

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 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012 ～ 2013

課題番号：23890093

研究課題名（和文） HIF を介さない VHL 制御機構解析による腎癌に対する分子標的治療抵抗性の克服

研究課題名（英文） Overcoming the resistance to molecular-targeted therapy for renal cell carcinoma by analyzing of VHL control mechanism in a HIF independent manner

研究代表者

山崎 俊成 (Yamasaki Toshinari)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00607749

研究成果の概要（和文）：

我々はこれまでに HIF を介さない pVHL-atypical PKC-JunB 経路が淡明型腎細胞癌（ccRCC）の進展に寄与することを示し、その下流エフェクターの一つとして CCL2 を報告した。本研究は、既存の抗 VEGF 療法に対する耐性克服の知見を得るため、ccRCC の新規治療標的として CCL2 の有用性を検討することを目的とした。研究では、腎癌臨床検体における CCL2 発現を確認し、腎癌細胞株からの xenograft を用いて CCL2 発現が腫瘍増生・血管新生に影響することを確認した。また、腎癌細胞株および臨床検体からの xenograft を用いて CCL2 中和抗体による抗腫瘍効果を確認した。その結果、CCL2 が ccRCC に対する新規治療標的になる可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

We previously reported that the pathway of pVHL-atypical PKC-JunB in a hypoxia-inducible factor (HIF) independent manner contributed to the progression in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), and detected chemokine (C-C motif) ligand-2 (CCL2) as one of a downstream effector of it. To obtain findings of overcoming resistance to existing anti-VEGF therapies, the purpose of this research is to investigate the utility of CCL2 as a novel therapeutic target in ccRCC. In this study, we evaluated CCL2 expression in ccRCC clinical specimens, and confirmed that CCL2 expression involved in tumor growth and vascularization in xenograft derived from ccRCC cell lines. Moreover, we confirmed the anti-tumor effect of CCL2 neutralization antibodies to xenograft derived from ccRCC clinical specimens and cell lines. These results suggest that CCL2 could be a potential therapeutic target in ccRCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
年度			
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

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：腎細胞癌、抗血管新生療法、VHL、CCL2

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

これまでに腎細胞癌 (RCC) の発癌進展の分子機構として von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子変異による HIF/VEGF 経路の活性化 が大きく寄与していることが明らかにされ、本経路を標的とした抗 VEGF 剤や Tyrosine kinase inhibitor (TKI) 剤などの分子標的治療が近年の進行性腎細胞癌の新たな標準治療となっている。しかし、治療前に薬剤感受性予測が不可であることや無効症例の存在、一定奏功期間後の耐性の出現などが臨床で大きな問題となっており、新たな治療ターゲットの探索・開発が必要と考えられる。

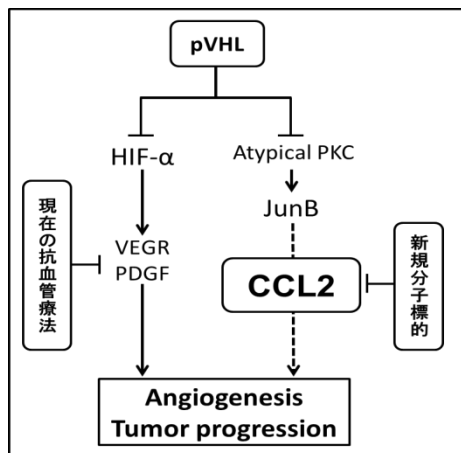
当教室ではこれまでに、HIF に依らない VHL-atypical PKC-JunB 経路が淡明型腎細胞癌 clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) の浸潤や血管新生に関与し、その下流 effector の一つとして chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) を報告した (図 1)。

また、RCC に対する治療感受性に関する研究を行っており、電子顕微鏡下にヒト RCC 腫瘍血管の形態学的特徴と抗 VEGF 療法感受性の相関を調べ、抗腫瘍効果を予測するバイオマーカーとなり得るか検討を行ってきたが、ここでも CCL2 が血管新生に関わる VHL-dependent、HIF-independent な因子の一つとして同定された。

CCL2 は腫瘍内へのマクロファージ浸潤を誘導し、血管新生を誘導することで抗 VEGF 療法に対する抵抗性を付与すると動物実験で報告されている。

以上の背景から、CCL2 が ccRCC に対する抗 VEGF 療法抵抗後の新規治療標的となりうると考えられた。

<図 1>



2. 研究の目的

本研究では、CCL2 が ccRCC に対する新規治療標的となり得るかをその目的とした。

3. 研究の方法

以下の 2 つを具体的検討項目として挙げる。

(1) RCC 臨床検体および *VHL* 変異型腎癌細胞株 (786-0、UMRC2) における CCL2 の発現と、CCL2 強制発現および発現抑制による影響を検討し、CCL2 が RCC の進展に果す役割を明らかにする。

(2) RCC 細胞株由来ならびに臨床検体由来マウス xenograft モデルに CCL2 中和抗体を投与して抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

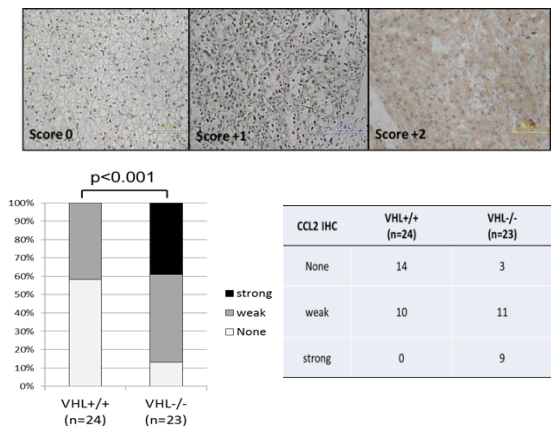
(1) RCC 臨床検体および *VHL* 変異型腎癌細胞株における CCL2 の発現と、CCL2 強制発現および発現抑制による影響の検討。

①臨床検体における CCL2 発現の検討

その臨床経過が把握できている、*VHL* wild および *VHL* null の腎癌組織と腎正常組織を用いて作製した TMA (Tissue microarray) を用いて、臨床検体 47 例における CCL2 免疫染色を行った。

その結果、*VHL* 変異を有する淡明型腎細胞癌症例では *VHL* 野生型症例に比べ CCL2 発現の増強を認めた (図 2)。

<図 2>

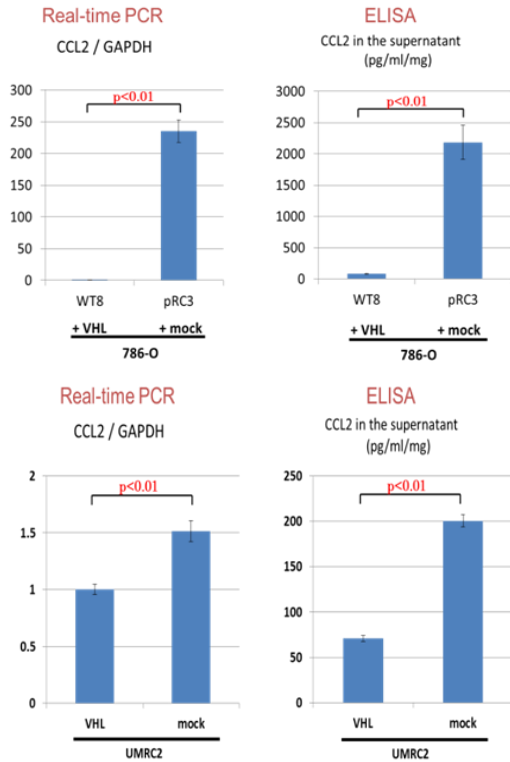


② *in vitro* での CCL2 機能評価

腎癌細胞株 786-0/UMRC2 (ともに *VHL*^{-/-}) に野生型 *VHL* を発現させた subclone (WT8、UMRC2+VHL) を用いて、*VHL* 遺伝子変異に伴う CCL2 発現の相違を qRT-PCR および ELISA にて解析した。

VHL 不活化腎癌細胞株に野生型 VHL を再導入すると CCL2 発現は抑制された (図 3)。

<図 3>

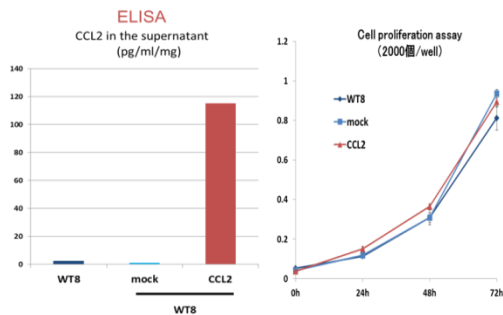


次に、CCL2 発現の低い WT8 細胞株で強制発現させ、CCL2 発現の高い 786-O 細胞株で発現抑制させた細胞株を作製し、細胞増殖能について評価した。

その結果、CCL2 強制発現 (図 4)、発現抑制 (図 5) とともに細胞増殖能に変化を認めなかった。

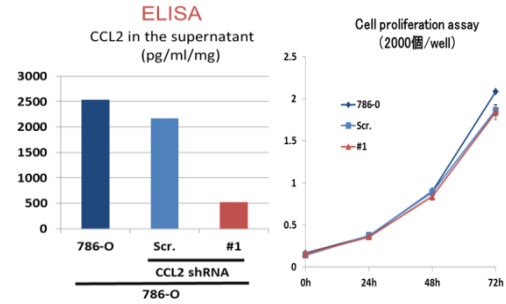
<図 4>

CCL2 強制発現



<図 5>

CCL2 発現抑制



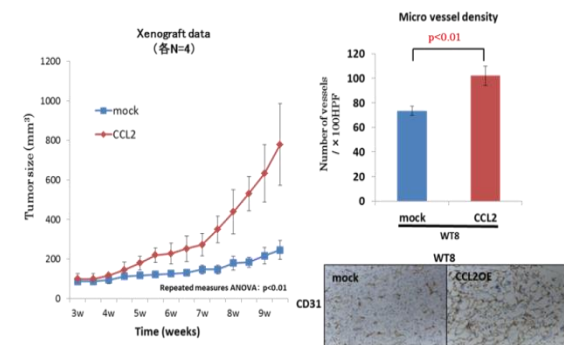
③ *in vivo*での CCL2 機能評価

Nude mouse を用いて、②で作製した CCL2 強制発現および発現抑制細胞株で皮下 xenograft を作製し、腫瘍増殖と血管新生について評価した。

その結果、CCL2 強制発現により腫瘍増殖および血管新生が増強し (図 6)、CCL2 発現抑制により腫瘍増殖および血管新生が抑制された (図 7)。

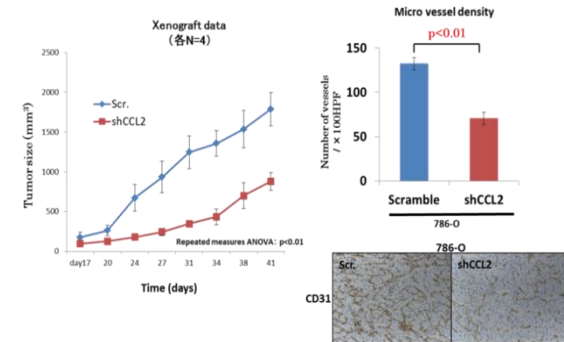
<図 6>

CCL2 強制発現



<図 7>

CCL2 発現抑制

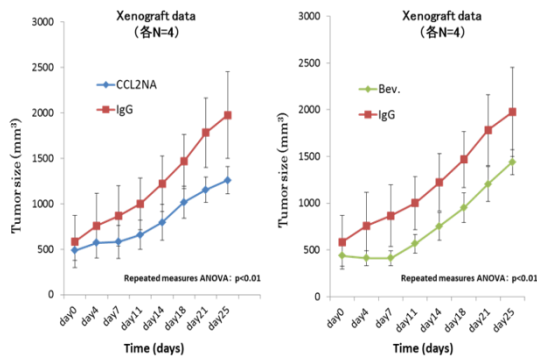


(2)RCC 細胞株由来ならびに臨床検体由来マウス xenograft モデルを用いた CCL2 中和抗体による抗腫瘍効果の検討。

①CCL2 を発現する 786-0 細胞株を用いて nude mouse に皮下 xenograft を作製し、CCL2 中和抗体および IgG 抗体 (control) を 10 μ l/mouse、bevacizumab を 100 μ l/mouse、ともに週 2 回腹腔内投与して、週 2 回腫瘍計測を行った。

その結果、bevacizumab 投与群と同様、CCL2 中和抗体による抗腫瘍効果を認めた (図 8)。

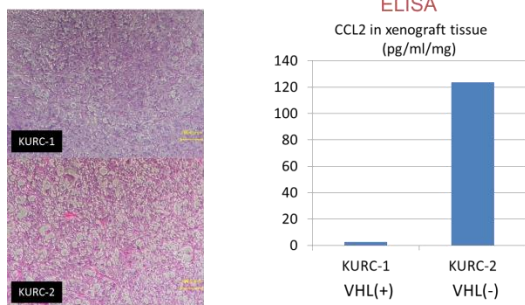
<図 8>



②我々はこれまでに臨床検体由来マウス xenograft を 2 系統 (KURC-1、KURC-2) 樹立しており、どちらも ccRCC の病理組織型を維持している。KURC-1 は VHL wild type, KURC-2 は VHL null type であり、CCL2 発現は KURC-1 に比べて KURC-2 で高かった (図 9)。

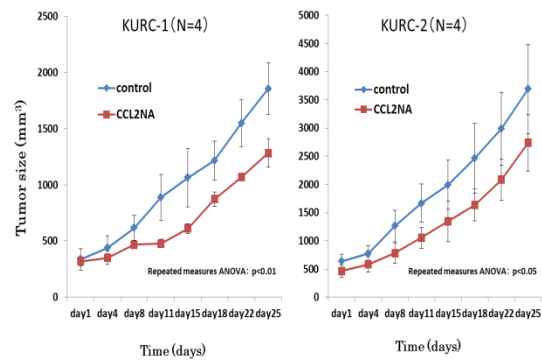
より実臨床に近いモデルで検証するために、これらを用いて CCL2 中和抗体による抗腫瘍効果を検討した。

<図 9>



これらのマウス xenograft に CCL2 中和抗体を投与したところ、どちらも control に比べて良好な抗腫瘍効果を認めた (図 10)。

<図 10>



以上の結果より、CCL2 は腎細胞癌の血管新生と腫瘍増殖に関与しており、進行性腎細胞癌に対する VHL-HIF-VEGF を標的とした既存の分子標的治療の効果が十分でない現状において、CCL2 は腎細胞癌に対する新規標的分子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)

T. Yamasaki (1 番目), et al
Tumor microvasculature with endothelial fenestrations in VHL null clear cell renal cell carcinomas as a potent target of anti-angiogenic therapy.
Cancer Science 2012 Nov;103(11):2027-37.
doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02412.x.

[学会発表] (計 1 件)

新垣、山崎ほか
腎細胞癌に対する新規治療ターゲットとしての CCL2 の検討
第 22 回泌尿器科分子・細胞研究会、2013 年 3 月 9 日、高知

[その他]

ホームページ等
<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 俊成 (Toshinari Yamasaki)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00607749

