

平成21年6月11日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590167
 研究課題名 (和文) プロテオーム解析に基づく腎臓癌の新規診断法の確立
 研究課題名 (英文) Proteomic analysis to discover diagnostic markers in human renal cell carcinoma
 研究代表者
 奥村 勝彦 (OKUMURA KATSUHIKO)
 姫路獨協大学・薬学部・教授
 研究者番号：60025707

研究成果の概要：

腎臓癌の新規診断マーカー・創薬ターゲットの探索を目指し、プロテオーム解析により腎臓癌の高発現しているタンパクを同定した。そこで、患者の手術前および手術後1、2、4および12週間後の血漿サンプルを得た。また数種のタンパクのELISA測定系を確立した。今後、診断マーカーを確立する予定である。さらに数種のタンパクについて腎臓癌細胞株においてノックダウンさせた結果、癌の増殖・転移に重要なVEGFの発現を変動させることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：臨床薬理学

科研費の分科・細目：6806

キーワード：プロテオーム解析、2-nitrobenzenesulfonyl、腎臓癌、診断マーカー、創薬ターゲット

1. 研究開始当初の背景

近年、疾患の発症や、予後、治療効果の予測を行うための、バイオマーカーの探索方法として、プロテオーム解析が注目を浴びている。従来、二次元電気泳動法とペプチドマスフィンガープリンティング法を組み合わせた解析によるプロテオーム解析が行われてきたが、検出できるタンパクが限られること、さらには定量性が問題であり、発現量の差を網羅的に検討することが困難であった。同位体標識法 (Isotope coded affinity tag;

ICAT法) は、同位体元素によりタンパクのシステイン残基を修飾してから処理を行うため、マスによる解析により、比較的容易に発現量の差を検出することが可能となった。さらに、同位体標識試薬として¹²Cおよび¹³Cで合成された2-nitrobenzenesulfonyl chloride (NBS) を用い、タンパクのトリプトファンを修飾することにより、効率よく定量的プロテオーム解析を行う方法を島津製作所が開発した。

そこで、腎臓癌の新規診断マーカー・創薬ターゲットの探索を目指し、外科的切除によ

り採取した腎臓癌試料とその周辺部位の正常試料とを用い、疾患プロテオーム解析を行った。その結果、100種類以上のタンパク質が発現変動していることを明らかにした（特許出願中；特願 2006-251615）。その一部は、活発な増殖活性に基づく解糖系酵素の発現上昇であったが、その他にも免疫活性やアポトーシス関連のタンパクの発現変動が認められた。

腎臓癌は、他の癌に比べ、放射線療法や化学療法の奏効率が極めて低く、外科的切除が標準療法となっている。しかし、遠隔転移の認められる腎臓癌では、外科的切除が行われるものの、5年生存率は10%と以下と非常に予後が悪い。したがって、早期発見、早期切除が基本となる。しかし適切な診断マーカーが存在しない現在、30%程度の患者では発見時にすでに遠隔転移を起こし、予後不良の患者となっている。したがって、診断マーカーの確立は、早期発見を容易にし、ひいては腎臓癌による死亡率を激減させる有用な手段となりえる。

また、腎臓癌は他の固形癌に比べ、放射線療法や化学療法に対して抵抗性を示すことが知られているが、近年、血管新生に重要な役割を果たしている Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) を阻害する分子標的薬、すなわち抗 VEGF 抗体や VEGF-tyrosine kinase 阻害剤が有意な生存期間の延長が認められている。しかし、奏効率そのものがそれほど高くなく、また重篤な副作用も問題となっている。したがって、新たな創薬ターゲットの確立は、遠隔転移患者に対して有用な治療手段を与えるものであり、さらなる生存期間の延長をもたらすものである。

そこで、腎臓癌の早期発見、あるいは外科的切除による治療効果の確認を可能とするための新規診断マーカーならびに有用な創薬ターゲットの探索を目指した。

2. 研究の目的

(1) 診断マーカーの確立

腎臓癌の癌部に高発現しているタンパクが、腎臓癌の診断マーカーとなり得るかについて検討を行う。すなわち、腎臓癌患者の血漿試料におけるタンパク濃度を検討することにより、診断マーカーとしての妥当性の検証を目的とした。すなわち、新規に腎臓癌と診断された患者の手術前、手術後1、2、4および12週間後の血漿試料を採取し、腎臓癌の有無、あるいは予後とタンパク濃度の関連を検討する。タンパク濃度は Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) による血漿中濃度測定系の確立を目指した。

(2) 創薬ターゲットの探索

プロテオーム解析により高発現しているタンパクのうち、癌の増殖、アポトーシスなどに関与していることが知られているタンパク、あるいは機能が未知のタンパクについて、腎臓癌細胞株における増殖・転移能などの機能を詳細に検討することにより、その創薬ターゲットとしての可能性を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 診断マーカーの確立

① 血漿試料の収集

文書による同意を得た患者から、手術前、および手術後1、2、4、12週間後に採血を行い、直ちに遠心して血漿試料を得た。

② ELISA 分析系の確立

プロテオーム解析結果から得られた候補タンパク質において、定法にしたがい、抗体を作成した。また96 well plate に固着させることにより、ELISA 分析系を確立した。

(2) 創薬ターゲットの探索

プロテオーム解析により得られた候補タンパク質に対する small interfering RNA (siRNA) を設計し、腎臓癌細胞株 786-O、ACHN、Caki-1 細胞に導入し、ノックダウン細胞を得、VEGF の発現量を測定することにより、細胞増殖に影響があるかどうか検討した。

4. 研究成果

(1) 診断マーカーの確立

① 血漿試料の収集

予定よりエントリーする患者数が少なかったが、現在、12名の患者から手術前および手術後の血漿試料を採取することに成功し、次に候補タンパク濃度の測定予定である。

② ELISA 分析系の確立

プロテオーム解析結果から癌部において発現変動の認められたタンパクのうち、今回は発現上昇の認められたタンパクを候補とした。また、その分子量や知られている機能などから、血清での検出が可能でありそうなもの、あるいは新規性の観点から12種類のタンパクを選択した。それぞれ定法に従い抗体を作成し、ELISA 測定用の Plate を作成した。標準タンパク質を用いて、ELISA 測定を行った結果、直線性、特異性を確認することができた。今後、臨床で得られた血漿試料について、測定を行う予定である。

これらの研究を通じて、これまで診断マーカーが皆無である腎臓癌の早期発見、予後診断に有用情報を与えることが期待される。

(2) 創薬ターゲットの探索

癌部に高発現している数種のタンパクに

対する siRNA を設計した。そのうち、腎細胞株 Caki-1 に処理したときの mRNA を Quantitative real time RT-PCR 法にて測定したところ、コントロールの細胞に比較して大きく発現量の低下を認めた siRNA を用いることとした。さらに、siRNA 処理し、ノックダウンさせた結果、癌の増殖・転移な役割を果たしている VEGF の mRNA を測定したところ、発現量の低下を認めた。さらに ELISA 法にて培養液中に分泌された VEGF を測定した結果、分泌量の低下も認めた。したがって、候補タンパク質は、VEGF の発現を通じ、癌の増殖・転移に関して、VEGF の発現を通じて関与していることが示唆された。したがって、これらのタンパクを創薬ターゲットとすることで、腎臓癌の新規治療薬の開発に重要な基礎的知見となると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Nakamura T, Nozu K, Iijima K, Yoshikawa N, Moriya Y, Yamamori M, Kako A, Matsuo M, Sakurai A, Okamura N, Ishikawa T, Okumura K, Sakaeda T. Association of cumulative cyclosporine dose with its irreversible nephrotoxicity in Japanese patients with pediatric-onset autoimmune diseases. *Biol Pharm Bull.* 2007, 30(12):2371-2375. (査読有)
2. Kawakami M, Nakamura T, Okamura N, Komoto C, Markova S, Kobayashi H, Hashimoto N, Okumura K, Sakaeda T. Knock-down of sorcin induces up-regulation of MDR1 in HeLa cells. *Biol Pharm Bull.* 2007, 30(6):1065-1073. (査読有)
3. Okamura N, Masuda T, Gotoh A, Shirakawa T, Terao S, Kaneko N, Suganuma K, Watanabe M, Matsubara T, Seto R, Matsumoto J, Kawakami M, Yamamori M, Nakamura T, Yagami T, Sakaeda T, Fujisawa M, Nishimura O, Okumura K. Quantitative proteomic analysis to discover potential diagnostic markers and therapeutic targets in human renal cell carcinoma. *Proteomics.* 2008, 8(15):3194-3203. (査読有)
4. Yamamori M, Taniguchi M, Maeda S, Nakamura T, Okamura N, Kuwahara A, Iwaki K, Tamura T, Aoyama N, Markova S, Kasuga M, Okumura K, Sakaeda T. VEGF T-1498C polymorphism, a predictive marker of differentiation of colorectal adenocarcinomas in Japanese. *Int J Med Sci.* 2008, 5(2):80-86. (査読有)
5. Sakaeda T, Yamamori M, Kuwahara A, Hiroe S, Nakamura T, Okumura K, Okuno T, Miki I, Chayahara N, Okamura N, Tamura T. VEGF G-1154A is predictive of severe acute toxicities during chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma in Japanese patients. *Ther Drug Monit.* 2008, 30(4):497-503. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1. 寺尾 秀治, 岡村 昇, 白川 利朗, 中村 任, 柴田 敏之, 武中 篤, 藤澤 正人, 後藤 章暢. Effect of sorcin on VEGF expression in renal cell carcinoma. 第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月、横浜。
2. 金子 直樹, 岡村 昇, 増田 太郎, 後藤 章暢, 白川 利朗, 寺尾 秀治, 渡辺 真, 松原 稔哉, 菅沼 一樹, 瀬戸 亮太, 松本 隼, 川上 恵, 山森 元博, 中村 任, 矢上 達郎, 柴田 敏之, 藤澤 正人, 奥村 勝彦, 西村 紀. 腎細胞癌における診断マーカーおよび創薬ターゲット探索のための定量的プロテオーム解析. 日本ヒトプロテオーム機構第 6 回大会、2008 年 7 月、大阪。
3. 川上 恵, 中村 任, 岡村 昇, 寺尾 秀治, 後藤 章暢, 白川 利朗, 藤澤 正人, 山森 元博, 柴田 敏之. Suppression of sorcin mRNA in patients with renal cell carcinoma. 第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月名古屋。
4. Naoki Kaneko, Noboru Okamura, Taro Masuda, Akinobu Gotoh, Toshiro Shirakawa, Shuji Terao, Makoto Watanabe, Toshiya Matsubara, Kazuki Suganuma, Ryota Seto, Jun Matsumoto, Megumi Kawakami, Motohiro Yamamori, Tsutomu Nakamura, Tatsurou Yagami, Toshiyuki Sakaeda, Masato Fujisawa, Katsuhiko Okumura, Osamu Nishimura. Quantitative Proteomic Analysis to Discover Potential Diagnostic Markers and Therapeutic Targets in Human Renal

Cell Carcinoma. 第 81 回日本生化学会、
2008 年 12 月、神戸.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし
Tamura T. VEGF 6-1154A is predictor of severe acute toxicities during chemoradiotherapy for squamous cell carcinoma patient.
Hiroe S, Nakamura T, Okumura K, Okino M, Miki I, Chayabara N, Ohno K, Tamura T. VEGF 6-1154A is predictor of severe acute toxicities during chemoradiotherapy for squamous cell carcinoma patient. J Clin Oncol. 2008; 26(11):1873-1877.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 勝彦 (OKUMURA KATSUHIKO)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：60025707

(2) 研究分担者

岡村 昇 (OKAMURA NOBORU)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60379401

(3) 連携研究者

なし

金子直樹, 岡村昇, 曾田太郎, 藤倉
真章, 白川利則, 寺尾孝彦, 藤原
良徳, 菅原一樹, 菅原太彦, 松
本幸, 村上恵, 山森元樹, 中村任,
大土達郎, 柴田敏之, 藤澤五人, 奥
村勝彦, 西村純, 菅原良徳, おける
腫瘍マーカーおよび腫瘍マーカー
の定量的な測定法の確立. 日本
癌学会. 2008 年 7 月, 大阪.

中村任, 岡村昇, 寺尾孝彦, 藤
原良徳, 白川利則, 藤澤五人,
山森元樹, 柴田敏之, 藤原良徳,
sorcina mRNA 在 patients with renal
cell carcinoma. 第 67 回日本癌学会
総会, 2008 年 10 月名古屋.

Naoki Kaneko, Noboru Okamura, Taro
Masuda, Akinobu Gotoh, Toshiro
Shirikawa, Shoji Terao, Makoto
Watanabe, Toshiya Matsubara, Kazuki
Suganuma, Ryota Seto, Jun Matsumoto,
Megumi Kawakami, Motohiro Yamamoto,
Tetsuya Kakumaru, Tatsuo Yagami,
Toshiyuki Sakurada, Masato Fujisawa,
Katsuhiko Okumura, Osamu Nishimura.
Quantitative Proteomic Analysis to
Discover Potential Diagnostic Markers
and Therapeutic Targets in Human Renal

癌細胞. 腫瘍マーカーの定量的な測定法の確立. 日本癌学会. 2008 年 7 月, 大阪.
Kaneko N, Okamura N, Gotoh A, Shirakawa T, Terao S, Kaneko K, Suganuma K, Watanabe M, Matsubara T, Seto R, Matsumoto J, Kawakami M, Yamamoto M, Kakumaru T, Yagami T, Sakurada T, Fujisawa M, Nishimura O, Okumura K. Quantitative proteomic analysis to discover potential diagnostic markers and therapeutic targets in human renal cell carcinoma. Proteomics. 2008; 8(12):3194-3203. (査読有)
Yamamoto M, Tamiguchi M, Masuda S, Okamura T, Okamura N, Kawabara A. Knock-down of sorcin induces up-regulation of MDR1 in HeLa cells. Biol Pharm Bull. 2007; 30(6):1065-1073. (査読有)
Kawakami M, Nakamura T, Okumura N, Komuro C, Matkova S, Kobayashi H, Hashimoto N, Okumura K, Sakurada T. Knock-down of sorcin induces up-regulation of MDR1 in HeLa cells. Biol Pharm Bull. 2007; 30(12):2371-2376. (査読有)
Okumura K, Sakurada T. Association of cumulative cyclosporine dose with its irreversible nephrotoxicity in Japanese pediatric-onset autoimmune diseases. Biol Pharm Bull. 2007; 30(12):2371-2376. (査読有)
Nakamura T, Nozu K, Iijima K, Yoshikawa N, Moriya Y, Yamamoto M, Kaki A, Matsuo M, Sakurai A, Okumura N, Ishikawa T, Okumura K, Sakurada T. Association of cumulative cyclosporine dose with its irreversible nephrotoxicity in Japanese pediatric-onset autoimmune diseases. Biol Pharm Bull. 2007; 30(12):2371-2376. (査読有)
Zakaev T, Yamamoto T, Okumura T, Hiroe S, Nakamura T, Okumura K, Okino M, Miki I, Chayabara N, Ohno K, Tamura T. VEGF 6-1154A is predictor of severe acute toxicities during chemoradiotherapy for squamous cell carcinoma patient. J Clin Oncol. 2008; 26(11):1873-1877. (査読有)

論文発表数
雑誌論文 (計 5 件)

1. Nakamura T, Nozu K, Iijima K, Yoshikawa N, Moriya Y, Yamamoto M, Kaki A, Matsuo M, Sakurai A, Okumura N, Ishikawa T, Okumura K, Sakurada T. Association of cumulative cyclosporine dose with its irreversible nephrotoxicity in Japanese pediatric-onset autoimmune diseases. Biol Pharm Bull. 2007; 30(12):2371-2376. (査読有)

2. Kawakami M, Nakamura T, Okumura N, Komuro C, Matkova S, Kobayashi H, Hashimoto N, Okumura K, Sakurada T. Knock-down of sorcin induces up-regulation of MDR1 in HeLa cells. Biol Pharm Bull. 2007; 30(6):1065-1073. (査読有)

3. Okumura N, Masuda T, Gotoh A, Shirakawa T, Terao S, Kaneko K, Suganuma K, Watanabe M, Matsubara T, Seto R, Matsumoto J, Kawakami M, Yamamoto M, Kakumaru T, Yagami T, Sakurada T, Fujisawa M, Nishimura O, Okumura K. Quantitative proteomic analysis to discover potential diagnostic markers and therapeutic targets in human renal cell carcinoma. Proteomics. 2008; 8(12):3194-3203. (査読有)

4. Yamamoto M, Tamiguchi M, Masuda S, Okamura T, Okamura N, Kawabara A. Knock-down of sorcin induces up-regulation of MDR1 in HeLa cells. Biol Pharm Bull. 2007; 30(6):1065-1073. (査読有)