

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590186

研究課題名（和文） 疾患プロテオミクス情報を基にした腎臓がん新規ターゲットの探索

研究課題名（英文） Discovery of novel targets for the treatment of renal cell carcinoma based on tumor proteomics

研究代表者

岡村 昇 (OKAMURA NOBORU)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60379401

研究成果の概要（和文）：疾患プロテオミクス情報に基づいて、腎臓がんを高発現している新規タンパク質の機能を検討したが、大きな役割を果たしていないことが示唆された。PPAR γ 刺激薬トログリタゾンの作用を検討したところ、トログリタゾンは PPAR γ 非依存的に抗腫瘍効果を示し、MAPK p38 経路が重要であることを明らかにした。さらに内因性 PPAR γ 刺激物質の 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J $_2$ も PPAR γ 非依存的に抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The novel proteins, showing highly expressed in renal cell carcinoma were selected based on proteomics, and their functions were investigated in renal carcinoma cell lines. The results suggested they did not play a role in proliferate. Next, the effects of troglitazone, a PPAR γ agonist, on renal carcinoma cell lines were examined, and it was revealed that the anti-tumor effects was independent of PPAR γ and MAPK p38 pathway played an important role. In addition, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J $_2$ exhibited anti-tumor effects on renal carcinoma cell lines independently of the PPAR γ pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、医療系薬学

キーワード：臨床薬学

1. 研究開始当初の背景

腎臓がんは他のがん比べ、細胞毒性に基づく従来の化学療法剤や放射線療法の奏功率が極めて低く、遠隔転移の認められる腎臓がんでは、生存期間の中央値は数カ月から1年程度、5年生存率は10%未満であり、有効な化学療法開発が期待されていた。種々の血管内皮細胞増殖因子（Vascular Endothelial

Growth Factor; VEGF) に対するヒト化モノクローナル抗体 bevacizumab、マルチキナーゼ阻害剤 sorafenib など、いわゆる分子標的薬が進行性転移腎臓がん患者において有意な生存期間の延長を示しているが、十分とは言えない。したがって、新しい創薬ターゲットに基づく新規抗がん剤が期待されていた。

これまで、我々は腎臓がんの新規診断マー

カー、創薬ターゲットの探索を目指し、疾患プロテオミクスを行い、新規に腎臓がんが高発現しているタンパクを見出した。そこで、本研究では、新規に同定したタンパクが新規創薬ターゲットになり得るか否かについて検討を行うこととした。

2. 研究の目的

(1) 新規タンパクの腎臓がん細胞における役割の検討

プロテオミクス情報により、新規に見出した数種のタンパクが、創薬ターゲットになり得るかについて検討を行う。すなわち、腎臓がん細胞株において、タンパクを RNA 干渉法によりノックダウンさせ、その細胞増殖やアポトーシスに関連する遺伝子の発現量等を検討し、その増殖に及ぼす役割について明らかにすることを目的とした。

(2) PPAR γ 刺激薬 troglitazone の抗腫瘍効果の検討

プロテオミクス情報に基づいて選択したタンパクが大きな役割を果たしていないことを明らかにしたので、他の創薬ターゲットの探索を目指した。すなわち、種々のがん細胞において抗腫瘍効果が認められている PPAR γ 刺激薬 troglitazone の腎細胞株に対する影響およびその作用機序について詳細に検討することにより、がん細胞の増殖シグナルあるいはアポトーシスに重要な因子を探索し、創薬ターゲットとしての基礎的情報を得ることを目的とした。

(3) PPAR γ 刺激物質

15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂

(15d-PGJ₂) 抗腫瘍効果の検討

さらに、内因性 PPAR γ 刺激物質が troglitazone と同様の抗腫瘍効果を示すか、あるいは示すとすれば作用機序については同様なのかどうかについて明らかにすることにより、さらなる創薬ターゲットの探索を目指した。

3. 研究の方法

(1) 新規タンパクの腎臓がん細胞における役割の検討

プロテオミクス情報により、新規に見出した数種のタンパクに対する siRNA を設計した。Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies 社) により、3 種のヒト腎臓がん細胞株 786-O、Caki-2、および ACHN 細胞に transfection した。TaqMan MGB Probe 法により、特異的 mRNA 量を定量することにより、ノックダウンを確認した。特異的 siRNA あるいはコントロール RNA を導入した細胞の増殖は、Cell Quanti-Blue 蛍光試薬を用いて、生存細胞数を測定することにより

比較した。

(2) PPAR γ 刺激薬 troglitazone の抗腫瘍効果の検討

PPAR γ 刺激薬 troglitazone の影響は、786-O、Caki-2 および ACHN 細胞を用いて検討した。細胞の生存率には、Cell Quanti-Blue 蛍光試薬を用いた。核形態は、Hoechst 33342 による染色後、蛍光顕微鏡で観察し、caspase-3 活性は定法に従い測定した。さらに、troglitazone 抗腫瘍効果の作用機序を詳細に検討する目的で、PPAR γ 阻害薬 GW9662、p38 阻害剤 SB202190 等の troglitazone の抗腫瘍効果に及ぼす影響を検討した。

(3) PPAR γ 刺激物質

15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂

(15d-PGJ₂) 抗腫瘍効果の検討

15d-PGJ₂ の影響は、troglitazone と同様に 3 種の腎臓がん細胞株を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 新規タンパクの腎臓がん細胞における役割の検討

数種のタンパクについて、設計した siRNA を transfection することにより、有意な mRNA 量の低下が認められ、ノックダウンすることができた。しかし、ノックダウンした細胞では、細胞増殖に全く変化が認められなかった。したがって、今回選択した新規タンパクは、腎臓がん細胞の増殖に大きな影響を与えないことが示唆された。

(2) PPAR γ 刺激薬 troglitazone の抗腫瘍効果の検討

3 種のヒト腎臓がん細胞株 786-O、Caki-2 および ACHN 細胞に対し、troglitazone は濃度依存的に増殖抑制効果を示し、それぞれ 50% 増殖阻害濃度 (IC₅₀ 値) は、18.0、23.1 および 39.3 μ M であった (Fig. 1)。また、クロマチンの凝集の認められる細胞が増加し、caspase-3 活性が上昇したことから、troglitazone は caspase を介したアポトーシスを引き起こすことが示唆された (Fig. 2)。しかし、PPAR γ 阻害剤である GW9662 存在下でも troglitazone の効果は影響を受けなかったことから、この効果は PPAR γ 非依存的であることが示唆された (Fig. 3A)。さらに、p38 MAPK 阻害剤である SB202190 で細胞生存率は回復したことから、troglitazone の抗腫瘍効果に p38 MAPK 経路が重要であることが示唆された (Fig. 3B)。

以上のことから、p38 MAPK 経路は腎臓がんの創薬ターゲットになり得る可能性が示された。

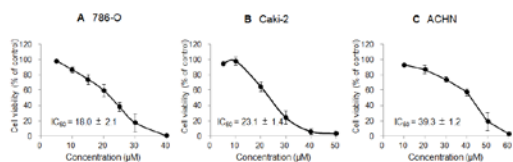


Fig. 1 Effects of troglitazone on proliferations of 786-O (A), Caki-2 (B) and ACHN (C) cells.

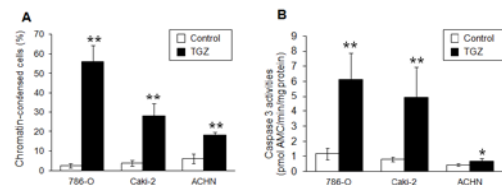


Fig. 2 Effects of troglitazone on chromatin condensations (A), and caspase-3 activities (B).

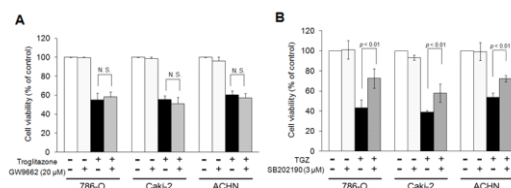


Fig. 3 Effects of GW9662 (A) and SB202190 (B) on troglitazone induced cell death.

(3) PPAR γ 刺激物質 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) 抗腫瘍効果の検討

15d-PGJ₂は troglitazone と同様、濃度依存的に抗腫瘍効果を示し、さらには PPAR γ 非依存的であった (Figs. 4, 5)。また、クロマチンの凝集や Caspase-3 活性の上昇が認められたことから、アポトーシスによるものであることが示唆された。さらに、Caki-2 細胞においては、JNK 阻害剤により生存率が回復したこと、リン酸化 JNK の上昇が認められたことから、JNK 経路が重要であることが示唆された。一方、786-O 細胞においては、リン酸化 Akt の発現量が低下したことから、Akt 経路が重要であることが示唆された。これらの結果より、15d-PGJ₂ は新規の腎臓がん細胞治療へ応用できる可能性が示された。

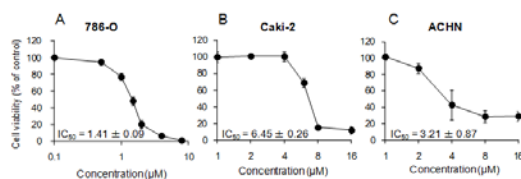


Fig. 4 Effects of 15d-PGJ₂ on proliferations of 786-O (A), Caki-2 (B) and ACHN (C) cells.

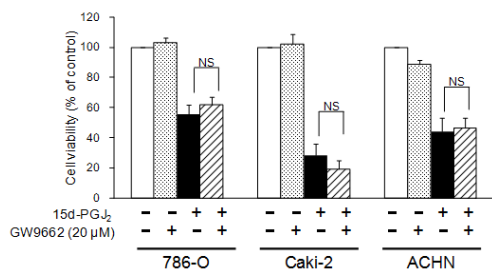


Fig. 5 Effects of GW9662 15d-PGJ₂ on induced cell death.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

1. Fujita M, Tohi M, Sawada K, Yamamoto Y, Nakamura T, Yagami T, Yamamori M, Okamura N. Involvement of the mevalonate pathway in anti-proliferative effect of zoledronate on renal cell carcinoma, ACHN. *Oncol Rep.* 27: 1371-1376 (2012). (査読有)
2. Fujita M, Yagami T, Fujio M, Tohji C, Takase K, Yamamoto Y, Sawada K, Yamamori M, Okamura N. Cytotoxicity of troglitazone through PPAR γ -independent pathway and p38 MAPK pathway in renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* 312: 219-227 (2011). (査読有)
3. Yamamoto Y, Fujita M, Koma H, Yamamori M, Okamura N, Yagami T. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ enhanced the anti-tumor activity of camptothecin against renal cell carcinoma independently of topoisomerase-II and PPAR γ pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 410: 563-567 (2011). (査読有)
4. Yamamoto Y, Takase K, Kishino J, Fujita M, Okamura N, Sakaeda T, Fujimoto M, Yagami T. Proteomic identification of protein targets for 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ in neuronal plasma membrane. *PLoS One.* 6: e17552 (2011). (査読有)
5. Seki K, Senzaki K, Tsuduki Y, Ioroi T, Fujii M, Yamauchi, H, Shiraiishi Y, Nakata I, Nishiguchi K, Matsubayashi T, Takakubo Y, Okamura N, Yamamori M, Tamura T, Sakaeda T. Risk factors for oxaliplatin-induced hypersensitivity reactions in Japanese patients with advanced colorectal cancer. *Int J Med Sci.* 8: 210-215 (2011). (査読有)
6. Yagi M, Yamamori M, Morioka I, Yokoyama N, Honda S, Negi A, Nakamura T, Okamura N, Okumura K, Sakaeda T, Matsuo M. VEGF 936C>T is predictive of threshold retinopathy of prematurity in Japanese infants with a 30-week gestational age or less. *Res Rep Neonatol.* 1: 5-11 (2011). (査読有)
7. Horinouchi M, Yagi M, Imanishi H, Mori T, Yanai T, Hayakawa A, Takeshima Y, Hijioka M, Okamura N, Sakaeda T, Matsuo M, Okumura K, Nakamura T. Association of genetic polymorphisms with hepatotoxicity in patients with childhood acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. *Pediatr Hematol Oncol.* 27: 344-354 (2010).

(査読有)

8. Kuwahara A, Yamamori M, Fujita M, Okuno T, Tamura T, Kadoyama K, Okamura N, Nakamura T, Sakaeda T. TNFRSF1B A146G genotype is predictive of clinical efficacy after treatment with a definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 29: 100 (2010). (査読有)
9. Yagi M, Nakamura T, Okizuka Y, Oyazato Y, Kawasaki Y, Tsuneishi S, Sakaeda T, Matsuo M, Okumura K, Okamura N. Effect of CPS1 4217C>A genotype on valproic acid-induced hyperammonemia. *Pediatr Int.* 52: 744-748 (2010). (査読有)
10. Kohno E, Murase S, Matsuyama K, Okamura N. Effect of corticosteroids on phlebitis induced by intravenous infusion of antineoplastic agents in rabbits. *Int J Med Sci.* 6: 218-23 (2009). (査読有)
7. 藤尾弥希、藤田恵、田路千明、澤田京子、山森元博、山本泰弘、高瀬堅吉、矢上達郎、岡村昇. 腎臓がん細胞におけるトログリタゾンの抗腫瘍効果に対する p38 MAPK 経路の役割. 日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月、静岡.
8. 栗原晶子、山森元博、岡村昇、片岡和三郎、田村孝雄. 食道がん化学放射線療法における治療成績とフルオロウラシル血漿中濃度との相関. 日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月、静岡.
9. 矢上達郎、山本泰弘、高瀬堅吉、岡村昇、柴田敏之. 神経細胞膜における 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. 第 33 回日本神経科学大会、2010 年 9 月、神戸.
10. 藤田恵、田路千明、澤田京子、山本泰弘、高瀬堅吉、矢上達郎、岡村昇. 腎臓がん細胞におけるトログリタゾンの抗腫瘍活性の検討. 日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月、岡山.
11. 西部香、藤田恵、澤田京子、岡村昇. 骨髄腫細胞株 IM-9 に対する zoledronate の抗腫瘍効果. 日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月、岡山.

[学会発表] (計 11 件)

1. 田路千明、藤田恵、本田陽子、山本泰弘、中村任、矢上達郎、山森元博、岡村昇. 腎臓がん細胞における 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ の抗腫瘍メカニズムの解明. 日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月、札幌.
2. 西口裕子、藤田恵、稲彩乃、本田陽子、山森元博、岡村昇. ヒト神経膠芽腫細胞におけるテモゾロミドの効果に及ぼす抗てんかん薬の影響. 日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月、札幌.
3. 山本泰弘、高馬宏美、藤田恵、山森元博、中村任、岡村昇、矢上達郎. 腎細胞癌に対する 15-デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン J₂ と各種抗腫瘍剤との併用による相乗毒性. 第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月、京都.
4. 山本泰弘、高瀬堅吉、藤田恵、岡村昇、柴田敏之、矢上達郎. 15-デオキシ-デルタ 12,14-プロスタグランジン J₂ 誘導神経細胞死に対する抗エノラーゼ抗体の効果. 第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月、横浜.
5. 土肥麻貴子、藤田恵、澤田京子、山森元博、岡村昇. ヒト腎臓がん細胞株 ACHN に対する Zoledronate の抗腫瘍効果. 日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月、静岡.
6. 田路千明、藤田恵、澤田京子、山森元博、山本泰弘、高瀬堅吉、矢上達郎、岡村昇. 腎臓がん細胞における 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ の抗腫瘍効果. 日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月、静岡.

[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]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡村 昇 (OKAMURA NOBORU)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60379401

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

山森 元博 (YAMAMORI MOTOHIRO)

武庫川女子大学・薬学部・講師

研究者番号：10444613

藤田 恵 (FUJITA MEGUMI)

武庫川女子大学・薬学部・助手

研究者番号：50509966