

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25年 6月13日現在

機関番号：22701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591775
 研究課題名(和文) プロテオミクス解析を用いた腎細胞癌のストレス対応情報伝達ネットワークの解明
 研究課題名(英文) Elucidation of Signal Networks to Stress in Renal Cell Carcinoma by Proteomic Analysis
 研究代表者
 中井川 昇 (NAKAIGAWA NOBORU)
 横浜市立大学・附属病院・准教授
 研究者番号：00237207

研究成果の概要(和文)：我々はプロテオミクス解析を用い低酸素状態においてヒト腎癌細胞内で発現や活性が誘導される蛋白を幾つか同定した。これらの蛋白は腎細胞癌治療の主役である血管成長因子受容体を標的としたチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)に対し抵抗性を獲得する際に重要な働きをしていると考えられた。これらの蛋白の中にブドウ糖の取り込みを制御する蛋白が含まれていたため、ヒト生体内での腎癌のブドウ糖の集積をFDG PET/CTによって測定したところ、ブドウ糖の集積の高い腎癌ではTKI治療に対して抵抗性を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found some intracellular molecules in human renal cell carcinoma (RCC) cells which expressed or activated by hypoxia conditions using proteome analyses. These molecules were thought to act critical roles in the intracellular signal pathways to gain the resistance to tyrosine kinase inhibitors (TKI) targeting angiogenesis, which were mainstay of treatment for human RCC. One of these molecules acts to regulate glucose uptake, and glucose uptake was speculated to be the index to resistance to TKI treatment. Actually, we found that the uptake of glucose in human RCC evaluated by FDG PET/CT could predict the response of RCC to TKI treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：泌尿器科学

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：ストレス・プロテオミクス・腎細胞癌

1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌の発癌・進行のメカニズムが明らかになり、そのメカニズムの中で重要な働きをしている VEGF の受容体や mTOR (mammalian target of rapamycin) 蛋白を標的とした分

子標的薬が開発され、進行性腎癌の治療成績は改善しつつある。しかし、これらの薬剤は癌の進行を一定の期間制御するに過ぎず、ある時期を過ぎると再び癌が進行することも同時に明らかになってきた。これは現在標的

とされている mTOR-HIF-VEGF という情報シグナルは腎癌の進行に重要な働きをしているけれども細胞の生存を保つために必須ではないために癌細胞は生存を続け、レスキューとなる新たな進行メカニズムが惹起され、癌細胞が増殖を続けるためと考えられた。

2. 研究の目的

そこで、培養腎癌細胞にストレスをかけ、ストレスによって活性化される腎癌細胞内の情報伝達蛋白のネットワークをプロテオミクス解析という手法を用いて明らかにし、このネットワークの維持に必須の細胞内蛋白を同定し、治療反応の予測因子や新たな治療標的となりうるか評価する。

3. 研究の方法

低酸素ストレスに対する培養腎癌細胞内の蛋白の発現の変化を横浜市立大学先端医科学センターを利用してマスマスペクトロメトリーを併用したプロテオミクス解析手法によって網羅的に観察を行った。次いで、細胞内情報伝達系蛋白の多くが活性化されるとリン酸化されることを利用して、リン酸化蛋白のみを抽出しこれを前述のプロテオミクス解析を利用し、活性状態が変化する蛋白を同様に網羅的に観察した。

低酸素状態において発現や活性が誘導された蛋白から、既存のデータバンクを用いて腎癌の進行や生存に関連することが予測される蛋白を絞り込み、手術検体を用いて上記候補のメッセンジャーRNA の発現を解析した。上記候補蛋白の発現を生体内で間接的に評価すると思われる FDG PET/CT を用いて、腎癌患者の予後予測等が可能か検討を行った。

4. 研究成果

プロテオミクス解析手法によって低酸素状態下で生じる培養腎癌細胞の細胞内の数千種類以上の蛋白の発現の変化を網羅的に観察し

、低酸素状態で発現が誘導される細胞内蛋白、低酸素状態でリン酸化が亢進する細胞内蛋白を同定したところ、既知の糖代謝に関わる複数の酵素、糖のトランスポーターの発現が亢進していること、複数のストレス蛋白のリン酸化が亢進していることを明らかにした。

さらに、これらの蛋白の発現をsiRNAを用いて抑制、もしくはこれらの蛋白活性を阻害剤によって阻害することによって腎癌細胞の低酸素状態での増殖、生存が抑制されることも明らかにした。

低酸素状態というストレスの中で糖代謝に関わる複数の酵素、糖のトランスポーターの発現が亢進していることから、糖の取り込みの状態が腎細胞癌のストレス耐性を反映していることが予測されたため、糖の取り込みを画像化する¹⁸F-2-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography/ computed tomography (FDG PET/CT)に注目し、FDG PET/CTによって検出される腎癌組織の糖の集積の程度と臨床経過の相関を検討したところ、単位体積あたりの糖の集積の高い腎癌の症例の予後は極めて悪く、逆に低い腎癌の症例では長期生存が得られること、VEGFの受容体を標的とした薬剤を投与した際に腎癌組織の糖の集積が著明に低下する症例では長期間腫瘍の進行を抑えられるのに対し、低下しない症例ではその効果は短期間で終わることを明らかにした。

同時に、薬物療法中の腎癌患者の血液サンプルを収集、血液サンプルのプロテオミクス解析を行い、培養腎癌細胞のプロテオミクス解析によって得られたデータとともに検討し、実際の臨床において治療効果判定や予後予測に有用な血中バイオマーカー候補を数種類明らかにした。ただし、少ない症例数を対象とした検討のため、より症例数を増やした検討を続けていく必要がある。

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)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① 中井川昇、矢尾正祐、他 イメージングバイオマーカーとしての FDG PET/CT の可能性 臨床泌尿器科 67(1)53-59 2013 査読無
- ② Ueno D, Yao M, Tateishi U, Minamimoto R, Makiyama K, Hayashi N, Sano F, Murakami T, Kishida T, Miura T, Kobayashi K, Noguchi S, Ikeda I, Ohgo Y, Inoue T, Kubota Y, Nakaigawa N. Early assessment by FDG-PET/CT of patients with advanced renal cell carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitors is predictive of disease course. BMC Cancer. 2012 12:162. doi:10.1186/1471-2407-12-162. 査読有
- ③ Ito H, Shioi K, Murakami T, Takizawa A, Sano F, Kawahara T, Mizuno N, Makiyama K, Nakaigawa N, Kishida T, Miura T, Kubota Y, Yao M. C-reactive protein in patients with advanced metastatic renal cell carcinoma: usefulness in identifying patients most likely to benefit from initial nephrectomy. BMC Cancer. 2012 12:337. doi: 10.1186/1471-2407-12-337. 査読有
- ④ 中井川昇、矢尾正祐、他 進行性腎細胞癌の画像マーカーとしての FDG PET/CT 泌尿器外科 25(1)3-10 2012 査読無
- ⑤ 中井川昇、矢尾正祐、他 新しい画像診断・評価法 バイオマーカーとしての FDG PET/CT 泌尿器外科 25(5)1175-1180 2012 査読無
- ⑥ Kato S, Kubota K, Shimamura T, Shinohara Y, Kobayashi N, Watanabe S, Yoneda M, Inamori M, Nakamura F, Ishiguro H, Nakaigawa N, Nagashima Y, Taguri M, Kubota Y, Goshima Y, Morita S, Endo I, Maeda S, Nakajima A, Nakagama H. Semaphorin 4D, a lymphocyte semaphorin, enhances tumor cell motility through binding its receptor, plexinB1, in pancreatic cancer. Cancer Sci. 2011;102(11):2029-37. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02053.x. 査読有
- ⑦ 中井川昇、矢尾正祐 腎細胞癌の分子標的治療の理論的根拠 医学のあゆみ 236(12)1085-1089 2011 査読無
- ⑧ Namura K, Minamimoto R, Yao M, Makiyama K, Murakami T, Sano F, Hayashi N, Tateishi U, Ishigaki H, Kishida T, Miura T, Kobayashi K, Noguchi S, Inoue T, Kubota Y, Nakaigawa N. Impact of maximum standardized uptake value (SUVmax) evaluated by 18-Fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography/computed tomography (18F-FDG-PET/CT) on survival for patients with advanced renal cell carcinoma: a preliminary report. BMC Cancer. 2010 10:667. doi: 10.1186/1471-2407-10-667. 査読有
- ⑨ Minamimoto R, Nakaigawa N, Tateishi U, Suzuki A, Shizukuishi K, Kishida T, Miura T, Makiyama K, Yao M, Kubota Y, Inoue T. Evaluation of response to multikinase inhibitor in metastatic renal cell carcinoma by FDG

PET/contrast-enhanced CT. Clin Nucl Med. 2010 35(12):918-23. doi: 10.1097/RLU.0b013e3181f9ddd9.

査読有

- ⑩ 中井川昇、矢尾正祐、他 泌尿器科に必要な PET 検査の知識 腎細胞癌と PET 検査 臨床泌尿器科 64(12)935-942 2010 査読無

〔学会発表〕(計 6 件)

- ① Nakaigawa N, Yao M, Tateishi U, Minamimoto R, Uemura H, Inoue T, Y Kubota Y Impact of Maximum Standardized Uptake Value (SUVmax) Evaluated by 18-Fluoro-2-deoxy-D-glucose Positron Emission Tomography /Computed Tomography (¹⁸F-FDG-PET/CT) on Survival for Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma ASCO annual meeting 2012. 5. 31-6. 4 Chicago USA
- ② 中井川昇、矢尾正祐、上野大樹、村上貴之、榎山和秀、小林一樹、大古美治、池田伊知郎、岸田健、野口純男、三浦猛、窪田吉信 FDG PET/CT を用いた進行性腎細胞癌に対する TKI 治療の経時的評価の有用性についての検討 第 100 回日本泌尿器科学会総会 (2012. 4. 21-24) 横浜パシフィコ (神奈川県) (総会賞受賞)
- ③ Nakaigawa N, Yao M, Minamimoto R, Namura K, Makiyama K, Ueno D, Sakata R, Kasuga J, Inoue T, Kubota Y FDG PET/CT as an imaging biomarker for patients with metastatic renal cell carcinoma. AACR-NCI-EORTC International Conference (2011. 11. 12-16) Berlin German
- ④ Nakaigawa N, Yao M, Makiyama K,

Minamimoto R, Inoue T, Kubota Y FDG PET/CT as Imaging Biomarker for Advanced Renal Cell Carcinoma American Urology Association Annual meeting (2011. 5. 14-19) Washington DC, USA

- ⑤ 中井川昇、矢尾正祐、南村和宏、榎山和秀、岸田健、三浦猛、小林一樹、長嶋正純、村上貴之、池田伊知郎、梅本晋、窪田吉信 FDG PET/CT を用いた進行性腎細胞癌の予後予測についての検討 第 99 回日本泌尿器科学会総会 (2011. 4. 21-24) 名古屋国際会議場 (愛知県)
- ⑥ 中井川昇、南村和宏、南本亮吾、佐野太、榎山和秀、小林一樹、野口純男、石垣華子、岸田健、三浦猛、井上登美夫、矢尾正祐、窪田吉信 ¹⁸F-FDG PET/CT による進行性腎細胞癌の臨床経過予測の検討 第 98 回日本泌尿器科学会総会 (2010. 4. 27-30) 盛岡市民文化ホール：(岩手県)

〔図書〕(計 2 件)

- ① 中井川昇、矢尾正祐、他、新しい診断と治療の ABC 腎がん・膀胱がん 改訂第 2 版、2011 21-28p
- ② 中井川昇、矢尾正祐、他、メディカルレビュー社 Year Book of RCC 2010、2010 117-126p

〔その他〕

本研究の成果である FDG PET/CT によって腎細胞癌患者の予後や薬剤に対する反応を予測できるという趣旨の報告で、2012 年日本泌尿器科学会賞、2013 年欧州泌尿器科学会学会会議でのベストポスター賞を受賞している。

6. 研究組織
(1) 研究代表者

中井川 昇 (NAKAIGAWA NOBORU)
横浜市立大学・附属病院・准教授
研究者番号：00237207

(2) 研究分担者

矢尾 正祐 (YAO MASAHIRO)
横浜市立大学・医学研究科・准教授
研究者番号：00260787