treated metastatic ccRCCs were strongly positive for CD44, and the CD44 expression was significantly higher in the tumors from the sunitinib-treated patients than in those from untreated ones. Our data show that TNF- plays an important role in progression of ccRCCs by inducing EMT and CD44 expression, and suggest that CD44 induced by TNF- may be involved in the resistance to the sunitinib treatment.

研究分野：病理学

キーワード：腎細胞癌 浸潤 転移 分子標的治療 癌幹細胞 上皮-間葉転換

1. 研究開始当初の背景

腎細胞がんは根治術後でも高率に再発することが知られている。腎細胞がんには抗がん化学療法や放射線治療の効果はなくインターロイキン2やインターフェロンを用いた免疫療法が行われてきたが、奏効率は10~20%に留まっている。近年、切除不能の腎細胞がんに対し血管新生阻害薬スニチニブ等の分子標的薬による治療が導入され一定の腫瘍縮小効果が得られているものの、抗腫瘍効果は未だ不十分であり、大部分の症例で治療耐性になることが問題となっている。しかし、耐性機構の解明につながる基礎的研究は殆ど行われていない。

病理学的にスニチニブ治療後の腎細胞がん組織では、脱分化傾向の顕著な紡錘細胞がんの残存を確認されている。形態学的に通常型の腎細胞がんから紡錘細胞がんへの移行は上皮-間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)と考えられ、腎細胞がんではEMTがスニチニブ治療に対する耐性獲得に関与していることが示唆された。そのため、腎細胞がんのEMT誘導機構が特定できれば、根治療法の開発につながることを期待される。

Tumor necrosis factor- α (TNF- α)は腫瘍壊死因子として発見されたが、近年低用量のTNF- α はむしろ腫瘍の増殖を促進することが報告された。また、TNF- α はtransforming growth factor- β (TGF- β)とともに主要なEMT誘導因子である。乳がんではがん幹細胞マーカーであるCD44をTNF- α が誘導することも知られている。TNF- α は細胞膜タンパク質として産生され、TNF-converting enzyme (TACE)であるADAM17によってシェディングされることで細胞外に放出される。尚、ADAM17は種々のがんにおいて過剰発現しており、がん細胞の浸潤・転移および治療抵抗性にかかわっていると報告されている。しかし、腎細胞がんにおけるADAM17やTNF- α 発現と臨床病理学的因子や予後との相関についての報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、腎細胞がん細胞株(786-0およびACHN)におけるTNF- α によるEMT誘導機構を解析するとともに、がん幹細胞マーカーであるCD44の誘導を解析した。また、ADAM17をsiRNAにより特異的に抑制し、がん細胞の浸潤能の変化を検討した。腎細胞がん外科切除検体におけるADAM17、TNF- α 、CD44発現を免疫組織学的に解析し、臨床病理学的因子、予後との関連を調べた。さらに、分子標的薬治療前後の腎がん切除検体におけるADAM17、TNF- α 、CD44発現を検討し、治療耐性との関連を調べた。

3. 研究の方法

(1) 腎細胞がん外科切除検体における

ADAM17、TNF- α 、CD44発現の解析: 原発性淡明細胞型腎細胞がん100例のパラフィン切片を用いてADAM17、TNF- α 、CD44発現を免疫組織学的に検討し、臨床病理学的因子および予後との関連を解析した。

- (2) TNF- α による腎細胞がん由来細胞株のEMT誘導機構の解析: 腎細胞がん由来細胞株である786-0とACHNの培養系に主要なEMT誘導因子であるTNF- α とTGF- β を添加し、trans-well culture insertやMatrigel invasion chamberを用いて遊走能と浸潤能の変化を測定するとともに、E-cadherin、matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)、TNF- α 発現の変化を定量PCR法で測定した。
- (3) TNF- α によるCD44発現の誘導: TNF- α を786-0とACHNの培養系に加えた際のCD44発現の変化を定量PCR法と免疫ノブロット法によって検討した。
- (4) siRNAによるADAM17発現の抑制と遊走・浸潤能変化の測定: 786-0のADAM17発現をsiRNAによって特異的に抑制し、その効果を定量PCR法によって確認するとともに、上記の方法で*in vitro*における遊走能と浸潤能の変化を測定した。
- (5) スニチニブ治療後残存がん細胞におけるADAM17、TNF- α 、CD44発現解析: スニチニブ治療によるがん細胞の形質変化を検討するため、上記の原発性腎細胞がん100例に加え、スニチニブ治療後の原発性腎細胞がん4例および転移性腎細胞がん(未治療12例とスニチニブ治療後10例)におけるTNF- α 、CD44、ADAM17発現を調べ治療との相関を検討した。
- (6) 腎細胞がん外科切除検体における血管密度の測定: スニチニブ治療による血管新生抑制効果を調べるため、CD34染色を行って微小血管密度を測定した。
- (7) 倫理面への配慮: ヒトがん患者の組織を用いた解析にあたっては、患者本人のインフォームドコンセントを得た上で用い、慶應義塾大学倫理委員会の承認のもと、厚生労働省の倫理指針を遵守して行った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

腎細胞がんにおけるADAM17、TNF- α 、CD44の発現と臨床病理学的因子の相関: ADAM17、TNF- α 、CD44発現は腎細胞がんの原発巣の進展度、遠隔転移、組織学的異型度と相関していた。また、ADAM17、TNF- α 、CD44高発現例は低発現例に比べ、再発率および死亡率が高いことがわかった。

腎細胞がんにおけるTNF- α 、ADAM17、CD44発現の関連: 腎細胞がん組織におけるTNF- α とADAM17発現には正の相関があり、ADAM17によるTNF- α のシェディ

ングが TNF- の発現亢進に関与していると考えられた。また、TNF- 高発現症例は低発現例に比べ有意に CD44 発現が高い傾向がみられ、腎細胞がん組織において TNF- が CD44 発現を誘導していることが示唆された。

TNF- による 786-0 と ACHN の EMT 誘導: TNF- を添加して 786-0 と ACHN を培養すると E-cadherin 発現が低下し、vimentin と MMP-9)発現が上昇するとともに、*in vitro* における遊走能と浸潤能が亢進した。また、興味深いことに TNF- 投与によりがん細胞の TNF- mRNA 発現が誘導された。

TNF- による CD44 発現の誘導: TNF- 投与によりがん細胞の CD44 mRNA 発現が上昇した。イムノプロット法により CD44 蛋白発現の上昇も確認された。

siRNA による 786-0 の ADAM17 発現の抑制と遊走能と浸潤能の低下: siRNA により 786-0 の ADAM17 発現を特異的に抑制すると *in vitro* におけるがん細胞の遊走能と浸潤能が control siRNA(non-silencing siRNA)を加えた細胞株に比べ有意に抑制された。

スニチニブ治療後がん組織における ADAM17 と CD44 発現の相関: スニチニブ治療後の腎細胞がん原発巣では未治療組織に比べ、有意に CD44 と ADAM17 発現が上昇していた。同様にスニチニブ治療後の転移性腎細胞がん組織は未治療の症例に比べ CD44 と ADAM17 陽性細胞の比率が有為に増加していた。

スニチニブ治療と微小血管密度の相関: スニチニブ治療と微小血管密度の間には有意な関連は認めなかった。

(2) 得られた成果の国内外の位置づけとインパクト

EMT はがん細胞の浸潤・転移の重要なステップである。EMT では E-cadherin の低下により細胞接着能が低下し、MMP や vimentin の誘導により浸潤能が亢進することが重要と考えられている。本研究により TNF- が腎細胞がんの EMT を誘導し、E-cadherin 発現の抑制および vimentin と MMP-9 発現の誘導によってがん細胞の遊走能と浸潤能を高めていることが明らかとなった。

転移性腎細胞がんに対するスニチニブ治療は従来の免疫療法と比較すると有意に腫瘍が縮小し奏効率が高いと報告されているが、多くの患者において治療耐性となり、最終的には死亡する。そのために、スニチニブ治療後に残存する耐性がん細胞の形質を解析することは極めて重要である。がんの治療抵抗性にはがん幹細胞が関与していると考えられ、EMT とがん幹細胞の分子機構には共通点が多いことが明らかとなってきた。スニチニブ治療後の腎細胞がん組織は、未治療の組織に比べ有意に CD44 陽性のがん細胞の比率が上昇していた。CD44 は化学療法に対

する治療抵抗性に関与していることが報告されており、CD44 を標的とした治療がスニチニブ抵抗性腎細胞がんに対する効果的な新規治療法の開発につながることも期待される。

スニチニブは vascular endothelial growth factor receptor の作用を阻害し血管新生を抑制することで治療効果を発揮していると考えられている。本研究ではスニチニブ治療の有無と微小血管密度の関連を検討した結果、治療後がん組織での有意な微小血管密度の低下が確認された(本研究と同様にスニチニブ治療を 2 クール後早期に摘出した腎細胞がん組織では有意な血管密度低下が報告されている)。スニチニブ治療により当初は血管密度が低下すると考えられるが、多くの症例では、EMT や癌幹細胞の誘導により治療が効かなくなると推定された。

ADAM17 は TNF- や epidermal growth factor receptor ligand のシェディングに関与しており、卵巣がん、乳がん、膵がん、結腸がん、頭頸部がん等の多くのがんにおいて過剰発現し、がん細胞の増殖・浸潤・血管新生に関わっている。さらに乳がんではハーセプチンに対する治療耐性に関与し、胃がんのがん幹細胞では CD44 と共発現していることが報告されている。本研究では、ADAM17 が腎細胞がんの原発巣の進展度、遠隔転移、組織学的異型度と相関し、ADAM17 高発現症例は早期に再発し、予後不良であることが判明した。*In vitro* の実験では、ADAM17 発現抑制は遊走能と浸潤能の低下につながる事が明らかとなった。また、スニチニブ治療後がん組織では CD44 とともに残存がん細胞に ADAM17 が高発現しており、ADAM17 と CD44 が腎細胞がんのがん幹細胞マーカーである可能性が示唆された。

(3) 今後の展望

腎細胞がんでは、TNF- が EMT およびがん幹細胞マーカーである CD44 発現を誘導した。一方、TACE である ADAM17 発現の siRNA による特異的な抑制ががん細胞の遊走能と浸潤能を抑制した。また、ADAM17、TNF- 、CD44 を高発現している腎細胞がんは早期に再発し、死亡率が高いことが明らかとなった。スニチニブ治療後に残存しているがん細胞では ADAM17 と CD44 が過剰発現していた。ADAM17 による TNF- のシェディングおよび TNF- による CD44 発現の誘導が腎細胞がんの浸潤・転移及び治療耐性に関与していると考えられ、ADAM17/ TNF- /CD44 経路の特異的な阻害が既存の分子標的治療に耐性となった腎細胞がんの新規治療標的になることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 21 件)

- (1) Hashimoto S, Mikami S, Sugino H, Yoshikawa A, Hashimoto A, Onodera Y, Furukawa S, Handa H, Oikawa T, Okada

- Y, Oya M, Sabe H. Lysophosphatidic acid activates Arf6 to promote the mesenchymal malignancy of renal cancer. *Nat Commun.* 査読有, 2016 Feb 8;7:10656, doi: 10.1038/ncomms10656.
- (2) Hagiwara M, Kikuchi E, Kosaka T, Mikami S, Saya H, Oya M. Variant isoforms of CD44 expression in upper tract urothelial cancer as a predictive marker for recurrence and mortality. *Urol Oncol* 査読有, doi: 10.1016/j.urolonc.2016.03.015.
- (3) Shirotake S, Yasumizu Y, Ito K, Masunaga A, Ito Y, Miyazaki Y, Hagiwara M, Kanao K, Mikami S, Nakagawa K, Momma T, Masuda T, Asano T, Oyama M, Tanaka N, Mizuno R, Oya M. Impact of Second-Line Targeted Therapy Dose Intensity on Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 査読有, doi: 10.1016/j.clgc.2016.03.014.
- (4) Kosaka T, Mikami S, Yoshimine S, Miyazaki Y, Daimon T, Kikuchi E, Miyajima A, Oya M. The prognostic significance of OCT4 expression in patients with prostate cancer. *Hum Pathol.* 査読有, 2016 May;51:1-8 doi: 10.1016/j.humpath.2015.12.008.
- (5) Tanaka N, Mizuno R, Shirotake S, Ito K, Yasumizu Y, Masunaga A, Ito Y, Miyazaki Y, Hagiwara M, Kanao K, Mikami S, Nakagawa K, Momma T, Masuda T, Asano T, Oyama M, Oya M. Effect of reclassification of the IMDC model in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with targeted therapy in the first-line and second-line settings. *Urol Oncol.* 査読有, 2016 Mar 31 doi: 10.1016/j.urolonc.2016.02.023.
- (6) Fukumoto K, Kikuchi E, Mikami S, Miyajima A, Oya M. Lymphovascular invasion status at transurethral resection of bladder tumors may predict subsequent poor response of T1 tumors to bacillus Calmette-Guérin. *BMC Urol.* 査読有, 2016 Jan 19;16:5 doi: 10.1186/s12894-016-0122-1.
- (7) Obata J, Tanaka N, Mizuno R, Kanao K, Mikami S, Matsumoto K, Kosaka T, Kikuchi E, Jinzaki M, Oya M. Plasma fibrinogen level: An independent prognostic factor for disease-free survival and cancer-specific survival in patients with localized renal cell carcinoma. *BJU Int.* 査読有, 2016 Jan 18 doi: 10.1111/bju.13414.
- (8) Ogihara K, Kosaka T, Kikuchi E, Hongo H, Mikami S, Oya M. Spontaneous Regression of Epstein-Barr Virus-Positive Primary Diffuse Large Cell B-Cell Lymphoma of the Urinary Bladder After the Cessation of Enzalutamide. *Clin Genitourin Cancer.* 査読有, 2016 Apr;14(2):e215-8 doi: 10.1016/j.clgc.2015.12.028.
- (9) Hattori S, Kikuchi E, Kosaka T, Miyazaki Y, Tanaka N, Miyajima A, Mikami S, Oya M. Relationship Between Increased Expression of the Axl/Gas6 Signal Cascade and Prognosis of Patients with Upper Tract Urothelial Carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 査読有, 2016 Feb;23(2):663-70 doi: 10.1245/s10434-015-4848-x.
- (10) 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, 2015 Jul 15;137(2):299-310, doi: 10.1002/ijc.29398.
- (11) Ohmura G, Tsujikawa T, Yaguchi T, Kawamura N, Mikami S, Sugiyama J, Nakamura K, Kobayashi A, Iwata T, Nakano H, Shimada T, Hisa Y, Kawakami Y. Aberrant Myosin 1b Expression Promotes Cell Migration and Lymph Node Metastasis of HNSCC. *Mol Cancer Res.* 査読有, 2015 Apr;13(4):721-31. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0410.
- (12) Mikami S, Mizuno R, Kosaka T, Saya H, Oya M, Okada Y. Expression of TNF- 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, 2015 Apr 1;136(7):1504-14. doi: 10.1002/ijc.29137.
- (13) Muro Y, Kosaka T, Hato T, Mikami S, Oya M. Coincident detection of lung metastasis of prostate cancer and primary lung cancer: A case report. *Can Urol Assoc J.* 査読有, 2015 Jul-Aug;9(7-8):E524-6. doi: 10.5489/cuaj.2376.
- (14) Kuroda N, Karashima T, Inoue K, Kasajima A, Ohe C, Kawakami F, Mikami S, Matsuura K, Moriyama M, Nagashima Y, Petersson F, Lopez JI, Cohen RJ, Michal M, Hes O. Review of renal cell carcinoma with rhabdoid features with focus on clinical and pathobiological aspects. *Pol J Pathol.* 査読有, 2015 Mar;66(1):3-8.

- <http://www.termedia.pl/Review-paper-Review-of-renal-cell-carcinoma-with-rhabdoid-features-with-focus-on-clinical-and-pathobiological-aspects,55,25037,1,1.html>
- (15) Kosaka T, Mizuno R, Shinojima T, Miyajima A, Kikuchi E, Tanaka N, Shinoda K, Morita S, Mikami S, Oya M. The implications of prostate-specific antigen density to predict clinically significant prostate cancer in men \leq 50 years. *Am J Clin Exp Urol*. 査読有, 2014 Dec 25;2(4):332-6 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4297329/>.
- (16) Kuroda N, Ohe C, Kawakami F, Mikami S, Furuya M, Matsuura K, Moriyama M, Nagashima Y, Zhou M, Petersson F, López JI, Hes O, Michal M, Amin MB. Clear cell papillary renal cell carcinoma: a review. *Int J Clin Exp Pathol*. 査読有, 2014 Oct 15;7(11):7312-8 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4270541/>.
- (17) Ide H, Kikuchi E, Mikami S, Miyajima A, Oya M. Expression level of dihydropyrimidine dehydrogenase is associated with clinical outcome in patients with T1G3 bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guerin. *BMC Res Notes*. 査読有, 2014 Sep 13;7:646 doi: 10.1186/1756-0500-7-646..
- (18) Kuroda N, Imamura Y, Hamashima T, Ohe C, Mikami S, Nagashima Y, Inoue K, Perez-Montiel D, Petersson F, Michal M, Hes O. Review of small cell carcinoma of the kidney with focus on clinical and pathobiological aspects. *Pol J Pathol*. 査読有, 2014 Mar;65(1):15-9. <http://www.termedia.pl/Review-of-small-cell-carcinoma-of-the-kidney-with-focus-on-clinical-and-pathobiological-aspects,55,22722,1,1.html>.
- (19) Jinzaki M, Silverman SG, Akita H, Nagashima Y, Mikami S, Oya M. Renal angiomyolipoma: a radiological classification and update on recent developments in diagnosis and management. *Abdom Imaging*. 査読有, 2014 Jun;39(3):588-604. doi: 10.1007/s00261-014-0083-3.
- (20) Kobayashi H, Kikuchi E, Mikami S, Maeda T, Tanaka N, Miyajima A, Nakagawa K, Oya M. Long term follow-up in patients with initially diagnosed low grade Ta non-muscle invasive bladder tumors: tumor recurrence and

worsening progression. *BMC Urol*. 査読有, 2014 Jan 8;14:5. doi: 10.1186/1471-2490-14-5.

- (21) Mikami S, Oya M, Mizuno R, Kosaka T, Katsube K, Okada Y. Invasion and metastasis of renal cell carcinoma. *Med Mol Morphol*. 査読有, 2014 Jun;47(2):63-7. doi: 10.1007/s00795-013-0064-6.

〔学会発表〕(計3件)

- (1) 三上 修治、尿路上皮癌の総合診断学の up to date 病理、**第35回日本画像医学学会学術大会**、2016年2月26日、ステーションコンファレンス東京(東京都千代田区)。
- (2) 三上 修治、腎腫瘍性病変 共有すべき知識とは 病理、**第34回日本画像医学学会学術大会**、2015年2月27日、ステーションコンファレンス東京(東京都千代田区)。
- (3) 三上 修治、腎細胞癌の増殖・進展機構に関する研究 2014年11月20日、**第60回日本病理学会秋季特別総会**、国立劇場おきなわ(沖縄県浦添市)。

〔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
<http://k-ris.keio.ac.jp/Profiles/73/0007299/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
三上 修治 (MIKAMI SHUJI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 20338180

(2) 研究分担者
小坂 威雄 (KOSAKA TAKEO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 30445407

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