

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：34521

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860072

研究課題名(和文) 内因性抗腫瘍物質を用いた新規腎臓癌治療薬探索研究

研究課題名(英文) Novel therapeutic approach using the endogenous antitumor substance in renal cell carcinoma

研究代表者

山本 泰弘 (Yamamoto, Yasuhiro)

姫路獨協大学・薬学部・准教授

研究者番号：70533850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓癌は、臨床的に抗悪性腫瘍薬が効きにくい難治癌である。本研究では、腎臓癌の新規治療法を探索するために、内因性抗がん物質である15-デオキシ-デルタ12,14-プロスタグランジンJ2(15d-PGJ2)の抗腫瘍効果および標的タンパク質を網羅的に解析した。トポイソメラーゼ阻害薬であるエトポシドと15d-PGJ2の併用によって、それぞれの単独処置に比べて相乗的なアポトーシス誘導による細胞増殖抑制が認められた。また、プロテオーム解析によって、15d-PGJ2と結合するタンパク質として、解糖系酵素、細胞骨格タンパク質、分子シャペロン等、55種類を同定した。

研究成果の概要(英文)：Renal cell carcinoma (RCC) is clinically refractory cancer for resistant to anticancer drug. In this study, to explore the novel therapeutic modality for RCC, we investigated the anticancer effect of endogenous anticancer substance 15-Deoxy- 12, 14-Prostaglandin J2 (15d-PGJ2) and identified the target protein of 15d-PGJ2. The topoisomerase II inhibitor etoposide exhibited cytotoxic effects synergistically with 15d-PGJ2. The 55 target proteins for 15d-PGJ2 were identified by using proteomic approach (e.g. glycolytic enzymes, cytoskeletal proteins and molecular chaperons).

研究分野：医歯薬学

キーワード：腎臓癌 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎臓癌の治療には放射線療法も化学療法も無効の場合が多いことから、根治的腎全摘出を行う外科的切除がスタンダードとなっている。腎臓癌に対して化学療法が奏効しない理由として、腎臓は体内の不要な物質を尿として排泄する性質を持つことから、抗がん剤が腎臓の癌病変部位にまで到達できない、或いは抗がん剤に対する腎臓癌細胞の感受性が低い等の可能性が考えられている。そこで我々は、腎臓癌部にまで到達することができ、かつ腎臓癌細胞に対し細胞毒性を有する内因性物質である 15-デオキシ-デルタ 12,14-プロスタグランジン J₂ (15d-PGJ₂) に着目した。15d-PGJ₂ の抗悪性腫瘍作用は当初、その前駆体である Δ¹²-PGJ₂ が L1210 等の血球がんに対し抗腫瘍作用を示す内因性物質として発見されたことにより見出された。その後、15d-PGJ₂ が大腸癌や肺癌等の固形癌細胞に対しアポトーシスを誘導することが明らかとなり、申請者も 15d-PGJ₂ が Caki-2 腎臓癌細胞に対し細胞増殖抑制作用を持つことを明らかにした。

(2) 15d-PGJ₂ が示す腫瘍細胞毒性は、その受容体である peroxysome proliferator activated receptor γ (PPARγ) を介したものであると考えられていた。しかしながら、PPARγ には腫瘍細胞毒性とは逆の作用である細胞保護作用を持つことが明らかになり、PPARγ 非依存的な経路による細胞死が存在する可能性が示唆されている。近年、申請者が行った検討においても、PPARγ 選択的アゴニストでは細胞死が誘導されず、15d-PGJ₂ によって惹起される細胞死が PPARγ 選択的アンタゴニストで抑制されないことを確認している。また、申請者はラット大脳皮質においてプロテオーム解析法を用いた 15d-PGJ₂ と結合するタンパク質の探索を行い、候補として挙げたあるタンパク質の阻害剤が 15d-PGJ₂ の細胞毒性を抑制することを見出している。これらの結果は 15d-PGJ₂ の PPARγ 非依存的な細胞傷害メカニズム解明の一助となる可能性を秘めており、その成果は 15d-PGJ₂ を利用した、新しい腎臓癌治療薬の開発に繋がるものであると期待される。

2. 研究の目的

15d-PGJ₂ の抗悪性腫瘍効果の作用機序を明らかにし、抗がん剤が効きにくい腎臓癌に対する 15d-PGJ₂ を利用した新しい治療法への臨床応用に展開するための基盤となる研究を行う。

(1) 15d-PGJ₂ ならびに各種薬剤を併用して適用し、腎臓癌細胞の増殖を抑制するものを探索する。

(2) 15d-PGJ₂ の抗腫瘍効果の作用メカニズムを明らかにするために、15d-PGJ₂ が結合す

るタンパク質を網羅的プロテオーム解析によって同定し、15d-PGJ₂ の細胞死誘導のシグナル伝達経路に關与する分子をスクリーニングする。

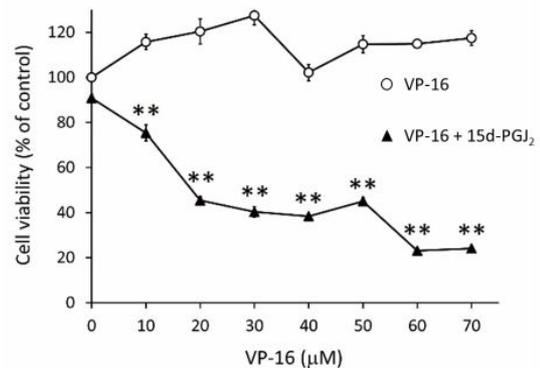
3. 研究の方法

(1) 培養細胞系を用いて、15d-PGJ₂ ならびに各種薬剤を併用して適用し、腎臓癌細胞の増殖を抑制するものを探索する。15d-PGJ₂ と既存の抗悪性腫瘍薬を組み合わせる腎臓癌細胞に適用し、腎臓癌細胞の増殖を抑制するものがないか探索する。

(2) 腎臓癌において網羅的なプロテオーム解析により、15d-PGJ₂ と結合するタンパク質を同定する。腎臓癌細胞にビオチン標識 15d-PGJ₂ を結合させたものから抽出したタンパク質を 2次元電気泳動し、抗ビオチン抗体を用いた Western blotting およびタンパク質染色を行い、Western blotting により検出されたスポットを選択し、質量分析法により結合候補タンパク質を同定する。

4. 研究成果

(1) 15d-PGJ₂ ならびに各種薬剤を併用して適用し、腎臓癌細胞の増殖を抑制するものがないか、検討を行った。15d-PGJ₂ と既存の抗悪性腫瘍薬を組み合わせる腎臓癌細胞株に適用し、腎臓癌細胞の増殖抑制作用について MTT assay を指標に評価した。トポイソメラーゼ阻害薬エトポシドと 15d-PGJ₂ の併用によって、それぞれの単独処置に比べて相乗的な細胞増殖抑制が認められた。また、その作用機序はカスパーゼ-3 の活性化を介したアポトーシス誘導である可能性が示唆された。



Treatment with etoposide (VP-16) enhanced the antiproliferative effect of 15d-PGJ₂ in Caki-2 cells. The cells were assayed for viability using MTT following treatment with VP-16 (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 μM) (open circles) and combination treatment with VP-16 and 15d-PGJ₂ (20 μM) (closed triangles) for 24 h. The results are expressed as the means ± SEM of three independent experiments. **P<0.01, vs. control cells.

(2) 15d-PGJ₂が結合するタンパク質を同定し、これらのタンパク質が抗悪性腫瘍効果にどのような寄与があるかを明らかにする目的で検討を行った。腎臓癌細胞株において2次元電気泳動法ならびに質量分析法を用いたプロテオミクスを行い、15d-PGJ₂と結合するタンパク質として、解糖系酵素、細胞骨格タンパク質、分子シャペロン等、55種類を同定した。同定したタンパク質のうち、いくつかのものは他の細胞腫で15d-PGJ₂標的タンパク質として既に報告されている。これらのタンパク質の腎臓癌細胞における機能解析を行うことによって、新たな分子標的薬の創生も含めた、新規腎臓癌治療戦略が確立されることが期待される。

Target proteins of 15d-PGJ₂

Protein	Length	MW	PI
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	573	61187	5.7
Alpha-actinin-4	911	105245	5.27
Actin filament-associated protein 1-like 2	818	92155	5.22
Actin, cytoplasmic 1	375	42052	5.29
Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	517	56859	6.63
Annexin A2	339	38808	7.57
AP-4 complex subunit beta-1	739	84574	5.59
Aspartyl-tRNA synthetase, isoform CRA b	468	53829	6.1
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	529	56525	5.26
Beta-defensin 136	78	9148	9.18
BN51 protein	395	44122	6.33
Cerebellar degeneration-related protein 2	454	52165	5.01
Chain A, Crystal Structure Of Hsc70BAG1 in complex with ATP	381	42120	6.38
Choline dehydrogenase, mitochondrial	594	66058	8.57
Coiled-coil domain-containing protein 81	652	76777	9.25
E3 ubiquitin-protein ligase RNF115	304	34252	5.39
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	290	31823	8.34
Fc receptor-like protein 2	508	56077	5.98
Frameshift mutation results in premature stop	410	46112	5.48
GDP-fucose protein O-fucosyltransferase 2	429	50229	6.15
Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	300	35020	5.78
Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B	1484	167972	6.47
Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	669	74269	7.85
Glycolipid transfer protein domain-containing protein 2	291	31964	10.19
hCG2038892	55	6587	9.04
Immunoglobulin heavy chain	167	18483	8.23
Immunoglobulin heavy chain variable region	100	11115	9.45
JmjC domain-containing protein 8	334	37075	9.74
Keratin, type II cytoskeletal 1	644	66170	8.15
Keratin, type II cytoskeletal 73	540	59457	6.93
Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	1394	159003	5.81
Mitochondrial ATP synthase, H ⁺ transporting F1 complex beta subunit	445	48083	4.95
Mitochondrial heat shock 60kD protein 1 variant 1	569	60813	5.83
N-alpha-acetyltransferase 16, NatA auxiliary subunit	864	102424	8.06
Non-histone chromosomal protein HMG-14	100	10653	9.6
Ornithine aminotransferase, mitochondrial	439	48846	6.57
Phosphodiesterase 4D interacting protein	1132	129788	5.05
Pleckstrin homology domain-containing family A member 3	300	34353	6.19
Poly [ADP-ribose] polymerase 14	1801	204725	6.81
Presequence protease, mitochondrial	1037	118407	6.5
Prohibitin	272	29843	5.57
Protein disulfide-isomerase isoform X5	357	41073	4.76
Putative uncharacterized protein CXorf28	62	7332	10.45
Septin-5	369	43206	6.21
Spermatogenesis-associated protein 1	437	50504	8.54
Stress-70 protein, mitochondrial precursor	679	73920	5.87
T-complex protein 1 subunit beta	535	57794	6.01
T-complex protein 1 subunit gamma	545	61066	6.1
UDP-GalNAc:beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase	331	39828	7.67
UDP-glucose 6-dehydrogenase	494	55674	6.73
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	294	32060	7.49
WD repeat-containing protein 91	747	84204	6.15
Xyloside xylosyltransferase 1	393	44235	8.35
Zinc finger protein 133 isoform c	654	75579	9.26
Zinc finger protein 189	626	75039	8.85

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4件)

Yamamoto Y, Koma H, Yagami T. Hydrogen peroxide mediated the neurotoxicity of

an antibody against plasmalemmal neuron-specific enolase in primary cortical neurons. Neurotoxicology 2015 in press. 査読有

Yamamoto Y, Koma H, Hiramatsu H, Abe M, Murakami K, Ohya A, Yagami T. Treatment of etoposide combined with 15-deoxy-^{12,14}-prostaglandin J₂ exerted synergistic antitumor effects against renal cell carcinoma via peroxisome proliferator-activated receptor- α -independent pathways. Mol. Clin. Oncol. 2014 2: 292-296. 査読有

Yagami T, Yamamoto Y, Kohma H. Leukotriene receptor antagonists, LY293111 and ONO-1078, protect neurons from the sPLA₂-IB-induced neuronal cell death independently of blocking their receptors. Neurochem. Int. 2013 63(3):163-171. 査読有

Yagami T, Yamamoto Y, Kohma H, Nakamura T, Takasu N, Okamura N. L-type voltage-dependent calcium channel is involved in the snake venom group IA secretory phospholipase A₂-induced neuronal apoptosis. Neurotoxicology. 2013 35C:146-153. 査読有

[学会発表](計8件)

太田栄亮, 山本泰弘, 高馬宏美, 高橋稔, 山田知佳, 中村任, 矢上達郎. 腎臓癌細胞表面においてエノラーゼは発現している. 日本薬学会第135年会. 26PB-pm228. 神戸, 2015年3月

丸地章太, 高橋稔, 山脇知佳, 山本泰弘, 高馬宏美, 矢上達郎, 中村任. 低酸素下ヒト腎がん由来細胞におけるVHL遺伝子非依存的なRNA結合タンパク質の発現誘導. 日本薬学会第135年会. 26PB-pm229. 神戸, 2015年3月

矢上達郎, 太田栄亮, 山本泰弘, 高馬宏美, 15-デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン J₂ と トロンボキサン A₂ は アミロイドベータ惹起回転行動に 関与 する. 第 88 回 日本 薬理 学会 年会. P2-44. 名古屋, 2015年3月

矢上達郎, 山本泰弘, 高馬宏美, 太田栄亮. 脳虚血マーカーである抗熱ショックタンパク質 70 kDa 抗体は H₂O₂ を介して神経細胞死を惹起する. 第 37 回 日本 神経 科学 学会 大会 01-I-6-4. 横浜, 2014年9月

山本健裕, 久保美知華, 田村佳織, 島田愛理, 日向優太, 田中涼葉, 里井俊太, 村上和展, 大宅麻子, 久村誠也, 小林雄馬, 山本泰弘, 高馬宏美, 矢上達郎. 15-デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン J₂ は トポイソメラーゼ 阻害 剤 の 抗 腎 癌 作用 を 増 強 する. 第 87 回 日本 薬理 学会 年会 P1-14-1, 仙台, 2014年3月

矢上達郎, 山本泰弘, 高馬宏美, 村上和

展、大宅麻子、久村誠也、小林雄馬 L型膜電位依存性カルシウムチャンネルは分泌型ホスホリパーゼ A₂ 惹起神経細胞アポトーシスに参与している. 第 87 回日本薬理学会年会、021-4-4、仙台、2014 年 3 月

山本泰弘、高馬宏美、大宅麻子、村上和展、久村誠也、小林雄馬、中村任、矢上達郎 15-deoxy-^{12,14}-PGJ₂ 膜標的タンパク質である神経特異的エノラーゼに対する抗体は過酸化水素を介して神経細胞死を誘導する. 日本薬学会第 134 年会. 28amM-169、熊本、2014 年 3 月

高橋稔、山脇知佳、山本泰弘、高馬宏美、矢上達郎、中村任 低酸素下ヒト腎がん由来細胞における VHL 遺伝子非依存的な RNA 結合タンパク質の発現誘導. 日本薬学会第 134 年会. 30pmL-134、熊本、2014 年 3 月

〔その他〕

ホームページ

http://www.himeji-du.ac.jp/faculty/dp_pharm/pharm/ph3/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 泰弘 (YAMAMOTO YASUHIRO)

姫路獨協大学・薬学部・准教授

研究者番号：70533850