

令和元年6月18日現在

機関番号：34521

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18892

研究課題名(和文) プロテオーム解析に基づく新規腎臓癌治療薬のシーズ探索と創薬への基盤研究

研究課題名(英文) Basic research for seeds search and drug discovery of novel renal cancer therapeutic medications based on proteomics

研究代表者

山本 泰弘 (Yamamoto, Yasuhiro)

姫路獨協大学・薬学部・准教授

研究者番号：70533850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤が効きにくい悪性腫瘍である腎臓癌を研究対象とし、新たな薬物治療の候補となる物質を探索することを目的に研究を行った。内因性抗腫瘍物質である15-デオキシ-12,14-プロスタグランジンJ2を細胞死が起きない低濃度で腎臓癌細胞に適用すると、がん悪性化の原因である遠隔臓器転移の初期段階と考えられている癌細胞の遊走が抑制されることを見出した。von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子は、腎臓癌の発症に関連が深い遺伝子である。15d-PGJ2はVHL遺伝子を持つ腎臓癌細胞と持たない腎臓癌細胞の両者において、抗がん剤の効果を増強することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞遊走は、悪性腫瘍が原発巣から転移する際に起こる現象である。本研究の検討によって、15d-PGJ2は腎臓癌細胞に対して、細胞死を起こさない低濃度においても、癌細胞の遊走を抑制することが明らかとなった。内因性物質である15d-PGJ2の低濃度適用は、従来の抗がん剤治療に多くみられた副作用である正常細胞に対する細胞毒性を起こすことがないため、危険性の少ない転移治療に応用できることが期待される。また、15d-PGJ2を用いた治療は、VHL遺伝子変異の有無によらずに、抗がん剤の効果を増強することができるため、より多くの腎臓癌症例に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Renal cell carcinoma (RCC) is chemoresistant cancer. In this study, we explored the candidates of novel therapeutic medications for RCC. The 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) is an endogenous anti-cancerous agent. Treatment with low concentrations at which cell death does not occur, of 15d-PGJ2 decreased the migration of Caki-2 cells. The von Hippel-Lindau (VHL) gene is closely associated with the onset of kidney cancer. 15d-PGJ2 enhanced the effect of anti-cancer agents independently of VHL status in renal cell carcinomas.

研究分野：薬理学

キーワード：腎臓癌 プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

腎臓癌の治療には著効を示す化学療法が少ないことから、根治的腎全摘出を行う外科的切除がスタンダードとなっている。腎臓癌に対して化学療法が奏効しない理由として、腎臓は体内の不要な物質を尿として排泄する性質を持つことから、抗がん剤が腎臓の癌病変部位にまで到達できない、或いは抗がん剤に対する腎臓癌細胞の感受性が低い等の可能性が考えられている。そこで、我々は腎臓癌部にまで到達することができる内因性物質であり、腎臓癌細胞に対し細胞毒性を有する 15-デオキシ^{12, 14} プロスタグランジン J₂ (15d-PGJ₂) に着目した。15d-PGJ₂ の抗悪性腫瘍作用は当初、その前駆体である 12-PGJ₂ が血球がんに対し抗腫瘍作用を示す内因性物質として発見されたことにより見出された。その後、15d-PGJ₂ が大腸癌や肺癌等の固形癌細胞に対しアポトーシスを誘導することが明らかとなり、申請者らも 15d-PGJ₂ が腎臓癌細胞に対し抗腫瘍作用を持つことを明らかにした (Yamamoto et al. Biochem Biophys Res Commun. 2011)。

一方、15d-PGJ₂ が示す腫瘍細胞毒性は、その受容体である peroxysome proliferator-activated receptor (PPAR) を介したものであると考えられていたが、近年の報告により、PPAR 非依存的な経路による細胞死が存在する可能性が示唆されている。申請者らは新規の PPAR 非依存的な経路を探る試みとして、既存の抗悪性腫瘍薬と 15d-PGJ₂ を腎臓癌細胞に併用適用することで、それぞれの単独適用と比較して相乗的に細胞増殖抑制作用が現れることを見出した (Yamamoto et al. Mol. Clin. Oncol. 2014)。また申請者らは、神経細胞における 15d-PGJ₂ の新たな細胞膜標的タンパク質を分離・同定することに成功しており (Yamamoto et al. PLoS One. 2011) 同定した 15d-PGJ₂ 標的タンパク質の一つである解糖系酵素 -エノラーゼの抗体を処置することによって細胞死が誘導されることを報告した (Yamamoto et al. Neurotoxicology. 2015)。-エノラーゼは癌転移に深く関与するプラスミノーゲンの受容体であることが報告されている (Edward F et al. Blood. 2009)。申請者らは、-エノラーゼが腎臓癌細胞表面に 15d-PGJ₂ と共発現していることを明らかにしており、-エノラーゼを標的とした転移抑制メカニズムの可能性があることを報告した (第 135 回日本薬学会年会. 2015)。

2. 研究の目的

臨床的に抗がん剤が効きにくい腫瘍である腎臓癌を研究対象とし、外科手術が適用不可の症例、あるいは外科手術後の腎臓癌に対する薬物治療の可能性を探索することを目的とする。候補薬剤として、内因性抗がん物質である 15d-PGJ₂、近年開発が進んでいる分子標的薬としての抗体などを用い、腎臓癌に対する作用およびそのメカニズムを解析することで、難治癌である腎臓癌の新規治療法の開発を目指す。

< 主な具体的目標 >

- (1) 15d-PGJ₂ や抗体などの各種薬剤の中から、腎臓癌に対する細胞死誘導作用および転移抑制作用を有するものを探索する。
- (2) 腎臓癌に対して抗腫瘍効果を示した上記薬剤の詳細な作用メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 腎臓癌において網羅的なプロテオーム解析により、15d-PGJ₂ と結合するタンパク質を同定する。腎臓癌細胞にビオチン標識 15d-PGJ₂ を結合させたものから抽出したタンパク質を 2 次元電気泳動し、抗ビオチン抗体を用いた Western blotting およびタンパク質染色を行い、Western blotting により検出されたスポットを選択し、質量分析法により結合候補タンパク質を同定する。

(2) 同定した創薬標的タンパク質の阻害剤や抗体あるいはそのタンパク質活性を増強する薬剤の中から、腎臓癌細胞の増殖・生存・遊走を抑制するものがないか探索する。癌細胞の増殖・生存に関しては、MTT アッセイや Propidium Iodide (PI) 核染色、アポトーシスに関してはカスパーゼ活性、細胞遊走に関しては、創傷治癒アッセイ (wound healing assay) やボイデンチャンパー (トランスウェル) アッセイなどを指標に行う。さらに候補分子の生存および遊走に関する分子メカニズムについて、シグナル分子の動きをウエスタンブロットング法や免疫染色法によって解析する。

4. 研究成果

(1) 腎臓癌細胞株 caki-2 を用いて、15d-PGJ₂ が結合するタンパク質についてプロテオーム解析を行った結果、細胞骨格タンパク質、転移酵素、DNA 結合タンパク質、転写因子、分子シャペロン等が、15d-PGJ₂ に結合することを見出した。次に、これらのタンパク質に対する特異的

抗体を用いて、腎臓癌細胞の増殖・遊走を抑制するものがないか探索する検討を行った。しかしながら、上記のタンパク質に対する抗体においては、増殖や遊走を抑えるものは見出せなかった。

(2) 15d-PGJ₂ 単独処置における腎臓癌細胞に対する抗癌作用の評価研究として、癌細胞の遊走に及ぼす影響を検討した。15d-PGJ₂ を caki-2 に適用すると、細胞死を誘導しない低濃度において、腎臓癌細胞の遊走を阻害することが明らかになった。

(3) 15d-PGJ₂ の腎臓癌細胞遊走阻害作用について、そのメカニズムを検討した結果、15d-PGJ₂ の受容体である Peroxisome Proliferator-Activated Receptor は関与しておらず、c-Jun N 末端キナーゼおよび focal adhesion キナーゼの活性化を介することが明らかとなった。

(4) 腎臓癌の発症と関連が深い遺伝子の一つである von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子と 15d-PGJ₂ の関与について、VHL 遺伝子の発現が異なる細胞種を用いて、15d-PGJ₂ ならびに各種薬剤を併用して適用し、15d-PGJ₂ の抗腫瘍作用に VHL 遺伝子が関与するかどうか検討した。検討の結果、VHL 遺伝子の有無によらずに、15d-PGJ₂ は抗がん剤であるトポイソメラーゼ阻害剤の抗腫瘍活性を増強することが明らかとなった。

上記の成果から、内因性物質である 15d-PGJ₂ が腎臓癌の進展を抑制できることが明らかとなった。今後のさらなる検討により、15d-PGJ₂ を用いた新規腎臓癌治療法の開発が促進されることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Koma H, Yamamoto Y, Fujita T, Yagami T. 15-deoxy- 12, 14-prostaglandin J2 enhances anticancer activities independently of VHL status in renal cell carcinomas. *Biochem. Biophys. Rep.* 2019; Volume 18, July, 100608-100608. (DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.01.001>)

Yagami T, Yamamoto Y, Koma H, Pathophysiological Roles of Intracellular Proteases in Neuronal Development and Neurological Diseases. *Mol Neurobiol.* 2019 May;56(5):3090-3112. (DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1277-4>)

Yagami T, Yamamoto Y, Koma H. Physiological and pathological roles of 15-deoxy - 12,14-prostaglandin J2 in the central nervous system and neurological diseases. *Mol Neurobiol.* 2018 Mar;55(3):2227-2248. (DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0435-4>)

Yamamoto Y, Koma H, Ayaka Nishi, Yagami T. Anti-heat shock 70 kDa protein antibody induced neuronal cell death. *Biol. Pharm. Bull.* 2017; 40: 402-412. (DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00641>)

Yamamoto Y, Yamamoto T, Koma H, Nishii A, Yagami T. Synergistic effects of 15-deoxy 12,14-prostaglandin J2 on the anti-tumor activity of doxorubicin in renal cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Rep.* 2017; 9:61-66. (DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.11.004>)

Yagami T, Yamamoto Y, Koma H. 15-deoxy- 12,14-prostaglandin J2 in neurodegenerative diseases and cancers *Oncotarget.* 2017; 8(6):9007-9008. (DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14701>)

Koma H, Yamamoto Y, Nishii A, Yagami T. 15-Deoxy- 12,14-prostaglandin J2 induced neurotoxicity via suppressing phosphoinositide 3-kinase. *Neuropharmacology.* 2016 Oct 19;113(Pt A):416-425. (DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.10.017>)

Yagami T, Koma H, Yamamoto Y. Pathophysiological Roles of Cyclooxygenases and Prostaglandins in the Central Nervous System. *Mol Neurobiol.* 2016 Sep;53(7):4754-71. (DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9355-3>)

[学会発表](計14件)

山本泰弘、高馬宏美、矢上達郎 腎臓癌細胞膜における 15 デオキシ-デルタ 12 14-プロスタグランジン J2 の新規標的タンパク質 日本薬学会 第 139 年会 23PO-pm315 千葉、2019 年 3 月

矢上達郎、山本泰弘、高馬宏美 抗神経特異的エノラーゼ抗体による神経細胞死はカスパーゼ 3 不活性化とカスパーゼ 1 活性化を伴う 日本薬学会 第 139 年会 21PO-am138 千葉、2019 年 3 月

高馬宏美、山本泰弘、矢上達郎 15 デオキシ-デルタ 12 14-プロスタグランジン J2 は腎臓癌において VHL とは独立して抗腫瘍効果を発揮する 日本薬学会 第 139 年会 23PO-pm316 千葉、2019 年 3 月

矢上達郎、山本泰弘、高馬宏美 形質膜に局在する電位依存性陰イオンチャンネルは 15-deoxy- 12, 14-prostaglandin J2 膜標的タンパク質の一つである 第 92 回日本薬理学会年会 1-P-047 大阪、2019 年 3 月
米田有里、山本泰弘、高馬宏美、矢上達郎 15-デオキシ- 12, 14-プロスタグランジン J2 とトポイソメラーゼ阻害剤との併用による腎臓癌細胞遊走抑制作用の解析 第 68 回 日本薬学会 近畿支部総会・大会 P-PM174 姫路、2018 年 10 月
熊谷宏昭、山本泰弘、高馬宏美、矢上達郎 VDAC 阻害剤は 15-deoxy- 12,14-prostaglandin J2 の神経細胞毒性を亢進する 第 68 回 日本薬学会 近畿支部総会・大会 P-PM194 姫路、2018 年 10 月
Yamamoto Y, Koma H, Yagami T. A plausible involvement of plasmalemmal voltage-dependent anion channel in the neurotoxicity of 15-deoxy- 12;14-prostaglandin J2. The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. July 1-6, 2018 (Kyoto, Japan)
Fujita T, Asanoma Y, Shirai W, Hashimoto E, Echigo T, Yoneda Y, Kumagai H, Yamamoto Y, Koma H, Yagami T. Synergistic effects of 15-deoxy- 12,14-prostaglandin J2 and anticancer agents on renal cell carcinomas. The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. July 1-6, 2018 (Kyoto, Japan)
山本泰弘、高馬宏美、矢上達郎. 15-デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン J2 は focal adhesion kinase の不活性化によって腎臓癌細胞の遊走を抑制する. 日本薬学会第 138 年会. 28PA-pm360 金沢、2018 年 3 月
矢上達郎、山本泰弘、高馬宏美. 抗 14-3-3 / 抗体はカスパーゼ 3 を不活性化し、ユビキチン化蛋白質の蓄積を抑制し、神経細胞死を誘導する 日本薬学会第 138 年会 26PA-pm223. 金沢、2018 年 3 月
山本泰弘、高馬宏美、矢上達郎. Heat shock protein 70 抗体の神経細胞死誘導メカニズムの解析. 第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会 1-10-2 神戸、2017 年 10 月
山本泰弘、高馬宏美、西井彩桂、矢上達郎 15-デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン J2 の腎臓がん細胞遊走におけるシグナル制御機構. 日本薬学会第 137 年会 25PB-am184 仙台、2017 年 3 月
高馬宏美、山本泰弘、西井彩桂、矢上達郎 海馬において 15-デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン J2 は PI3 キナーゼを抑制して記憶想起を低下させた. 日本薬学会第 137 年会 25PB-am090 仙台、2017 年 3 月
矢上達郎、山本泰弘、高馬宏美、西井彩桂. 15-デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン J2 は PI3 キナーゼを抑制して神経細胞毒性を示す. 第 90 回日本薬理学会年会 1-0-41. 長崎、2017 年 3 月

〔その他〕

ホームページ等

http://www.himeji-du.ac.jp/faculty/dp_pharm/pharm/ph3/

<https://researchmap.jp/read0150248/>

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：高馬 宏美

ローマ字氏名：Koma Hiromi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。