

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462495

研究課題名(和文)腎細胞癌に対する新規治療標的としてのAKT3-HIF1 経路の解明と薬剤の開発

研究課題名(英文) Identification of AKT3-HIF1 pathway as a new therapeutic target for renal cell carcinoma

研究代表者

近藤 慶一 (KONDO, Keiichi)

横浜市立大学・附属病院・准教授

研究者番号：80363836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究では腎細胞癌株に対するsiRNAを用いたAKTサブタイプの個別抑制によるHypoxia Inducible Factor (HIF) サブユニットの発現抑制の確認に始まり、手術検体を用いた実際の症例におけるAKT, HIF 各サブユニットの発現量の比較と病理学的因子ならびに予後との相関について解析した。AKTサブタイプの抑制によるHIF サブタイプの抑制効果は腎細胞癌株毎に組み合わせが異なっていた。これは細胞株の組織型やvon Hippel Lindau腫瘍抑制遺伝子の欠損の有無が影響していると考えられた。残念ながらAKTサブタイプの発現と臨床的な予後には相関が見られなかった。

研究成果の概要(英文)：We started this study from suppression experiment with renal carcinoma cell line plus siRNA for suppression of hypoxia inducible factor alpha subunit, to expression analysis of each subtype of AKT and HIF alpha subunit in surgical specimens of renal cell carcinomas and statistical analysis of relationship between expression level of these subtypes and pathological factors & prognosis. Suppression of each AKT subtype show suppression of HIF alpha subtype, but combination of AKT subtype suppression and HIF alpha subtype suppression were different among renal carcinoma cell lines. Original histopathological factors of renal carcinoma cell line and status of von Hippel-Lindau tumor suppressor gene influenced these differences. Expression of AKT subtype couldn't show relationship with the prognosis of renal cell carcinoma patients.

研究分野：泌尿器科腫瘍学

キーワード：AKT HIF 腎細胞癌

1. 研究開始当初の背景

淡明細胞型腎癌では von Hippel-Lindau (VHL) 病腫瘍抑制遺伝子の機能が失われており (Kondo K et. Al Cancer Research, 1994)、その結果 Hypoxia Inducible Factor (HIF) サブユニットの分解が進まなくなっている。その結果 Vascular endothelial growth factor (VEGF)、Platelet derived growth factor (PDGF)などの発現亢進による血管新生の亢進や、糖代謝酵素の誘導による嫌氣的糖代謝の亢進 (Warburg 効果) が起こっている。

以前に当研究者は淡明細胞型腎癌においてその発生・進展に重要な役割を持つのは HIF のサブタイプの中の HIF2 であることを報告した (Kondo K et. Al. Cancer Cell, 2002 & PLoS Biology, 2003)。免疫組織染色による解析でも HIF2 はほぼ全ての pVHL 欠損型淡明細胞型腎癌で発現亢進が見られるが、HIF1 は約 1/3 の症例でその発現が欠損しており、腎癌の発生における HIF2 の重要性が示されてきた。

では HIF1 の発現に意味はないのかというと、HIF1 と 2 の双方を発現している腎癌 (H1H2 型) と HIF2 のみを発現している腎癌 (H2 型) ではその下流で生じている細胞内情報伝達経路の活性化に相違が見られることが複数のグループから明らかにされ、HIF1 の発現にも意義があることが示された。(図1)

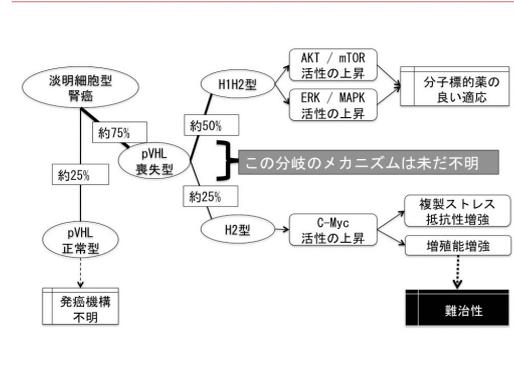
H1H2 型では AKT-mTOR 経路などが活性化されており、現在も用いられている mTOR 阻害剤が有効性を示す可能性がある。これに対し H2 型では c-Myc が活性化して増殖能が促進されるとともに複製ストレスに対する抵抗性が増強しており、非常に予後の悪い Rapid type の腎癌につながる可能性があるのだが、この経路に有効な治療理論はいまだに存在していない。そしてなぜ HIF1 の発現が喪失するのも明らかにされていない。

そこで当研究者は HIF1 と 2 の発現に変化が見られるような生理的環境について検討してみた。血流が不足するという事は単に酸素濃度が低下するだけではなく、同時に栄養素の欠乏も意味している。そこで pVHL を欠損している腎細胞癌株を生体内での正常酸素濃度の下限 (5%) で培養する際にグルコース濃度を同時に低下させたところ、HIF2 の発現状態は変化せず、1 のみが低下するという現象を見出した。この現象は pVHL による分解制御によるものではないため、細胞外グルコース濃度の感知システ

ムでもある AKT-mTOR 経路による 1 の発現量調節の可能性が考えられた。しかしこの経路上のタンパクの発現量とリン酸化を検出して見たところほとんど変化が見られず、AKT のサブタイプである AKT3 の発現量のみが低下していた(2012 癌学会で発表済み)。

AKT3 の発現を抑制すると HIF1 の発現が低下するという現象自体は以前にカナダの研究室から報告されているが、そのメカニズムはいまだ明らかにされていない。

(図1)



2. 研究の目的

上記の研究の結果を踏まえて、細胞周囲環境による AKT3 経路を介した HIF1 の発現調節機構の詳細を明らかにするとともに、この経路が腎細胞癌の生物学的特性にどのような影響を与えるのかを解析する。そしてこの経路に対する選択制の高い阻害剤・活性剤を探索するためのスクリーニングシステムを構築し、臨床応用を視野に入れた薬剤の開発を目指す。

この研究では遺伝子の導入や薬剤を使用することなく細胞培養環境を人の体内で生じる範囲内で変化させるだけで HIF2 に影響を与えずに 1 を抑制可能であるため、生理的に起こる反応に非常に近似した実験系を構築できることが特徴である。また AKT 阻害剤はすでに複数作成されており実際に Phase I に使用されたものもあるが、いずれも AKT1/2 の阻害作用がほとんどで AKT3 に選択性の高いものはいまだに報告されていない。PI3K-AKT-mTOR という細胞内のタンパク合成のメインストリームを抑制する薬剤は副作用も多様かつ重篤であると報告されていることから、より選択性の高い、標的を絞り込んだ薬剤が必要とされている。AKT3 の発現異常は薬剤耐性を獲得した乳癌や悪性黒色腫などでも報告されており、この研究で選別される薬剤の応用範囲は専門科を超えた広がりが見込める。

3. 研究の方法

・ AKT pathway による HIF1 の発現制御が AKT3 特異的であるという現象が特定の腎細胞癌株においてのみ生じる現象ではなく、普遍的に生じているかどうかを確認するために、複数の腎細胞癌株に対して個々の AKT サブタイプに対する siRNA を用いて抑制実験を行う。抑制の効果は細胞抽出液を用いた Western Blotting で確認するとともに、各 AKT サブタイプ特異的なモノクローナル抗体を用いた免疫沈降実験で下流への影響を確認する。

・ 同意を得て手術時に採取し凍結保存してある腎癌組織及び周囲正常組織を用いて AKT サブタイプ及び HIF サブタイプの発現を検出する。方法としては組織抽出液を作成し、Western Blotting を行い、アクチンを内的コントロールとして定量化する。AKT サブタイプの発現量と HIF サブタイプの発現量の相関を見るとともに、この分子の発現量と既知の臨床・病理学的因子（手術時年齢・最大腫瘍径・Fuhrman grade・組織型・M 分類）及び臨床的な予後との相関についても解析を行う。

4. 研究成果

今回の研究では腎細胞癌株に対する siRNA を用いた AKT サブタイプの個別抑制による Hypoxia Inducible Factor (HIF) サブユニットの発現抑制の確認に始まり、手術検体を用いた実際の症例における AKT, HIF 各サブユニットの発現量の比較と病理学的因子ならびに予後との相関について解析した。

腎細胞癌株には RCC4 (plus VHL or Empty vector), ACHN 及び RenCa を用いたが、どの AKT サブタイプを抑制するとどちらの HIF サブタイプが抑制されるのかは株毎に違いが見られた。RCC4 株に pVHL を再導入した細胞株とからベクターを導入した株で結果に違いが見られたことから、この現象は von Hippel Lindau 腫瘍抑制遺伝子の欠損の有無が影響している可能性が示唆された。また株を樹立する際に用いられた腎細胞癌の組織型も影響していると考えられた。

実際の腎癌検体を用いた Western Blotting の結果では腎癌では淡明細胞型・非淡明細胞型を問わず、全ての AKT サブタイプは発現していたが、周囲正常組織との発現量に有意な違いは認められなかった。HIF サブタイプは明らかに腎癌組織で周囲正常組織と比較して発現量が増加していたが、今回の研究では

HIF1 の方が周囲正常組織と腎癌組織の違いが大きい傾向が見られた。

これらの分子の発現量と既知の臨床・病理学的因子（手術時年齢・最大腫瘍径・Fuhrman grade・組織型・M 分類）の相関を見たが、個々の分子の発現量とこれらの因子の間には有意な相関は見られなかったが、AKT2 の腎癌組織と周囲正常組織との比率が高いものほど Fuhrman grade が高いことが明らかになった ($P < 0.001$)。また非淡明細胞型では淡明細胞型よりもこの AKT2 の腫瘍/正常比が有意に高いことも明らかになった ($P < 0.001$)。同様に転移を有する症例の原発巣では HIF1 の腫瘍/正常比が有意に上昇していた ($P < 0.001$)。

これらの分子の発現及び腫瘍/正常比が予後に与える影響について Cox 比例ハザードモデルを用いて解析したところ、単変量解析では HIF2 の腫瘍/正常比が高いと予後が不良であることが明らかになったが、残念なことに上記の因子を組み入れた多変量解析では有意な予後決定因子としては残らなかった。

現在ゲノム編集技術を用いた AKT サブタイプの個別欠損株の作成を試みており、今後はこれらの細胞株を用いてマウスへの腫瘍移植片モデルを作成し、各種薬剤への抵抗性を測定する予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

腎細胞癌における HIF サブタイプと AKT サブタイプの関連性 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 パシフィコ横浜（横浜）

腎細胞癌における HIF サブタイプと AKT サブタイプの相関性の定量的解析 第 26 回泌尿器科分子・細胞研究会 2017 年 3 月 全労済ソレイユ（大分）

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 慶一 (KONDO, Keiichi)
横浜市立大学・附属病院・准教授
研究者番号：80363836

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()