

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24790351  
研究課題名(和文)腎癌の癌化、増殖、浸潤におけるグリシンエヌメチルトランスフェラーゼの重要な役割

研究課題名(英文)The function of glycine N-methyltransferase in the proliferation of renal cell carcinoma

研究代表者  
宋 裕賢 (Song, YooHyun)  
九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：10586746  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：腎癌細胞株、および、腎癌組織(手術標本)において、GNMTが発現していた。さらに、腎癌細胞株におけるGNMTが細胞周期、特に、細胞増殖に関連していることを解明することができた。次に、アポトーシスとGNMTとの関係を調査した。腎癌細胞株において、GNMTのノックダウンによりアポトーシス関連タンパクが誘導された。腎癌におけるGNMTのアポトーシス制御が細胞増殖に関与していることが示唆された。GNMTの発現や機能の解明が腎癌の新しい治療の発見につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have reported that the GNMT gene acts as an oncogene. However, little is known about the specific function of GNMT in carcinogenesis and progression in renal cell carcinoma (RCC). We performed Western blotting analysis using normal kidney cells and RCC cells. GNMT proteins were expressed in normal kidney cell and most RCC cells. In immunohistochemistry, GNMT protein was expressed in the cytoplasm of RCC cells. We found that the knockdown of GNMT expression induced apparently effect on RCC cell proliferation. Furthermore, GNMT knockdown in RCC cell induced prominent increases in the sub-G1 fraction, indicating cellular death. To investigate the mechanism of cellular death by GNMT knockdown, Western blotting using an antibody against cleaved PARP, which indicates the presence of degradation products from the caspase cascade, was employed. GNMT knockdown induced cleavage of PARP in RCC cells. GNMT may play an important role in promoting cell growth via the regulation of apoptosis of RCC.

研究分野：医学

キーワード：腎癌

### 1. 研究開始当初の背景

Glycine N-methyltransferase (GNMT) は肝臓においてアミノ酸メチオニンの代謝に関与している酵素であるが、最近、GNMT は癌関連遺伝子であると認識されはじめた。以前、我々は GNMT 遺伝子がアポトーシスを介して、癌の増殖や浸潤に重要な役割を持っていることを報告した。さらに、GNMT は腎臓に存在していることが報告され、腎臓においても何らかの役割を持っている可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究により腎臓における分子標的としての GNMT の可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

良性腎細胞株として、HEK293。腎癌細胞株として、KG-2、Caki-1、ACHN、SKR1、KPK1、KPK13、NKK1。また、九州大学病院泌尿器科において施行された手術症例のうち、病理診断にて腎癌と診断され、ホルマリン固定パラフィン包埋標本が使用可能である症例を対象とした。抗 GNMT 抗体、アポトーシスとの関連を調べるために抗 cleaved-PARP 抗体を用いた。

腎細胞株及び腎癌細胞株の GNMT タンパク発現を解析するためにウエスタンブロット法を施行した。細胞株へ siRNA を導入し、GNMT をノックダウンさせることにより、細胞増殖能・細胞周期の変化などを調べた。細胞増殖を調べるために Cell Proliferation Assay、細胞周期を調べるためにフローサイトメトリーを施行した。免疫組織化学染色法にて、ホルマリン固定パラフィン包埋標本におけるタンパクの発現を解析した。GNMT の評価方法として、細胞膜、細胞質、核における発現を正常腎組織及び腎癌組織において評価した。

### 4. 研究成果

ウエスタンブロットにてタンパクの発現を調べたところ、正常腎細胞株、および各種腎癌細胞株に発現を認めた(図1)。

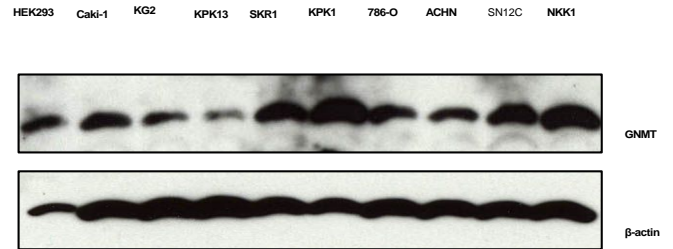


図1

淡明腎細胞癌5症例において免疫組織染色法を施行した。全例において腎皮質の細胞質に発現を認め、3例において腎癌細胞の細胞質に発現を認めた(図2)。

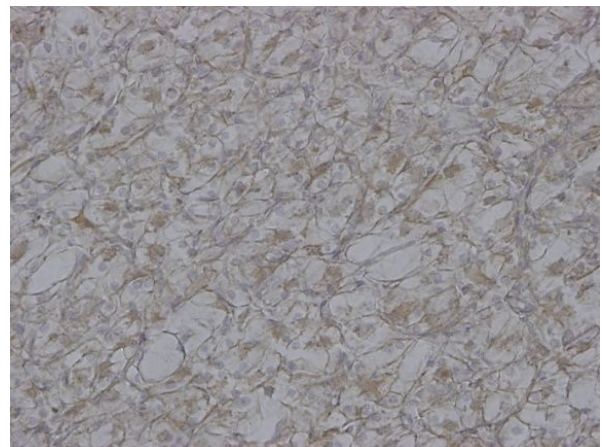


図2

Cell proliferation assay、フローサイトメトリーを施行する際に、正常腎細胞株である HEK293、GNMT タンパクが弱く発現していた腎癌細胞株 ACHN、強く発現していた腎癌細胞株 SKR1 を用いた。GNMT をノックダウンしたところ、HEK293 や ACHN に比べて、SKR1 の細胞増殖はより強く抑制された(図3)。

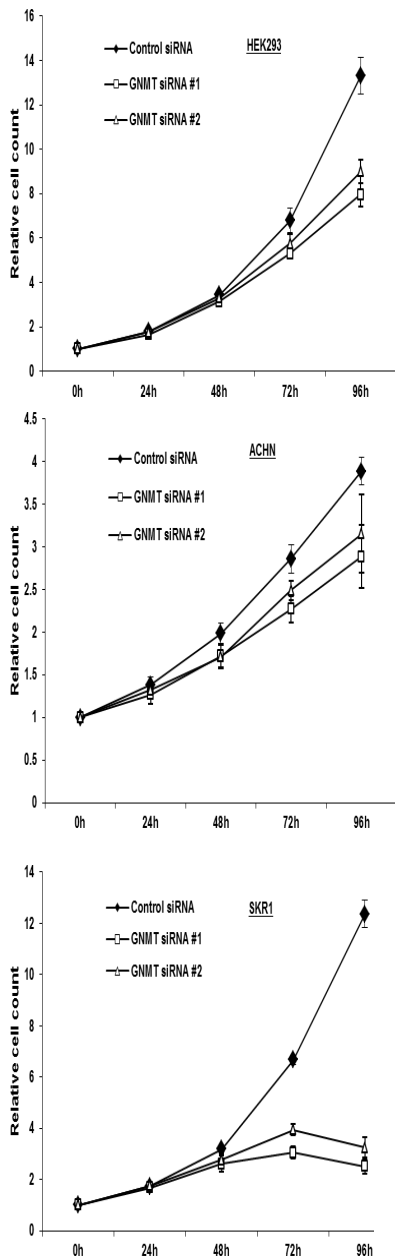


図 3

GNMT が細胞増殖に関連していることが示唆された。また、フローサイトメトリーにおいても同細胞株を用い GNMT をノックダウンしたところ、HEK293、ACHN において sub G1 の増加は軽度であるのに対して、SKR1 においては sub G1 が著明に増加していた。GNMT のノックダウンにより、sub G1 が誘導された (図 4)。

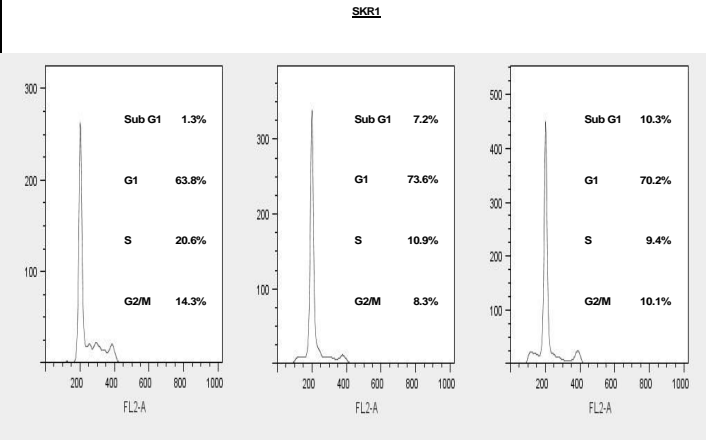


図 4

続いてアポトーシスの指標となり得る cleaved PARP のタンパク発現について検討した。腎癌細胞株において GNMT のノックダウンにより cleaved PARP が誘導された (図 5)。

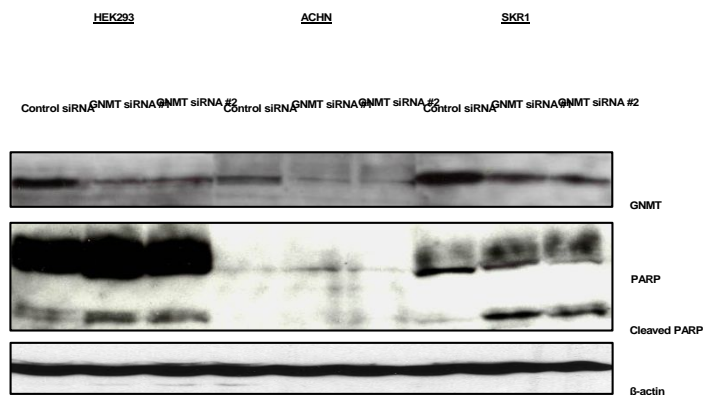


図 5

以上より GNMT とアポトーシスとの関連が示唆された。

腎癌において、GNMT はアポトーシスを制御することにより細胞の増殖に関与しているかもしれない。GNMT の発現や機能の解明が腎癌の新しい治療の発見につながる可能性がある。

(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6件)

宋裕賢 立神勝則 内藤誠二

スニチニブの有害事象と投与スケジュールに関する検討  
泌尿器外科 27 巻 46-47 2014 年 査読あり

Interaction between docetaxel resistance and castration resistance in prostate cancer: Implications of Twist1, YB-1, and androgen receptor.

Shiota M, Kashiwagi E, Yokomizo A, Takeuchi A, Dejima T, Song Y, Tatsugami K, Inokuchi J, Uchiumi T, Naito S.

Prostate. 2013 Sep;73(12):1336-44. 査読あり  
doi: 10.1002/pros.22681.

Mutual regulation between Raf/MEK/ERK signaling and Y-box-binding protein-1 promotes prostate cancer progression.

Imada K, Shiota M, Kohashi K, Kuroiwa K, Song Y, Sugimoto M, Naito S, Oda Y.

Clin Cancer Res. 2013 Jul 9. 査読あり  
doi: 10.1158/1078-0432.

Human heterochromatin protein 1 isoforms regulate androgen receptor signaling in prostate cancer.

Itsumi M, Shiota M, Yokomizo A, Kashiwagi E, Takeuchi A, Tatsugami K, Inokuchi J, Song Y, Uchiumi T, Naito S.

J Mol Endocrinol. 2013 Mar 27. 査読あり  
doi: 10.1530/JME-13-0024

Twist1 and Y-box-binding protein-1 are potential prognostic factors in bladder cancer.

Song YH, Shiota M, Yokomizo A, Uchiumi T, Kiyoshima K, Kuroiwa K, Oda Y, Naito S.

Urol Oncol. 2013 Feb 6. 査読あり

doi: 10.1016/j.urolonc.2012.11.003.

Causes of diminished renal function in the affected kidney after partial nephrectomy.

Tatsugami K, Tanaka S, Ohtsubo S, Inokuchi J, Yokomizo A, Kuroiwa K, Song YH, Naito S.

BJU Int. 2012 Oct;110 査読あり

doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.011027.x.

[学会発表](計3件)

演題名 「The important role of glycine N-methyltransferase (GNMT) in the proliferation of renal cell carcinoma」

学会名 34th congress of the society international d'urologie, Glasgow, Scotland  
12-15 October 2014

演題名 日本語 スニチニブの有害事象と投与スケジュールに関する検討

演題名 英語 Review of sunitinib adverse events associated with the schedules

学会名 第51回日本癌治療学会学術集会  
2013年10月24日~26日 京都

演題名 「The important role of glycine N-methyltransferase (GNMT) in the proliferation of renal cell carcinoma」

学会名 EAU annual congress, Milano, Italy  
15-19 March 2013

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宋 裕賢 ( YooHyun Song )

九州大学医学研究院 研究員

研究者番号 : 10586746

(2)研究分担者なし

(3)連携研究者なし