

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 6 月 15 日現在

機関番号：	22701
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21592054
研究課題名（和文）	HIF1 α 及び 2 α の特異的結合蛋白による腎細胞癌の増殖能と治療感受性の変化の解析
研究課題名（英文）	Analysis of the effect for proliferation & therapeutic sensitivity according to specific binding protein for each hypoxia-inducible factor (HIF) 1 α & 2 α
研究代表者	近藤 慶一 (KONDO KEIICHI)
	横浜市立大学・市民総合医療センター・准教授
研究者番号	80363836

研究成果の概要（和文）：

（緒言）腎細胞癌株及び臨床検体では Hypoxia Inducible Factor (HIF) α サブユニット（1 α および 2 α ）の発現パターンが異なることが知られています。構造的には非常に近似しているサブユニットなのですが、どのような機能の相違を有しているのかは明確になっておりません。そこでこのテーマを検討するために、それぞれのサブユニットに対して特異的に結合する蛋白を検索することを目的として実験を行いました。

（方法）VHL が正常に発現されており、さらに HIF1 α 及び HIF2 α の双方を低酸素環境で発現しうる腎細胞癌株として ACHN 及び SN12C の細胞株の抽出液からそれぞれの HIF α サブユニットに対する免疫沈降を行いました。HIF α と共沈降してきた蛋白を SDS-PAGE で分離し、銀染色を用いて発現量を比較しました。

（結果と今後の展開）コントロール抗体に対して発現の違いが見られるバンドが複数種検出されており、この結果を 2 次元電気泳動にかけて確認しました。

その結果を元にゲルから目的とするスポットを切り出して質量分析を試みたのですが、ゲル内に含まれている蛋白の量が多量にも微量で、信頼のおける解析結果がまだ得られておりません。同定されていない以上、この蛋白の細胞内での発現量を増加させることはできませんので、現在は HIF α とこの蛋白の親和性を増強させることを考えております。具体的には培養条件を変化させて HIF1 α と 2 α がそれぞれ有為に発現するような環境を選び出し、その条件下での細胞抽出液を用いて親和性の変化を検証しているところです。

研究成果の概要（英文）：

(Introduction) Renal cell carcinoma specimens show variable staining pattern of hypoxia-inducible factor (HIF) 1 α & 2 α . HIF1 α & 2 α have high homology, but different function. So far, it has not been clear what kind of function these proteins have specifically. To clarify this point, we search specific binding proteins for each HIF α .

(Materials & Methods) We extract proteins from renal cell carcinoma cell line ACHN & SN12C, which show normal von Hippel-Lindau (VHL) protein function and express both HIF α s under hypoxic condition, and immunoprecipitated them to find specific binding

proteins with HIF α specific antibodies. Co-immunoprecipitated proteins were dissolved by SDS-PAGE, and expression level compared by silver staining.

(Results & future plans) We could detect several candidate bands, which shows stronger expression compared with samples co-precipitated by control antibody. Next we tried to dissolve them by 2D-electrophoresis and picked up candidate spots to do mass-spectrometry analysis. But amount of these proteins were so little and we could not get reliable results, so far. It is unable to amplify these proteins in cancer cells, because we had not yet identified. Now we try to enhance affinity between HIF α s & these proteins. We change culture conditions such as oxygen and/or glucose concentrations to optimize each HIF α expression, respectively and check the affinity under such conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
22年度	1,700,000	510,000	2,210,000
23年度	700,000	210,000	910,000
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：HIF、結合蛋白、低酸素環境、腎細胞癌、治療感受性

1. 研究開始当初の背景

私は泌尿器科医として腎細胞癌の診断と治療を専門としておりますが、この癌にはいまだに手術以外には根本的な治療法が存在していません。進行症例に対してチロシンキナーゼ阻害剤が新たに承認されたものの、作用及び副作用とも満足の得られるものではありません。そのため早期診断のための腫瘍マーカーの探索及び進行症例への治療法の開発を進めていくことが必要不可欠です。

そのためには腎細胞癌の発生/進展過程の解明が必要であると考え、私はまず散発性腎細胞癌の臨床検体を用いて von Hippel-Lindau 腫瘍抑制遺伝子の変異解析を始めました (vhl; 当研究室の矢尾らが米国国立癌研究所の Zbar 博士らとともに同定に

成功した、von Hippel-Lindau 病という淡明型腎細胞癌を発生する遺伝性腫瘍症候群の原因遺伝子)。その結果、淡明型腎細胞癌 (非遺伝性腎細胞癌の7割を占める) の7割以上の症例において vhl の変異/欠失/不活化が検出されました (**Kondo K**, et al. Genes Chromosomes Cancer 2002 May; 34 (1): 58-68)。他の遺伝子についても解析を行いました、いずれも変異の検出率は低く (**Kondo K**, et al. Int J Cancer 2001 Jan 15; 91 (2): 219-224)、これらの遺伝子変異解析の結果からは vhl 遺伝子がコードする蛋白 (VHL) の機能の解明が腎細胞癌の診断/治療法の開発につながるとの確信を得ました。

研究をさらに進めるために、私は米国ダナファーバー癌研究所の Kaelin 博士の研究室

に留学しました。そこで私は共同実験者とともに VHL が他の分子とともに複合体を形成し、標的蛋白質である Hypoxia Inducible Factor α subunit (HIF α) を特異的に選別して能動的な分解に導いていることを明らかにしました (Ivan M, **Kondo K**, et al Science 2001 Apr 20; 292 (5516): 464-468)。HIF α はその名の如く、周囲酸素濃度が低下した際に細胞がその環境に適応するために必須の分子であり、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) や Erythropoietin、Glucose Transporter 1 及び Carboxyl Anhydrase IX などの発現を誘導しています。またダナファーマーでの研究に腎細胞癌株を用いた実験からこの VHL-HIF 経路が淡明型腎細胞癌の発育進展に必要不可欠であることを証明しました (**Kondo K** et al. Cancer Cell 2002 Apr; 1 (3): 237-246 & **Kondo K** et al. PloS Biol 2003 Dec; 1 (3))。現時点で HIF α には 3 つのサブタイプが報告されていますが (1 α / 2 α / 3 α)、HIF1 α と 2 α のみが転写活性能を持つとともに VHL による分解誘導の標的になっており、腎淡明型細胞癌では特に HIF2 α が増殖進展の鍵になっていることを明らかにしました。

その一方で VHL の関与が見られない多くの癌腫においても HIF α は発現誘導が見られており、その発現パターンが予後因子になり得るとの報告もあるのですが、そのほとんどは HIF1 α がメインになっており、腎細胞癌以外では HIF2 α の関与は進行癌の一部に限られています。このように腫瘍の増殖進展に大きな影響を及ぼしている HIF α ですが、ノックアウトマウスを用いた実験からは HIF α は腫瘍の進展にも抑制にも働いているという矛盾した報告が複数出されています。現時点で確認されているだけで HIF α が誘導する遺伝子は百種類を超えるとされており、その内容

も多岐にわたることがこの矛盾の原因の一部となっています。これらの報告から HIF α そのものを診断や治療の標的とするのは困難であると考えています。

以上より私は HIF1 α と 2 α の機能の差に着目して研究を行っています。この分野の研究では、2007 年に myc 原癌遺伝子への作用が HIF1 α と 2 α では反対になっていることが報告されております。また 2008 年の米国癌治療学会では、腎細胞癌への使用が開始されたチロシンキナーゼ阻害薬の効果を予測するマーカーとして HIF1 α と 2 α の発現パターンの違いが有効であるとの報告が見られました。このようにサブタイプの違いが腫瘍の増殖や治療の抵抗性に重大な影響を及ぼすことが明らかにされつつあり、この研究を押し進めることでより選択的な診断／治療標的の発見が期待できると考えています。

2. 研究の目的

腎細胞癌を中心にがん細胞株を用いてそれぞれの分子の機能の違いを解析するために、[1] 両分子に対する結合蛋白質の違いを免疫沈降反応によって検出します。HIF α が遺伝子を誘導するためには遺伝子上流にある制御部位に結合する必要がありますが、この部分への結合を促進あるいは抑制するような因子について検討します。[2] それぞれの分子の発現を抑制したがん細胞株を用いて薬剤あるいは放射線に対する感受性の違いを検討します。腎細胞癌に対し、チロシンキナーゼ阻害薬やインターフェロンを用いて実験を行い、感受性の違いを HIF1 α と 2 α が誘導する分子の違いを検出するための指標とします。

3. 研究の方法

(1) 免疫沈降法による HIF1 α 及び HIF2 α

結合因子の選別

平成20年の癌学会総会で報告した様にそれぞれに特異的に反応する抗体を用いて細胞抽出中の HIF1 α 及び HIF2 α を免疫沈降します。免疫沈降に使用しうる抗体は選別済みですが、沈降反応の最適化を今後行っていく予定です。その際それぞれに結合している蛋白質を、結合状態のまま免疫沈降する課程も最適化する必要があります。この実験には腎細胞癌株の中でも HIF1 α 及び HIF2 α の双方を発現しうる細胞を用います。その際 VHL による影響を除外するために、VHL が正常に発現されている細胞 (ACHN) と VHL を欠失している細胞 (RCC4) を使用します。平成18年度の科学研究助成金の報告で述べた様に、ACHN 細胞株に対してはレトロウイルスシステムを使用して HIF1 α 及び HIF2 α それぞれに対しての強制発現及び発現抑制細胞を樹立してあります。これらの細胞群から細胞抽出液を作製し、上記と同様に免疫沈降を試みることで、選別した結合蛋白が特異的に結合するものであるかどうかを確認します。

(2) 結合蛋白の同定

免疫沈降法により選別した結合蛋白を1次元泳動もしくは2次元泳動のゲルから切り出し、MALDI-TOFなどの質量分析法もしくはN末端アミノ酸配列分析法などを用いて同定します。この部分は当研究室に設備がないため、PROMEGA社などの提供するサービスを利用する予定です。この解析で判明したアミノ酸配列が既知の蛋白であればデータベースから塩基配

列を検索し、未知の蛋白であれば degeneration primer 法により塩基配列及び遺伝子座を決定します。

4. 研究成果

腎細胞癌株及び臨床検体では Hypoxia Inducible Factor (HIF) α サブユニット (1 α および 2 α) の発現パターンが異なることが知られています。構造的には非常に近似しているサブユニットなのですが、どのような機能の相違を有しているのかは明確になっておりません。そこでこのテーマを検討するために、それぞれのサブユニットに対して特異的に結合する蛋白を検索することを目的として実験を行いました。

前段階としてまず HIF1 α および 2 α それぞれに特異的に反応する抗体を用いた免疫沈降の条件を最適化するための予備実験を行いました。以前に癌学会で報告した際に用いたモノクローナル抗体だけではなく、認識部位の異なるモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体も用いてみた結果、腎細胞癌株 (ACHN ; VHL が正常に発現されており、さらに HIF1 α 及び HIF2 α の双方を低酸素環境で発現しうる細胞株) の抽出液からそれぞれの HIF α サブユニットを効率的に免疫沈降させる実験条件を特定することができました。

また ACHN 細胞株を元にレトロウイルスを用いて HIF1 α 及び HIF2 α それぞれを強制発現させた細胞株および shRNA を用いて発現を抑制した細胞株を既に作製し、より HIF α サブタイプの発現パターンの違いを増強させた環境下で、特異的に結合しうる蛋白の同定を試みました。

以上の実験で HIF α と共沈降してきた蛋白を SDS-PAGE で分離し、銀染色を用いて発現量を比較しました。その結果コントロール抗体に対して発現の違いが見られるバンドが複数種検出されており、この結果を2次元電

気泳動にかけて確認しました。

その結果を元にゲルから目的とするスポットを切り出して質量分析を試みたのですが、ゲル内に含まれている蛋白の量があまりにも微少で、信頼のおける解析結果がまだ得られておりません。同定されていない以上、この蛋白の細胞内での発現量を増加させることはできませんので、現在は HIF α とこの蛋白の親和性を増強させることを考えております。具体的には培養条件を変化させて HIF1 α と 2 α がそれぞれ有為に発現するような環境を選び出し、その条件下での細胞抽出液を用いて親和性の変化を検証しているところです。

またこの研究テーマを決定した後に発表された HIF α と mTOR の相互関連についても、分子標的薬として実用化されている薬剤の標的として関連深いことから、上記の発現抑制細胞株を用いて mTOR 経路にどのように影響が有るのかをウエスタンブロットで検討しております。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- 1) 近藤 慶一: HIF1 α 及び HIF2 α による腎細胞癌増殖制御機構における mTOR 経路の関与, 第 69 回日本癌学会総会, 大阪, 2010
- 2) 近藤 慶一: mTOR 阻害薬は低酸素及び低栄養状態の細胞にも増殖抑制効果を示す, 第 70 回日本癌学会総会, 名古屋, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 慶一 (KONDO KEIICHI)
横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授
研究者番号: 80363836

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: