

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：34521

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790209

研究課題名(和文)腎癌の定量的プロテオーム解析に基づく創薬ターゲットの発現変動機序解明

研究課題名(英文)Understanding of mechanisms underlying the expression changes of the therapeutic targets identified by quantitative proteomic analysis in renal cell carcinomas

研究代表者

中村 任(Nakamura, Tsutomu)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：80379411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：臨床腎臓組織の癌部と非癌部で発現に差異を認めたタンパク質についてヒト腎癌および大腸癌由来培養細胞を用いた検討を行った。その結果、ホスホフルクトキナーゼのアイソザイムやRNA結合タンパク質の一種には癌抑制遺伝子(VHL)の発現状態や低酸素環境によって発現調節されるものがあることを見出した。また、この発現調節には一部mRNAレベルの発現変動を伴わない低酸素応答の関与が示唆された。一方で、健常人と比較して腎癌患者で血中濃度が高値を示すタンパク質があり、腎癌早期発見に役立つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Previously, we detected the differences in protein expression between cancerous and noncancerous tissues of human renal cell carcinomas (RCC) by quantitative proteomic analysis, and identified many RCC-related proteins. Among them, the expression changes of the isozymes of phosphofructokinase and one of RNA-binding proteins were dependent on VHL status and were also found under hypoxic conditions in human renal and colorectal cancer cell lines. Those of these proteins under hypoxia occurred with or without their changes at mRNA level. Meanwhile, there were differences in the plasma concentrations of some RCC-related proteins between RCC patients and healthy controls, suggesting their use might represent a useful tool for primary detection of RCC.

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：腎癌 VHL 低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 腎癌(腎臓癌)に対しては腎摘除術が第一選択であるが、転移や再発した例などでは同術を選択することができない場合もあり、腎癌患者の生存率は10%以下と極めて予後が悪い。このため腎癌の早期発見・診断が重要となる。また、腎癌は他の癌種と比較して放射線療法や化学療法の奏効率が極めて低く、有効な補助療法の確立が急がれる。研究代表者らはこれまでに腎癌患者より摘出した腎臓組織の癌部と非癌部における発現比が大きく異なる100以上のタンパク質を同定しているが、その発現調節機構や腎特異性については未だ不明な点が多い。また、血液検体を用いた腎癌の早期発見・診断法は未確立である。

(2) 腎癌発症のリスクに関しては癌抑制遺伝子 von Hippel-Lindau(VHL)に異常を持つ患者(家族)で高く、また、VHL 遺伝子がコードするタンパク質は低酸素誘導因子の安定性に深く関与することから、がん増殖抑制や血管新生を阻害する分子標的薬が開発されているが適用は転移性腎細胞癌に限られる。一方で、研究代表者らは予備検討の結果、VHL 欠損腎癌細胞において血管内皮増殖因子(VEGF)が低酸素に対して発現調節を受けることを見出し、この現象がVHL タンパク質の発現状態に因らず腎癌と関連するものと推察している。

## 2. 研究の目的

(1) 臨床検体で同定されたタンパク質を腎癌治療のための創薬ターゲット候補とし、その発現変動の要因解明を目指す。特にタンパク質の低酸素応答性について検討する。

(2) 臨床検体で同定されたタンパク質が血漿中でも検出されるか検討する。

(3) 腎癌の発症は家族性のみならず散発的にも引き起こされることから、創薬ターゲットタンパク質とVHL 遺伝子発現との関連性について検討する。

(4) VHL タンパク質の発現は腎臓に特化されないことから、大腸癌細胞など腎臓以外の組織由来の癌細胞について検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた検討では、ヒト腎癌由来細胞であるRCC4細胞と786-o細胞(ともにVHL(-))ならびにRCC4細胞にVHL 遺伝子を導入したRCC4(VHL(+))細胞を用いた。また、大腸癌由来細胞であるHCT-15細胞(VHL(+))について検討した。

細胞の培養は常法に従い、37℃、5% CO<sub>2</sub>-95% 空気条件下で10%牛血清含有培地(D-MEMまたはRPMI1640)を用いて行った。

物理的低酸素環境の作製はマルチガスイ

ンキュベーターを用いて行い、窒素ガスによって空気中 O<sub>2</sub> 濃度を1%となるように調節した。化学的低酸素環境の作製には塩化コバルトを用い、細胞培養液中の最終塩化コバルト濃度が200 μM となるように設定し、規定の時間培養細胞を処理した。

(2) タンパク質の網羅的発現解析では、常法に従いRCC4(VHL(+))細胞とRCC4(VHL(-))細胞から抽出したタンパク質を二次元電気泳動に処して、両者の発現パターンに差異の認められたスポットについて質量分析を行い、MASCOT サーチの結果に基づいてタンパク質の同定を行った。

(3) 個々のタンパク質の発現量はウエスタンブロッティング法を用いて評価した。通常培養および低酸素培養を行った細胞から常法に従って調製した細胞溶解液について、特異的抗体を用いて目的タンパク質を検出し、 $\alpha$ -アクチンに対する相対的発現量として評価した。

(4) 遺伝子発現量はリアルタイムPCR法を用いて評価した。通常培養および低酸素培養を行った細胞から常法に従って細胞溶解液を調製し、全RNAを抽出した後、逆転写反応によってcDNAを作成した。作成したcDNAについて標的遺伝子に特異的なプライマーを用いてmRNAを定量した。標的遺伝子のmRNA量は $\alpha$ -アクチンのmRNA量に対する相対的発現量として評価した。

(5) 健常人と腎癌患者の血漿サンプル中のタンパク質は特異的抗体を用いてサンドイッチELISA法により定量した。

## 4. 研究成果

(1) RCC4(VHL(+))細胞とRCC4(VHL(-))細胞から抽出したタンパク質について発現パターンに差異の認められた数種類を同定したところ、既に研究代表者らが腎臓癌部において発現の上昇を認めた解糖系律速酵素であるホスホフルクトキナーゼ(PFK)のアイソザイム PFK type C (PFK-C) が含まれていた。

RCC4(VHL(+))細胞を化学的低酸素条件下で8時間および24時間培養したところ、通常培養時と比較してPFK-C mRNAの発現が2~3倍に上昇した。同様の傾向は他のPFKアイソザイムであるPFKLのmRNAにおいても認められた。一方で、RCC4(VHL(-))細胞に対する化学的低酸素状態の影響について検討したところ、PFKのアイソザイムについてRCC4(VHL(+))細胞で認められたようなmRNAの上昇を認めなかった。RCC4(VHL(-))細胞と同じくVHL(-)である786-o細胞についてもPFKアイソザイムのmRNA発現に有意な変化を認めなかった。VHL タンパク質を発現している細胞では、通常の酸素存在下、VHL タンパ

ク質によってユビキチン標識された低酸素誘導因子 HIF-1 がプロテアソームによって分解される。一方で VHL の発現を認めない細胞では、VHL タンパク質がないため HIF-1 が恒常的に発現する擬低酸素状態を維持していると考えられている。したがって、RCC4(VHL(+))細胞で認められた PFK-C タンパク質の低酸素応答には転写過程において HIF-1 のような低酸素誘導因子が関与すること、また、通常酸素環境下であっても、VHL(-)細胞では低酸素誘導因子の安定化によって PFK-C タンパク質が最大限発現上昇しているため低酸素応答を示しにくいものと推察された。臨床検体で認められた腎臓癌部での PFK-C の発現上昇は一部低酸素環境に起因することが示唆された。

(2) RCC4(VHL(-))細胞を物理的低酸素条件下で 8 時間培養したところ、RNA 結合タンパク質の一つ hnRNP A2/B1 のタンパク質発現量が通常培養時と比較して 2.1 倍であった(図)。同タンパク質は既に研究代表者らが腎臓癌部において発現の上昇を認めたタンパク質群の一つであった。同様の検討を RCC4(VHL(+))細胞について行ったところ、低酸素培養によって hnRNP A2/B1 タンパク質の上昇を若干認めるものの上昇率は約 1.2 倍であり、RCC4(VHL(-))細胞と比較して変化は小さかった。物理的低酸素下、24 時間培養後の影響についても検討をおこなったが、同タンパク質発現量は RCC4(VHL(-))細胞と RCC4(VHL(+))細胞のいずれの細胞においても低酸素応答に顕著な差異は認められなかった。また、786-o 細胞や HCT-15 細胞を用いて hnRNP A2/B1 mRNA 発現量に対する物理的低酸素環境の影響について検討を行ったが、有意な差異は認めなかった。したがって、hnRNP A2/B1 の低酸素応答には VHL 非依存的な発現調節機構が関与するものの、その影響は低酸素環境の持続時間によって変化すること、腎臓癌腫に限らず細胞腫によって応答の違いがあること、また、PFK-C や PFKL と異なって転写過程よりはむしろ翻訳後に低酸素の影響を受けていることなどが考えられた。hnRNP A2/B1 は VEGF の mRNA 発現調節に関与していることが報告されており、VHL 非依存的な低酸素応答関連因子の探索を行うことが新たな腎臓癌ターゲットの発見につながるものと考えられる。

(3) 既に研究代表者らが腎臓癌部において発現の上昇を認めたタンパク質のうち、ガレクチン-1、ガレクチン-3、 $\alpha$ -エノラーゼなどの血漿中濃度は、健常人と比較して腎臓癌患者において高値を示した。また、ガレクチン-1 とガレクチン-3 にカットオフ値を設定した場合、いずれの測定値もカットオフ値を超える患者は全体の 98%に相当し、健常人と比較して著しく高い割合で存在した。したがって、ガレクチン-1 とガレクチン-3 の血漿中

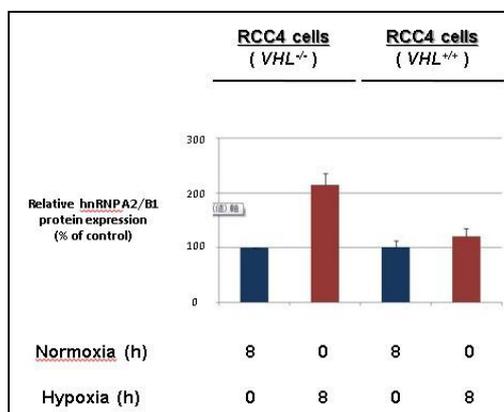


図 . RCC4 細胞における hnRNP A2/B1 タンパク質発現量の低酸素応答性と VHL 欠損の影響

濃度を組み合わせて評価することで腎臓の早期発見に役立てることが可能になると考えられた。

ところで、ガレクチン-1 は低酸素環境下で発現が上昇することや、その遺伝子発現調節領域に HIF-1 結合領域が存在することなどが報告されている。したがって、臨床検体で認められた腎臓癌部でのガレクチン-1 の発現上昇には低酸素環境が関与すると考えられる。一方で、ガレクチン-1 は、化学的低酸素条件下、RCC4 (VHL(+))細胞や HCT-15 細胞では発現が上昇するものの、RCC4 (VHL(-))細胞や 786-o 細胞では発現が低下する傾向にあり、VHL 発現の状態によっては低酸素環境下であっても発現調節が異なる可能性があると考えられた。

## 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 5 件)

Y. Yamamoto, M. Fujita, H. Koma, M. Yamamori, T. Nakamura, N. Okamura, T. Yagami. 15-Deoxy- (12,14)-prostaglandin J(2) enhanced the anti-tumor activity of camptothecin against renal cell carcinoma independently of topoisomerase-II and PPAR pathways. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 410(3), 563-7 (2011).

M. Fujita, M. Tohi, K. Sawada, Y. Yamamoto, T. Nakamura, T. Yagami, M. Yamamori, N. Okamura. Involvement of the mevalonate pathway in the antiproliferative effect of zoledronate on ACHN renal cell carcinoma cells. *Oncol Rep.*, 27(5), 1371-6 (2012).

M. Fujita, C. Tohji, Y. Honda, Y. Yamamoto, T. Nakamura, T. Yagami, M. Yamamori, N. Okamura. Cytotoxicity of 15-deoxy-<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> through PPAR $\alpha$ -independent pathway and the involvement of the JNK and Akt pathway in renal cell carcinoma. Int J Med Sci., 9(7), 555-66 (2012).

C. Yamawaki, M. Takahashi, K. Takara, M. Kume, M. Hirai, H. Yasui, T. Nakamura. Effect of dexamethasone on extracellular secretion of cystatin C in cancer cell lines. Biomed Rep., 1, 111-4 (2013).

N. Kaneko, A. Gotoh, N. Okamura, E. Matsuo, S. Terao, M. Watanabe, Y. Yamada, G. Hamami, T. Nakamura, M. Ikekita, K. Okumura, O. Nishimura. Potential tumor markers of renal cell carcinoma:  $\alpha$ -Enolase for postoperative follow up, and galectin-1 and galectin-3 for primary detection. Int J Urol., 20, 530-5 (2013).

〔学会発表〕(計 8件)

中山優子、高橋稔、中村任、奥村勝彦、高良恒史：ヒト腎癌由来 Caki-2 細胞株に対するエペロリムス長期暴露の影響、第 33 回日本病院薬剤師会近畿学術大会、2012 年 1 月 21-22 日、大阪、アジア太平洋トレードセンター

Y. Yamamoto, H. Koma, M. Fujita, M. Yamamori, T. Nakamura, N. Okamura, T. Yagami : The synergistic toxicity of the combination of 15-deoxy-<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> and several anti-tumor agents against renal cell carcinoma、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14-16 日、京都、国立京都国際会館

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-<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> 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 28-31 日、札幌、北海道大学

山脇知佳、高橋稔、高良恒史、久米学、安井裕之、中村任：培養細胞におけるシスタチン C 分泌に及ぼすデキサメタゾンの影響、日本薬剤学会第 27 年会、2012 年 5 月 24-26 日、神戸、神戸国際会議場

Y. Yamamoto, H. Koma, M. Fujita, M. Yamamori, T. Nakamura, N. Okamura, T. Yagami : The synergistic toxicity of the

combination of 15-deoxy-<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> and several anti-tumor agents against renal cell carcinoma、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18-21 日、名古屋、名古屋国際会議場

高橋稔、山脇知佳、山本泰弘、高馬宏美、矢上達郎、中村任：ヒト腎がん由来細胞を用いた VHL 遺伝子非依存的な低酸素応答関連因子の探索、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28-31 日、横浜、パシフィコ横浜、他

山本泰弘、高馬宏美、大宅麻子、村上和展、久村誠也、小林雄馬、中村任、矢上達郎：15-deoxy-<sup>12,14</sup>-PGJ<sub>2</sub> 膜標的タンパク質である神経特異的エノラーゼに対する抗体は過酸化水素を介して神経細胞死を誘導する、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 27-30 日、熊本、熊本市立総合体育館、他

高橋稔、山脇知佳、山本泰弘、高馬宏美、矢上達郎、中村任：低酸素下ヒト腎がん由来細胞における VHL 遺伝子非依存的な RNA 結合タンパク質の発現誘導、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 27-30 日、熊本、熊本市立総合体育館、他

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 任 (NAKAMURA TSUTOMU)  
姫路獨協大学・薬学部・教授  
研究者番号：80379411

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：