

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5月15日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791477

研究課題名（和文） 腎細胞癌における PHD3 の機能解析および臨床応用のための研究

研究課題名（英文） Functional analysis and clinical application of PHD3 in renal cell carcinoma

研究代表者

田中 俊明 (TANAKA TOSHIAKI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：50398327

研究成果の概要（和文）：

VHL 遺伝子変異腎細胞癌細胞株では正常酸素下で PHD3 が安定して発現していたが、VHL 野生型株 Caki-1 では正常酸素下で細胞密度が低い状態でのみ発現が亢進していた。Caki-1 における PHD3 の発現は PI3k 阻害剤であるおよび mTOR 阻害剤により阻害された。以上より Caki-1 における PHD3 発現は PI3k/Akt/mTOR 系路に依存していることが分かった。また、PHD3 の発現は HIF-1/HIF-2 ダブルノックダウンにおいても PHD3 の発現に変化は見られなかったことから、Caki-1 における PHD3 発現は HIF に依存しないことが分かった。また、Caki-1 PHD3 ノックダウンにより、in vitro で細胞増殖が増進する事が明らかとなった。SMKT-R2, SMKT-R3 においても同様の結果が得られた。また ACHN では通常 PHD3 の発現が見られないが、PHD3 強制発現株では細胞増殖が低下していた。以上から PHD3 は HIF に非依存性に細胞増殖抑制作用を有することが明らかとなった。従来 PHD3 は HIF の機能を制御する水酸化酵素として知られてきたが、本研究により新たな発現系路、および機能が明らかとなった。腎細胞癌症例における免疫染色による検討でも、PHD3 発現症例は無再発生存率が有意に良好であった。

腎細胞癌患者 22 例の血清での検討では、術前の抗 PHD3 抗体価は 0.610 ± 0.023 であり、健康者に比し有意に高値であった。腎細胞癌患者 17 例の術前後の比較では全例で抗 PHD3 抗体価の減少を認めた。PHD3 は腫瘍抗原として腎細胞癌患者免疫系に認識されており、その抗体価は同一個体において腫瘍体積を反映している可能性があり、血清腫瘍マーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

VHL gene-mutant cell lines of renal cell carcinoma (RCC), SMKT-R2 and SMKT-R3 had stable overexpression of PHD3. In Caki-1, a VHL-wild type RCC cell line, PHD3 expression was induced in the non-confluent state. In Caki-1, in the nonconfluent state, the PI3K/Akt/mTOR pathway was activated, and inhibition of the pathway with LY294002 reduced PHD3 expression. Even in HIF-1 α /2 α double-knockdown Caki-1, activation of the PI3k/Akt/mTOR pathway induced overexpression of PHD3. In addition, PHD3 siRNA promoted cell proliferation compared with control siRNA in Caki-1 without induction of HIF protein expression. Even in VHL-mutant SMKT-R2 and SMKT-R3, PHD3 siRNA showed the same effect. On the other hand, PHD3-expressing plasmid transfection into ACHN, a RCC cell line with no expression of PHD3 under normoxia, reduced cell proliferation compared with empty vector transfection.

In 22 patients with RCC, preoperative serum anti-PHD3 Ab titers were significantly higher in RCC patients than in healthy volunteers. Both pre- and postoperative serum samples were obtained from 17 patients at least 1 month after tumor removal. In all 17 patients, titers of serum anti-PHD3 were decreased after the surgical resection compared with those before operation. The result suggests that the anti-PHD3 Ab may be a novel serological marker for RCC, and the titer may reflect the tumor burden in each individual.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：(1)腎細胞癌 (2)腫瘍生物学 (3)分子生物学 (4)腫瘍免疫学 (5)シグナル伝達 (6)腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

当教室の研究で、Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase -3 (PHD3)が腎細胞癌に高率に発現しており、またこれが癌抗原として認識され、癌ワクチン療法の標的となることが示唆された。PHD3は転写因子HIFの水酸化酵素であるが、腎細胞癌における発現の機序、意義は明らかではない。

2. 研究の目的

腎細胞癌におけるPHD3発現の機序の解析をおこない、またPHD3の細胞増殖に対する作用の検討を行うことでこのPHD3の機能を解析する。さらに、PHD3が腫瘍抗原として自己に抗原認識されていることが以前の我々の研究で示されたことから、血清抗PHD3抗体価の腫瘍マーカーとしての意義を探索する。

3. 研究の方法

(1)腎細胞癌細胞株 SMKT-R2 SMKT-R3, Caki-1, ACHN を使用し、PHD3発現の状況をRT-PCR法にて評価した。

(2)VHL野生型腎細胞癌細胞株 Caki-1にて、細胞密度とPHD3発現の関連、およびPI3K/Akt/mTOR経路およびMAPK経路の活性の関与を検討した。加えて、HIF-1 α /HIF-2 α ダブルノックダウンモデルを作成し、このモデルにおいてもPI3K/Akt経路の活性化によりPHD3の発現が誘導されるか確認した。

(3)PHD3高発現を認める腎細胞癌細胞株、SMKT-R2, SMKT-R3, Caki-1において、PHD3ノックダウンモデルをsiRNAにて作成し、細胞数計測により増殖の変化を評価した。さらに、PHD3発現の見られない腎細胞癌細胞株ACHNにおいて、遺伝子導入によりPHD3強制発現モデルを作成し、細胞増殖の影響を評価

した。

(4)当科でこれまでに腎細胞癌にて手術を施行した患者のパラフィン包埋組織を用い、PHD3タンパクの発現を免疫染色にて評価し、予後の関係について解析した。

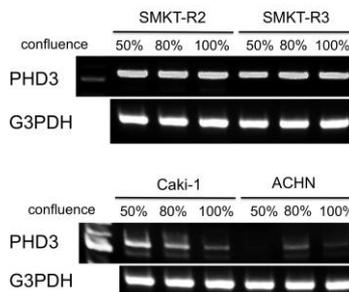
(5)腎細胞癌患者22例、健常者26例の血清を用いELISA法により血清抗PHD3抗体価を測定した。腎細胞癌患者22例、健常者26例の血清を用い検討した。

4. 研究成果

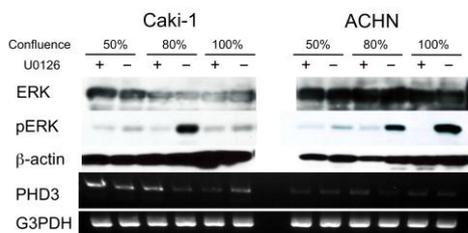
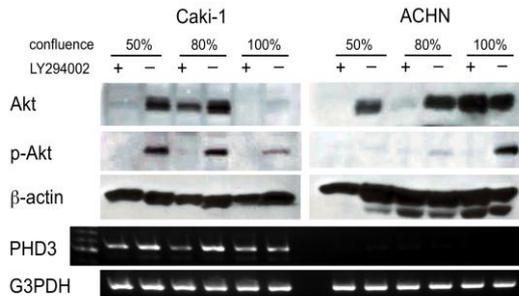
(1)VHL遺伝子シーケンシングにて、SMKT-R2, SMKT-R3がVHL遺伝子変異株であることが判明した。

VHL遺伝子変異腎細胞癌細胞株であるSMKT-R2, SMKT-R3では正常酸素下で、いずれの細胞密度でもPHD3が安定して発現していた。一方、VHL野生型株Caki-1では正常酸素下でPHD3の発現が不安定であった。

(2)Caki-1は細胞密度が低い状態でのみ発現が亢進しており、コンフルエントの状態では発現が低下していた。ACHNではPHD3の発現が見られなかった。



Caki-1 における PHD3 の発現は PI3k 阻害剤である LY294002 および mTOR 阻害剤である rapamycin により阻害された。このことから、Caki-1 における PHD3 発現は PI3k/Akt/mTOR 経路に依存していることが分かった。MAPK 経路の関与は認めなかった。

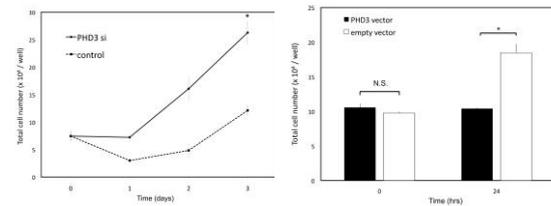


また、ウエスタンブロッティング法にて PHD3 の発現には HIF タンパクの発現を伴っていないことが示唆された。これを検証するため siRNA を用い、Caki-1 にて HIF-1/HIF-2 ダブルノックダウンモデルを作成した。このモデルにおいても PHD3 の発現は変化無く認められた。以上から、Caki-1 における PHD3 発現は HIF タンパクに依存しないことが分かった。

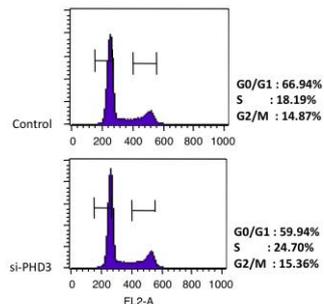


(3) Caki-1 にて siRNA で PHD3 をノックダウンすることにより、in vitro で細胞増殖が増進する事が明らかとなった。SMKT-R2, SMKT-R3 においても同様の結果が得られた。PHD3 には細胞増殖抑制効果があることが示唆され、VHL 遺伝子変異の有無に依存しないことから、この機能が HIF タンパクに非依存性であることが考えられた。さらに通常 PHD3 の発現が見られない ACHN にて PHD3 強制発現株を作成し検証したが、細胞増殖が有意に低下していた。以上から PHD3 は HIF に非依存性に細胞増殖抑制作用を有することが明らかとなった。従来 PHD3 は HIF の機能を制御する水酸化酵素として知られてきたが、本研

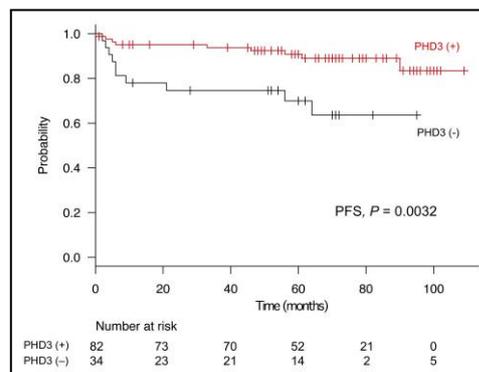
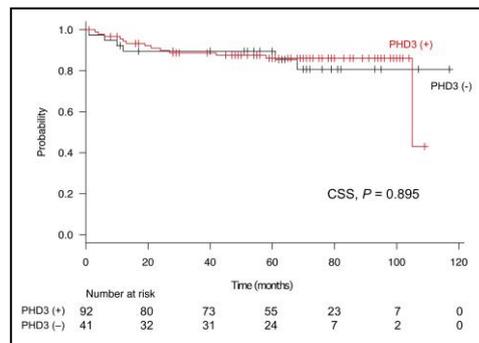
究により HIF の機能制御という機能の他に、新たな発現系路、および機能を有することが明らかとなった。



細胞周期解析では、Caki-1 の PHD3 ノックダウンによって、G0/G1 期細胞の減少、S 期細胞の増加が認められた。PHD3 は細胞周期停止作用を有すると考えられた。



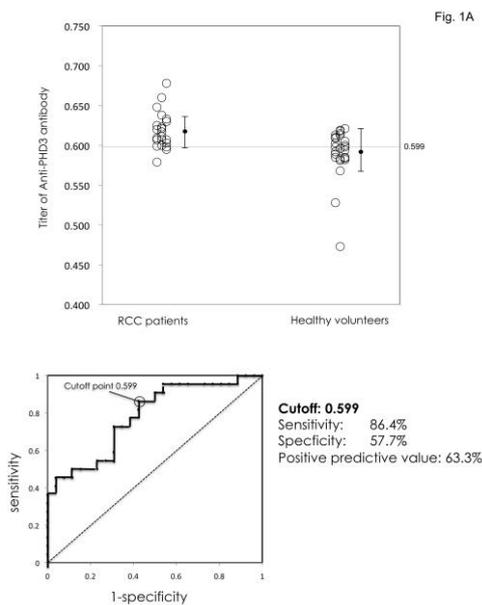
(4) 淡明腎細胞癌 133 例における免疫染色をおこなった。92 例 (69.2%) で発現が見られた。HIF-1α、HIF-2α の発現についても同時に評価したが、それぞれの発現と PHD3 の発現の間には相関が見られなかった ($p=0.0738$, 0.0971)。PHD3 発現の有無で癌特異的生存率には有意差はなかったが ($p=0.895$)、無再発生存率は有意に PHD3 発現症例で良好であった ($p=0.0032$)。



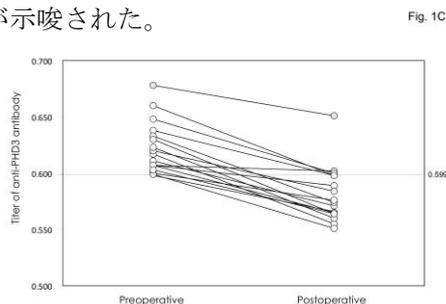
多変量解析にて無再発生存率について、病期、Fuhrman grade も含め検討したが、PHD3 陽性は有意に良好な予後因子であった ($p=0.0380$, HR 0.354, 95%CI 0.132-0.944)。この結果は、PHD3 に細胞増殖抑制作用があるという *in vitro* の結果と矛盾しないものであった。

	P value	HR (95% CI)
PHD3 positive	0.0380	0.354 (0.132-0.944)
Fuhrman grade 3	0.0296	3.475 (1.131-10.677)
Stage III or more	0.0019	5.366 (1.858-15.499)

(5) 血清抗 PHD3 抗体価については、腎細胞癌患者 22 例の術前血清の抗 PHD3 抗体価は健康者に比し有意に高値であった ($p=0.0001$)。ROC-AUC 解析では、吸光度 0.599 で感度 86.4%、特異度 57.7%、陽性的中率 63.3%であった



腎細胞癌患者 17 例での術前後の比較では全例で抗 PHD3 抗体価の減少を認めた ($p=0.0003$)。PHD3 は腫瘍抗原として腎細胞癌患者免疫系に認識されており、その抗体価は同一個体において腫瘍体積を反映している可能性があり、血清腫瘍マーカーとなる可能性が示唆された。



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 1 件)

Tanaka T, Kitamuta H, Torigoe T, Hirohashi Y, Sato E, Masumori N, Sato N, Tsukamoto T. Autoantibody against hypoxia-inducible factor prolylhydroxylase-3 is a potential serological marker for renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011, 137(5):789-94 (査読有)
DOI 10.1007/s00432-010-0940-6

〔学会発表〕 (計 4 件)

- ① Tanaka T, Kitamura H, Torigoe T, Hirohashi Y, Masumori N, Sato N, Tsukamoto T. PHD3 expression is a predictor of progression-free survival in renal cell carcinoma. 27th European Association of Urology Congress. Feb. 24-28, 2012, Paris.
- ② Tanaka T, Torigoe T, Hirohashi Y, Kitamura H, Masumori N, Tsukamoto T, Sato N. PHD3 has a HIF-independent-antiproliferative function in renal cell carcinoma. 第 69 回日本癌学会総会. 2010 年 9 月 22 日. 大阪.
- ③ Tanaka T, Torigoe T, Hirohashi Y, Kitamura H, Masumori N, Tsukamoto T, Sato N. PHD3 is expressed independently of HIF protein and has a HIF-independent anti-proliferative function in renal cell carcinoma: the novel expression mechanism and function. 21st European Association for Cancer Research. June 29, 2010. Oslo.
- ④ Tanaka T, Torigoe T, Hirohashi Y, Sato E, Honma I, Kitamura H, Masumori N, Sato N, Tsukamoto T. American Urology Association 2010. PHD3 has a HIF-independent-antiproliferative function in renal cell carcinoma. American Urological Association Annual Meeting 2010. May 30, 2010. San Francisco.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 俊明 (TANAKA TOSHIAKI)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：50398327

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：