

平成 2 6 年 6 月 1 7 日現在

機関番号： 8 2 4 0 6

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2010 ~ 2013

課題番号： 2 2 7 9 1 5 0 6

研究課題名（和文）腎細胞癌における小胞体ストレス応答と腫瘍進展の機序

研究課題名（英文）Mechanism of endoplasmic reticulum stress and tumor progression in renal cell carcinoma

研究代表者

黒田 健司（Kuroda, Kenji）

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・病院・助教

研究者番号：1 0 3 0 6 7 8 0

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000 円、（間接経費） 0 円

研究成果の概要（和文）：腎細胞癌においてHIF-VEGF経路が小胞体ストレス応答の制御下にあるとの報告があり、GRP78の発現増強が新たに報告されている。平成22年度は腎癌検体を用いてGRP78発現と臨床病理因子との相関を検討した。GRP78陽性率は、悪性度、腫瘍進達度、静脈浸潤、所属リンパ節転移、遠隔転移と有意な相関があり、癌特異的および無増悪生存率は、GRP78陽性群で有意に不良であった。基礎実験では、Caki-1, 7860, A498, 769Pと代表的な細胞株においてGRP78、IRE1共に発現が強く、現在までにGRP78及びIRE1発現を共に抑制することでより高い抗腫瘍効果が得られることを検証済みである。

研究成果の概要（英文）：In renal cell carcinoma (RCC), it was reported that HIF-VEGF signaling pathway could be under the control of endoplasmic reticulum stress (ER stress). Strong expression of GRP78 was also reported to play an important role in ER stress for RCC. In 2010, we investigated the relationship between expression level of GRP78 and clinicopathological parameters using RCC specimens. Statistically significant association was found between GRP78 positivity and higher tumor grade, advanced T stage, lymphovascular invasion, regional nodal involvement, and distant metastasis. Positivity of GRP78 expression was significantly associated with shorter disease-specific and progression-free survival. Representative RCC cell lines such as Caki-1, 7860, A498, 769P showed strong expression of GRP78 and IRE1 among ER stress-related proteins. It seemed that the expression of HIF1 and HIF2 were influenced by that of IRE1. So far, inhibition of GRP78 and IRE1 could lead to more anticancer effect on RCC cells.

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：小胞体ストレス 低酸素ストレス GRP78 IRE1 腎細胞癌

1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌における増殖・進展の機序のひとつに、VHL-HIF 経路があり、HIF から VEGF, PDGF 等の増殖因子が産生される。一方で近年癌細胞のアポトーシスに関与する現象として小胞体ストレス応答が着目され、すでに他癌腫における基礎実験では HIF-VEGF 経路が小胞体ストレス応答の制御下にあるとの報告もある。さらに腎細胞癌においても小胞体ストレス応答における重要な役割を担う GRP78 の発現増強が新たに報告されており、この小胞体ストレス応答から低酸素応答への経路が腎細胞癌治療へのアプローチとして利用出来れば今後の分子標的治療に新たな局面をもたらすことも可能と考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

腎癌細胞も他癌腫同様、正常細胞に比べて増殖シグナルを遙かに強く持っているが、その1つに VHL 遺伝子の関与がある^{1,2}。VHL 遺伝子にコードされるのは低酸素によって誘導される転写因子 Hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) で、vascular endothelial growth factor (VEGF) や Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)、erythropoietin、transforming growth factor α (TGF- α) などの発現を制御する。通常酸素濃度下 (21%酸素濃度) では、HIF-1 α は水酸化され、VHL 蛋白質に結合する形でユビキチン化され分解されるが、低酸素状態 (1%酸素濃度以下) になると、水酸化されないため分解を受けずに核内に移動し、多くの遺伝子を誘導する。21%酸素濃度下でも、VHL 蛋白質に変異が入ると、水酸化されず核内に移動して遺伝子を誘導する。そして HIF により誘導される遺伝子産物のいくつかは癌細胞自体にも作用して増殖シグナルとなっており、転写産物のひとつである VEGF も血管内皮に作用して血管内皮細胞を増殖させる役割を担っている。一方で、異常な折りたたみ構造の蛋白質が小胞

体内に蓄積する現象は小胞体ストレス (endoplasmic reticulum stress: ER stress) とよばれ、蛋白質の恒常性を維持する調節機構は小胞体ストレスに対する細胞の生理応答と考えられる。この調節機構の活性化は小胞体内の異常な折りたたみ構造の (もしくは、折りたたまれていない) 蛋白質の量に比例するため、この反応は小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR) と称されている。細胞が小胞体ストレスに晒されたとしても、UPR が正常に機能していれば、細胞は小胞体ストレスによる障害を回避することができる。しかし、UPR が機能せず、アポトーシスに関わる因子が活性化してしまった場合には細胞は不可逆な障害を受け、小胞体内腔の拡張に引き続いてミトコンドリアの形態変化、次いでシトクロム c の放出、カスパーゼ 3 の活性化などが観察され、最終的にアポトーシスに至ることになる。近年では神経変性疾患における小胞体ストレスの役割や、小胞体ストレスにより惹起される膵 β 細胞のアポトーシスと糖尿病との関連性も報告されている。UPR のシグナル伝達経路は現在のところ PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) 経路、inositol requiring enzymes 1 (IRE1) 経路、activating transcription factor 6 (ATF6) 経路という少なくとも 3 種類の小胞体膜貫通蛋白質を介した経路が知られている。このうち特にアポトーシスとの関連性が報告されているのは PERK 経路と IRE1 経路であり、PERK は最終的に C/EBP-homologous protein (CHOP) を、IRE1 は最終的に c-Jun N-terminal kinase (JNK) を活性化することで細胞をアポトーシスへと誘導する。最近になり、この ER stress 誘導性アポトーシス分子機構と、腫瘍細胞の増殖との相関についての報告例が散見されるようになり、また小胞体ストレス応答のシグナル伝達は、抗体産生を盛んに行う多発生骨髄腫のような癌細胞において、強く活性化

されていることが明らかになってきている。また GRP78 は非ストレス状態においてこれら小胞体ストレス蛋白と結合することが知られているが、こちらも近年、腎細胞癌において GRP78 の発現が、非腫瘍部に比して有意に強発現していたという報告もある。こうした種々の報告例を踏まえたうえで、腎細胞癌増殖・進展における、ER stress 応答を担う小胞体ストレスセンサー、PERK, IRE1 と HIF, VEGF 等低酸素応答蛋白経路を担う蛋白の関連性の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 腎癌検体を用いた免疫組織化学染色

腎細胞癌 (RCC) において GRP78 発現の臨床的意義は判然としていない。ゆえに RCC における GRP78 の発現について検討を行った。128 例の原発性腎癌検体 (120 例; Conventional, 8 例; Other) と 9 例の転移性腎癌検体を用いて免疫組織化学染色を行った。GRP78 陽・陰性の判定は染色の強度と染色細胞の割合に基づいて行い、その陽性度と臨床病理学的因子との関連を検討した。

(2) 腎癌細胞株を用いた基礎実験

腎癌細胞株 Caki-1, 7860 を用いて他施設から供与して頂いた IRE1 α -siRNA 投与による ER stress 応答蛋白の発現変化、細胞増殖に及ぼす影響を検討した。IRE1 α -siRNA を 0 あるいは 50nM transfect した細胞株を 48 時間継続培養した上でさらに通常酸素濃度下 (20% O₂, 5% CO₂)、あるいは低酸素濃度下 (1% O₂, 5% CO₂) で培養した後の細胞増殖抑制、蛋白発現について MTS assay および Western blotting 法により観察した。

IRE1 α -siRNA により IRE1 の発現低下が認められ、それに付随して HIF, STAT 等の蛋白発現が減弱することを確認した後、同等の蛋白発現抑制効果、細胞増殖抑制効果を有する薬剤の探索を行うべく、当初の使用予定にも

あったプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ (BZ) を始め、PI3K/mTOR 阻害剤 BEZ235、mTOR 阻害剤 AZD8055、選択的カルシウムイオンキレート薬 BAPTA-AM 等の薬剤を使用した。どの薬剤も細胞株に投与後 48 あるいは 72 時間後に MTS assay、あるいは Cell lysate を回収して Western blotting を実施した。

4. 研究成果

(1) 腎癌検体を用いた免疫組織化学染色

GRP78 は、全 128 例中 71 例 (55.5%) で、転移巣では 9 例中 8 例 (88.9%) で、非 Conventional RCC では 8 例中 7 例 (87.5%) で陽性であった。GRP78 陽性は、悪性度、腫瘍進達度、静脈浸潤、所属リンパ節転移、遠隔転移と有意な相関があり、癌特異的および無増悪生存率は、全患者ならびに Conventional RCC 症例において GRP78 陽性群で有意に不良であった。

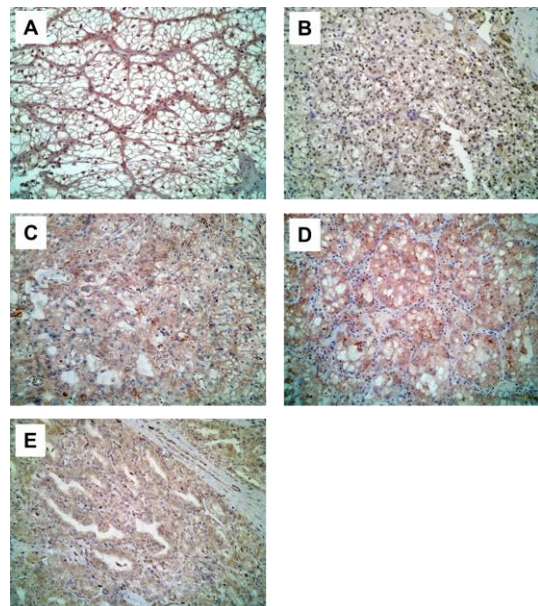


図 1. (A) 陰性 (0) (Intensity 1, Percentage < 5%), (B) 中等度陽性 (1+) (Intensity 2, Percentage 40-50%), (C) 強陽性 (2+) (Intensity 3, Percentage 80-90%), (D) 強陽性 (2+)、副腎転移巣, (E) 強陽性 (2+)、皮膚転移巣 Intensity was 3 and percentage was > 50% in both D and E.

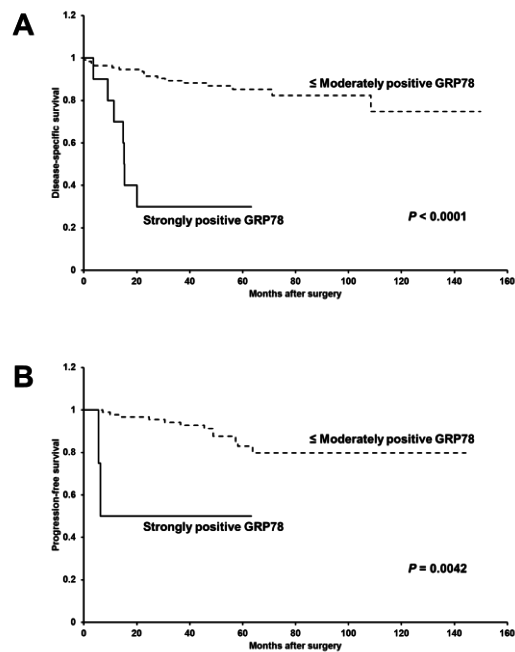


図 2. (A) 癌特異的生存率（全症例）（GRP78 発現中等度陽性以下：114 例；GRP78 発現強陽性：14 例）. (B) 無増悪生存率（NOMO 症例）（GRP78 発現中等度陽性以下：96 例；GRP78 発現強陽性：10 例）.

(2) 腎癌細胞株を用いた基礎実験

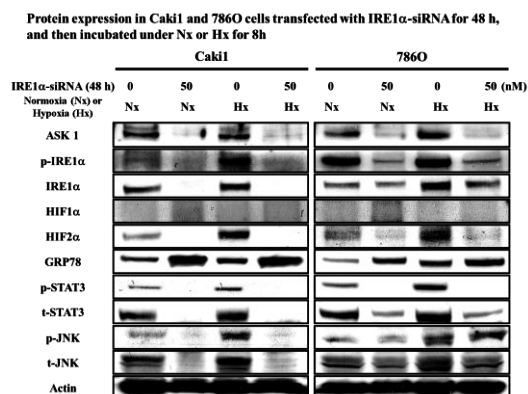


図 3. IRE1 α -siRNA を 0 あるいは 50nM transfect した細胞株を 48 時間継続培養した上でさらに通常酸素濃度下 (20% O₂, 5% CO₂)、あるいは低酸素濃度下 (1% O₂, 5% CO₂) で培養後の蛋白発現変化。HIF, STAT, JNK は IRE1 のノックダウンにより発現低下が見られたが GRP78 は発現が増強した。

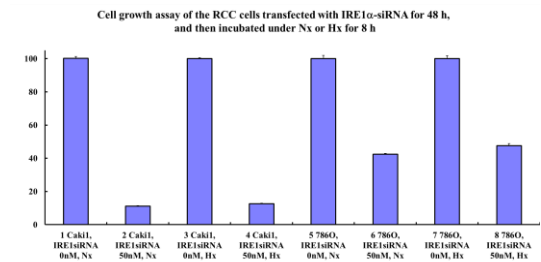


図 4. IRE1 α -siRNA を 0 あるいは 50nM transfect した細胞株を 48 時間継続培養した上でさらに通常酸素濃度下 (20% O₂, 5% CO₂)、あるいは低酸素濃度下 (1% O₂, 5% CO₂) で培養後の細胞増殖抑制。siRNA により十分な細胞増殖抑制効果が通常・低酸素濃度下に認められた。

Protein expression in 786O cells treated with BZ for 48 hours under normoxia or hypoxia

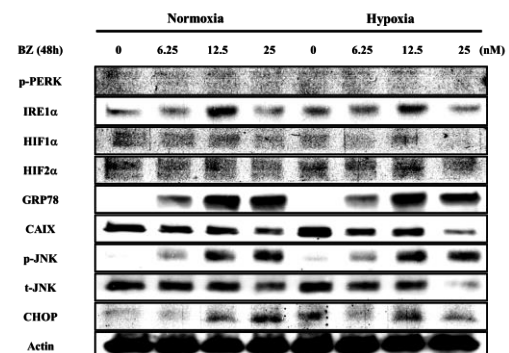


図 5. 通常あるいは低酸素濃度下 BZ 投与後 48 時間の蛋白発現変化 (786O)。IRE1 発現に著変なく GRP78 は発現が増強した。

Protein expression in 769P cells treated with BZ for 48 hours under normoxia or hypoxia

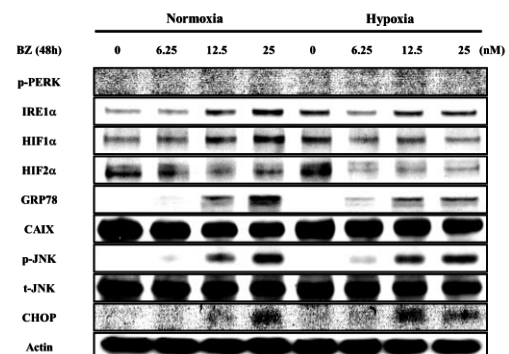


図 6. 通常あるいは低酸素濃度下 BZ 投与後 48 時間の蛋白発現変化 (769P)。IRE1 発現は増強、GRP78 も発現が増強した。

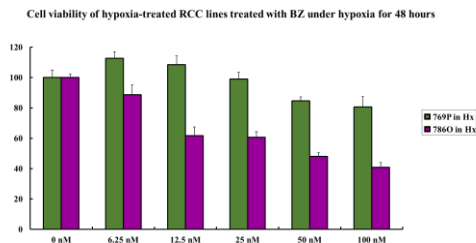


図 7. 低酸素濃度下 BZ 投与後 48 時間の細胞増殖 (7860, 769P)。いずれも十分な殺細胞効果は認められなかった。

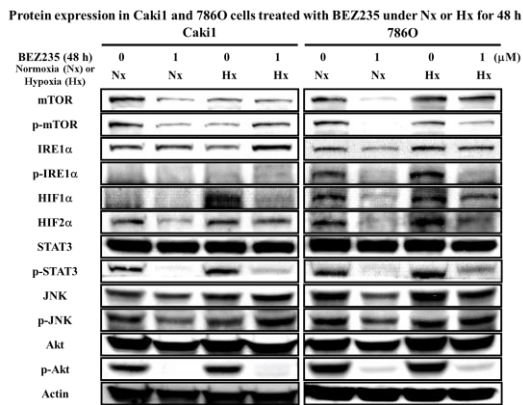


図 8. 通常あるいは低酸素濃度下 BEZ235 投与後 48 時間の蛋白発現変化 (Caki1, 7860)。IRE1 発現に著変なかった。

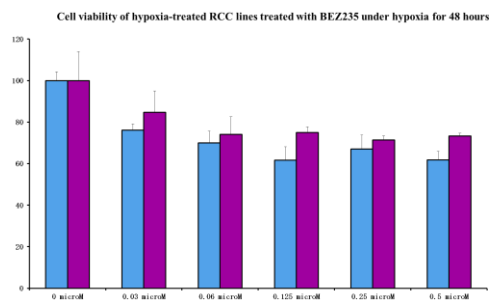
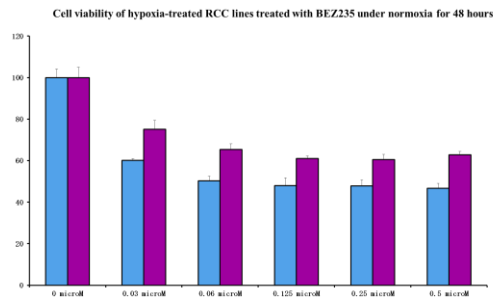


図 9・10. 通常あるいは低酸素濃度下 BEZ235 投与後 48 時間の細胞増殖 (Caki1, 7860)。いずれにも十分な殺細胞効果は認められなかった。

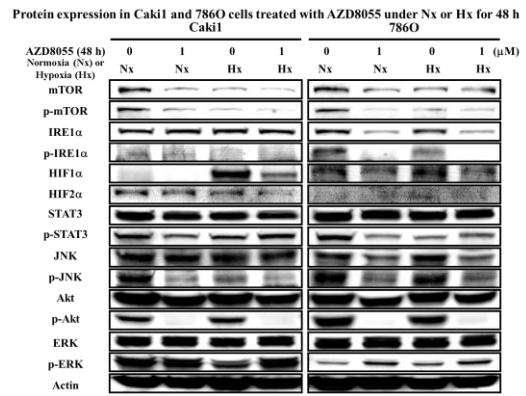


図 11. 通常あるいは低酸素濃度下 AZD8055 投与後 48 時間の蛋白発現変化 (Caki1, 7860)。IRE1 発現に著変なかった。

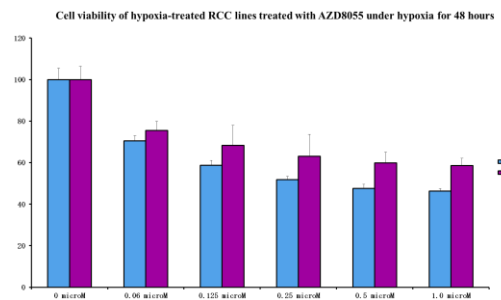
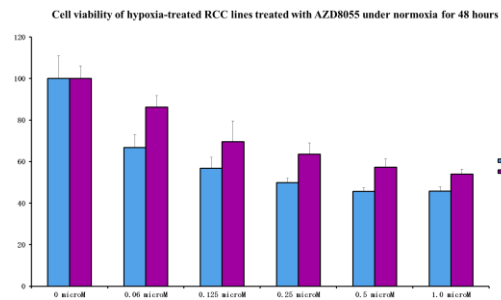


図 12・13. 通常あるいは低酸素濃度下 AZD8055 投与後 48 時間の細胞増殖 (Caki1, 7860)。いずれにも十分な殺細胞効果は認められなかった。

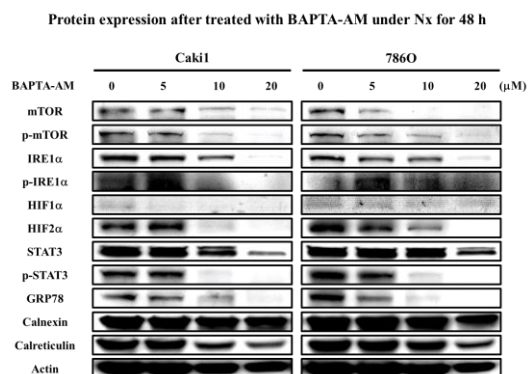


図 14. 通常酸素濃度下 BAPTA-AM 投与後 48 時

間の蛋白発現変化 (Caki1, 7860)。IRE1 発現が減弱し GRP78 発現も減弱した。HIF1 α は判然としないが HIF2 α の発現は濃度依存性に減弱した。

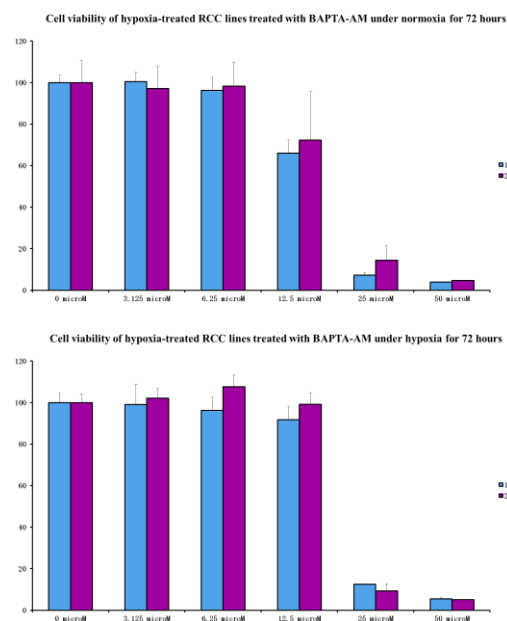


図 15・16. 通常あるいは低酸素濃度下 BAPTA-AM 投与後 72 時間の細胞増殖 (Caki1, 7860)。いずれにも十分な殺細胞効果が認められた。

以上一連の実験から、IRE1 および GRP78 双方の発現を減弱させることで十分な殺細胞効果が得られる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- ① Kenji Kuroda, Akio Horiguchi, Takako Asano, Keiichi Ito, Junichi Asakuma, Akinori Sato, Hidehiko Yoshii, Masamichi Hayakawa, Makoto Sumitomo, Tomohiko Asano. Glucose-Regulated Protein 78 Positivity as a Predictor of Poor Survival in Patients with Renal Cell Carcinoma. Urologia Internationalis 2011;87(4) : 450-456.

〔学会発表〕(計 3 件)

国内学会

- ① 黒田健司、堀口明男、田崎新資、吉井秀彦、佐藤全伯、朝隈純一、伊藤敬一、瀬口健至、早川正道、住友誠、浅野友彦. 腎細胞癌における GRP78 発現の検討. 第 99 回日本泌尿器科学会総会. 2011/4/21-24. 名古屋

- ② 吉井秀彦、伊藤敬一、黒田健司、佐藤全伯、朝隈純一、堀口明男、瀬口健至、辻明、住友誠、早川正道、浅野友彦. 防衛医科大学校における進行性腎細胞癌に対する分子標的治療薬の治療成績. 第 99 回日本泌尿器科学会総会. 2011/4/21-24. 名古屋.

国際学会

- ③ Kenji Kuroda, Akio Horiguchi, Takako Asano, Shinsuke Tasaki, Junichi Asakuma, Hidehiko Yoshii, Akinori Sato, Keiichi Ito, Kenji Seguchi, Makoto Sumitomo, Tomohiko Asano. IMPACT OF INCREASED EXPRESSION OF GLUCOSE-REGULATED PROTEIN 78 ON CLINICOPATHOLOGICAL PARAMETERS AND PROGNOSIS IN RENAL CELL CARCINOMA. 2011 Annual Meeting of the American Urological Association. 2011/5/14-19. Washington DC.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 健司 (KURODA KENJI)
防衛医科大学校・病院・助教
研究者番号 : 10306780