

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31日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592050

研究課題名（和文） ラミニン α 1、腎細胞癌の新規癌胎児性抗原研究課題名（英文） Laminin α 1, Novel cancer embryonal antigen of renal cell carcinoma

研究代表者

辛島尚（KARASHIMA TAKASHI）

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：60304672

研究成果の概要（和文）：ラミニン α 1がヒト腎細胞癌において、新規の腫瘍マーカーならびに標的分子となりうるかを検討した。ラミニン α 1 高発現腎細胞癌において、インテグリン α 4が同様に高発現していた。抗ラミニン α 1抗体もしくはshRNAにより、ラミニン α 1高発現腎細胞癌の腫瘍増殖抑制を認めた。しかし、血清中もしくは尿中のラミニン α 1の安定した検出はできなかった。ラミニン α 1は腎細胞癌における新規標的分子となりうる。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated that the missense mutation of von Hippel-Lindau tumor suppresser gene affected highly expression of laminin α 1 leading to increase tumorigenicity in human renal cell carcinoma (RCC). We investigated function of laminin α 1 and determined whether laminin α 1 would be novel tumor maker and target molecule in human RCC. Highly expression of integrin α 4 was identified in the human RCC cell expressing laminin α 1. The therapy with anti- laminin α 1 antibody and shRNA suppressed tumor growth of the RCC cell expressing laminin α 1. However, laminin α 1 was not stably detected in the serum or the urine of mice bearing human RCC. In conclusions, laminin α 1 is novel target molecule in human RCC. Laminin α 1 may affect tumorigenicity via integrin α 4.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：ラミニン α 1、腎細胞癌、癌胎児性抗原

1. 研究開始当初の背景

ラミニンは細胞接着だけでなく運動や増殖にも関係し、悪性腫瘍の浸潤や転移においても重要と考えられている。ラミニンは α 、

β 、 γ のサブユニットから構成される3量体であり、 α 1サブユニットを含む α 1 β 1 γ 1のラミニン-1と α 1 β 2 γ 1のラミニン-2は、発生と分化に関係し、胎児組織でのみ発現す

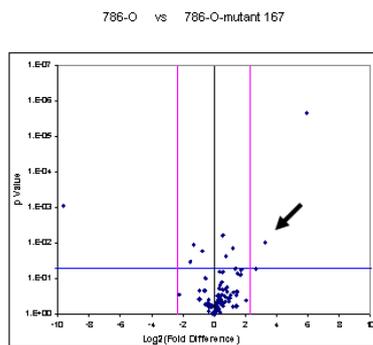
るとされている。

これまでに我々は、腎淡明細胞癌における von Hippel-Lindau 癌抑制遺伝子 (VHL 遺伝子) 変異の違いが、複数の遺伝子発現様式に作用し (参考文献 1)、動物実験モデルで腫瘍形成能に影響することを確認した。Table 1 に、腎淡明細胞癌 786-O 細胞をもとに野生型 VHL 遺伝子を導入した 786-O-WT 細胞、Elongin 結合部位の変異のみをもつ 786-O-mutant 167 細胞の各臓器での同所移植による腫瘍形成能を示す。

肺臓以外のいずれの臓器においても 786-O-mutant 167 細胞が、786-O 細胞より腫瘍形成能が高かった。また、野生型 786-O-WT 細胞は腫瘍形成能を示さなかった。このことより、VHL 遺伝子変化が腫瘍形成能に影響を与えることが示唆される。

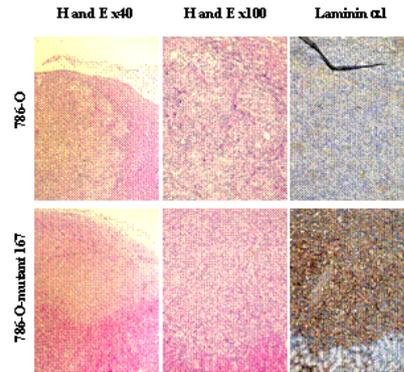
Figure 1 に 786-O 細胞と 786-O-mutant 167 細胞の細胞外マトリックスと接着因子関連遺伝子群の発現比較を示す。

Figure 1. Comparisons of extracellular matrix and adhesion molecule-related gene expression of 786-O-mutant 167 cells versus 786-O cells.



矢印のラミニン $\alpha 1$ を含めた 3 つの遺伝子発現に有意差が見られた。これら遺伝子群は、腫瘍形成能の差に直接関連している可能性がある。

Figure 2. Laminin $\alpha 1$ protein expression in the kidney tumor of 786-O and 786-O-mutant 167 cells



また、ラミニン $\alpha 1$ たんぱく発現は腫瘍形成能の高い 786-O-mutant 167 腫瘍組織で有意に高かった (Figure 2)。

以上の結果から、腎細胞癌においてラミニン $\alpha 1$ は VHL 遺伝子と関連し、腫瘍形成能を高めることが示唆された。ラミニンは分泌たんぱく質であり、血中やフラグメント化したものが尿中で検出される。よって、ラミニン $\alpha 1$ は新規癌胎児性抗原として血中および尿中腫瘍マーカーとなりうる。近年、腎細胞癌においても抗 VEGF 受容体を中心とした有効な分子標的治療薬が開発されつつある (参考文献 2)。ラミニン $\alpha 1$ の腫瘍形成における機能解析が進めば、分子標的治療の新たな対象因子となる。

【参考文献】

1) Tsuchiya MI, Okuda H, Takaki Y, Baba M, Hirai S, Ohno S, Shuin T. Renal cell carcinoma- and pheochromocytoma-specific altered gene expression profiles in VHL mutant clones. *Oncol Rep*. 2005 Jun;13(6):1033-41.

2) Karashima T, Inoue K, Fukata S, Iiyama T, Kurabayashi A, Kawada C, Shuin T. Blockade of the vascular endothelial growth factor-receptor 2 pathway inhibits the growth of human renal cell carcinoma, RBM1-IT4, in the kidney but not in the bone of nude mice. *Int J Oncol*. 2007 Apr;30(4):937-45.

2. 研究の目的

- (1) 腎細胞癌におけるラミニン $\alpha 1$ の機能解析
 - (2) 腎細胞癌に対する抗ラミニン $\alpha 1$ 療法の確立
 - (3) 腎細胞癌における新規腫瘍マーカーとしてのラミニン $\alpha 1$ の確立
- 以上 3 つを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラミニン $\alpha 1$ の結合蛋白を中心とした、相互関連因子の解析

ラミニン $\alpha 1$ 発現強度により増減する因子の解析を PCR array や免疫染色にて解析する。

(2) 抗ラミニン $\alpha 1$ 抗体およびラミニン $\alpha 1$ sort hairpinRNA によるラミニン $\alpha 1$ のノックダウンによる腫瘍増殖抑制効果の解析

抗ラミニン $\alpha 1$ IgG 抗体もしくは shRNA の添加による細胞増殖抑制効果を MTT アッセイを用いて解析する。

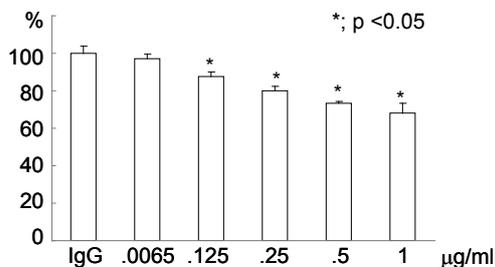
(3) 血中および尿中ラミニン $\alpha 1$ の検出

担癌マウスの血中より血清を分離し、抗ラミニン $\alpha 1$ 抗体を用いてウエスタンブロットにて解析した。

4. 研究成果

(1) ラミニン $\alpha 1$ 高発現腎細胞癌株において、結合蛋白質であるインテグリンのサブタイプ、 $\alpha 4$ の発現亢進が認められた。インテグリンはラミニンに対する既知の受容体であるが、 $\alpha 4$ はラミニン $\alpha 1$ との直接の結合は報告されていない。

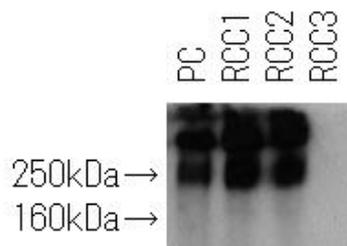
(2) 0.0065 から $1 \mu\text{g/ml}$ 濃度の抗ラミニン $\alpha 1$ IgG 抗体を添加し、72 時間後に MTT アッセイを行った。対象群を 100% とし各々の濃度での細胞増殖活性を%にて計測した。



ラミニン $\alpha 1$ 高発現腎細胞癌において、抗ラミニン $\alpha 1$ 抗体により細胞増殖抑制効果が濃度依存性に認められた。

また、shRNA のトランスフェクションにより、著名な細胞死が認められた。このことより、抗ラミニン $\alpha 1$ 療法は、ラミニン $\alpha 1$ 高発現腎細胞癌に対して、直接効果があり、標的分子となりえると考えられた。

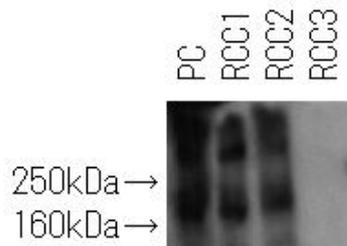
(3) ラミニン $\alpha 1$ 高発現腎細胞癌株を同所移植したヌードマウスの血液を採取し、血漿を分離抽出した。ラミニン 1 の構成成分である抗ラミニン $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。



抗ラミニン $\alpha 1$ 抗体



抗ラミニン $\beta 1$ 抗体



抗ラミニン $\gamma 1$ 抗体

血漿中ラミニン $\alpha 1$ (PC: ポジティブコントロールとして A431 を用いた)

いずれも非還元下での検出であり、還元下での検出はできなかった。主に 3 つのバンドから構成されていた。

ラミニン 1 は、通常は $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ からなる 3 量体から構成されている。ウエスタンブロットによるラミニン 1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$) の検出において、ラミニンサブユニットが単量体、2 量体の形でも存在する可能性が示唆された。

以上の結果より、一部の腎細胞癌においてラミニン $\alpha 1$ が高発現し、細胞増殖能や腫瘍形成能に関連していると考えられた。抗ラミニン $\alpha 1$ 療法が、細胞増殖能を制御したことから、ラミニン $\alpha 1$ は腎細胞癌のあらたな治療標的分子となる可能性が示唆された。一方、血中のラミニン 1 検出において、 $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ は、3 量体だけでなく、単量体や 2 量体で検出されたことより、各々が単量体や 2 量体でも機能を有する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辛島 尚 (KARASHIMA TAKASHI)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：60304672

(2) 研究分担者

井上 啓史 (INOUE KEIJI)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号：00294827

執印 太郎 (SHUIN TARO)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：70128601