

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462399

研究課題名(和文)腎細胞癌の発生と肉腫様変化におけるRAC2-VAV1シグナルの役割

研究課題名(英文)The roles of RAC2-VAV1 signaling in oncogenesis and sarcomatoid differentiation of renal cell carcinoma

研究代表者

小島 崇宏 (Kojima, Takahiro)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：40626892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：淡明型腎細胞癌組織におけるVAV1遺伝子発現を定量PCRにより検討した。淡明型腎細胞癌ではVAV1発現が亢進していた。しかしながら、腎癌細胞株に対してVAV1遺伝子発現抑制を行ったが、細胞増殖と浸潤は抑制されなかった。そこで、新たにRAC2のGEFであるPLD2に着目して研究を行った。淡明型腎細胞癌組織におけるPLD2タンパク発現を免疫化学染色により検討した。PLD2高発現症例は低発現症例と比較して有意に予後が不良であった。腎細胞株に対してPLD2遺伝子発現抑制を行ったところ、細胞増殖と浸潤が抑制された。これらの結果から、PLD2が淡明型腎細胞癌の新たな治療標的になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the expression of VAV1 in samples of patient with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) by Quantitative RT-PCR. The mRNA expressions of VAV1 were elevated in ccRCC. However, cell proliferation and invasion were not suppressed by VAV1 knockdown in renal cancer cell lines. Therefore, we next focused on PLD2 as the guanine nucleotide exchange factor of RAC2. We evaluated the expression of PLD2 in samples of patient with ccRCC by immunohistochemical staining. The high expression of PLD2 was significantly associated with a poorer prognosis in patients with ccRCC. Moreover, cell proliferation and invasion were suppressed by PLD2 knockdown in renal cancer cell lines. These results suggest that PLD2 may become a new target of therapy for ccRCC.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌 低分子量Gタンパク 肉腫様腎細胞癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 肉腫様腎細胞癌は、すべての組織型に合併し、腎細胞癌の最も異型度の高い最終的な表現型と考えられている。ゲムシタピンとドキシソルピシンを用いた化学療法が一定の効果を示すものの、その有効性は 10 - 20% 程度と低い (Expert Reviews 2011; 11: 913)。したがって、肉腫様腎細胞癌に特異的なシグナル伝達異常に基づいた新たな治療標的分子の同定と治療の開発が急務である。

(2) 網羅的遺伝子発現解析の結果から、肉腫様腎細胞癌では上皮系に特異的な遺伝子の発現が低下し、間葉系に特異的な遺伝子の発現が亢進しており、EMT が生じていることを報告した (American Urology Association 2010 Annual Meeting)。さらに、Small G タンパク RAC2 とその活性化因子である VAV1 の発現が非癌部と比較し、淡明型腎細胞癌で亢進しており、肉腫様腎細胞癌ではさらに著明に亢進していることを明らかにした。

(3) RAC-VAV シグナルの活性化は、上皮間葉転換 (EMT) を誘導し、癌の浸潤や転移の亢進に関与することが報告されている (J Clin Invest. 2013;123:4449, Translational Research 2013;162:181)。

(4) 予備実験として、RAC2、VAV1 高発現の腎癌細胞株 skrc-1 において siRNA により RAC2 または VAV1 の遺伝子発現を抑制したところ、RAC2 の抑制により著明な細胞増殖抑制効果が確認された。

2. 研究の目的

本研究では、淡明型腎細胞癌とその肉腫様変化における RAC2-VAV1 シグナルの発現と機能的な役割について検討し、新たな治療標的としての可能性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 淡明型および肉腫様腎細胞癌症例の FFPE を用いて免疫化学染色法により RAC2、PLD2 のタンパク発現を評価し、臨床病理学的因子との関連を検討した。

(2) 淡明型腎細胞癌症例の凍結組織 (癌部、非癌部) を用いて定量 PCR 法により RAC2 の mRNA 発現量を評価し、臨床病理学的因子との関連を検討した。

(3) 腎癌細胞株における RAC2、VAV1、PLD2 の mRNA 発現量を定量 PCR 法により評価した。

(4) 腎癌細胞株に対して siRNA を用い、RAC2、VAV1、PLD2 の発現抑制を行い、細胞増殖、遊走、浸潤能への影響を検討した。増殖は MTT アッセイ、遊走は創傷治癒アッセイ、浸潤はマトリゲルインバージョンアッセイを用いて評価した。

(5) 腎癌細胞株に対して shRNA レンチウイルスベクターシステムを用い、PLD2 発現抑制株を作成した。ヌードマウス (Balb/c nu/nu) を用いて、皮下移植モデル、腎被膜下移植モデルを作製し、腫瘍増殖・浸潤を評価した。

(6) RAC2 活性は Rac2 Activation Assay Kit (EMD Millipore, 17-369) を用いて評価した。

(7) PCR アレイによる遺伝子発現解析には RT² Profiler human angiogenesis and Extracellular Matrix and Adhesion Molecules PCR Arrays (SA Biosciences) を用いた。

(8) 細胞培養液にアンジオゲニン (ANG) 中和抗体 (R&D Systems, AB-265-NA)、リンコンビナント (R&D Systems, AB-265-AN-050) を添加し、腎癌細胞株における浸潤能への影響を評価した。

(9) 細胞培養液にホスファチジン酸 (DOPA, Avanti Polar Lipids, 840875P) を添加し、定量 PCR 法により ANG の mRNA 発現量の変化を評価した。

4. 研究成果

(1) RAC2、VAV1 の淡明型および肉腫様腎細胞癌における発現について

淡明型腎細胞癌 24 例において RAC2 の mRNA 発現ががん部では有意に亢進していることを定量 PCR 法にて確認した。しかしながら、臨床病理学的因子との関連は認められなかった。免疫化学染色では 48% (20/42 例) の症例でがん部での発現を認めた (図 1)。

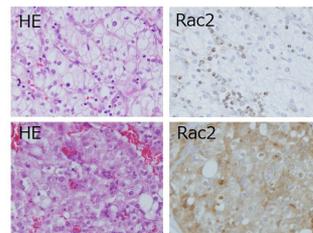


図 1 淡明型腎細胞癌における RAC2 発現

同一症例の淡明型成分と肉腫様成分における RAC2 の発現を免疫化学染色にて評価したが、肉腫様成分における有意な発現亢進は認めなかった。

淡明型腎細胞癌 24 例において VAV1 の mRNA 発現ががん部では有意に亢進していることを定量 PCR 法にて確認した。RAC2 と VAV1 の発現に有意な正の相関が認められた。

腎癌細胞株 (SN12c, SKRC59, ACHN, SKRC52, SKRC1) では 293T (Human embryonic kidney cell line) と比較して RAC2 の mRNA 発現が亢進していることを定量 PCR 法にて確認した。

(2) 腎細胞癌の増殖、浸潤における RAC2-VAV1 シグナルの意義について

腎癌細胞株 (SKRC59, SN12c) を用いて siRNA により RAC2 の発現抑制を行った結果、細胞増殖と遊走能は有意に抑制された(図2, 図3)。

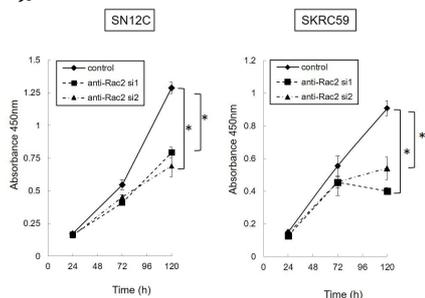


図2 RAC2発現抑制による細胞増殖への影響

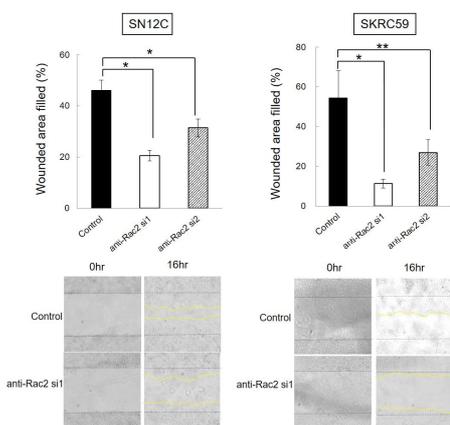


図3 RAC2発現抑制による細胞遊走への影響

腎癌細胞株 (SKRC59, SN12c) を用いて siRNA により VAV1 の発現抑制を行ったが、細胞増殖と遊走能は抑制されなかった。したがって、VAV1 の発現抑制による RAC2 活性の変化を pull-down assay にて評価する予定であったが、断念した。

そこで、RAC2 の GEF として機能する分子として、新たにホスホリパーゼ D2 (PLD2) に着目することとした。PLD2 はホスファチジルコリンをホスファチジン酸に変換する脂質代謝酵素であり、産生されたホスファチジン酸が多彩な生理機能を有することが知られている。一方で最近、乳癌では RAC2 の GEF として機能し、がんの増殖や浸潤を促進することが報告されている (Oncogene 2013; 32: 5551)。さらに、腎細胞癌では PLD2 の発現が亢進しており (Biochem Biophys Res Commun 2000; 278: 140)、以後の研究は腎細胞癌における RAC2-PLD2 シグナルの意義を明らかにすることを目的とした。

(3) 淡明型腎細胞癌における PLD2 の発現について

淡明型腎細胞癌 67 例において PLD2 の免疫化学染色によるタンパク発現を評価した。PLD2 高発現症例では有意に生存期間が短縮した (図4)。

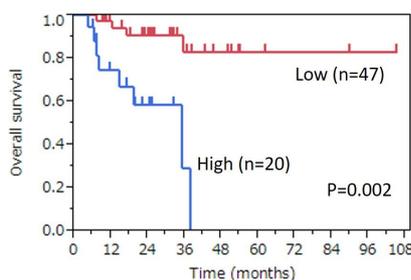


図4 腎細胞癌におけるPLD2発現と生存期間

腎癌細胞株 (SN12c, SKRC52, SKRC59) では 293T (Human embryonic kidney cell line) と比較して PLD2 の mRNA 発現が亢進していることを定量 PCR 法にて確認した。

(4) 腎細胞癌の増殖、浸潤における RAC2-PLD2 シグナルの意義について

腎癌細胞株 (SKRC52, SKRC59) を用いて siRNA により PLD2 の発現抑制を行った結果、細胞増殖と浸潤能は有意に抑制された。

腎癌細胞株 (SKRC52) を用いて shRNA により PLD2 発現抑制株を作成した。皮下移植モデル、腎被膜下移植モデルにて腫瘍増殖と浸潤が抑制された (図5, 図6)。

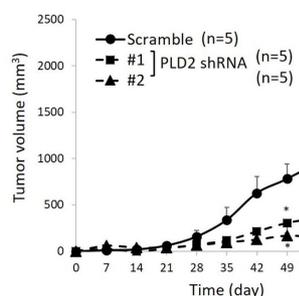


図5 PLD2発現抑制により腫瘍増殖への影響

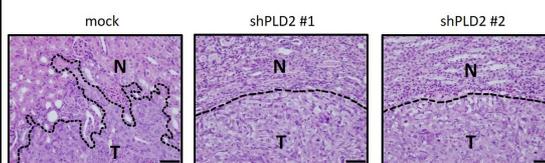


図6 PLD2発現抑制により腫瘍浸潤への影響

PLD2 の発現抑制による RAC2 活性の変化を pull-down assay にて評価した。しかしながら、使用した腎癌細胞株での RAC2 発現をウエスタンブロットで確認できず、断念した。

コントロール株と PLD2 発現抑制株を用い、PCR アレイにより細胞浸潤に関連する遺伝子発現の比較を行った。PLD2 発現抑制株ではコントロール株に比べ、ANG の遺伝子発現が抑制されていた。PLD2 により ANG の遺伝子発現は制御されていると考えられた。

腎癌細胞株 (SKRC52) に対して invitro で ANG の中和抗体を添加すると細胞浸潤は抑制された。一方、ANG リコンビナントを添加すると細胞浸潤が促進した (図7)。

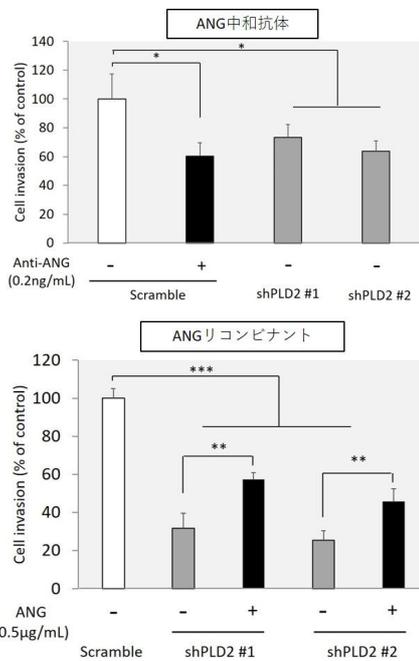


図7 腎癌細胞株におけるANGによる細胞浸潤への影響

PLD2 発現抑制株 (SKRC52) に対して *in vitro* でホスファチジン酸を添加すると ANG の mRNA 発現が亢進した (図8)。

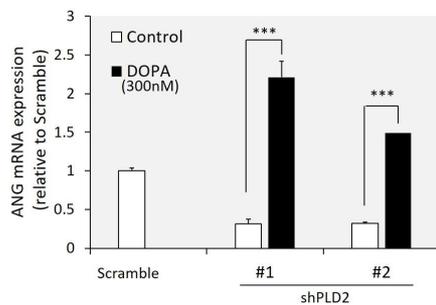


図8 フォスファチジン酸の添加によるANGの発現変化

本研究の成果から、腎細胞癌において PLD2 が細胞増殖や浸潤を促進し、がんの進展に寄与することが示唆された。また、PLD2 が ANG の遺伝子発現を制御することにより細胞浸潤を促進するという新たな知見を得ることができた。今後は、腎細胞癌の新たな治療標的としてなり得るか、PLD2 阻害剤を用いて研究を進める予定である。

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7件)

Usui J, Yokoyama C, Hagiwara M, Hirayasu K, Kojima T, Yoshino T, Nishiyama H, Hara M, Yamagata K. The Detection of Urinary Podocytes from Drug-Induced Glomerular Thrombotic Microangiopathy in Advanced Cancer Patients. Clin Lab. 2016 Dec 1;62(12):2413-2417. doi:

10.7754/Clin.Lab.2016.160525. 査読有
 Kurobe M, Kojima T, Nishimura K, Kandori S, Kawahara T, Yoshino T, Ueno S, Iizumi Y, Mitsuzuka K, Arai Y, Tsuruta H, Habuchi T, Kobayashi T, Matsui Y, Ogawa O, Sugimoto M, Kakehi Y, Nagumo Y, Tsutsumi M, Oikawa T, Kikuchi K, Nishiyama H. Development of RNA-FISH Assay for Detection of Oncogenic FGFR3-TACC3 Fusion Genes in FFPE Samples. PLoS One. 2016 Dec 8;11(12):e0165109. doi: 10.1371/journal.pone.0165109. 査読有
Kojima T, Kawai K, Miyazaki J, Nishiyama H. Biomarkers for precision medicine in bladder cancer. Int J Clin Oncol. 2017 Apr;22(2):207-213. doi: 10.1007/s10147-016-1068-8. 査読有
 Takaoka EI, Miyazaki J, Ishikawa H, Kawai K, Kimura T, Ishitsuka R, Kojima T, Kanuma R, Takizawa D, Okumura T, Sakurai H, Nishiyama H. Long-term single-institute experience with trimodal bladder-preserving therapy with proton beam therapy for muscle-invasive bladder cancer. Jpn J Clin Oncol. 2017 Jan;47(1):67-73. doi: 10.1093/jjco/hyw151. 査読有
 Matsuoka T, Kawai K, Ando S, Sugita S, Kandori S, Kojima T, Miyazaki J, Nishiyama H. DNA methyltransferase-3 like protein expression in various histological types of testicular germ cell tumor. Jpn J Clin Oncol. 2016 May;46(5):475-81. doi: 10.1093/jjco/hyw012. 査読有
Kojima T, Kawai K, Tsuchiya K, Abe T, Shinohara N, Tanaka T, Masumori N, Yamada S, Arai Y, Narita S, Tsuchiya N, Habuchi T, Nishiyama H. Identification of a subgroup with worse prognosis among patients with poor-risk testicular germ cell tumor. Int J Urol. 2015 Oct;22(10):923-7. doi: 10.1111/iju.12844. 査読有
 Ando S, Matsuoka T, Kawai K, Sugita S, Joraku A, Kojima T, Suetomi T, Miyazaki J, Fujita J, Nishiyama H. Expression of the oncoprotein gankyrin and phosphorylated retinoblastoma protein in human testis and testicular germ cell tumor. Int J Urol. 2014 Oct;21(10):992-8. doi: 10.1111/iju.12484. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

神島周也, 小島崇宏, 松岡妙子, 宮崎淳,

中村英二郎, 西山博之. ホスホリパーゼ D2 の発現亢進は腎癌の進展に關与する. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月, 神奈川県・横浜市
神鳥周也, 小島崇宏, 松岡妙子, 宮崎淳, 中村英二郎, 西山博之. 腎癌におけるホスホリパーゼ D の機能と治療標的としての有用性. 第 104 回日本泌尿器科学会総会, 2016 年 4 月, 宮城県・仙台市
松岡妙子, 神鳥周也, 小島崇宏, 河合弘二, 宮崎淳, 西山博之. 腎細胞癌における Rac2 発現とその機能的役割の検討. 第 103 回日本泌尿器科学会総会, 2015 年 4 月, 石川県・金沢市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 崇宏 (KOJIMA TAKAHIRO)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 40626892

(2) 研究分担者

宮崎 淳 (MIYAZAKI JUN)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号: 10550246

未富 崇弘 (SUETOMI TAKAHIRO)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 10574650

西山 博之 (NISHIYAMA HIROYUKI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 20324642

神鳥 周也 (KANDORI SHUYA)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号: 50707825