

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18085

研究課題名（和文）腎癌におけるアドレナリン受容体B2の機能解析と新規治療標的の開発

研究課題名（英文）beta2-adrenoceptor in renal cell carcinoma

研究代表者

菅野 秀典（Kanno, Hidenori）

山形大学・医学部・助教

研究者番号：10594327

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腎癌細胞におけるアドレナリン受容体（ADRB； $\beta$ -adrenoceptor）の機能解析と薬剤耐性との関連の検討を目的とした。ヒト腎癌細胞株にADRB1/2刺激作用を持つイソプロテレノールを添加したところERK1/2、Aktのリン酸化、BCL2、MCL1の発現を促進し、細胞活性の上昇が見られた。この反応はADRB1のノックダウンでは解除されず、ADRB2ノックダウンで解除された。次に、腎癌治療薬であるソラフェニブ、カボザンチニブを腎癌細胞株に添加したところ、細胞増殖を抑制したが、イソプロテレノール添加で抵抗性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADRB刺激はストレス環境で惹起されることが知られている。ストレス環境が癌の予後を悪化させることは多くの癌腫で報告されているが、その機序に言及したものは少ない。本研究は、ADRB刺激により腎癌の細胞活性をあげ、治療抵抗性に寄与することを基礎研究レベルで解明しており、今後ストレスとの関係などとの関連の研究の礎になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to investigate the role of  $\beta$ -adrenoceptor (ADRB) and drug resistance induced by ADRB activation in renal cell carcinoma (RCC). Adding isoproterenol onto human RCC cells, the phosphorylation of ERK1/2 and Akt was up-regulated, the expression of anti-apoptotic protein BCL2 and MCL1 increased, and the cell viability increased. This reaction was canceled by ADRB2 knockdown, while was not by ADRB1 knockdown. Clinically used RCC therapeutic agents sorafenib and cabozantinib suppressed viability in RCC cell lines, and isoproterenol weakened the sorafenib and cabozantinib effects.

研究分野：泌尿器科

キーワード：ADRB 腎癌 薬剤耐性

### 1. 研究開始当初の背景

癌患者、特に進行癌患者は、慢性的な精神的ストレス環境に置かれている。これまでストレスと癌の促進について、いくつかの報告があり、ストレス応答としてのカテコールアミンによるアドレナリン受容体刺激、特に  $\beta$  アドレナリン受容体刺激 ( $\beta$  adrenergic receptor: ADRB) は、cAMP 上昇、Erk 経路、Akt 経路の活性化、Bcl-2 ファミリー蛋白の発現上昇などを介して癌の進行と関連していることが示されている。さらに、肝細胞癌の研究において、 $\beta_2$  アドレナリン受容体 (ADRB2) 刺激がソラフェニブに対する治療抵抗性に関与する報告がある。また、乳癌や前立腺癌では交感神経が腫瘍に多く分布している症例の予後が不良である。腎癌 (RCC) においては、近年、ADRB2 を阻害することにより細胞増殖が抑制されることが報告されたが、この研究は ADRB を刺激していない環境下での検討で、リガンドとは無関係な、ADRB の基礎活性にのみ着目した研究であった。

また、我々はこれまでの研究で、腎癌細胞株において Bcl-2 ファミリー蛋白がソラフェニブ耐性に寄与することを報告している。

### 2. 研究の目的

ストレス当により惹起されることが想定される ADRB1/2 刺激が、Bcl-2 ファミリー蛋白の発現を介してソラフェニブなどの腎癌治療薬剤の効果減弱に働くと仮説を立てた。本研究では、カテコラミン存在/非存在下での腎癌における ADRB1/2 の機能解析、ADRB1/2 と細胞内シグナル、Bcl-2 ファミリー蛋白の発現解析、ADRB1/2 刺激によりソラフェニブ抵抗性を引き起こすかを検討した。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト RCC 細胞株 A498、786O、769P、A704、Caki-1、Caki-2、ACHN について、ADRB1、ADRB2 の発現を mRNA レベルは RT-qPCR 法を用いて、蛋白レベルはウェスタンブロット法を用いて比較した。

(2) ADRB1、ADRB2 の発現が高い細胞株 ACHN と A498 を用いて、ADRB1/2 の基礎活性(カテコラミン非存在下)をみるため、siRNA 法によるノックダウンを行い、MTS アッセイで細胞活性を評価した。

(3) ADRB1、ADRB2 の発現が高い細胞株 ACHN と A498 を用いて、ADRB 刺激(カテコラミン存在下)の効果を見るため、イソプロプラノール (ISO) を添加した。添加後腎癌細胞株で ISO が作用していることを確認するため、cAMP アッセイで細胞内 cAMP を評価した。また、ISO によりシグナル伝達が活性化しているか、Bcl-2 ファミリー蛋白が変化しているか、細胞活性が変化しているかを評価するため、Akt、ERK1/2、STAT3、4EBP1、pAkt (S473)、pERK1/2(T202/Y204)、pSTAT3(Y705)、p4EBP1(T37/T46)、Bcl-2、Mcl-1 の発現量変化をウェスタンブロット法で評価した。細胞活性の変化は MTS アッセイで評価した。

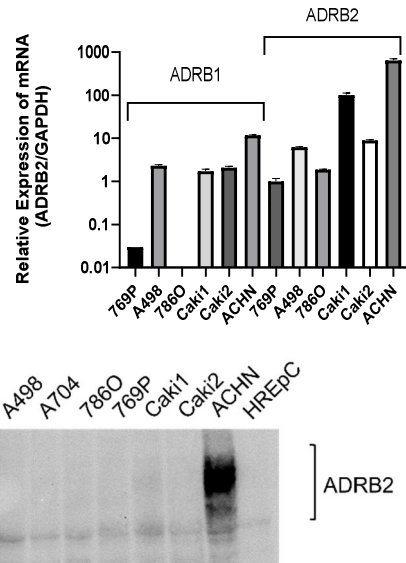
(4) ソラフェニブの効果を減弱するか評価するため、ISO とソラフェニブを添加し、MTS アッセイで評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 腎細胞癌株の ADRB1/2 発現

RCC 細胞株における ADRB1、ADRB2 の mRNA 発現レベルを qRT-PCR 法で確認した。769-P 細胞株における ADRB2 の mRNA の発現レベルを 1 とし、各細胞株の

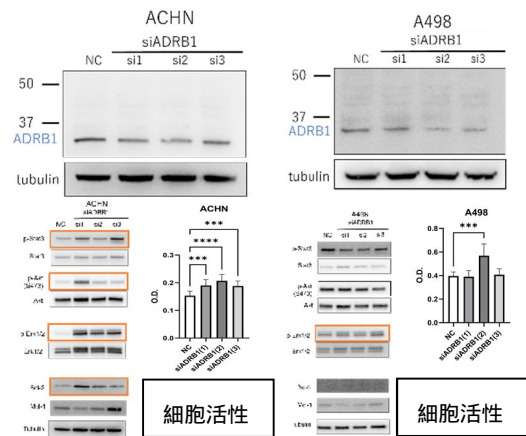
mRNA 発現量の相対値を求めた。ADRB2 の mRNA 発現レベルは、A-498 では約 6 倍、Caki-1 では約 100 倍、ACHN では約 640 倍であった。ADRB1 の発現は、A-498、Caki-1、Caki-2、ACHN で確認されたが、いずれの細胞株でも ADRB2 に比べて発現レベルは低かった。Western blot で蛋白発現を確認したところ、q RT-PCR と同様の傾向が見られた。Human Renal Cortical Epithelial HRCEpC と比較して、ADRB1 および ADRB2 の発現は癌細胞の方が高かった。



## (2) ADRB1/2 の基礎活性の検討

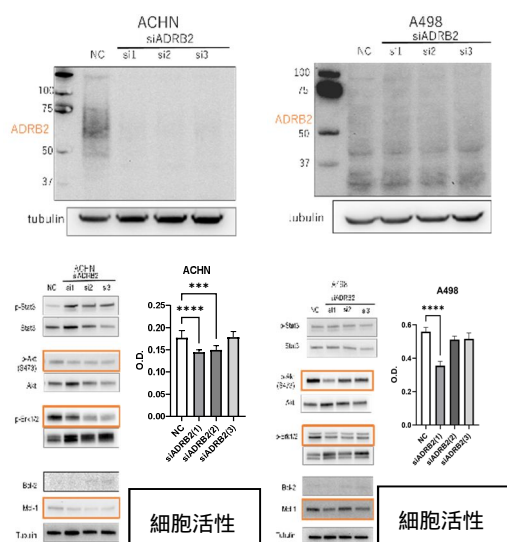
ADRB1/2 の基礎活性を見るために、ヒト腎癌細胞株 ACHN と A-498 を用いて、カテコールアミン非存在下に siRNA 法により ADRB1 および ADRB2 のノックダウンを行った。

ADRB1 のノックダウンにより、ACHN では Stat3、Akt (S473)、Erk1/2 のリン酸化、Bcl-2 の発現が上昇した。A-498 では Erk1/2 のリン酸化が軽度上昇したが、ADRB1 が高発現である ACHN ほどの差は認められなかった。MTS アッセイで細胞活性を見たところ、ACHN では ADRB1 ノックダウンにより細胞活性が上昇した。A-498 については最も ADRB1 の蛋白発現が低下していた



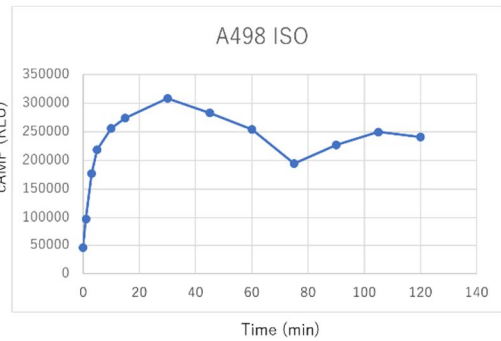
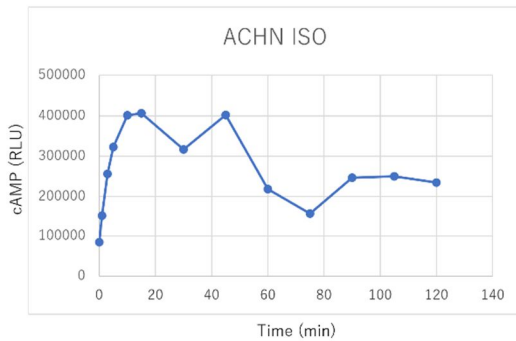
siADRB1(2)のみ細胞活性が上昇していたが、siADRB1(1)、siADRB1(2)では細胞活性の差を認めなかった。

次に ADRB2 ノックダウンの結果を示す。ADRB2 のノックダウンにより、Akt (S473)、Erk1/2 のリン酸化が低下した。ADRB2 発現が多い ACHN については Bcl-2 ファミリータンパクである Mcl-1 が低下した。A-498 においても siADRB2(1)、siADRB2(3)では Mcl-1 は低下していたが、ADRB2 の mRNA 発現レベルが比較的高かった siADRB2(2)では Mcl-1 の低下は認められなかった。MTS アッセイで細胞活性を見たところ、ACHN では mRNA の発現抑制効果が高かった siADRB2(1)と siADRB2(2)で、A-498 では最も発現抑制効果が高かった siADRB2(1)で細胞活性は低下していた。



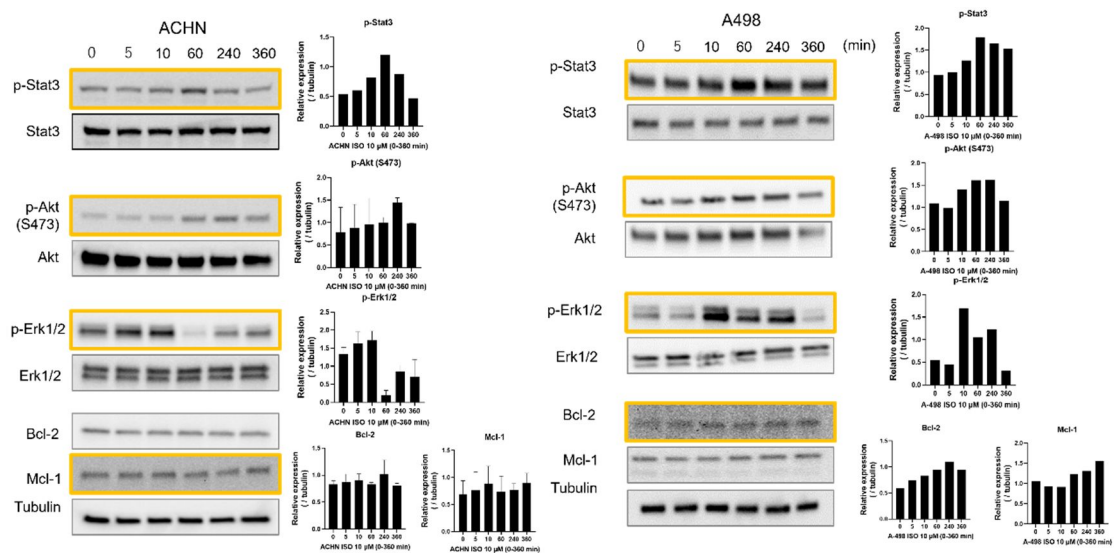
## ADRB 刺激が腎癌細胞へ与える影響

ADRB 刺激が腎癌細胞のシグナル伝達に影響を与えるかを調査するために、ISO を腎癌細胞株 ACHN、A-498 に添加し、GloSensor cAMP アッセイを用いて細胞内 cAMP 濃度を経時的に観察した。ACHN、A-498 とも ISO による ADRB 刺激により、刺激直後から 60 分間、cAMP の濃度上昇を認めた。

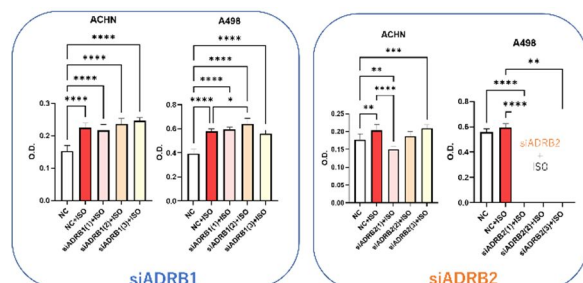


ISO ; Isoproterenol  
RLU ; Relative Luminescence Units

次に腎癌細胞株に ISO を添加し、シグナル伝達、Bcl-2 ファミリー蛋白の発現を見た。ACHN、A-498 ともに 50 $\mu$ g/mL カナマイシンと 10%ウシ胎児血清を添加した RPMI 培地を用いて、5% CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C のインキュベーター内で培養したのち、同培地で培地交換後、2 時間後に、最終濃度が 10  $\mu$ M となるように ISO を添加し、5, 10, 60, 240, 300 分後に蛋白を回収した。ERK1/2 のリン酸化レベルは cAMP の濃度上昇と同様、刺激直後から上昇し、60 分以降低下した。Stat3、Akt (S473) のリン酸化は cAMP や pERK1/2 の上昇から遅れて上昇し、刺激 4 時間後以降に ACHN では Mcl-1 の、A-498 では Bcl-2 の発現上昇が見られた。

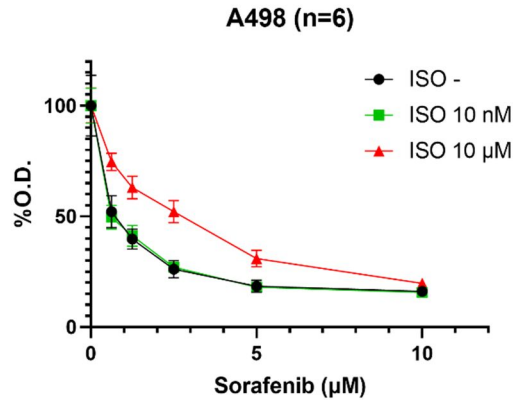


NC、siADRB1、siADRB2 導入細胞に ISO を添加し細胞活性を観察したところ、NC 導入細胞への ISO 添加により細胞活性促進が観察された。この活性促進は ADRB1 ノックダウンにより解除されず、ADRB2 ノックダウンにより解除された。



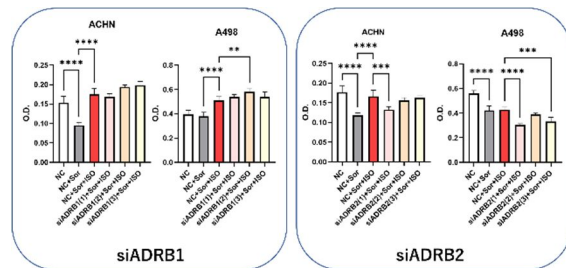
### (3) ADRB 刺激と阻害が腎癌治療薬 Sorafenib の効果に与える影響

薬剤耐性と ADRB 刺激が関連するかを検討するため A-498 にて 0–10  $\mu\text{M}$  の Sorafenib を ISO 非存在下および ISO 10 nM (血中濃度レベル) 10  $\mu\text{M}$  (神経末端レベル) 添加条件下で MTS アッセイを行い、Sorafenib 無添加状態との細胞活性比を求めた。ISO 非存在下と比較し、血中濃度レベルの 10 nM ISO では細胞活性に差は認められなかったが、神経末端レベルの 10  $\mu\text{M}$  ISO 刺激では細胞活性が上昇した。この結果から、神経末端レベルの ADRB1/2 刺激は Sorafenib 耐性作用を持つと考えられた。

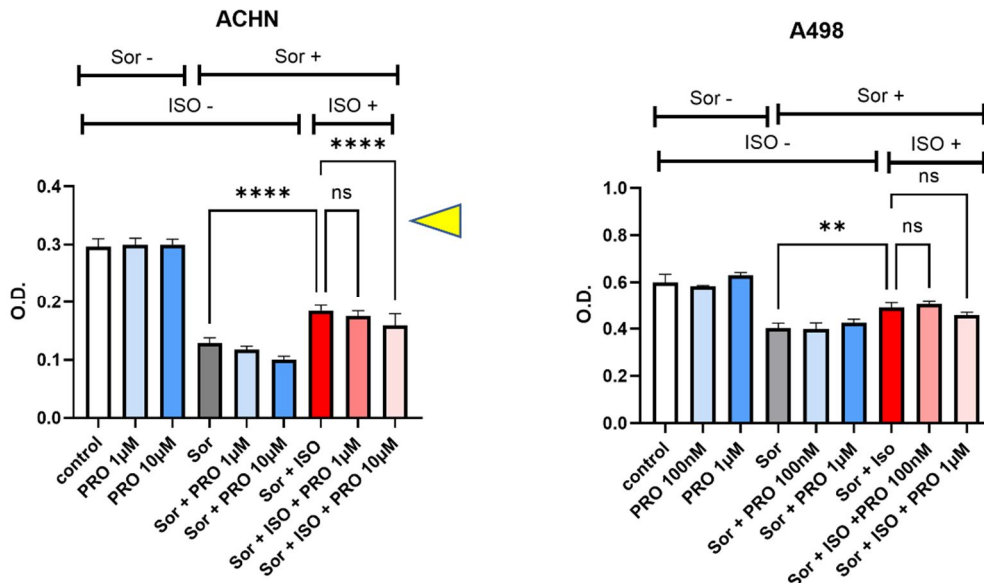


次に ADRB1/2 ノックダウンで ISO による Sorafenib 耐性作用が解除されるかを見るために、ADRB1/2 ノックダウン ACHN、A-498 において 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib と ISO 10  $\mu\text{M}$  添加による細胞活性を観察した。5  $\mu\text{M}$  Sorafenib では細胞活性は低下したが、ISO の添加により Sorafenib の効果は減弱した。

siADRB1 が ISO による Sorafenib 耐性作用を解除しなかったことと対照的に、ADRB2 ノックダウンは ISO による Sorafenib 耐性作用を解除した。A-498 に siADRB2 を導入 48 時間後に ISO を添加し、6 時間後に蛋白を回収し Bcl-2、Mcl-1 の発現を見たところ、両者の発現低下が見られた。



次に、治療応用の可能性を見るため非特異的 ADRB 遮断薬 (PRO) の併用による細胞活性を調べた。ACHN に PRO を添加したところ細胞内の cAMP 濃度は著明に低下していた。しかし、ISO による Sorafenib 耐性作用に関しては、臨床的に投与不可能な 10  $\mu\text{M}$  では若干細胞活性が低下していたものの、低濃度の PRO では Sorafenib 耐性を解除することはできなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牛島正毅、内藤整、伊藤裕美、成澤貴史、小澤迪喜、八木真由、菅野秀典、櫻井俊彦、西田隼人、加藤智幸、土谷順彦
2. 発表標題 腎細胞癌における アドレナリン受容体の役割
3. 学会等名 第31回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------