

腎細胞癌における腫瘍増殖および
発生・再発のメカニズムに関する研究

(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系内分泌代謝内科学専攻

池田 迅

修了年 2017年

指導教員 相馬 正義

概要

癌は、全世界で最も多い死因であり、我が国においても、心疾患、脳血管疾患と共に国民の三大生活習慣病と言われ、癌による死亡者数は増加の一途を辿っている[1, 2]。腎細胞癌による日本の年間死亡者数も同様に年々増加傾向にあり、この50年間で男性は約25倍、女性では約17倍に増加している[3]。我が国において、腎細胞癌は近年の生活習慣の欧米化による高血圧症や糖尿病、高脂血症などの増加に伴い、死亡者数、罹患者数ともに年々増加している癌の一つである。

腎細胞癌はある程度の大きさにならないと症状をきたさない事が多く、発見時には既に転移を認めることが多い。早期に発見された場合の予後は比較的良好であるが、既に遠隔転移を有しているような進行した病期の予後は不良である[4-6]。腎細胞癌の治療法は、基本的には外科手術による腫瘍の完全摘出である。これまで単腎や腎機能低下、両側腎癌の症例に対しては腎部分切除術が絶対適応とされ、腫瘍径が40 mm以下で対側腎が正常である場合には選択的適応とされてきた。しかし近年、腫瘍径が小さいなど適応を絞った症例において、選択的に腎部分切除術が行われるようになり、腫瘍径40 mm以下のT1a症例に対しては腎部分切除術が第一選択に推奨されている[7]。最近では、慢性腎臓病の概念が広く普及し、術後の腎機能保護に有用であるとされる腎部分切除術の適応が拡大しつつあり、腫瘍径40 mm以上の症例にもその適応が拡大しているとする報告もあるが、長期的な生存率や再発率については未だ決まった見解は得られていない[8]。

腎細胞癌のリスクファクターとして、von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子の変

異が注目されている[9]。更に、肥満や喫煙歴、高血圧症や糖尿病などの個人の生活習慣に加え、カドミウムやアスベストなどへの曝露歴も腎細胞癌の発症リスクを高くすると報告されている[10-15]。しかし、肥満、高血圧症、糖尿病などの生活習慣病がなぜ腎癌発生のリスクとなるのか、明確な成因はまだ明らかになっていない。

Hypertension-related Calcium regulated gene/copper metabolism MURR1 domain 5 (HCaRG/COMMD5) は、Montreal 大学の Tremblay 教授らのグループにより 2000 年に初めて報告された新規の遺伝子で、主に細胞質に存在し、225 個のアミノ酸から構成され、カルボキシル末端側に特徴的な COMM domain を持つ COMMD family に属している[16]。HCaRG は、特に遺伝的高血圧動物の近位尿細管に強く発現しており、これまでに培養細胞を用いた実験において腎臓の細胞の増殖を抑制し、分化や遊走を促すことが報告されている[17-19]。更に、ヒト HCaRG を近位尿細管に特異的に高発現させた遺伝子改変(HCaRG-Tg)マウスを用いた実験では、HCaRG が急性腎障害後の尿細管の修復を促進させる事が報告されている。これは、HCaRG が細胞増殖停止やアポトーシスなどの細胞増殖サイクルを制御する p53 とは独立した経路の p21 の発現を誘導し、虚血により障害を受け一旦脱分化した尿細管上皮細胞において E-cadherin の発現を促し、再分化を促進しているためであった[20]。癌細胞に共通な主な特徴として、無秩序な細胞増殖や増殖抑制に対する抵抗性などが挙げられ[21]、尿細管上皮細胞の間葉上皮移行を促進し、細胞増殖をコントロールする HCaRG は、尿細管上皮細胞由来である腎細胞癌細胞の無秩序な細胞増殖を抑制し、癌抑制遺伝子として働くのではないかと予測された。

そこで本研究では、これまでの我々のグループの先行研究において癌抑制遺伝子としての働きが期待されている HCaRG と、腎細胞癌の発生や再発、予後との関係性を明らかにすることを試みた。HCaRG の癌抑制効果とそのメカニズムを解明することで、HCaRG が新たな腎細胞癌の予後予測因子や術後フォローアップの指標となる可能性や、治療法・再発予防法の開発へと繋がる可能性を見出すことを目的として以下の検討を行った。

第 1 章 腎臓における HCaRG の発現と腎細胞癌の予後との関連

本章では、HCaRG が正常尿細管に比べて腎細胞癌で発現が低下しているのかどうかを確認し、腎細胞癌の新たな予後予測因子や術後のフォローアップの指標となりうるかの可能性を探るために、腎臓における HCaRG の発現変化と TNM 分類や核異型度、再発との関係について検討した。

日本大学医学部附属板橋病院にて 1997 年から 2006 年までに腎癌摘出手術を受け、検体が病理部に保管されている淡明細胞型腎細胞癌患者 117 症例分の病理組織検体を使用し、HCaRG の免疫組織染色を行った。そして、HCaRG の発現様式と淡明細胞型腎細胞癌の各症例の TNM 分類・悪性度・腫瘍径・予後・及び既往歴や生活習慣病との関連を検討した。染色の評価は、HCaRG の染色性を腎細胞癌と同一スライド内で組織学的に正常と思われる近位尿細管とで比較した。次に、正常近位尿細管における HCaRG の染色性を、染色性なしの 1 から強染色性の 4 までの 4 段階に分け、1、2 を弱染色 (weak/absence) 群/HCaRG 低発現群、3、4 を強染色 (strong) 群/HCaRG 高発現群とした。

腎細胞癌では正常近位尿細管と比べて、HCaRG の染色性が低下していた。し

かし、各症例の腎細胞癌における HCaRG の染色性に大きな差は見られなかった。一方で、正常腎組織では、それぞれの症例で近位尿細管の染色性に大きな差が観察された。HCaRG が最も強く染色されていたのは、比較的腫瘍径の小さい患者の近位尿細管であった。HCaRG 高発現群では、最大腫瘍径の平均が 42.9 mm であり、低発現群の平均値 54.0 mm と比べて有意 ($p = 0.0205$) に小さかった。次に、5 年無再発生存率を、HCaRG 高発現群と低発現群について、Kaplan-Meier 生存曲線を用いて検討したところ、HCaRG 高発現群では、低発現群に比べて有意に ($p = 0.0396$) 改善していた。更に、一般的に予後が良いとされる T1a 及び T1b の計 76 症例で、HCaRG の発現強度と 5 年間の再発の有無について検討を行った。HCaRG 高発現群では、低発現群に比べて有意 ($p = 0.0284$) に 5 年間の再発例が少ないことが明らかになった。

腫瘍径は、腎細胞癌の予後予測因子のうち最も重要な項目のひとつである [22-25]。実際に、今回の検討を行った 117 症例においても、腫瘍径が 40 mm 以下の群の 5 年無再発生存率は、40 mm より大きい群に比べて極めて良好であった。このことから、正常近位尿細管に発現する HCaRG が、腫瘍増大に対して抑制的に働き、腫瘍径を小さく留め、病期の進行を遅らせることで、患者予後の改善に大きく寄与しているのではないかと推測した。これまでに大腸癌において、腫瘍に隣接した正常組織内の遺伝子発現は、癌の再発の可能性を示唆するがん微小循環の変化を反映していると報告されている [26]。今回の我々の検討において、正常近位尿細管の HCaRG が高い症例では、腫瘍径は小さく、再発率も低かった。このことから、近位尿細管の HCaRG の発現レベルが腎細胞癌の腫瘍進展や予後予測、術後の再発予測をするためのバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

また、HcARG の発現レベルから術後の再発リスクを予測することで、腎部分切除か腎摘出術かといった術式の選択や、術後の化学療法を含めたフォローアップ方法の指標の1つとなることが期待された。さらに、腎障害により尿細管が傷害され HcARG の発現が低下しているネフローゼ症候群や透析患者の予後は悪化していたことから、腎障害時にいかに尿細管を保護できるように治療を行えるか、また普段の生活や生活習慣病の治療などを通じていかに内因性の HcARG を高められるかといったことが、腎細胞癌の発生を抑え発症後の予後を改善するために重要であることが示唆された。

第2章 HcARG が腎細胞癌の進展や再発を抑制するメカニズムの検討

第1章にて、腎尿細管上皮細胞由来の淡明細胞型腎細胞癌では、正常近位尿細管に比べて HcARG の発現が低下していることが明らかになった。加えて、近位尿細管における HcARG の発現が高い患者では、癌は小さく、予後は良好で、再発も少なかった。そこで私は、正常近位尿細管から分泌された HcARG が、近接の癌原細胞や腎癌細胞に作用し、腎細胞癌細胞の未分化性を失わせ、腫瘍の増大を抑制している可能性があるのではないかと考えた。本章では、正常尿細管上皮細胞が HcARG を分泌しているのかどうかを明らかにし、分泌された HcARG が実際に癌細胞の増殖を抑制するのかどうかを検討した。また、腫瘍の進展や再発に重要であり、自己複製能と多分化能といった特徴が明らかになっている癌幹細胞に注目し、HcARG が癌細胞の幹細胞性に与える影響について検討した。

マウス腎細胞株及びヒト近位尿細管上皮細胞株に HcARG を導入した HcARG 高発現細胞株では、Total HcARG タンパクの発現量はそれぞれのコントロール細胞

に比べて明らかに増加していた。尿細管上皮細胞より HCaRG が分泌されているのかどうかを確認するために、これらの HCaRG 高発現細胞株の培養液上清をアセトン沈殿法により濃縮し、Western blotting にて HCaRG の検出を試みた。HCaRG 高発現細胞株の培養液中では、コントロール細胞株の培養液に比べてより多くの HCaRG タンパクが確認され、培養液中に確認された HCaRG タンパクと cell lysate 中の HCaRG タンパクの分子量はほぼ変わりがなかった。次に、siRNA を用いて HCaRG のノックダウンを試みたところ、コントロールに比べて 90%以上のタンパク発現が抑制できることが確認された。この HCaRG を抑制した細胞の培養液中では、コントロール細胞の培養液に比べて HCaRG タンパクが減少していた。

次に、培養液中に分泌された HCaRG が癌細胞に与える影響を確認するために、腎細胞癌細胞株を HCaRG 高発現細胞株とコントロール細胞株を培養した培養液を用いて培養した。HCaRG 高発現細胞株由来の培養液で培養したものでは、腎細胞癌細胞株の増殖が抑制されており、E-cadherin の発現が亢進していたことから、尿細管上皮細胞から分泌された HCaRG は癌細胞の分化を促進すると考えられた。更に、癌細胞の増殖や維持に重要な ErbB 受容体のうち EGFR と ErbB3 の発現が抑制されていた。最後に、HCaRG が癌細胞の幹細胞性に与える影響を調べるために、Sphere formation assay および Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) Activity Assay を行った。Sphere formation assay では、HCaRG が sphere 形成を抑制することを確認し、ALDH activity assay では、HCaRG が ALDH 活性を抑制し、腎細胞癌細胞の癌幹細胞性抑制をしていることを確認した。今回、正常尿細管上皮細胞から分泌された HCaRG が、以上の結果から、正常尿細管上皮細

胞において産生された HCaRG は周辺組織に分泌され、癌細胞内の ErbB 受容体の発現を抑制し、癌細胞の間葉上皮移行を促進し、癌幹細胞性を抑制すると考えられた。

総括

今研究を通して、急性腎障害による近位尿細管上皮細胞の脱落や、慢性腎臓病による間質の繊維化で近位尿細管上皮細胞が失われるなど、近位尿細管が不可逆的な障害を受けることで、HCaRG の発現低下が惹起されることが、腎細胞癌の増大や進展、再発のリスクを高める要因の一つではないかと推測された。腎細胞癌の発生や再発のリスクを軽減するには、生活習慣病を一因とする腎障害の進行を抑制し、いかに尿細管上皮細胞の脱落を抑え、癌幹細胞の維持や癌細胞の増殖を抑制すると推測される HCaRG の発現を保つことが、腎癌の予防や治療、再発予防における重要な戦略になると期待される。

今後、ELISA や尿中に脱落した近位尿細管細胞の培養など、近位尿細管における HCaRG の非侵襲的で簡易な測定方法を確立し、血中及び尿中に含まれる HCaRG と腎細胞癌の発症や進展、予後との関連を検討していきたいと考えている。そして、本研究成果を基礎として、HCaRG を利用した新たな腎細胞癌の治療法や再発予防法開発の道筋となり、臨床応用され、少しでも多くの人々の健康維持に寄与することを期待する。

引用文献

1. World Cancer Report 2014
2. 厚生労働省 人口動態調査 厚生労働省ホームページ
平成 28 年 9 月 7 日アクセス <http://www.mhlw.go.jp/>
3. 国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」ホームページ
平成 28 年 9 月 7 日アクセス http://ganjoho.jp/reg_stat/index.html
4. Mihara S. *et al.* Early detection of renal cell carcinoma by ultrasonographic screening--based on the results of 13 years screening in Japan. *Ultrasound Med Biol.* 25(7):1033-1039 1999
5. Kawada S. *et al.* Current state and effectiveness of abdominal ultrasonography in complete medical screening. *J Med Ultrason.* 32(4):173-179, 2005
6. 全国がん（成人病）センター協議会 生存率協同調査 全国がん（成人病）センター協議会ホームページ
平成 28 年 9 月 7 日アクセス <http://www.zengankyo.ncc.go.jp/etc/>
7. Lucas SM. *et al.* Renal function outcomes in patients treated for renal masses smaller than 4 cm by ablative and extirpative techniques. *J Urol.* 17(1):75-79, 2008
8. Hollingsworth J.M. *et al.* Surgical management of low-stage renal cell carcinoma: Technology does not supersede biology. *Urology.*

67(6):1175–1180, 2006

9. Gnarr JR. *et al.* Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet.* 7(1):85–90, 1994
10. Hunt J.D. *et al.* Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer.* 114(1):101–108, 2005
11. Yuan JM. *et al.* Hypertension, obesity and their medications in relation to renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 77(9):1508–1513, 1998
12. Waalkes S. *et al.* Obesity is associated with improved survival in patients with organ-confined clear-cell kidney cancer. *Cancer Causes Control.* 21(11):1905–1910, 2010
13. Chow WH. *et al.* Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol.* 7(5):245–257, 2010
14. Moyad MA. Obesity, interrelated mechanisms, and exposures and kidney cancer. *Semin Urol Oncol.* 19(4):270–279, 2001
15. Chow WH. *et al.* Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med.* 343(18):1305–1311, 2000
16. Matsuda H. *et al.* Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG/COMMD5) and kidney diseases: HCaRG accelerates tubular repair. *J Nephrol.* 27:351–360, 2014
17. Solban N. *et al.* HCaRG, a novel calcium-regulated gene coding for a nuclear protein, is potentially involved in the regulation of cell proliferation. *J Biol Chem.* 275(41):32234–32243, 2000

18. Devlin A. M. *et al.* HCaRG is a novel regulator of renal epithelial cell growth and differentiation causing G2M arrest. *Am J Physiol Renal Physiol.* 284(4):F753-762, 2003
19. El Hader C. *et al.* HCaRG increases renal cell migration by a TGF- α autocrine loop mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289(6):F1273-1280, 2005
20. Matsuda H. *et al.* HCaRG accelerates tubular repair after ischemic kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 22(11):2077-2089, 2011
21. Bader A. G. *et al.* Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer.* 5(12):921-929, 2005
22. Iimura Y. *et al.* Development and External Validation of a New Outcome Prediction Model for Patients With Clear Cell Renal Cell Carcinoma Treated With Nephrectomy Based on Preoperative Serum C-Reactive Protein and TNM Classification : The TNM-C Score. *J Urol.* 181(3):1004-1012, 2009
23. Frank I. *et al.* An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGNscore. *J Urol.* 168(6):2395-2400, 2002
24. Zisman A. *et al.* Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *J Clin Oncol* 19(6): 1649-1657, 2001
25. Rini BI. *et al.* Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol.* 20:300-306, 2008

26. Schneider S. *et al.* Gene expression in tumor-adjacent normal tissue is associated with recurrence in patients with rectal cancer treated with adjuvant chemoradiation. *Pharmacogenet Genomics*. 16:555-563, 2006