

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659712

研究課題名(和文) Atypical PKC経路を標的とした腎細胞癌に対する新規抗癌活性化合物の同定

研究課題名(英文) Identification of new therapeutic target molecules for renal cell carcinoma

研究代表者

中村 英二郎 (Nakamura, Eijiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90293878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：腎細胞癌(RCC)は経年的に増加傾向を示している。抗VEGF療法が奏功するが殆どの症例で耐性が獲得されるため新規治療薬の開発が急務である。RCCは70%の症例でVHL遺伝子変異を認めるが、我々はpVHLで制御される分子としてclusterinを同定した。同分子はVHL遺伝子欠失に伴い発現が現弱することより腫瘍抑制機能を有していることが想定される。そこで、clusterinのPromoter領域のクローニングを行い、同分子の発現機構の解明、及び、RCCの新規治療標的の同定を試み、MAP2K1が同定され、RCCに対して有望な治療標的遺伝子となり得ることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Recently, the number of RCC patients is increasing. Although, anti-VEGF therapies improve the prognosis of those patients, most of tumors acquire resistance and finally progress. It has been reported that VHL gene is mutated in 70% of RCC and we showed that clusterin was regulated by pVHL. It was suggested clusterin had a tumor suppressor function since this molecule is down regulated by pVHL. Based on these, we have cloned the promoter region of clusterin to examine the regulation mechanisms of the p protein as well as the identification of new therapeutic target for RCC. As a result of this, MAP2K1 was identified as new molecular therapeutic target for RCC.

研究分野：11

科研費の分科・細目：7307

キーワード：腎細胞癌

1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌 (RCC) は全腎悪性腫瘍の約 85% を占め、経年的に増加傾向を示している。初診時に約 25% の症例が遠隔転移を有し、また、根治的腎摘除術を施行し得た場合でも約 20% の症例で再発を認める。遠隔転移を有する症例では抗 VEGF 療法を中心とした治療が行われるが CR が得られる事は稀である。また、PR が得られた症例の殆どが同療法に対する治療抵抗性を獲得するため、罹患例の約 1/3 が死亡に至る予後不良な疾患である。本邦の 2005 年データでは年間新規患者数が 1.8 万人、6132 人が癌死している。また、全世界では 2006 年に 209,000 人が罹患し 102,000 人が癌死したと報告 (Rini et al. Lancet 2009) されており新規治療薬の開発が急務である。

2. 研究の目的

RCC は VHL 病家系において遺伝性発生を来すことから、患者 DNA の解析により VHL 癌抑制遺伝子が cloning された (Latif et al. Science 1993)。また、非遺伝性 RCC の 60-70% の症例でも同遺伝子変異を認めた。VHL 遺伝子蛋白 (pVHL) の機能として、Hypoxia-inducible factor (HIF) を制御していることが知られている一方、VHL 病は褐色細胞腫や血管腫などの遺伝性発生をきたす。この臨床所見は HIF 以外の pVHL の標的分子の存在を示唆するが、本申請者は HIF 以外に atypical PKC (aPKC) が pVHL により制御されることを見いだし、AP-1 protein の JunB が aPKC の下流で褐色細胞腫の発症原因となる事を見い出した。また、aPKC/JunB 経路は MMP-2 や CCL2 などの発現を HIF independent に誘導し、RCC の細胞浸潤能、腫瘍新生血管の増生を制御するとの知見を既に得ており、同経路に位置する新規治療標的分子の同定を目的とした。

3. 研究の方法

本申請者は、wt-VHL (WT)、control mock、

を 786-O cells (VHL-/-RCC 細胞株) に導入した細胞のプロテオーム解析にて新規マーカー蛋白質 clusterin を同定し aPKC/JunB pathway の制御下にあることを報告した。そこで、clusterin の Promoter 領域のクローニングを行い、同分子の発現亢進に伴い 786-O (VHL-/-) 細胞が薬剤耐性を獲得する新規の実験系を樹立した。Lenti-viral shRNA library を Infection し Blasticidine にて Positive selection を行い得られたクローンより germline DNA を回収、PCR 法にて shRNA sequence を確認し BLAST 解析を行うことにより、aPKC/JunB 経路に関連する新規治療標的分子の同定を行った。

4. 研究成果

① clusterin Promoter 領域のクローニング

腎癌細胞株 786-O (VHL-/-) 細胞より genomic DNA を抽出。PCR 法により、clusterin の Exon1 より上流約 300bp のクローニングを行った。

② スクリーニングに必要な実験系の作成

上記の clusterin promoter 3' 側に Blasticidine 耐性遺伝子を組み込んだ plasmid を作成、786-O 細胞に Transfection を行い shRNA library 及び、chemical library を用いたスクリーニングを可能とする実験系を樹立した。

③ shRNA library screening の実施

新たに樹立した実験系に対して、Cellecta 社製の shRNA ライブラリー

<http://www.cellecta.com/technology/shRNA-library-construction/>

を用いてスクリーニングを行った。shRNA からなるウイルスを Infection 後に Blasticidin による selection を行ったところ、複数のクローンが得られた (図 1)。これらを pick up し、clusterin の発現を確認したところ複数のクローンにおいて発現亢進が確認された (図 2)。

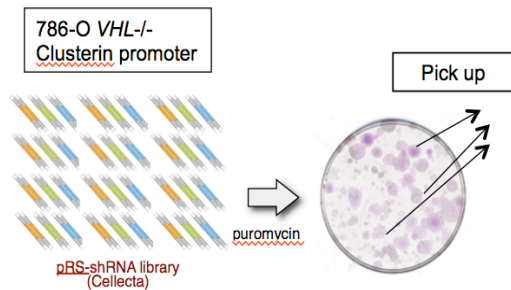
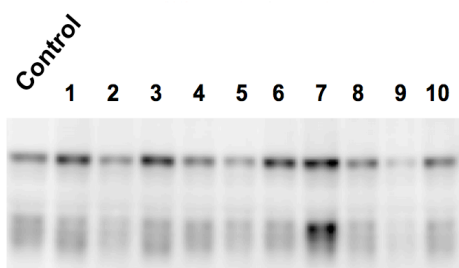


図 1



I.B clusterin

図 2

④治療標的分子の同定

得られた上記のクローンより germline DNA に Integrate された shRNA sequence を PCR 法にて同定、BLAST 解析を行ったところ、その内の一つが MAP2K1 を Code していることが明らかとなった。同分子を含む MAPK pathway は、VHL-/- 細胞の増殖を Drive する可能性を示唆するデータが報告されていることから、shMAP2K1 に対する感受性が、VHL の再導入により変化するか検討を行った。

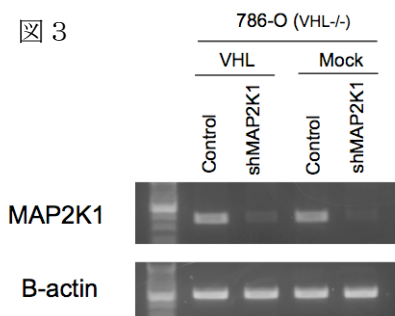


図 3

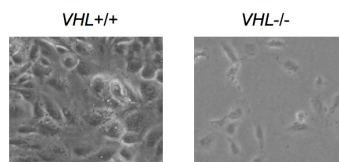


図 4

本スクリーニングで得られた shRNA 配列により、VHL の再導入、又は、Mock の Infection のみを行った 786-O 細胞の両細胞ともに、MAP2K1 mRNA の発現低下が確認された(図 3)。両細胞の増殖能の観察を行ったところ、VHL 再導入を行った細胞においては増殖能が保たれていたが、Mock Infection の細胞では増殖能低下が認められた(図 4)。

⑤今後の展望

MAP2K1 は siRNA により、その発現を低下させた場合、VHL-/- 細胞特異的な増殖抑制をもたらす事が報告されている(*Proc Natl Acad Sci USA*. 2008) ことから RCC に対して有力な治療標的であることが推察される。今後は、MAPK pathway の活性化機構に関する解析を行うと伴に、clusterin の発現亢進を認めた残りのクローンの解析も進めていく予定である。

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 5 件)

1, Li L, Shen C, E Nakamura, Ando K, Signoretti S, Beroukhim R, Cowley GS, Lizotte P, Liberzon E, Bair S, Root DE, Tamayo P, Tsherniak A, Cheng SC, Tabak B, Jacobsen A, Hakimi AA, Schultz N, Ciriello G, Sander C, Hsieh JJ, Kaelin WG Jr. SQSTM1 Is a Pathogenic Target of 5q Copy Number Gains in Kidney Cancer. *Cancer Cell*. 2013;24(6):738-50.

2, Kajita Y, Kato T Jr, Tamaki S, Furu M, Takahashi R, Nagayama S, Aoyama T, Nishiyama H, E Nakamura, Katagiri T, Nakamura Y, Ogawa O and Toguchida J. The transcription factor Sp3 regulates the expression of a metastasis-related marker of sarcoma, actin filament-associated protein 1-like 1 (AFAP1L1). *PLoS One*. 2013;8(1):e49709.

3, Saito R, Shirakawa R, Nishiyama H, Kobayashi T, Kawato M, Kanno T, Nishizawa K, Matsui Y, Ohbayashi T, Horiguchi M, Nakamura T, Ikeda T, Yamane K, Nakayama E, E Nakamura, Toda Y, Kimura T, Kita T, Ogawa O and Horiuchi H. Downregulation of Ral GTPase activating protein promotes tumor invasion and metastasis of bladder cancer. *Oncogene*. 2013 Feb 14;32(7):894-902.

4, Yamasaki T, Kamba T, Kanno T, Inoue T, Shibasaki N, Arakaki R, Yamada T, Kondo K, Kamoto T, Nishiyama H, Ogawa O and E Nakamura. Tumor microvasculature with endothelial fenestrations in VHL null clear cell renal cell carcinomas as a potent target of anti-angiogenic therapy. *Cancer Sci*. 2012 Nov;103(11):2027-37

5, Kanno T, Kamba T, Yamasaki T, Shibasaki N, Saito R, Terada N, Toda Y, Mikami Y, Inoue T, Kanematsu A, Nishiyama H, Ogawa O and Nakamura E. JunB promotes cell invasion and angiogenesis in VHL-defective renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2012 Jun 21;31(25):3098-110.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

<http://www.dsk.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
中村英二郎 (NAKAMURA EIJIRO)

研究者番号：90293878

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし