

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09140

研究課題名(和文) 淡明細胞型腎細胞癌におけるVBC-Cu12複合体下流の新規治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Exploring novel downstream targets of VBC-Cu12 complex in clear cell renal cell carcinoma

研究代表者

神波 大己 (Kamba, Tomomi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：20402836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト腎細胞癌細胞株786-0の亜株(pRC3、WT8)を用いて3D培養系を確立し、細胞内アルギニン及び/又はリシンを安定同位体ラベルしたpRC3(VHL-)、WT8(VHL+)、WT8にHIF安定化剤(Roxadustat)を添加したものを3D培養し、SILAC法によるプロテオミクス解析を行い、VHL欠損により増加する分子254種を同定した。更にRNAシーケンスを行い、標的候補分子の転写レベルでの発現変化やHIF依存性を併せて検討した。腎細胞癌自体の増殖・生存や患者予後に関与する事から、mTOR関連分子と酸化ストレス関連分子に焦点を当て、pVHL新規標的候補分子として更なる解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎細胞癌は増加傾向を示している癌の一つである。腎細胞癌のうち大部分を占める淡明細胞型腎細胞癌では約80%の症例でVHL遺伝子変異やプロモーターのメチル化が認められ、VHLタンパクの機能喪失が癌化および進展に寄与していることが知られている。現在までにVHLの下流分子である血管内皮成長因子VEGFのシグナル伝達を阻害する分子標的薬が複数臨床応用され、一定の予後改善効果が実証されてきたが、完全奏効することは非常に稀であり奏効してもいずれ抵抗性が獲得される。VEGF以外の腎細胞癌特異的な新規治療標的の同定は新規治療薬の開発、更なる予後改善につながる可能性を秘めており、学術的意義、社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：We have developed three-dimensional culture system using sub-line of human renal cell carcinoma cell line 786-0, namely pRC3 and WT8. To identify novel pVHL target proteins, we performed SILAC (Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture) with pRC3(VHL-), WT8 (VHL+), WT8+HIF stabilizer(Roxadustat) cultured in 3D. The expression levels of 254 proteins were elevated by VHL deficiency. In addition, RNA sequencing was performed to investigate the transcriptional expression changes and HIF dependency of the candidate target molecules. Among the candidate molecules, we focused on mTOR-related molecules and oxidative stress-related molecules because they are involved in the proliferation and survival of RCC cells and the prognosis of patients, and are now conducting further analysis of these molecules as new candidate targets of pVHL.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：腎癌 VHL 新規標的分子 3次元培養 質量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

von Hippel-Lindau(VHL)遺伝子の欠失・変異による下流シグナルの異常活性化は淡明細胞型腎細胞癌発生の主要なメカニズムである。VHL 遺伝子の産物 pVHL は、elonginB/C, Cullin2, Rbx1 とともに VBCul2 複合体を形成し、ユビキチン・リガーゼとして機能することが知られている。その代表的な標的は HIF1/2-^α である。正常酸素状態では VBC-Cul2 複合体により HIF1/2-^α はユビキチン化され、プロテアソームにより分解される。低酸素状態では HIF が蓄積し、転写因子としての機能を発揮する。腎細胞癌で最も頻度の高い淡明細胞型腎細胞癌(ccRCC)では約 90%に VHL 遺伝子異常を認める(Nickerson et al., Clin Cancer Res. 2008)。結果として正常酸素分圧下でも HIF1/2-^α の異常蓄積が生じ、VEGF などの標的遺伝子を恒常的に発現する。このメカニズムに基づき、VEGF-VEGFR シグナル経路を標的とした分子標的薬(VEGFR-TKI)が開発され、進行性腎細胞癌治療へと臨床応用されている。VEGFR-TKI は、IFN など免疫治療薬を凌駕する薬剤として腎細胞癌薬物療法にパラダイムシフトをもたらしたが、VEGFR-TKI の限界(限定的な臨床効果、薬剤抵抗性獲得など)も明らかとなってきた。肺癌に対する EGFR-TKI が肺癌細胞そのものを標的として直接的に腫瘍増殖を抑制しているのに対して、腫瘍細胞自体ではなく腫瘍間質の血管内皮細胞を標的として間接的に腫瘍増殖を抑制している点が VEGFR-TKI の限界の要因として挙げられる。一方で、VBC-Cul2 複合体は HIF 以外にも Spry2、aPKC、Akt などの分子も標的とする事が報告されており、ccRCC における VHL 遺伝子異常の全体像は未解明の部分も残されている。VHL 遺伝子異常が ccRCC の発生・進展の根本的メカニズムであるのならば、VBC-Cul2 複合体の標的として腎細胞癌腫瘍細胞自体の増殖能や浸潤能に直接関わる分子が存在する可能性が大いに考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、ccRCC の発生・進展に關与する VBC-Cul2 複合体の新規標的分子を同定し、淡明細胞型腎細胞癌における発癌・進展メカニズムを明らかにし、腎細胞癌細胞を標的として新規治療標的を探索することを目的とする。ccRCC 細胞株において、正常 VHL 遺伝子を導入することによって発現低下を認める遺伝子を同定する試みはこれまで多くなされてきたが、それらは二次元培養系を用いたものであり、必ずしも生体(3次元)環境を反映してはいない欠点があった。本研究では、VBC-Cul2 複合体の新規標的分子を同定する為の工夫として、より生態環境を反映した 3次元培養系を用いるとともに、微小な発現量の差異を検出可能とするプロテオミクス解析手法を導入する。

3. 研究の方法

(1) 3次元培養条件の最適化

ccRCC 由来の VHL 欠損細胞株 786-0 を親株とした、空ベクター導入株 pRC3 及び VHL 導入株 WT8 を用いてスフェロイド培養を行った。pVHL の標的として既知の HIF α の下流分子の発現レベルを指標としつつ、スフェロイド中心部の低酸素の影響を除外するなど、細胞数や培養時間などの最適化を行った。

(2) プロテオーム解析による標的候補分子の探索

発現差異解析において微細な発現量差の定量性に優れた SILAC(Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture)法を採用した。安定同位体(C13, N15)でラベルされたリシンとアルギニンを含む培養液で6回以上継代する事で、細胞株を Light(12C, 14N), Middle(13C, 14N), Heavy(13C, 15N)の3種に代謝ラベルした。pRC3(Heavy), WT8(Middle), WT8 + Roxadustat(HIF安定化剤)を3次元培養し蛋白質を抽出、SDS-PAGEでサイズ分画をした後にLC-MS解析を行った。

(3) RNA シーケンシングによる網羅的遺伝子発現差異解析

プロテオーム解析と同条件で3次元培養したpRC3及びWT8からRNAを抽出してRNAシーケンシングを行い、網羅的遺伝子発現差異解析を行った。

(4) プロテオームとトランスクリプトームの統合解析と標的候補分子の検証

4. 研究成果

3次元培養においてはスフェロイド中心部の低酸素や低栄養の影響が考えられた。そこで様々な細胞数でスフェロイドを形成し、リアルタイムPCRで低酸素応答遺伝子の発現を2次元培養と3次元培養下で比較検討した。その結果、 2×10^4 等多い細胞数でスフェロイドを形成すると、VHL導入WT8細胞においても2次元培養に比して低酸素応答遺伝子の発現増加が認められ、スフェロイド中心部に低酸素の影響が出てくると考えられた(図1)。

そこでWT8細胞で低酸素応答遺伝子の発現増加を認めない 2×10^3 の細胞数でスフェロイドを形成し、HIF α により転写される既知の下流遺伝子の発現レベルをVHLの有無及び、2次元培養と3次元培養で比較検討した。その結果、3次元培養を行う事によりVHL欠損細胞でHIF標的遺

伝子の発現が劇的に増加する事を見出した。具体的には pRC3 細胞で WT8 に比して VEGFA は 2 次元培養下では 6.9 倍であったものが 3 次元培養下では 124 倍に(図 2A)、Glut1 は 5.4 倍であったものが 140 倍の発現増加を認めた(図 2B)。この結果は、より生理的かつ低酸素の影響を受けない 3 次元培養下で、VHL 欠損の効果により顕著に見られるという新たな発見であるとともに、3 次元培養下でオミクス解析を行う事で pVHL の新規標的分子を探索するという、本研究計画の妥当性を支持するものであった。

SILAC と LC-MS により、3 次元培養された 3 種類の pRC3, WT8, WT8 + Roxadustat サンプルに共通して 3599 種類の蛋白質が同定された。

これらの蛋白質のうち、pRC3 において WT8 に比して 1.5 倍以上有意差を持って発現量が多い蛋白質は 254 種類であった(図 3)。これらの pVHL 標的候補蛋白質に関して、HIF の下流分子を除

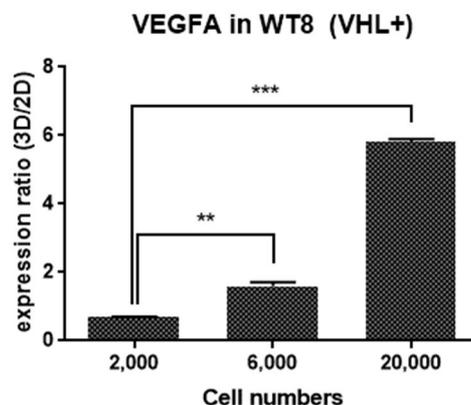


図 2 A VEGFA mRNA

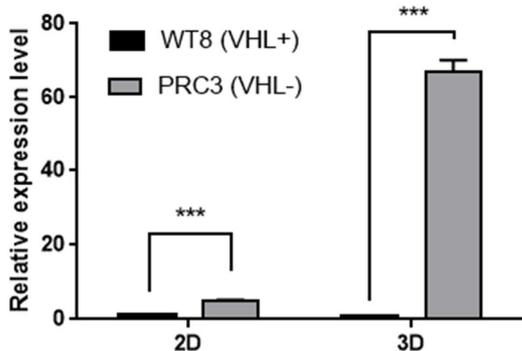
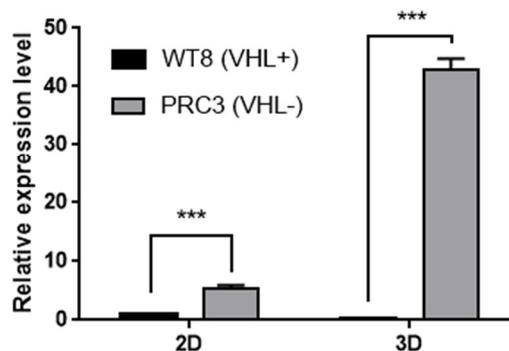
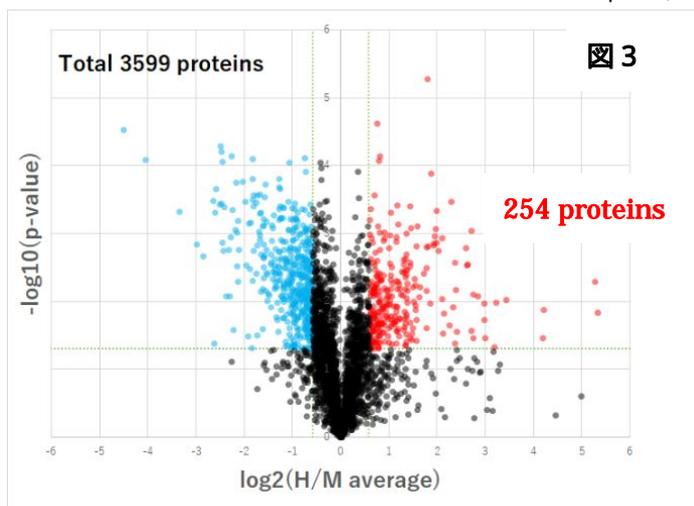


図 2 B Glut1 mRNA



外する目的で、WT8, WT8 + Roxadustat 間で Roxadustat 処理により発現が優位に増加しない蛋白質という条件で、候補蛋白質を絞り込んだ。更に、プロテオーム解析と同条件で培養した pRC3, WT8, WT8 + Roxadustat のサンプルを用いたトランスクリプトーム解析結果より、標的候補分子の転写レベルでの発現変化や HIF 依存性を併せて検討するとともに、腎細胞癌腫瘍細胞自体の増殖能や生存に直接関与しうる分子という観点で、pVHL の新規標的候補分子を mTOR 関連分子と、その発現量が ccRCC の予後と優位に関与する酸化ストレス関連分子に焦点を当てて解析を進めた。引き続きこれら候補分子の pVHL による発現制御機構や ccRCC の発がん・進展に果たす役割についての研究を継続し、新規治療標的としての可能性を検討していく。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	馬場 理也 (Baba Msaya) (10347304)	熊本大学・国際先端医学研究機構・准教授 (17401)	
研究分担者	矢津田 旬二 (Yatsuda Zyunji) (20749626)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師 (17401)	
研究分担者	元島 崇信 (Motoshima Takanobu) (60726355)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教 (17401)	
研究分担者	村上 洋嗣 (Murakami Yoji) (70735703)	熊本大学・病院・助教 (17401)	
研究分担者	荒木 令江 (Araki Norie) (80253722)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------