

機関番号：13802

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890094

研究課題名（和文）腎癌におけるS100ファミリー蛋白と細胞周期G1期制御因子との関連の検討

研究課題名（英文）：The relationship between S100-family protein and cell cycle regulator in renal cell cancer

研究代表者 杉山 貴之 (SUGIYAMA TAKAYUKI)

浜松医科大学 ・ 医学部附属病院 ・ 診療助教

研究者番号：70444346

研究成果の概要（和文）：

S100A2,A4の腎癌細胞における発現を、ヒト腎癌細胞株とヒト腎癌摘出検体にて検討した。細胞株ではS100A2は検討した5種全てで発現が亢進していた一方、S100A4では2株のみ発現亢進であった。腎癌検体においては、S100A4は30%の症例で発現が亢進していたが、S100A2は癌組織で発現が低下していた。S100A4発現亢進例では病理組織学的に脈管内侵襲の認める例が多かった。シスプラチン負荷による培養細胞株では、S100A2はp53依存性に上昇するのに対し、S100A4は腎癌、正常組織で異なる動きがあり、p53非依存性に変化している可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We examined the S100A2 /A4 mRNA level in human renal cell cancer (RCC) cell and resected human kidney specimen. S100A2 mRNA have been elevated in all five RCC cells and S100A4 mRNA were overexpressed in 2 RCC cells. But S100A2 mRNA was low level in human RCC tissue part. S100A2 level were increased in cis-platinum tolerated HEK(human embryonic kidney) cells. We suppose that S100A2 level is regulated by p53-status but S100A4 is not employed by p53.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,020,000	306,000	1,326,000
2010年度	940,000	282,000	1,222,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,960,000	588,000	2,548,000

研究分野：泌尿器外科学 分子腫瘍学

科研費の分科・細目：医歯薬学・泌尿器科学

キーワード：腎癌 S100 蛋白

1. 研究開始当初の背景

腎癌は、その早期発見あるいは病期を反映する臨床における有用な尿あるいは血清マーカーは認められていなかった。これまで我々は、腎癌の腫瘍マーカー候補としてカルシウム結合蛋白S100ファミリー遺伝子、S100A10と複合体を形成するアネキシンII、並びに脳型脂肪酸結合

蛋白(B-FABP)についての研究を行い、その有用性につき報告してきた(Teratani T et al; Cancer Lett 2002, Teratani T et al; BBRC 2002, Domoto T et al; Cancer Sci. 2007)。一方、転移性腎癌の治療にはインターフェロン、IL-2などのサイトカイン療法が主に用いられてきたがその有効性は乏しいのが現状である。近年腫瘍発生進

展にかかわるシグナル伝達経路の解明に伴い、分子標的治療薬が開発されその有効性は示されつつあるが、まだ癌のシグナル伝達のメカニズム解明は十分ではなく、より有効な治療法開発が望まれている。

細胞周期の G1 チェックポイントで重要な働きを行うp53は、DNA 損傷などのストレス刺激や癌遺伝子の活性化などにより安定化され、細胞周期の停止、DNA 修復、アポトーシスの誘導を行うことが知られている。P53 は各種癌組織で高率に変異が認められているが、一方、S100 ファミリー遺伝子産物とこの p53 の結合についての報告が近年認められている。

2. 研究の目的

今回我々は、癌との関わりが示唆されている S100 ファミリー遺伝子のなかで腎癌において発現量の変化するものに対し、発現制御機構、特に癌抑制遺伝子 p53 とその制御因子との関連性に関する解析を行い、さらには臨床的パラメーターとこれらの関連性についての検討を行うことで、S100 ファミリー遺伝子の発現亢進・減弱が腎癌発生、進展に如何にして関与しているかを検討する基礎研究を計画した。また近年、分子生物学的マーカーによる抗体製剤、チロシンキナーゼ阻害剤の効果予測に関する研究が精力的になされているが、我々の研究はまた S100 ファミリー遺伝子およびその産物が、分子標的薬の効果予測のためのマーカー候補となるかの基礎的研究となると考えている。

3. 研究の方法

1) 腎癌細胞におけるS100ファミリー遺伝子の発現度確認:ヒト腎癌培養細胞 (786-O, 769-P, Caki-1, TUHR14TKB, OS-RC2) および対照としてHEK293細胞を使用。RNAを抽出。TaqMan Gene Expression Assay (Applied biosystems社)にて、癌抑制遺伝子p53との関連が示唆されるS100A2,A4, S100B, およびこれまで報告してき

たS100A10のmRNA発現につき、リアルタイムPCR法にてmRNAの発現確認を行った。

2) ヒト腎癌組織におけるS100ファミリー遺伝子の発現度確認:浜松医科大学附属病院泌尿器科にて文面にて事前に研究用検体採取の同意を得られた方を対象とした。当院にて根治的腎摘除を施行し明細胞腎癌と診断された例で、正常部腎皮質・および腎癌組織を摘出し、totalRNA抽出後細胞株と同様にリアルタイムPCR法で発現を確認した。

3) DNA障害刺激によるS100ファミリー遺伝子の発現誘導確認:細胞外的要因によるp53誘導目的に、細胞培養液にシスプラチン負荷を行い、S100蛋白遺伝子の誘導確認を行った。各細胞株培地にシスプラチンを添加し、p53により誘導されるp21のmRNA発現増加を確認の後、リアルタイムPCR法にてS100蛋白のmRNA発現変化を確認した。

4. 研究成果

1) 腎癌細胞におけるS100ファミリー遺伝子の発現度確認:HEK293細胞と比較しS100A2、S100Bはすべての腎癌細胞株で発現が低下していた。S100A4ではCaki1,769-Pの2株のみ発現亢進であり、残りの3株では60%以下の発現量であった(図1)。

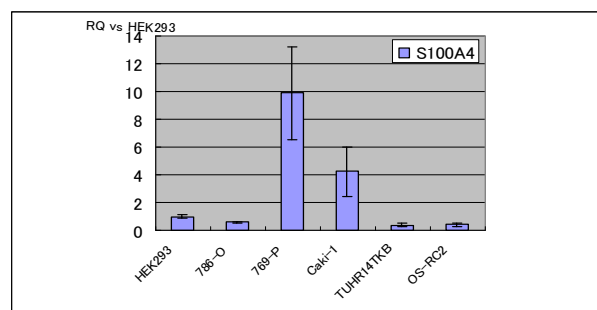


図1 腎癌細胞におけるS100A4 mRNAの発現。

S100A2,A4についてP53変異株である膀胱癌細胞T24、およびp53欠損株である肺癌細胞H1299にて測定比較したが、S100A4,A10は腎癌細胞とほぼ同程度であったが、S100A2ではHEK293や他の腎癌細胞株と比較しT24で高発現している一方、H1299では他の腎癌細胞より発現が低下していた。

2) ヒト腎癌組織におけるS100ファミリー遺伝子の発現度確認:腎癌手術検体を用いた検討では、S100A4は30%(4/13)の症例で正常組織に比して発現が亢進していた(図2)が、一方S100A2はすべての癌組織において正常組織と比較し発現が低下していた。

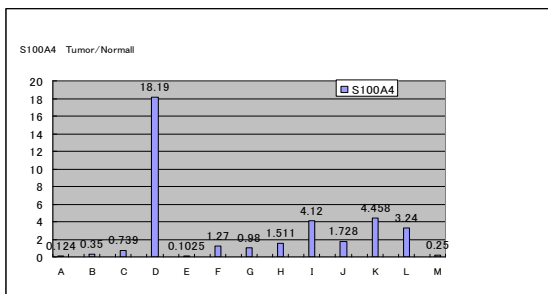


図2: 腎癌摘出組織におけるS100A4mRNA発現。同一患者の正常組織との発現比を測定している。

S100A4発現亢進例では病理組織学的に脈管内侵襲の認める例が多い傾向にあったが、対象症例の内多くがstage2以下であり、今後の症例集積増加により差が明らかになる可能性がある。

上記1)、2)の要旨については、2010年4月の日本泌尿器科学会総会(於:盛岡)で発表を行った。

3) DNA障害刺激によるS100ファミリー遺伝子の発現誘導確認:シスプラチン負荷にてp21m

RNA発現が亢進している環境にて、S100A2はHEK細胞、腎癌細胞いずれでも発現亢進を認めたのに対し、S100A4mRNA発現はHEK細胞で発現低下したが腎癌細胞では抑制されなかった(図3)。

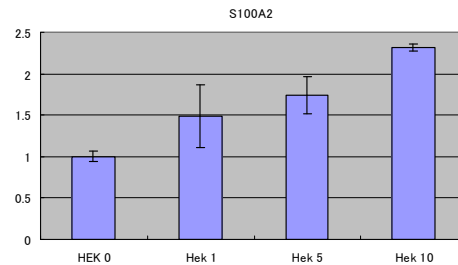


図3 シスプラチン負荷によるS100A2mRNAの発現。0-10ug/mlの濃度で測定を行った。

上記3)に関しては平成22年度の第69回日本癌学会学術総会にて発表を行った。

文献的には、S100A4、S100A2はいずれも遺伝子座は近隣にあり、P53に結合しその機能に影響を及ぼすとされているが、今回の検討ではS100A2はp53誘導シグナルにつれ上昇するのに対し、A4は腎癌、正常組織で異なる動きがあると考えられ、p53非依存性に変化している可能性があると考えられた。近年の報告でも、S100A2はp53と結合すること、およびS100A2,A4蛋白の核局在と悪性腫瘍との関連が報告されている。本研究においては、p53の変異の少ない腎癌において、S100A2の発現を認めていない。S100蛋白の多くは、プロモーター領域のメチル化によって発現制御がなされているとされ、現在S100A2,A4についてゲノムDNA抽出ーバイサルファイト処理の後、PCR法を基本にした測定を行い、また平行して免疫染色法にて蛋白発現を確認し、mRNAレベルとの整合性を確認中である。

これらの結果などから、我々はS100A2は腎癌発生において発現低下するという癌抑制遺伝子

の働きをもち、S100A4は浸潤転移形成に関与すると仮定しているが、今後臨床サンプルの解析数増加により確証となると考えている。

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）

〔学会発表〕(計 2件)

杉山貴之 他:ヒト腎癌細胞株におけるS100ファミリー遺伝子発現の検討。第98回日本泌尿器科学会総会。平成22年4月、盛岡市

杉山貴之 他:腎細胞におけるシスプラチン誘導アポトーシスとS100蛋白の反応性の検討:第69回日本癌学会学術総会。平成22年9月、大阪市。

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 貴之 (SUGIYAMA TAKAYUKI)

浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教

研究者番号：7 0 4 4 4 3 4 6