

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592334

研究課題名(和文)腎癌VHL遺伝子異常解析によるHIF蛋白の発現予測と分子標的薬の効果予測法の開発

研究課題名(英文)Analyses of altered VHL protein function in the clear cell renal carcinoma(CRCC) and its utilization for CRCC patients.

研究代表者

執印 太郎 (SHUIN, TARO)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：70128601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：淡明細胞型腎癌ではVHL遺伝子の変異による発症が約90%を占め、HIF・VEGFの発現上昇があるためVEGFレセプター阻害薬が有効とされるが、VHL変異のある腎癌でもHIFの分解があり、HIF発現の低い癌にも骨転移がある。HIF1aは癌抑制作用、HIF2aには腫瘍増殖促進作用がある。進行性淡明細胞型腎癌 VEGFレセプター阻害薬投与の方式は必ずしも成立しない。本研究は典型的な変異VHL遺伝子をVHLノックアウトES細胞に導入し、VHL-エロンガンBC複合体形成によるHIF1a・HIF2aの発現の変化を解析した。これによりVHL変異によるVEGF阻害分子標的薬の使用の治療効果予測法を確立する。

研究成果の概要(英文)：Clear cell renal cell carcinoma (CCRCC) is one of the most common pathological type in kidney cancer. VHL gene mutation results in the accumulation of HIF1a and HIF2a protein. Accumulation of HIF protein results in the increased expression of VEGF proteins. Currently many molecular targeting drugs for VEGF receptor are one of the most popular treatments for metastatic kidney cancers. However, it should be noted that some of mutant VHL protein has a residual normal function or altered other function. To elucidate the residual or altered function in the mutant protein we introduced mutant VHL gene detected in CCRCC to VHL double knockout mouse embryonal fibroblasts(MEFs), and we could develop MEF1 and MEF2. Only one mutant VHL protein resulted in the decreased function in HIF1a. Other mutant VHL protein could not result in the similar changes. To understand CCRCC and its treatment option, we would like to analyze altered function in mutant VHL proteins further.

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：VHL遺伝子変異 HIF1 HIF2 ES細胞

## 1. 研究開始当初の背景

淡明細胞型腎癌では VHL 遺伝子の突然変異と機能喪失で発症しているものが 80 - 90% を占め、HIF・VEGF の発現上昇があるため多くの癌で VEGFreceptor 阻害薬が有効とされる。そのため多くの進行腎癌で VEGF 阻害薬か VEGF 受容体阻害薬が有効とされ、VEGF 阻害薬の効果予測をせずに高価な薬剤が投与される。

しかし、実際には淡明細胞型腎癌で VHL 変異があっても VHL 蛋白機能が残存しながら癌化が起こっているものや、HIF 発現が少ない場合でも骨転移を認める腎癌があるとされる。

残念ながら個別の癌の特徴を解析して投与を決定するなどの方策は採られていない。

本来は淡明細胞型腎癌でも肺癌の VEGF 受容体のように個別解析を行って分子標的薬の選択し効果予測を行うことが、無駄な薬剤投与を減らし、副作用による患者さんの消耗をおこさないような薬剤投与ができるように予測法の確立をすることが必要である。

現在、進行腎癌に対しては治療効果予測を行うことをせずに VEGFreceptor の tyrosine kinase 阻害薬である Sunitinib、Sorafenib などによる無差別治療が行われている。VEGF receptor の tyrosine kinase 阻害薬の無効な癌では副作用による患者の全身状態の消耗のみが起こり、予後を低下させている。

## 2. 研究の目的

(1) 我々は VHL 遺伝子異常が解析され、予後が確定している約 300 例の淡明細胞型腎癌検体を保存している。本研究で予後の確定した腎癌から典型的な VHL 遺伝子変異を選び、VHL をノックアウトしたマウス ES 細胞内に変異 VHL 遺伝子を導入し、VHL knockout ES 細胞内での HIF1a・HIF2a 蛋白の発現として定量的に解析する。これにより最終的には VHL 遺伝子異常で判断できる分子標的薬の治療効果予測法を確立することを目的とする。

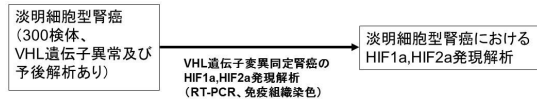
我々の研究の特色・独創的な点は下記の点である。

機能が異なるとされる HIF1a (= 癌抑制作用)、HIF2a (= 腫瘍増殖促進作用) の発現を VHL 遺伝子異常から予測して実際の腎癌における発現との間で検証を図る点である。

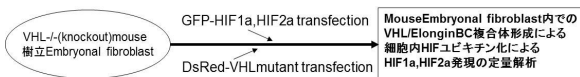
VHL 遺伝子異常に基づく HIF 発現の予測が出来れば無駄な VEGFreceptor 阻害薬の投薬が避けられる。現在は不可能である VHL 遺伝子解析に基づく淡明細胞型腎癌の個別化治療が行え、無効な VEGFreceptor 阻害薬の投与がないため、実質的に生存期間の延長が図れる。

### (2) 本研究のシエーマ

VHL 遺伝子変異同定腎癌細胞内での RT-PCR、免疫組織染色による HIF1a, HIF2a 発現解析。



VHL<sup>-/-</sup> (knockout) mouse 由来 embryonal fibroblast 内での実験的 HIF1a, HIF2a 発現解析。



VHL と ElonginBC の結合能を FRET 解析する。

の研究結果の対比による VHL 遺伝子変異に基づく HIF1a, HIF2a 発現予測系の確立と分子標的薬効果予測法の確立。

## 3. 研究の方法

(1) VHL 遺伝子変異 database より進行淡明細胞型腎癌の deletion、insertion、missense mutation、nonsense mutation などの典型的な VHL 遺伝子変異を抽出し、当該癌組織の HIF1a、HIF2a の発現解析を PCR 法及び免疫染色を用いて行う。

(2) VHL ノックアウトマウス由来 ES 細胞系の変異 VHL 遺伝子、蛍光色素付き HIF1a、HIF2a 遺伝子を導入して発現の定量解析系を確立する。

(3) 進行淡明細胞型腎癌から deletion、insertion、missense mutation、nonsense mutation の典型的な VHL 遺伝子変異を抽出し、当該癌組織の HIF1a、HIF2a の発現解析を PCR 法及び免疫染色を用いて行う。

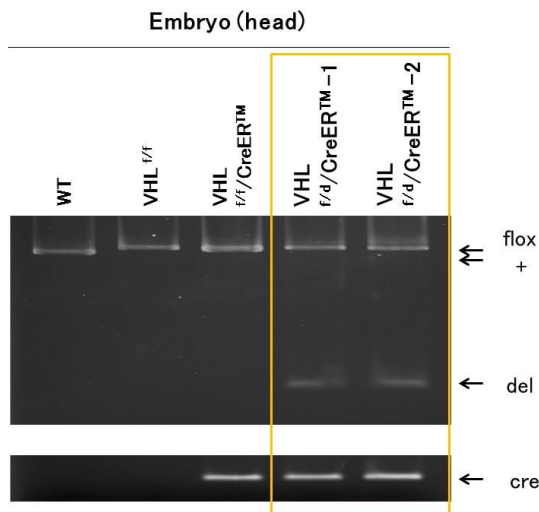
(4) 研究結果を総括し、VHL 遺伝子異常から HIF1a、HIF2a の発現予測を行い、VEGF 阻害剤の効果予測を行う。

## 4. 研究成果

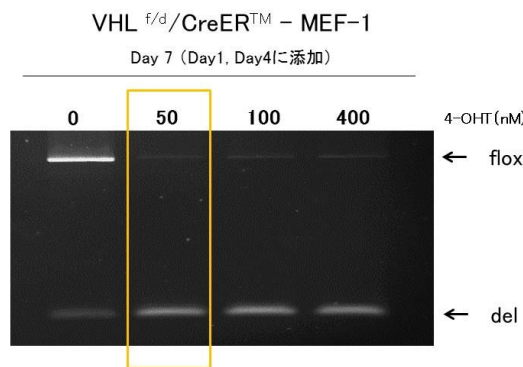
まず、conditional VHL knockout mouse より ES 細胞を取り出し、タモキシフェン投与にて VHL 遺伝子を双方とも knockout した mouse ES 細胞の確立を試みた。その結果、約 2 年の経過でようやく VHL ノックアウトマウス ES 細胞 MEF-1、MEF-2 の確立に成功した。

以下に、その図表を示す。

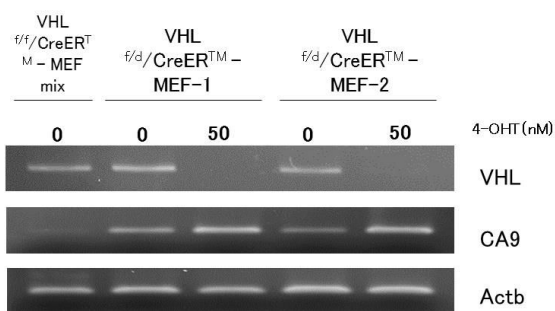
VHL knockdown mouse GenomeDNA genotyping PCR



4-OHT 条件検討  
GenomeDNA genotyping PCR



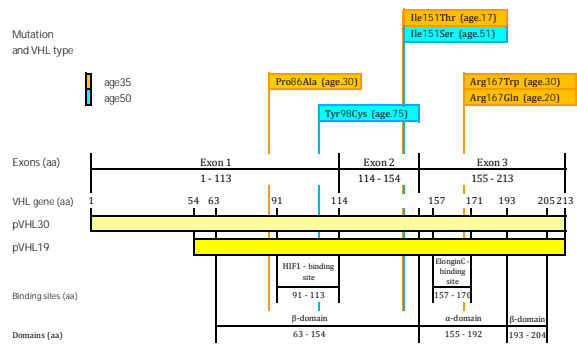
50nM 4-OHT, day7  
RT- PCR



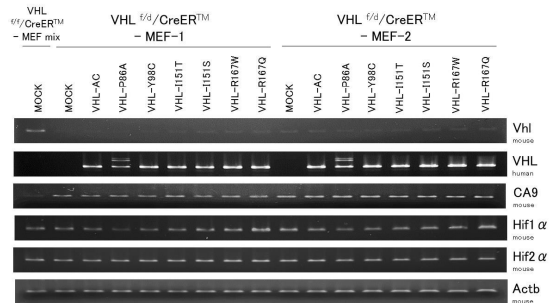
VHL ノックアウトマウス ES 細胞内に予後の確定した変異型 VHL 遺伝子を導入して強制発現させて純粋の変異型 VHL 遺伝子の効果を検討した。MEF-1, MEF-2 に VHL P86A mutant では HIF1a の発現が減少していることが確認された。

発症年齢	Mutation
30	Pro86Ala
75	Tyr98Cys
17	Ile151Thr
51	Ile151Ser
30	Arg167Thr
20	Arg167Gln

## Location Of The Gene Mutation

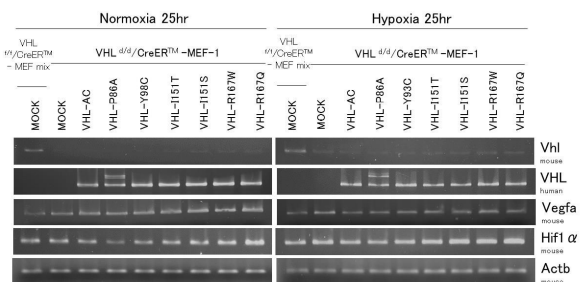


Transfection : VHL-AC, VHL-point mutation (human) ... VHL *d/d/CreERTM* -MEF-1, 2RT- PCR



VHL *d/d/CreERTM* -MEF-1

Transfection : VHL-AC, VHL-point mutation (human), Hypoxia- Normoxia  
RNA RT cDNA RT- PCR



それに対して、VHLY98C、VHLI151T、VHLI151S、VHLR167W、VHLR167Q では HIF1a の発現が減少は確認されなかった。このことより一部の VHL mutant では HIF1a の発現を減少させていることが確認された。

しかし、Elongin 複合体との関係は明らかではなかった。今後この系をさらに明らかにして、VHL の mutant の機能解析と細胞の遺伝子発現に対する影響を確認する予定である。

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

執印 太郎 (SYUIN, Taro)  
高知大学・教育研究部医療学系・教授  
研究者番号：7012861

### (2) 連携研究者

辛島 尚 (KARASHIMA, Takashi)  
高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号：60304672

蘆田 真吾 (ASHIDA, Shingo)  
高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号：80380327

田村 賢司 (TAMURA, Kenji)  
高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号：50464384

十川 和博 (SOGAWA, Kazuhiro)  
東北大学・生命科学研究科・教授  
研究者番号：80175421

柿沼 由彦 (KAKINUMA, Yoshihiko)  
日本医科大学・大学院医学研究科・大学院  
教授  
研究者番号：40233944