

平成21年 6月16日現在

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2007～2008
課題番号：	19591864
研究課題名(和文)	癌化シグナルを標的とした新規腎細胞癌治療法開発のための研究
研究課題名(英文)	Development of the novel therapies targeting oncogenic signals of renal cell carcinoma
研究代表者	中井川 昇 横浜市立大学・附属病院・准教授
研究者番号	00237207

## 研究成果の概要：

肝細胞成長因子の受容体型チロシンキナーゼである MET 蛋白が腎細胞癌の発癌メカニズムの中で、増殖、生存能、上皮-間葉転換、運動能、血管新生といった様々な step において重要な働きをしていること、この MET 蛋白が腎細胞癌の新規治療標的となることを明らかにしました。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,800,000	540,000	2,340,000
20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：トランスレーショナルリサーチ癌細胞・組織遺伝子 プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

本邦では年間1万人前後の新規腎細胞癌患者が発症すると言われていています。近年の画像診断の発達、普及に伴い、早期の段階で腎癌が発見されるようになり、根治的手術の可能な症例が増えてきました。そのため、腎癌の治療成績は向上してきていますが、手術適応のない腎癌に対するサイトカイン療法の治療成績は十分な数字とは言えず、根治的手術が不可能な進行症例については以前と同

様にその治療が困難であることに変わりありません。

その一方で、ヒト腎癌の発癌メカニズムに関する研究はここ10年間で目覚ましい進歩を遂げていると思われます。その間、私達もヒト腎細胞癌の約8割を占める淡明細胞腎癌の原因遺伝子である癌抑制遺伝子 VHL 遺伝子を同定し、この遺伝子の不活性化が腎癌発生の原因であることを報告してしまし

た。

VHL 遺伝子の産物である VHL 蛋白は、正常細胞内では hypoxia inducible factor (HIF) と呼ばれる血管内皮細胞成長因子(VEGF)、血小板由来成長因子(PDGF)などの蛋白の産生を誘導する転写因子を分解しています。そして、mutation によって VHL 遺伝子の不活性化が生じて正常な VHL 蛋白が作られなくなると、分解されなくなった HIF 蛋白が細胞内に過剰に蓄積します。その結果、VEGF、PDGF といった成長因子が過剰に産生され、血管増殖や間質細胞の増殖が進むことが、腎細胞癌の進行のメカニズムと言われてきました。

しかし、癌細胞が産生する VEGF や PDGF が刺激する対象は癌細胞自身ではなく、周囲の血管内皮細胞や間質細胞ですから、以上の説明では、VHL 遺伝子の不活性化によって癌細胞がなぜ分裂を始めるのか、その後もなぜ自己増殖を繰り返していくのかということとは説明できないままでした。

そこで、私達は腎癌細胞がどのようにして増殖を開始し、それを維持していくのか、そのメカニズムに焦点を当てて研究を続けてきました。増殖に関わる細胞内分子、細胞内シグナル伝達系は無数にありますが、VHL 遺伝子に異常が起きた際に活性化する細胞内情報伝達系蛋白のスクリーニングを試みたところ、VHL 遺伝子の不活性化によって、MET 蛋白と呼ばれる細胞増殖において重要な役割をするチロシンキナーゼの活性が特異的に亢進しており、腎癌細胞の増殖と腫瘍形成にはこの MET 蛋白の活性が不可欠であることが明らかになりました (Nakaigawa N. *Et al. Cancer Res.*66(7):3699-705. 2006)。MET 蛋白とは、細胞表面に存在する受容体型チロシンキナーゼで、通常は肝細胞成長因子(HGF)の刺激によって活性化し、second

messenger を介して細胞の増殖、構造、運動性などを制御しています。人においては幅広い臓器で発現しており、腎臓では尿細管細胞で発現しており、腎臓の発生段階において重要な役割を果たすと考えられています。また、MET 遺伝子の point mutation が、乳頭状腎癌の原因であることを私達は以前に報告してきました。

## 2. 研究の目的

そこでまず、MET 蛋白の活性を直接阻害することで、腎細胞癌の治療が可能であるかを検討します。MET 蛋白によるシグナルを阻害する方法として MET 蛋白の活性部位と結合することによって活性を阻害する small molecule と、MET 蛋白の発現自体を RNA 干渉により阻害してしまう SiRNA を用いる方法があります。既に国内外の製薬会社から幾つかの MET 蛋白に対する特異的阻害剤と SiRNA を入手しており、これらの薬剤の抗癌剤としての評価を細胞レベルで行い、臨床応用が可能となる治療薬を同定したいと考えています。さらに、MET 蛋白の活性化によって引き起こされる下流のシグナル系を明らかにすることで、腎癌の増殖、腫瘍形成能を直接制御するシグナル蛋白を同定し、新たな治療標的を見つけたいと考えています。

現在、腎細胞癌に対する治療として VEGF、PDGF を標的とした治療が注目を集めていますが、その有効期間は1年前後であり、癌の進行を一定の期間制御するに過ぎないことも明らかになりつつあります。これらの分子標的薬は VHL 遺伝子の不活性化により大量に発現してくる VEGF、PDGF を標的としているために、あたかも腎細胞癌の発癌メカニズ

ムそのものを標的にしているかのように思われがちですが、初めに述べたように VEGF、PDGF といった成長因子の標的は癌細胞そのものではありませんから、それらをブロックしても癌細胞そのものが直接死滅する訳ではなく、あくまでも癌の進行を抑える治療に過ぎません。癌細胞自身の増殖シグナルを標的とした治療薬こそが、より効率のよい治療薬になりうると考えています。今回の研究によって腎癌の癌化メカニズムが明らかになれば、淡明細胞型腎癌の発癌の本質が明らかになると同時に、腎癌の新規治療・予防法の開発に繋がると思われます。

### 3. 研究の方法

①MET 蛋白によるシグナルを阻害する方法として MET 蛋白の活性部位と結合することによって活性を阻害する small molecule と、MET 蛋白の発現自体を RNA 干渉により阻害してしまう SiRNA を用いることにより、を用いてその活性を阻害する方法があります。既に国内外の製薬会社から幾つかの MET 蛋白に対する特異的阻害剤と SiRNA を入手しており、これらの薬剤の MET 蛋白活性もしくは発現阻害効果を評価した上で、抗癌剤としての評価を培養細胞レベルで行い、抗癌剤としての可能性を検討します。

②同時に手術検体を用いて実際の腎癌組織中の MET 蛋白活性を測定し、どのような腎癌症例が本治療法の適応となるかの検討を行います。

③MET 蛋白の活性化によって引き起こされる下流のシグナル系の代表的なものとして、MAP kinase、PI3kinase、STAT3 など

細胞増殖、浸潤能を制御することが知られている蛋白が幾つかあります。これらの蛋白がどのような働き、増殖、浸潤を引き起こしているのか、それぞれの蛋白の発現、活性を抑制することにより明らかにします。同時に、今まで同定されていなかった MET 蛋白シグナルの下流シグナルを探索します。

### 4. 研究成果

平成 19 年度の成果として、まず MET 特異的阻害剤である PHA-665752 が濃度依存性に MET 蛋白の活性を阻害することによって、淡明細胞型腎癌細胞の増殖を抑制することを明らかにしました。また同時に、MET 蛋白の発現自体を RNA 干渉により阻害してしまう SiRNA を用いて MET 蛋白の発現を抑制することによっても、腎癌細胞の増殖が抑制されることも明らかにしました。

さらに、手術によって得た実際の淡明細胞型腎癌組織を用いた検討において、病期、悪性度に関わらず、MET 蛋白の発現が約 66% の組織で、活性が約 74% の組織で正常腎組織と比較して、亢進していることを明らかにしました。

以上の知見は、MET 蛋白が淡明細胞型腎癌の治療標的となりうること、これらの薬剤が新たな腎癌の治療薬としての可能性を持つことを示唆すると思われます。

平成 20 年度は、平成 19 年度で得た知見に基づき、MET 蛋白が腎癌の発癌メカニズムの中でどのような働きをしているのか、その詳細を調べたところ、

(1) MET 蛋白の活性化によって腎癌細胞の増殖が誘導されること

(2) MET 蛋白の発現によって apoptosis

が抑制されること

(3) MET 蛋白の活性化によって癌細胞の特徴でもある間葉系マーカーの発現が誘導されること

(4) MET 蛋白の活性化によって癌細胞が運動能を獲得すること

(5) MET 蛋白の活性化によって癌の進行に必要とされる血管新生を誘導する VEGF の産生が亢進すること

を明らかにしました。

以上のように、MET 蛋白は腎癌の発癌メカニズムにおける、増殖、生存能、上皮-間葉転換、運動能、血管新生といった様々な step において重要な働きをしており、新規治療標的となることを明らかにしました。今後は臨床応用に向けて本研究を継続していく予定です。

#### 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 12 件)

Makiyama K, Nakaigawa N, Miyoshi Y, Murakami T, Yao M, Kubota Y. Retroperitoneoscopic nephrectomy in overweight and obese Japanese patients: complications and outcomes. Urol Int. 81(4):427-30. 2008 査読有

Huang Y, Murakami T, Sano F, Kondo K, Nakaigawa N, Kishida T, Kubota Y, Nagashima Y, Yao M. Expression of Aquaporin 1 in Primary Renal Tumors: A Prognostic Indicator for Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. Eur Urol. 2008 査読有

Makiyama K, Nakaigawa N, Miyoshi Y, Murakami T, Yao M, Kubota Y. Improvement on parenchymal suturing technique in laparoscopic partial nephrectomy. Int J Urol 15(9):854-5. 2008 査読有

Yao M, Huang Y, Shioi K, Hattori K, Murakami T, Sano F, Baba M, Kondo K, Nakaigawa N, Kishida T, Nagashima Y, Yamada-Okabe H, Kubota Y. A three-gene expression signature model to predict clinical outcome of clear cell renal carcinoma. Int J Cancer. 123(5):1126-32 2008 査読有

中井川昇 岸田健 矢尾正祐 窪田吉信  
非淡明細胞の臨床はどう変化する  
Urology Review 6(4) p78-84 2008 査読無

矢尾正弘 中井川昇 近藤慶一 岸田健  
これからはじまる進行腎がんに対する分子標的薬治療 - VHL を中心に Urology Review 6(4) p23-29 2008 2008 査読無

Murakami T, Sano F, Huang Y, Komiya A, Baba M, Osada Y, Nagashima Y, Kondo K, Nakaigawa N, Miura T, Kubota Y, Yao M, Kishida T: Identification and characterization of Birt-Hogg-Dubé associated renal carcinoma. J Pathol. 211: 524-31. 2007 査読有

Minamimoto R, Yamanaka S, Kawamoto M, Endoh M, Nishito R, Yoshida K, Nakaigawa N, Yao M, Kubota Y, Inoue T: High FDG uptake

on oncocytoma located in the retroperitoneum mimicking malignancy. Clin Nucl Med. 32:582-3. 2007 査読有

Yao M, Huang Y, Shioi K, Hattori K, Murakami T, Nakaigawa N, Kishida T, Nagashima Y, Kubota Y: Expression of adipose differentiation-related protein: a predictor of cancer-specific survival in clear cell renal carcinoma. Clin Cancer Res. 13:152-60. 2007 査読有

槇山和秀 中井川昇 三好康秀 村上貴之 矢尾正祐 窪田吉信: 小径腎癌に対するマイクロ波組織凝固装置使用、無阻血、後腹膜鏡下腎部分切除術の検討 Jpn J Endourol ESWL 20: 84-88 2007 査読有

Umemoto S, Miyoshi Y, Nakaigawa N, Yao M, Takebayashi S, Kubota Y: Distinguishing splenosis from local recurrence of renal cell carcinoma using a technetium sulfur colloid scan. Int J Urol. 14: 245-7. 2007 査読有

Sugiura S, Makiyama K, Nakaigawa N, Yao M, Kubota Y, Oshiro H: Collecting duct carcinoma producing granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF). Int J Urol. 14: 555-7. 2007 査読有

[学会発表] (計 6件)

Nakaigawa N, WadaT, Ishiguro H, Sano F, Yao M, Kubota Y , and Christensen JG, c-MET as a molecular target for novel clear cell renal carcinoma therapy Keystone symposia Steamboat 2008 March

中井川昇 佐野太 和田朋子 岸田健 矢尾正祐 窪田吉信 MET蛋白シグナルを標

的とした腎細胞癌に対する新規治療の検討 第96回日本泌尿器科学会総会 横浜 2008年4月

Nakaigawa N, WadaT, Ishiguro H, Sano F, Yao M, Kubota Y , and Christensen JG, c-MET as a molecular target for novel clear cell renal carcinoma therapy AACR 99<sup>th</sup> Annual Meeting SanDiego 2008 April

中井川昇 パネルディスカッション9 症例より学ぶ—腎がん 集合間症例と骨転移を伴う症例 第73回日本泌尿器科学会東部総会 東京 2008年9月

Nakaigawa N, WadaT, Ishiguro H, Sano F, Yao M, Kubota Y , and Christensen JG, c-MET as a molecular target for novel clear cell renal carcinoma therapy 第67回日本癌学会学術総会 名古屋 2008年10月

中井川昇: 分子標的治療時代におけるサイトカイン療法 第95回日本泌尿器科学会総会教育セミナー(2007年)

[図書] (計 2件)

①矢尾正祐 中井川昇 1. RCC発生のメカニズム Year Book of RCC 2008 メディカルレビュー社 2008

②矢尾正祐 中井川昇 岸田健 新しい診断と治療のABC-腎癌・膀胱癌 腎癌 病因特に分子腫瘍学について 気原和徳 最新医学社 16-25 (2007)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中井川昇 (NAKAIGAWA NOBORU)  
横浜市立大学・附属病院・准教授  
研究者番号 00237207

### (2) 研究分担者

矢尾正祐 (YAO MASAHIRO)  
横浜市立大学・医学研究科・准教授  
研究者番号 00260787

岸田健 (KISHIDA TAKESHI)  
横浜市立大学・附属病院・准教授  
研究者番号 60254166

### (3) 連携研究者

なし