

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861287

研究課題名(和文) ナノ磁性ビーズを用いたmTOR阻害薬の抗腫瘍効果メカニズムの解析

研究課題名(英文) Exploring the mechanism of action of mTOR inhibitors in renal cell carcinoma

研究代表者

大石 正勝(Oishi, Masakatsu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：90405316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：mTOR阻害薬に対する感受性の異なる腎癌細胞株を探索し、これらの細胞抽出液中のmTOR阻害薬結合蛋白として、 β -actin, RPS18, C1QBP, PHBを精製・同定した。C1QBP、PHB1の発現抑制で薬剤の細胞増殖抑制効果に明らかな影響が見られなかった。以上より、腎癌細胞株においてmTOR阻害薬とC1QBP、PHB1が結合していると考えられたが、mTOR阻害薬の細胞増殖抑制効果への関与は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We purified and identified the binding proteins of mTOR inhibitors from renal cell carcinoma cells. Beta-actin, RPS18, C1QBP, and PHB were identified as the binding proteins of mTOR inhibitors. Knockdown of C1QBP or PHB1 did not affect cell growth inhibition by mTOR inhibitors in renal cell carcinoma cells. These results suggest that mTOR inhibitors bind to C1QBP and PHB1, but these binding proteins do not affect cell growth inhibition by mTOR inhibitors.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎癌 mTOR阻害薬 ナノ磁性ビーズ ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

転移性腎細胞癌の治療は分子標的薬の導入により、その治療成績は著しく改善されてきた。しかし、継続使用による治療抵抗性や、多彩な副作用による継続投与の中断が大きな課題である。腎癌分子標的治療薬である mTOR 阻害薬も有効性は示されているものの、もともと不応性のものや、継続使用による抵抗性や副作用が認められる (Motzer RJ *et al.* Lancet 2008)。

mTOR 阻害薬は FKBP12 と結合し、mTOR 阻害効果を発揮していることは報告されているが (Guertin DA *et al.* Cancer cell 2007)、副作用として間質性肺炎を高頻度に認めるがその分子メカニズムの詳細は不明である (Maroto JP *et al.* Journal of Clinical Oncology 2011) との報告や、間質性肺炎が出現している症例の方が奏効率が高い傾向があるとも報告されている (Dabydeen DA *et al.* Eur J Cancer 2012)。このように、FKBP12 との結合以外に、実際にどのような蛋白が関与し、抵抗性や副作用を引き起こしているかについてはほとんど明らかになっていない。

一方、ケミカルバイオロジーとは、生理活性物質や薬剤を用いて、生命現象の分子機構を解き明かしていく研究分野である。近年ケミカルバイオロジーの進展により、薬剤結合蛋白を同定する技術が発展を遂げている。その手法の一つであるナノ磁性ビーズ (Shimizu *et al.* Nat Biotechnol. 2000) を用いてサリドマイド結合蛋白が見出され、その結合蛋白の機能解析を通して、サリドマイドによる催奇形性の分子機構が明らかになった (Ito T *et al.* Science 2010) という報告もあり、近年脚光を浴びてきている分野である。

筆者もケミカルバイオロジーの手法を用いて、野菜、果物などの食品成分に多く含まれるフラボノイドが、TRAIL の感受性を増加させるメカニズムの解析を行ってきた。そし

て、異なるメカニズムにより TRAIL 感受性増加作用を持つ 2 種類のフラボノイドと前立腺癌細胞との結合蛋白を比較した結果、フラボノイドであるアピゲニンが TRAIL の receptor である DR5 を誘導するメカニズムの解明に成功した (Oishi M *et al.* PLoS ONE 2013)。

また、癌予防効果が報告されているフラボノイドであるアピゲニンの癌細胞内の直接の標的分子を、ナノ磁性ビーズを用いて見出し、RNAi 法を用いてその標的分子が細胞周期の G2 期を制御する新規蛋白であることも明らかにし、アピゲニンによる癌予防効果の分子機構を明らかにした (Iizumi Y, Oishi M *et al.* PLoS ONE 2013)。

このような研究の経緯より、生理活性物質の標的分子探索技術と標的分子の機能解析技術を用いて、mTOR 阻害薬の感受性の異なる腎癌細胞株と mTOR 阻害薬との結合蛋白を同定し、抗癌効果の解明を行うという着想に至った。

2. 研究の目的

ナノ磁性ビーズを用いた手法により、腎癌における mTOR 阻害薬の結合蛋白を同定する。この結合蛋白の解析により、mTOR 阻害薬の抗腫瘍効果のメカニズムや抵抗性の原因を発見し、新たな腎癌治療法へとつなげる。

3. 研究の方法

1) 腎癌の分子標的治療剤、mTOR 阻害薬である、エベロリムス、テムシロリムスと複数の腎癌細胞株 (A498, ACHN, Caki-1, 786-0) の感受性を細胞増殖試験により調べることで、薬剤による効果の違い、腎癌細胞株による感受性の違いを明らかにする。

2) mTOR 阻害薬をナノ磁性ビーズに固定化し、mTOR 阻害薬固定化ビーズを作製する。この際 mTOR 阻害薬固定の至適条件を検討する。そして、1) で検討した感受性に差がある 2 種類の腎癌細胞株の抽出液と混合することで、mTOR

阻害薬に直接結合する蛋白を精製する。

3) 精製した蛋白をポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、銀染色を行い薬剤間あるいは、腎癌細胞の種類による結合蛋白の違いを比較する。結合に差を認める蛋白や共通に結合している蛋白を質量分析計(MALDI-TOF MS)で同定し、文献検索により増殖抑制や抵抗性に関与しているかを精査する。

4) 3)で同定された結合蛋白をウエスタンブロット法で確認する。次にこの蛋白を腎癌細胞において RNAi 法による発現抑制を行うことで、これらの蛋白の腎癌細胞での機能や、mTOR 阻害薬の効果にどのような影響を与えるかを検討する。

4. 研究成果

1) 腎癌細胞株である A-498, ACHN, Caki-1, 786-0 を用いて、mTOR 阻害薬であるエベロリムス、テムシロリムスの感受性を細胞増殖試験(WST-8 法)で調べた。その結果エベロリムス、テムシロリムスとも Caki-1, 786-0, A-498 で増殖抑制効果に差が見られたため、再度 3 種の細胞で精査し、Caki-1, 786-0 を使用することとした(図1)。

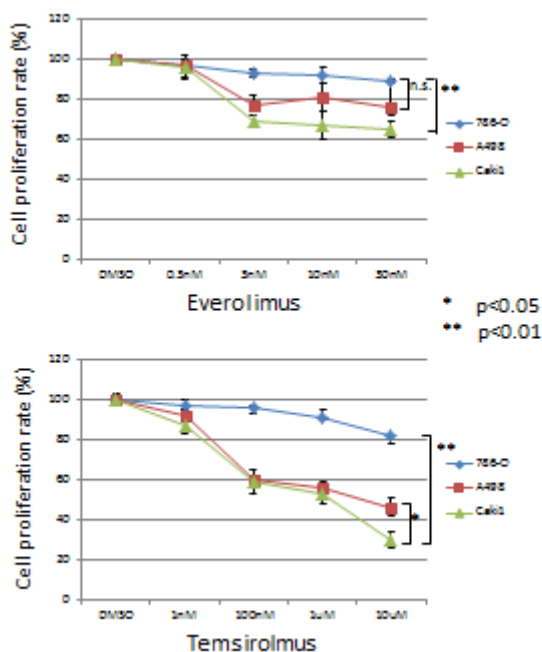


図1 mTOR阻害薬の感受性の検討

2) カルボキシル基を表面に有したナノ磁性ビーズ(多摩川精機株式会社)に mTOR 阻害薬を化学結合を用いて固定した(図2)。mTOR 阻害薬固定化ビーズを、Caki-1, 786-0 から作製した細胞抽出液(whole cell lysate)に投入し、結合反応させて、ビーズを磁気分離し、洗浄後、結合蛋白を分離、精製した。続いてポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行い、銀染色で検出した。mTOR 阻害薬をビーズに固定化する際に、0mM、1mM、10mM、50mM の濃度のエベロリムスを用いて行ったところ、0mM では検出されないバンドが、50mM で最も明らかに検出されており、以降はエベロリムス、テムシロリムスとも 50mM の濃度で薬剤をビーズに固定化した。

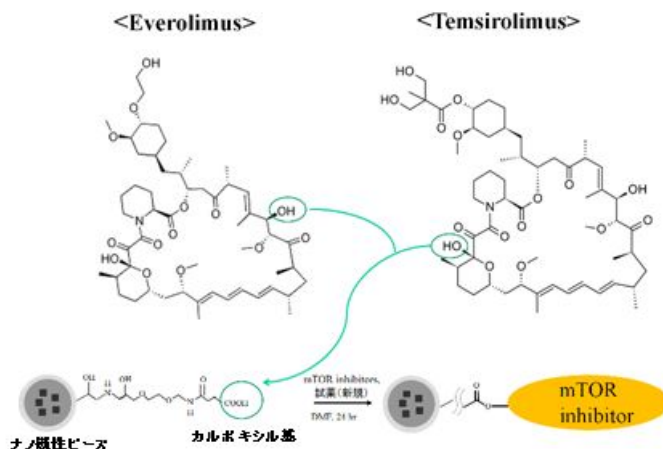
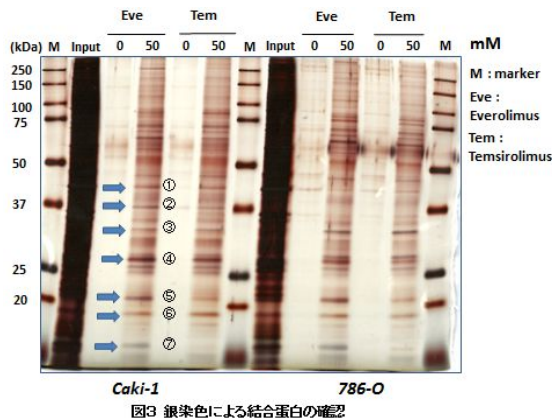


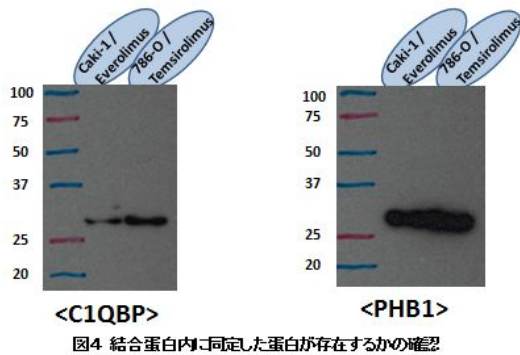
図2 mTOR阻害薬固定化ビーズ作成の模式図

3) エベロリムス、テムシロリムスをそれぞれ固定化したビーズを 786-0, Caki-1 の細胞抽出液と混合し、作成した結合蛋白の銀染色の所見を検討し、共通に結合している蛋白、結合に差がある蛋白を視認した。約 20 倍の濃度の mTOR 阻害薬結合蛋白を精製し、銀染色で確認後、それぞれのバンドを切り出し、質量分析計(MALDI-TOF MS)を用いて蛋白を同定した(図3)。これにより actin、complement component 1 q subcomponent binding protein (C1QBP)、Prohibitin (PHB)、Ribosomal protein S18 (RPS18)を同定した。これらのうち、がん細胞の増殖等に関与し、mTOR 阻害薬の抗腫瘍効果と関連が

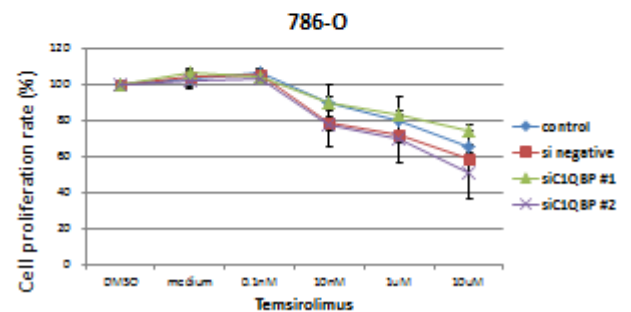
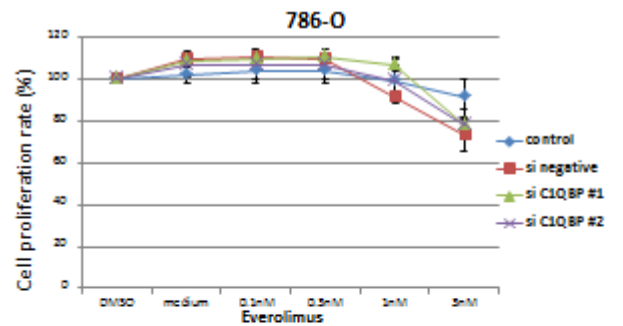
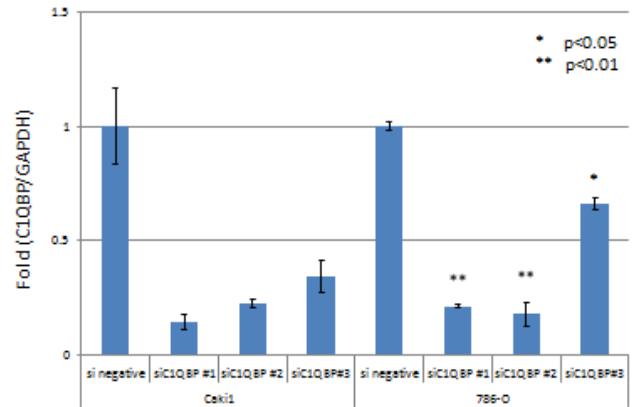
あると考えられた C1QBP、PHB について精査することとした。



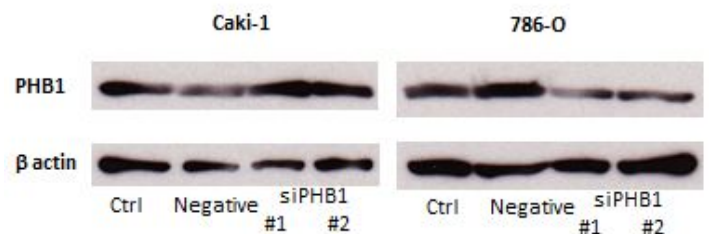
4)3)で同定された蛋白が本当に精製されてきた蛋白中に存在するかを、ウエスタンブロット法を用いて確認した(図4)。具体的にはC1QBP、PHB1の抗体を用いて、C1QBP、PHB1が存在することを確認した。



次にこれらの蛋白の発現抑制を行い、腎癌細胞において mTOR 阻害薬の効果に影響があるかを調べた。まず、C1QBP について、RNAi 法を用いて、mRNA レベルでの発現抑制を確認した(図5)。次に、RNAi 法で C1QBP の発現抑制を行った腎癌細胞株を mTOR 阻害薬で処理し、細胞増殖抑制効果に影響があるか WST-8 法を用いて検討した(図6)。しかし、Caki-1 では有意差をもった発現抑制ができず、また 786-0 では発現抑制はできたが、再現性を持った感受性への影響は確認できなかった。



次に PHB1 についても同様に発現抑制を行い、ウエスタンブロット法で確認したところ蛋白レベルでは 786-0 のみ低下していた(図7)。細胞増殖抑制に関する効果については同様に再現性を持った感受性への影響は見られなかった(図8)。



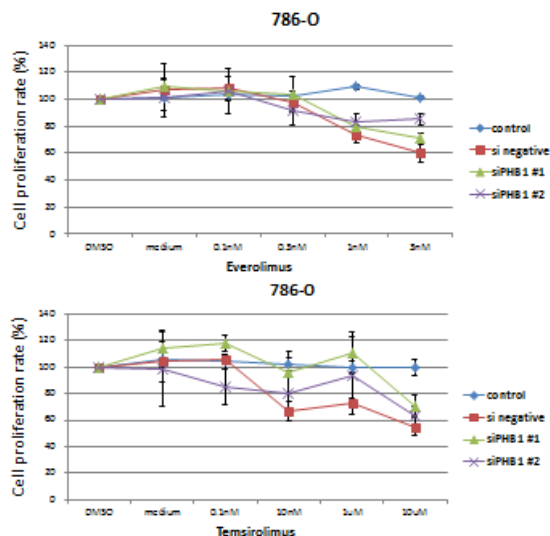


図8 PHB1のmTOR阻害薬の増殖抑制効果への関与の検討

これらの結果より、腎癌細胞株(786-O, Caki-1)において mTOR 阻害薬と C1QBP、PHB1 が結合していると考えられたが、mTOR 阻害薬の癌細胞増殖抑制効果への関与は認めなかった。今後は C1QBP、PHB1 の共発現抑制での影響、あるいは他の結合蛋白の探索や RPS18 について検討する。

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 1 件)

The role of mTOR inhibitor binding proteins : exploring the mechanism of mTOR inhibitor. Masakatsu Oishi, Takashi Ueda, Takumi Shiraishi, Hiroyuki Nakanishi, Terukazu Nakamura, Yoshio Naya, Fumiya Hongo, Koji Okihara, Tsuneharu Miki and Osamu Ukimura, The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2015/10/10, **名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)**

[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:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大石 正勝(OISHI, Masakatsu)

京都府立医科大学・医学研究科・特任助教

研究者番号: 90405316

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし