

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 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590590

研究課題名（和文） 腎細胞癌のマトリックス・リモデリング制御機構に着目した個別化
抗血管新生療法の検討研究課題名（英文） The investigation of individual anti-angiogenic therapy focused on
the control mechanism of matrix remodeling in renal cell carcinoma

研究代表者

神波 大己 (Kamba Tomomi)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20402836

研究成果の概要（和文）：

本研究は腎細胞癌においてマトリックスリモデリング機構を制御する経路を同定し、抗血管新生療法の新規治療標的やその感受性マーカーになりうるかの検討を目的とした。研究では、HIF を介しない VHL-atypical PKC-JunB 経路が腎細胞癌の進展に寄与することを示し、実際に、腎癌細胞株からの xenograft を用いて JunB の発現が腫瘍増生と血管新生に影響することを確認した。さらに、JunB 下流エフェクターとして MMP-2/9 および CCL2 を同定し、その機能解析の結果、腎細胞癌の血管新生や浸潤に対する新規分子標的になる可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this research is to identify a pathway of the control mechanism of matrix remodeling in renal cell carcinoma and to examine whether it could be a new therapeutic target and a sensitive marker of anti-angiogenic therapy. This study indicates that the pathway of VHL-atypical PKC-JunB not through the HIF (hypoxia-inducible factor) contributes to the progression of renal cell carcinoma, and we actually confirmed with xenografts from kidney cancer cell lines that the expression of JunB affected tumor growth and angiogenesis. Moreover, we identified matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9 and chemokine (C-C motif) ligand-2 (CCL2) as downstream effectors of JunB. The results of their functional analysis suggest that they have the possibility to be new molecular targets for angiogenesis and invasion of renal cell carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

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：腎細胞癌、マトリックス・リモデリング、抗血管新生療法、VHL、JunB、MMP-2/9、CCL2

1. 研究開始当初の背景

これまでに腎細胞癌 (RCC) の発癌進展の分子機構として von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子変異による HIF/VEGF 経路の活性化 が大きく寄与していることが明らかにされ、本経路を標的とした Tyrosine kinase inhibitor (TKI) 剤を始めとした分子標的治療が近年の進行性腎細胞癌の新たな標準治療となり、進行性腎細胞癌の治療にパラダイムシフトをもたらした。しかし、事前の感受性予測が不可であることや無効症例の存在、耐性の出現が問題となっており、新たな治療ターゲットの探索・開発が必要と考えられる。

当研究室ではこれまでに、VHL 遺伝子が atypical PKC を介して JunB を制御しており、VHL 遺伝子変異による JunB の活性化が胎生期神経細胞のアポトーシスを制御することで、VHL 病における褐色細胞腫の発生に寄与することを報告した。しかしながら、JunB が RCC の進展に寄与するかどうかは明らかになっていない。

また、腎細胞癌に対する治療感受性に関する研究を行っており、電子顕微鏡下にヒト RCC 腫瘍血管の形態学的特徴と抗 VEGF 療法感受性の相関を調べ、抗腫瘍効果を予測するバイオマーカーとなり得るか検討を行ってきたが、VEGF だけでなく細胞外マトリックス・リモデリングが血管新生において重要であることが示唆された。

以上の背景から、JunB が RCC の進展に果す役割を明らかにし、JunB が制御する腎細胞癌のマトリックス・リモデリング制御機構に着目した抗血管新生療法の可能性について検討を行った。

2. 研究の目的

本研究では、JunB が RCC の進展に果す役割を明らかにし、JunB の制御するマトリックス・リモデリング機構を同定することで、抗血管新生療法の新規標的薬や、抗血管新生療法の感受性マーカーになり得るかをその目的とした。

3. 研究の方法

以下の 2 つを具体的検討項目として挙げる。

(1) 臨床検体における JunB の発現、および VHL 変異型腎癌細胞株 (786-0、A498) における

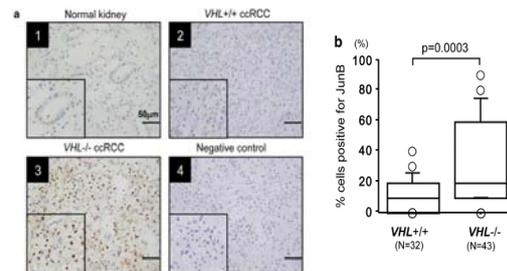
JunB の発現と、JunB 発現抑制および強制発現による影響を検討し、JunB が RCC の進展に果す役割を明らかにする。

(2) JunB 下流エフェクターの検索とその解析を行う。

4. 研究成果

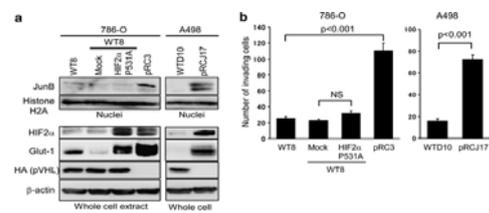
(1) 臨床検体における JunB 発現、および VHL 変異型腎癌細胞株における JunB 発現と、JunB 発現抑制および強制発現による影響の検討。

①その臨床経過が把握できている、VHL wild および VHL null の腎癌組織と腎正常組織を用いて作成した TMA (Tissue microarray) を用いて、臨床検体 75 例における JunB 免疫染色を行った。



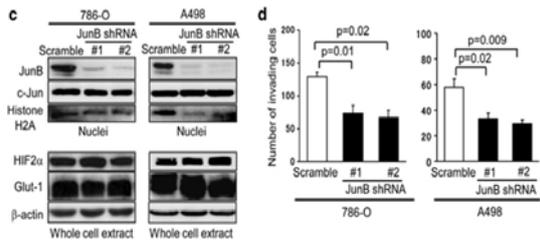
VHL 変異を有する淡明型腎細胞癌症例では VHL 野生型症例に比べ JunB の発現増強を認められた。

②腎癌細胞株 786-0/A498 に野生型 VHL や HIF を発現した subclone で JunB の発現と浸潤能評価した。

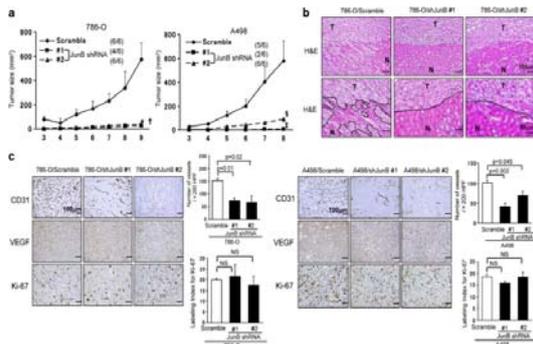


JunB の発現、浸潤能共に HIF-independent に制御されている可能性が示唆された。

③JunB 高発現株である 786-0/A498 において short hairpin RNA (shRNA) を用いて JunB knockdown 細胞を作成した。In vitro では細胞浸潤能の低下を認めた。

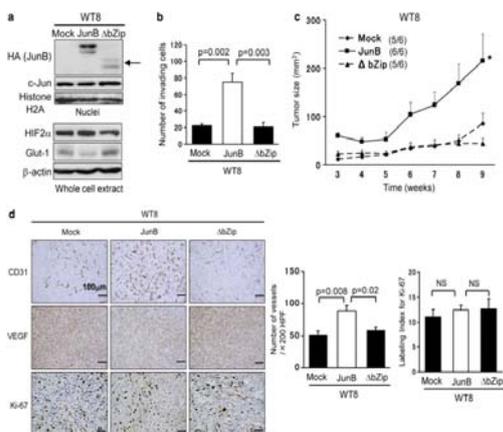


In vivo における JunB の機能を評価するため、JunB knockdown 細胞を用いてヌードマウス皮下移植モデルおよび腎被膜下移植モデルを作成した。



JunB knockdown により皮下移植モデルにおける腫瘍増生と血管新生、腎被膜下移植モデルにおける腫瘍細胞の腎実質への浸潤がいずれも著明に抑制された。しかし、腎細胞癌の主要な血管新生因子である VEGF の発現の変化は認めなかった。

④さらに、786-0 に野生型 VHL を安定発現させた細胞 (WT8) に JunB を強制発現すると、in vitro での細胞浸潤能、in vivo での腫瘍増生と血管新生が共に増強された。



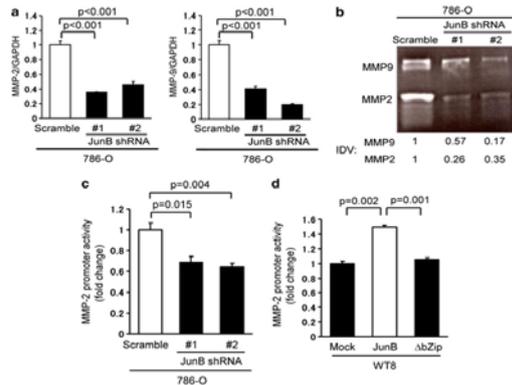
以上により、JunB は VHL 遺伝子不活化を有する淡明型腎細胞癌の血管新生や浸潤を制御していることが示唆された。

(2) JunB 下流エフェクターの検索とその解析

① JunB が制御する遺伝子を探索するため、786-0 JunB knockdown 細胞と control 細胞を用いて、血管新生と細胞外マトリックスに関する PCR array を行った。

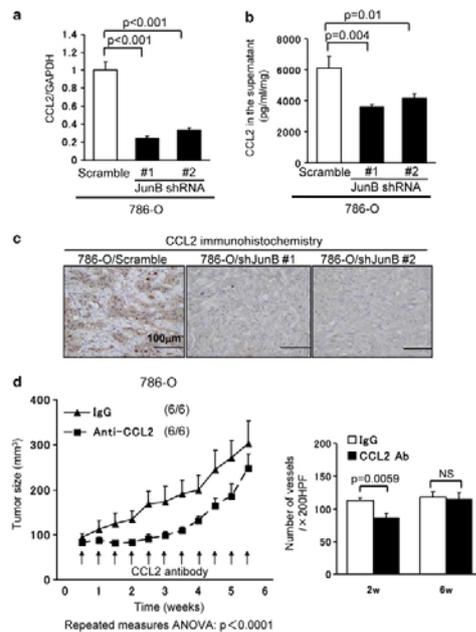
その結果、MMP-2/9 および CCL2 を候補分子として同定し、さらにそれらについて解析を行った。

② 786-0/A498 JunB knockdown 細胞を用いて、MMP-2/9 および CCL2 について解析を行った。



MMP-2/9 に関して、蛋白活性や in vivo での活性低下を確認した。

また、CCL2 蛋白の発現量低下は ELISA で確認され、786-0 ヌードマウス皮下移植モデルに CCL2 中和抗体を投与すると、腫瘍増殖と血管新生が抑制された。



Repeated measures ANOVA: $p < 0.0001$

いずれの結果も、JunB knockdown 細胞の解析と同様の結果であり、JunB の下流エフェクターとして MMP-2/9 や CCL2 が作用し、浸潤・血管新生に関与するものであるとの示唆が得られた。

以上の結果より、JunBはVHL遺伝子不活化を有する腎細胞癌の血管新生や浸潤を制御しており、その下流エフェクターとして、MMP-2/9 やCCL2などの浸潤・血管新生に関与する遺伝子が同定された。

進行性腎細胞癌に対する VHL-HIF-VEGF を標的とした既存の分子標的薬治療の効果が十分でない現状において、これとは全く別の経路である VHL-JunB 経路における MMP-2/9 や CCL2 などの分子が腎細胞癌の血管新生や浸潤に対する新規分子標的となる可能性が示唆された。

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1件)

T. Kannno, T. Kamba (2番目), O. Ogawa (12番目), et. al

JunB promotes cell invasion and angiogenesis in *VHL*-defective renal cell carcinoma.

Oncogene. 2011 Oct 24. , 査読有

doi: 10.1038/onc.2011.475. [Epub ahead of print]

[学会発表] (計3件)

①T. Kannno, T. Kamba, O. Ogawa, et. al

JunB promotes cell invasion and angiogenesis in *VHL*-defective renal cell carcinoma.

10th Asian Congress of Urology, 30 Aug 2010, Taipei

②寒野、神波、小川ほか

JunBはVHL遺伝子変異を有する腎細胞癌において浸潤能と血管新生を制御する

第98回日本泌尿器科学会総会、2010年4月28日、盛岡

③Upregulation of JunB by the inactivation of pVHL induces angiogenesis and promotes tumor growth via MMP-2 in RCC.

第68回日本癌学会学術総会、2009年10月2日、横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神波 大己 (Tomomi Kamba)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20402836

(2) 研究分担者

小川 修 (Osamu Ogawa)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90260611