

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870348

研究課題名(和文) エピジェネティック制御異常に着目した腎細胞癌の新規治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Screening for novel therapeutic target molecule focused on the aberrant epigenetic gene regulation in renal cell carcinoma.

研究代表者

室伏 善照 (Murofushi, Yoshiteru)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50448578

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)：本研究は、腎細胞癌(RCC)の遺伝子変異解析結果に基づいた新規標的分子のスクリーニングの有用性と標的分子のvalidationを行うことを目的とした。一次スクリーニングにより複数のエピジェネティクス関連遺伝子が有用な標的遺伝子候補として抽出された。さらにin vitroにおける二次スクリーニングの結果、得られた標的遺伝子候補のshRNA(抑制)はVHL遺伝子変異細胞において有意な増殖抑制効果を示した。また、in vivoにおいても同様の結果が得られた。以上のことから、本研究で得られた標的遺伝子候補はRCCの新規治療標的分子として期待でき、また抽出に用いたスクリーニング法も有用であると示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is that the screening and validation of the novel target molecule based on the results of gene mutation analysis in renal cell carcinoma (RCC). Using first screening we found some epigenetic related genes as useful candidate target genes. Moreover, the shRNA for these candidate genes inhibited cell growth significantly in VHL gene mutant cells in vitro second screening, and showed same results in vivo. These results suggested that these candidate target genes are anticipated as the novel target molecule in RCC and the screening methods used in this project is useful.

研究分野：分子腫瘍学、分子標的治療学

キーワード：腎細胞癌 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌 (RCC) は全腎悪性腫瘍の約 85% を占め、罹患者数が増加傾向にある。局所症状が出にくいいため、初診時に約 25% の症例が既に遠隔転移を有する。また、術後に約 20% の症例で再発を認め、罹患者の約 1/3 が死亡に至る予後不良な疾患である。本邦の 2005 年データでは年間新規罹患者数は 1.8 万人、うち 6,132 人が癌死し、全世界では 2006 年に 209,000 人が罹患し 102,000 人が癌死したと報告 (Rini BI, et al., *Lancet* 2009) されている。進行症例では抗 VEGF 療法が行われるが、完全奏功 (CR) が得られることは稀であり殆どの症例が治療抵抗性を獲得するため、新規治療薬の開発が急務である。

RCC は家族性腫瘍症候群である Von Hippel-Lindau (VHL) 病家系において遺伝性発生を来すことから、同患者 DNA の positional cloning により VHL 癌抑制遺伝子が単離・同定された (Latif F, et al., *Science* 1993)。VHL 遺伝子蛋白 (pVHL) の機能として Hypoxia-inducible factor (HIF) の制御が知られており、当研究グループを含めて HIF の制御が VHL 変異を有する RCC (*VHL*^{-/-} RCC) の発生に必須であることが示された (Kondo K, Nakamura E, et al., *Cancer Cell* 2002; Maranchie J, et al., *Cancer Cell* 2002)。

近年、癌遺伝子、及び、癌抑制遺伝子を探索するべく Whole-genome sequence や Exome sequence が行われているが、RCC においても新たな変異遺伝子が報告された (van Haafden G, et al., *Nat Genet.* 2009; Dalglish GL, et al., *Nature* 2010; Peña-Llopis S, et al., *Nat Genet.* 2012)。その中で特に、エピジェネティクス (クロマチンリモデリングやメチル化) に関わるヒストン修飾酵素 (ヒストン脱メチル化酵素、及び、ヒストンメチル化酵素) をコードする遺伝子の変異が注目されている。これらの変異は一定の頻度で存在することから、エピジェネティクスで制御される RCC の進展に関連する遺伝子の存在が示唆される。

2. 研究の目的

本研究は RCC の遺伝子変異解析結果に基づいた新規標的分子のスクリーニングの有用性と標的分子の validation を行い、以下の点を明らかにすることを目的とする。

- 1) 8 種類の *VHL*^{-/-} RCC 細胞株に対して、mini pooled shRNA library、及び、Deep sequencing 法を併用してクロマチンリモデリング、及び、ヒストンのメチル化の制御に働く遺伝子群の細胞増殖に与える影響を *in vitro*、及び、*in vivo* において明らかにする。
- 2) *VHL*^{-/-} RCC 細胞株の細胞増殖に対して特異的に負に働く (Synthetic lethal) 関連遺伝子を同定し、下流標的遺伝子を明らかにすることで、創薬を目指した治療標的分子の同定を行う。

3. 研究の方法

- 1) クロマチンリモデリング、及び、ヒストン修飾に働く候補遺伝子を選択し、各々 1 遺伝子につき数種の small hairpin RNAs (shRNAs) を選択して mini pooled shRNA library を作製する。各 shRNA を導入した *VHL*^{-/-} RCC 細胞株から genome DNA を抽出し、Deep sequencing により integration された shRNA を検知する。

mini pooled shRNA library と Deep sequencing の併用 (一次スクリーニング) により得られた有用な標的遺伝子候補について、*VHL*^{-/-} RCC 細胞 (Mock) と wt-VHL を再導入した *VHL* (+) コントロール細胞 (VHL) を用いて、標的遺伝子候補に対する shRNA を導入し、結果の再現性を clonogenic assay により確認する (二次スクリーニング)。また、shRNA も複数用いて再現性の向上をはかる。

- 2) 二次スクリーニングにて *in vitro* で VHL 細胞に対して Mock 細胞において増殖抑制効果を示した shRNA について、同 shRNA 導入 Mock 細胞を用いてヌードマウスの *in vivo* 皮下腫瘍モデルを作製し、*in vivo* での腫瘍増殖抑制効果を評価し、標的遺伝子候補に対する shRNA の RCC 治療の有用性を検討する。

4. 研究成果

1) 標的遺伝子候補のin vitroにおけるvalidation (二次スクリーニング)

i) 一次スクリーニングにより複数のヒストン修飾酵素遺伝子が有用な標的遺伝子候補として抽出された。RCC組織において変異を認めるヒストン修飾酵素を標的としたhairpinについて先行検証を行い、VHL細胞と比較してMock細胞においてhairpinの検出頻度が増加しており細胞増殖に有利に働いたことが示された。この結果より一次スクリーニングの信頼性が確認された。

ii) 対照的に、逆の作用を示す修飾酵素は逆の結果が導き出されると予想された。逆の作用を示すヒストン修飾酵素遺伝子を標的としたhairpinは、VHL細胞と比較してMock細胞においてhairpinの検出頻度が減少しており増殖抑制効果を示すことから、標的遺伝子候補の一つであると考えられた。

iii) 一次スクリーニングにより増殖抑制効果を示す遺伝子候補のshRNAを導入したVHL細胞とMock細胞を用いてclonogenic assayによるin vitroでの二次スクリーニングを行い、結果の再現性の確認を行った。複数のhairpinでの再現性は認められなかったが、有用なhairpinにおいて、一次スクリーニングと同様にVHL細胞と比較してMock細胞において有意な増殖抑制効果を示す (Fig. 1)、再現性が高い有力な標的遺伝子候補を複数絞り込むことができた。この結果はスクリーニングの有用性と信頼性を示すものと考え得る。

2) In vivo 皮下腫瘍モデル

一次スクリーニングにより得られた有力な標的遺伝子候補のうち、先行して評価・検討を進めた最有力の標的遺伝子候補について、レンチウイルスによりshRNAを導入したMock細胞をヌードマウスに皮下移植してin vivo皮下腫瘍モデルを作製し、評価した。コントロール細胞 (コントロールshRNA導入Mock細胞) と比較して、移植後37日に有意な増殖抑制が認められた (Fig. 2)。

Fig. 1

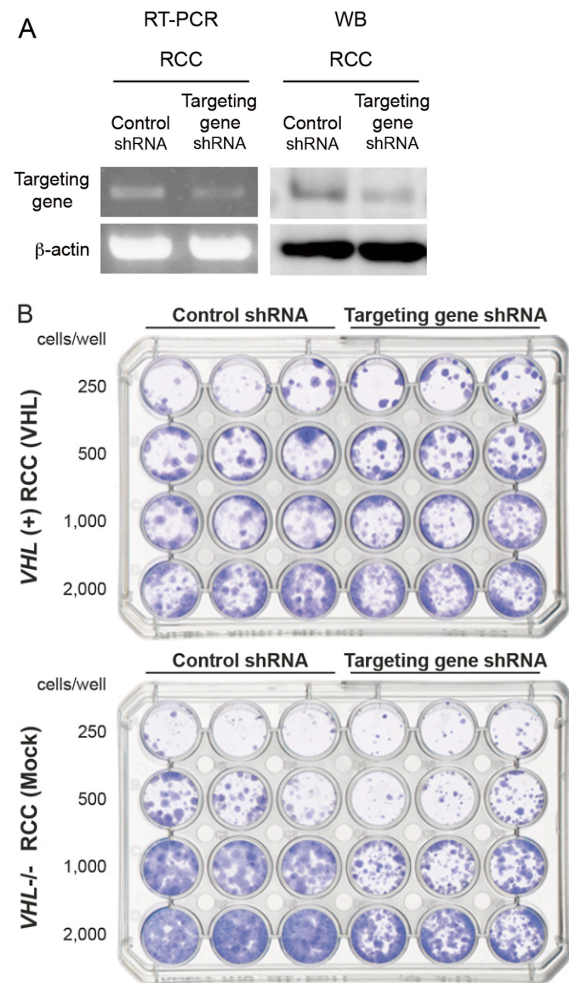
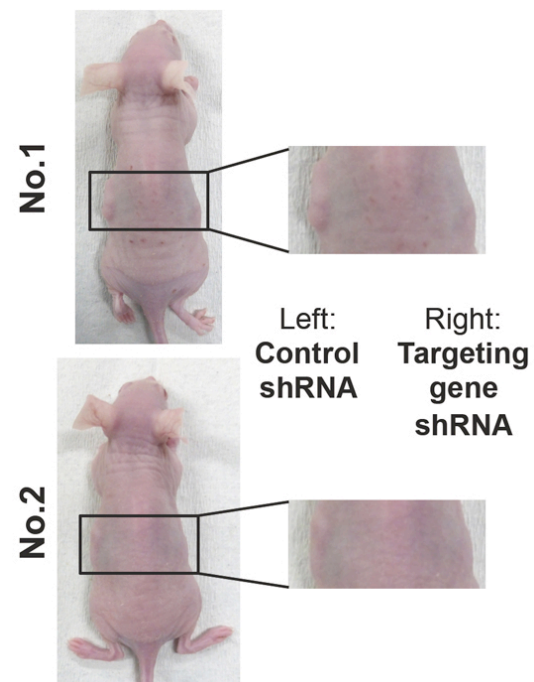
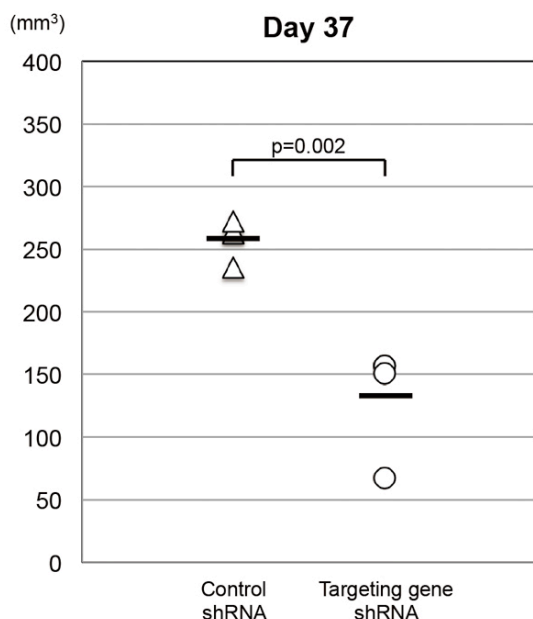


Fig. 2





以上のことから、得られたエピジェネティクス関連の標的遺伝子候補はRCCの新規治療標的分子として期待できるものであり、またその抽出に用いたスクリーニング法も有用であることが示された。今後は、Off Target Effectの検証とともに、標的遺伝子のさらなる機能解析を行うことが重要である。

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1件)

1. 室伏善照, 木我敬太, 中村英二郎. Phenotypic characteristics of renal disease in patients with von Hippel-Lindau disease. 腎と透析, 77 (5), 770-773, 2014

[学会発表] (計3件)

1. Murofushi Y, Imamura K, Kiga K, Sugiyama A, Inoue H, Ogawa O, Hiai H and Nakamura E. Novel disease model of pheochromocytoma using VHL patient-derived iPS cells. The 4th Global Cancer Genomics Consortium Symposium, Nov 14-15, 2014 (Kyoto)
2. Murofushi Y, Imamura K, Niwa A, Yamasaki T, Kamba T, Saito M, Inoue H, Ogawa O and Nakamura E. : Development of new experiment models for VHL hereditary cancer disease by using patient-derived iPS cells. 11th International VHL Medical Symposium 2014, Oct 23-25, 2014 (Madrid, Spain)

3. Nakamura E, Murofushi Y, Imamura K, Niwa A, Sugiyama A, Kinoshita K, Arakaki R, Shibasaki N, Yamasaki T, Kamba T, Saito M, Inoue H, Ogawa O. : Development of new therapeutic strategy for VHL hereditary cancer disease by using patient-derived iPS cells. 73th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sep 25-27, 2014 (Yokohama)

[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]

ホームページ等

<http://www.dsk.med.kyoto-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室伏 善照 (MUROFUSHI, YOSHITERU)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号 : 5 0 4 4 8 5 7 8

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし