

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592404

研究課題名(和文)一酸化窒素供与剤併用による新規腎癌治療法の開発

研究課題名(英文)The effect of Nitric Oxide (NO) treatment on renal cell cancer

研究代表者

本郷 文弥 (HONGO, Fumiya)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80291798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化窒素(NO)はタンパクをS-ニトロソ化することによるシグナル伝達で知られている。NOを供与剤併用の腎癌治療への応用をめざし、腎癌におけるNOの作用についての検討を行った。

腎癌培養細胞(ACHN、CAKI-1、NC60)を用い、NO供与剤としてDETA-NONOateを投与した。ビオチンスイッチ法(ケイマン社)にてS-ニトロソ化タンパクを分離、精製した。その後TOF-MSにてS-ニトロソ化されたタンパクの特定を行ったところ、NC65においてはHSP90、HSP70あるいはHSP70ファミリーであるGRP78をはじめとして計10種のS-ニトロソ化タンパクが特定された。

研究成果の概要(英文)：Purpose and methods: Nitric oxide (NO) is a signaling molecule. This post-translational modification by NO is known as S-nitrosylation. We examined the effect of the NO donor DETA-NONOate on the renal cell cancer cell lines; CAKI-1, NC65, and ACHN. Anti-S-nitroso-Cysteine antibody was applied as a primary antibody for immunohistochemistry. The biotin-switch technique was applied to detect specific S-nitrosylated proteins.

Results and conclusions: Significant up-regulation of S-nitrosylated proteins employed with NO donor was observed by immunohistochemistry. Specific S-nitrosylated proteins in ACHN cells were detected by the biotin-switch technique and included HSP90 (heat shock protein 90), GRP78 (HSP70 family), HSP70, and pyruvate kinase M2. In ACHN cells, Significant up regulation of S-nitrosylated HSP90 by western blot. Conclusions: Our data showed that NO treatment significantly increased S-nitrosylation of several proteins.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：腎癌 一酸化窒素 sニトロソ化

1. 研究開始当初の背景

1) 腎癌における分子標的治療の現在

腎細胞癌の発癌・進行において重要な因子であるHypoxia inducible factor (HIF)-1 α は低酸素状態で活性化される転写因子である。腎細胞癌においてはVHL遺伝子の変異を起こし、その活性が低下すると、vascular endothelial growth factor (VEGF)やplatelet derived growth factor (PDGF)の産生を誘導する。VEGFは腎細胞癌における特徴的な血管増生の主要なメカニズムを担うものと考えられ、実際にこの経路をターゲットとして開発されたチロシンキナーゼ阻害剤(TKD)やmTOR阻害剤(mTORi)の臨床効果が示されている。しかし、完全奏効率は低く、再発・転移を来す症例や治療抵抗性を示す症例も存在する。また、分子標的薬同士の併用は有害事象が強く、現在のところよい組み合わせは得られていない。したがって、有用な治療法の確立が望まれている。

2) VHL-HIF経路とNOのかかわり

腎細胞癌においてはVHL-HIF経路が注目され、分子標的治療のターゲットとなり、臨床応用された。しかし、治療抵抗性が問題となる。その原因としてHIF-1 α やNF- κ Bの活性化があげられる。また、NF- κ BによるHIF-1 α の発現調節(van Uden P, Biochem J, 2008)やNOによるHIF-1 α の抑制作用(Yasuda H et al, Clin Cancer Res, 2006)が報告されている。さらにNOはNF- κ Bの活性抑制作用をもつ。そこで血管新生阻害作用の増強という点でNOの直接的なあるいはNF- κ Bを介したVHL-HIF経路への治療介入が分子標的治療の耐性克服につながる可能性が示唆される。

一方、ソラフェニブやスニチニブといったチロシンキナーゼ阻害剤によるアポトーシス誘導メカニズムの報告に加え、NOによる活性化p53蛋白の増加を介したアポトーシス誘導の経路も報告されている。従って、アポトーシス誘導という点でもチロシンキナー

ゼ阻害剤とNO供与剤の併用の有用性が示唆される。

適切な併用薬としてニトログリセリン(NTG)に注目した。ニトログリセリンはNO供与体であり、これまでより虚血性心疾患に対して使用されており、安全性も高く、廉価である。NO供与剤の癌細胞への影響は以下のものが報告されている。S-ニトロソ化はリン酸化などともにタンパクの翻訳後修飾の1つで、一酸化窒素(NO)によるタンパク修飾である。われわれはこれまでに前立腺癌におけるFasを介したアポトーシスへの抵抗性を転写因子YY-1のS-ニトロソ化により克服できることを報告した(Hongo et al, 2005)。

2. 研究の目的

in vitro および *in vivo* においてヒト腎癌細胞における分子標的薬とNO供与剤との併用による抗腫瘍効果、アポトーシス誘導効果、血管新生阻害効果の検討を行う。さらに *in vivo* において転移抑制効果も明らかにする。その上で、申請者らは腎癌においてVHL-HIF経路をターゲットとし、チロシンキナーゼ阻害剤やmTOR阻害薬とNO供与剤の併用による血管新生とアポトーシスの両シグナル伝達経路を制御するという新しい治療戦略の確立を目指す。その結果をふまえ、臨床への応用を提案する。

3. 研究の方法

腎癌培養細胞として、CAKI-1, ACHN, NC65を用いた。NO供与剤としてDETA/NONOate (100-500 μ M)を用いた。免疫染色によるS-ニトロソ化タンパクの同定は以下の方法で行った。免疫染色は一次抗体として抗Sニトロソステイン抗体を用いた。抗原賦活はPBS(-)にて5min x 3(microwave)にておこなった。ビオチンスイッチ法(ケイマン社)により

S-NO を S-C-biotin に変換後にビーズ (Dynabeads M-280 Streptavidin) を用いて磁気分離し、S-ニトロソ化タンパクを分離、精製した。その後 SDS-polyacrylamide gel 後、TOF-MS にて S-ニトロソ化されたタンパクの特定を行った。

4. 研究成果

腎癌培養細胞株において、免疫染色により NO 供与剤による S-ニトロソ化が確認された。また、その NO 供与剤による S-ニトロソ化は濃度依存性に増強が認められ、バイアブル細胞の減少が認められた (図 1)。

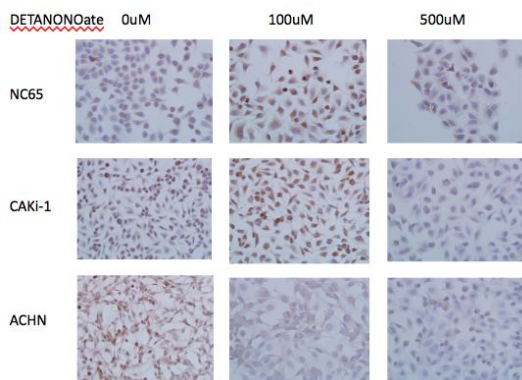


図 1 NO ドナーの投与により濃度依存性に腎癌培養細胞株における Sニトロソタンパクの発現が増強した。(Anti-S-nitroso-Cysteine antibody in rabbit (SIGMA-ALDRICH) 1:2000)

ビオチンスイッチ法により、HSP90 をはじめとしていくつかの Sニトロソ化タンパクが検出された(図 2)。そのタンパクは 9 種であった。HSP90 のほかには GRP78 (HSP70 family), HSP70, and pyruvate kinase M2 等が検出された。#3 HSP90 (heat shock protein 90) は分子シャペロンとして知られている。また、細胞ストレス状況下で発現量が増大するが、通常でも細胞質にもっとも多く存在するタンパク質の一つである。

腎癌培養細胞株である ACHN において HSP90 の Sニトロソ化について、ウエスタンブロットでその発現を確認した (図 3)。NO 供与剤が腎癌細胞に及ぼす影響として

HSP90 が関連している可能性が考えられた。

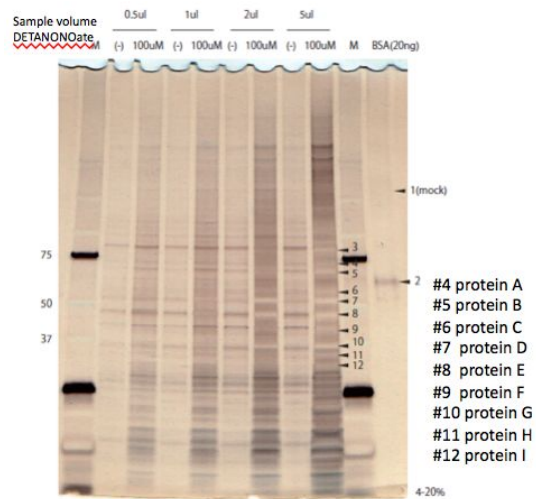


図 2 腎癌培養細胞株 (ACHN) において Sニトロソ化されたタンパクがビオチンスイッチ法により明らかになった。

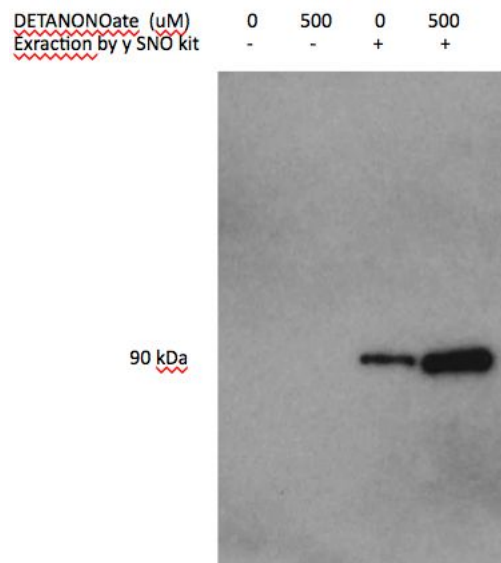


図 3 ウエスタンブロットにより ACHN における Sニトロソ化された HSP90 の発現を認めた。

NO 供与剤による Sニトロソ化が腎癌培養細胞株において確認された。数種のタンパクが確認されたため、どのタンパクが腎癌に対する薬物療法に有効なターゲットとなるかはまだ明らかではない。引き続き研究をすすめ、分子標的薬や新規免疫療法と NO 供与剤の併用による新規薬物療法を確立をめざすものである。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1) Fumiya Hongo, Takashi Ueda, Saya Ito-Ueda, Yasunori Kimura, Terukazu Nakamura, Yoshio Naya, Tsuneharu Miki.
Detection of protein S-nitrosylation by the biotin-switch technique in renal cell cancer cells
2012年9月21日, 第71回日本癌学会, 札幌.

2) Fumiya Hongo, Takashi Ueda, Saya Ito-Ueda, Masakatsu Oishi, Terukazu Nakamura, Yoshio Naya, Tsuneharu Miki
Detection of S-nitrosylated protein in renal cell cancer. AACR 2013, Apr 6-10, 2013. Washington DC, USA.

3) 本郷文弥、上田崇、伊藤紗弥、大石正勝、中村晃和、納谷佳男、三木恒治. 腎癌におけるS-ニトロソ化タンパクの同定. 第101回日本泌尿器科学会, 2013年4月27日, 札幌.

4) Fumiya Hongo, Takashi Ueda, Saya Ito-Ueda, Masakatsu Oishi, Terukazu Nakamura, Yoshio Naya, Tsuneharu Miki.
Detection of S-nitrosylated heat shock protein 90 (HSP90) in renal cell cancer. AACR 2014, Apr 5-9, 2014, San Diego, USA.

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
特記すべきことなし。

6. 研究組織

(1)研究代表者
本郷 文弥 (HONGO, Fumiya)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：80291798

(2)研究分担者
三木 恒治 (MIKI, Tsuneharu)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：10243239

河内 明宏 (KAWAUCHI, Akihiro)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：90240952

中村 晃和 (NAKAMURA, Terukazu)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：10381964

木村 泰典 (KIMURA, Yasunori)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：平成25年6月退職により資格喪失

(3)連携研究者
該当なし