

学位論文題名

Impact of mTORC2-HIF-2 α signaling pathway on the regulation of E-cadherin expression and cell motility in renal cell carcinoma

(腎癌細胞におけるE-cadherin発現および細胞運動能に及ぼす
mTORC2-HIF-2 α シグナルの重要性に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景・目的】腎細胞癌は病理学的所見から淡明細胞型腎細胞癌と非淡明細胞型腎細胞癌の2つに大別され、淡明腎細胞癌は腎癌全体の約75-80%を占めている。淡明腎細胞癌が生じる原因のひとつに Von Hippel-Lindau(VHL)遺伝子の欠損があり、VHL 遺伝子は通常酸素下において hypoxia-inducible factor (HIF)の分解に関与している。従って VHL 遺伝子を有する細胞では、通常酸素下で HIF の活性は極めて低い。しかしながら、VHL 遺伝子の欠損した淡明腎細胞癌においては、転写因子である HIF が恒常的に維持されている。局所腎細胞癌の治療は根治的摘除術が第一選択であるが、転移を有する進行性腎細胞癌に対しては分子標的治療薬 mTOR 阻害剤(everolimus, temsirolimus)が広く使用されている。mTOR は mTORComplex1 (mTORC1)と Complex2 (mTORC2)からなるが、既存の mTOR 阻害剤は mTORC1 阻害による細胞増殖抑制効果と血管新生阻害効果が報告されている。一方、mTORC2 も腎癌の進展に重要である事が唆されているが、まだそのメカニズムは十分に解明されていない。近年 mTORC2 シグナルの下流にある HIF-2 α の活性化により癌細胞の E-cadherin の発現抑制が起こることが報告されている。E-cadherin は上皮細胞における代表的な細胞間接着因子であり、その発現の減弱・消失が癌の悪性度や転移と相関する。我々は、mTORC2- HIF-2 α 経路の阻害が腎癌細胞の E-cadherin の発現や細胞の運動能に及ぼす効果を解析するとともに、mTORC2 が腎癌治療の新たなターゲットとなりうるか検討を加えた

【方法】1) VHL を導入した腎がん細胞株 RCC4/VHL を指標として、VHL 欠損腎がん細胞株 RCC4 および 786-O について E-cadherin の発現と局在を real time-PCR 法、Western blot 法、免疫蛍光染色法にて検討し、time-lapse 顕微鏡にて個々の細胞の運動能を検討した。2) VHL 欠損細胞株 786-O において、作用機序の異なる mTOR 阻害剤、Rapamycin (mTORC1 阻害剤)および PP242 (mTORC1C2 阻害剤)を用いて、用量時間依存性による E-cadherin の発現変化を real-time PCR 法、Western blot 法で検討し、その局在を免疫蛍光染色法で確認した。また time-lapse 顕微鏡と wound healing assay を用いて、細胞の運動能と遊走能を検討した。

【結果】1) RCC4/VHL 細胞が HIF-2 α の発現低下および細胞の junction に E-cadherin の

発現を認めるのに対し VHL 欠損腎がん細胞株 RCC4、786-O 細胞では、HIF-2 α の発現亢進と E-cadherin の発現低下を認めた。また time-lapse 顕微鏡にて細胞の移動距離を測定すると、RCC4/VHL 細胞に比較して、RCC4 および 786-O 細胞では、細胞の移動距離が有意に長く、運動能が亢進していた。従って VHL 欠損腎がん細胞株 RCC4 と 786-O では、HIF-2 α の発現亢進と E-cadherin の発現低下を認め、RCC4/VHL 細胞に比べて運動能が亢進している事を確認した。2) 786-O 細胞に対して 0.05~0.5 μ M の PP242 で処理すると、HIF-2 α の発現低下に伴い、用量依存的に E-cadherin の蛋白/遺伝子レベルでの発現が確認され 0.5 μ M で有意に増強した。また PP242 を同濃度で 8,16,24 時間作用させると、時間を追って E-cadherin の発現が増加し 24 時間で有意に増強した。さらに PP242 投与により免疫蛍光染色にて細胞の junction に E-cadherin の局在が確認された。一方、rapamycin 投与ではこれらの効果を認めなかった。また 786-O 細胞の移動距離を測定すると PP242 投与群では rapamycin 投与群に比べて有意に移動距離が短く、運動能の低下を認めた。さらに創傷治癒面積を比較すると PP242 投与群では濃度依存的に治癒面積が抑制され、rapamycin 投与群に比べて遊走能も低下している事が明らかとなった。

【考察】 mTORC1 は数多くの癌腫を活性化している事で知られる phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 経路により活性化されており、mTORC1 は癌治療の標的分子として優れていると考えられている。しかしながら mTORC1 の下流に存在する S6K1 は PI3K/Akt 経路を負のフィードバックで抑制しており、mTORC1 の持続的な阻害は、PI3K/Akt 経路の活性化を誘導してしまうという欠点がある。それに対して近年 mTORC2 は直接的に Akt をリン酸化することで Akt 活性を完全に制御出来る事が報告された。それゆえ癌治療における mTORC2 の制御の重要性が認識されはじめている。PP242 は mTORC2 の Akt リン酸化を阻害する作用があり、mTORC2 および Akt の下流に存在する mTORC1 の両方の制御を可能にしている事から、今後臨床応用が期待される。我々の研究では 786-O 細胞株への PP242 投与は E-cadherin の遺伝子および蛋白レベルでの発現増強を認め、これらの効果は HIF-2 α の抑制に付随するものと考えられる。遺伝子操作により HIF 活性を抑制する事で E-cadherin の発現が増強する事は、近年明らかとなっており、我々の実験は mTORC1/C2 阻害剤 PP242 投与による HIF-2 α の抑制が E-cadherin の発現を増強させ、薬剤の使用によっても同様の結果であった事を証明した。また我々の研究は mTORC2/HIF-2 α 経路の抑制が 786-O 細胞の運動能や遊走能も抑制し得る事を証明した。E-cadherin の制御は細胞の運動能や腫瘍増殖および転移に密接に関連する事が知られている。また E-cadherin の発現は予後にも影響しており、E-cadherin の発現が低下した腎細胞癌患者は予後が悪かったとの報告もあり、PP242 投与による E-cadherin の発現増強には腫瘍の増殖や転移を抑制する可能性がある。

【結論】我々の研究は mTORC2、HIF-2 α そして E-cadherin の経路を制御する事で細胞の接着能を亢進させ細胞の運動能を抑制するという観点から、進行性腎細胞癌治療における新規治療戦略の基礎になり得ることを示した。それゆえに mTORC2 は腎細胞癌の浸潤や転移を抑制するための重要な標的であると言える。さらに mTORC1/C2 阻害剤は cadherin を制御する薬剤として進行性腎細胞癌における新規治療戦略のひとつになる可能性がある。

学位論文審査の要旨

主査	教授	櫻木	範明
副査	准教授	篠原	信雄
副査	准教授	濱田	淳一
副査	教授	武富	紹信

学位論文題名

Impact of mTORC2-HIF-2 α signaling pathway on the regulation of E-cadherin expression and cell motility in renal cell carcinoma

(腎癌細胞におけるE-cadherin発現および細胞運動能に及ぼす
mTORC2-HIF-2 α シグナルの重要性に関する研究)

転移を有する進行性腎細胞癌に mTORComplex1 (mTORC1) 阻害剤が使用されているが、mTOR には Complex2 (mTORC2) が存在し、下流の HIF-2 α は E-cadherin の発現を抑制することが指摘されている。申請者は mTORC2 阻害が腎癌細胞の HIF-2 α 、E-cadherin の発現に及ぼす効果を解析するとともに、mTORC2 が腎癌治療の新たな標的分子となりうるか検討した。

まず VHL 癌抑制遺伝子を導入した腎癌細胞株 RCC4/VHL を指標として、VHL 欠損腎癌細胞株 RCC4、786-O について E-cadherin の発現と細胞の運動能を検討した。RCC4、786-O 細胞では、RCC4/VHL 細胞に比較して、HIF-2 α の発現亢進と E-cadherin 発現低下を認め、細胞運動能の亢進を認めた。

次に E-cadherin の発現が低下し、運動能の亢進した 786-O 細胞株において、作用機序の異なる mTOR 阻害剤、Rapamycin (mTORC1 阻害剤) および PP242 (mTORC1/C2 阻害剤)、を用いて、E-cadherin の発現変化と細胞の運動能を検討した。PP242 で処理すると、HIF-2 α の発現低下に伴い、用量時間依存的に mRNA および蛋白レベルでの E-cadherin の発現増強が起こり、その発現は、免疫蛍光染色にて細胞の接着面に確認された。また各細胞の移動距離を測定すると PP242 投与群では有意に移動距離が短く、運動能の低下を認めた。また Wound healing assay を用いて遊走能を比較すると、PP242 投与では濃度依存的な遊走能の低下を認めた。一方 Rapamycin 投与ではこれらの効果を認めなかった。

PP242 処理による mTORC2 阻害により、VHL 欠損腎癌細胞の E-cadherin の発現増強は用量時間依存性に起こり、細胞の運動能は低下することが示された。mTORC2 は腎癌治療における新たな標的分子となりうると考えられた。

審査に際して、武富教授より、1) 臨床検体における E-cadherin 発現と VHL 発現の関係、2) HIF-1 α 発現がある細胞での E-cadherin 発現への mTOR 阻害剤の効果について質問があった。申請者は VHL 欠損した組織では、E-cadherin の発現は抑制されており、VHL 発現がある組織においては、E-cadherin の発現を認める事が多く VHL と E-cadherin の発現は相関しているとの報告があること、および PP242 は mTORC1 および mTORC2 の両方の阻害作用を持ち合わせているため、HIF-1 α の発現も同時に抑制され、PP242 投与により、E-cadherin の発現が増強すると考えていると回答した。濱田准教授より、1) HIF-2 α は E-cadherin 発現を直接制御しているか、それともこの経路に何らかの因子が関与しているか、2) 腎癌細胞 786-O での運動能亢進メカニズムについて質問があった。これに対し、786-O 細胞において、HIF-2 α は Snail および SIP1 等の EMT 誘導転写因子を介して E-cadherin を制御しているとの報告があること、E-cadherin だけではなく、N-cadherin の高発現も細胞の運動能に関与している可能性があるかと回答した。篠原准教授より他癌腫において、mTORC2 の制御による cadherin 発現についての先行研究について質問があり、悪性黒色腫の細胞を使用して、PI3K-PTEN pathway を制御する事で E-cadherin と N-cadherin の switching が起こる事を発表した論文があると回答した。櫻木教授より臨床における進行性腎細胞癌の治療について質問があり、転移を有する進行性腎細胞癌に対し抗癌剤治療・放射線治療効果が低いため IFN- α や IL-2 等のサイトカイン療法が主流であったが、その奏効率は 15-20% であり満足すべきものではなかった。しかし、2008 年以降はスニチニブ等のチロシンキナーゼ阻害剤やエベロリムス等の mTORC1 阻害剤が使用されており標準治療となっていると回答した。

本研究は、薬剤投与による mTORC2 の制御が HIF-2 α の発現を抑制し、cadherin の switching に伴い細胞の運動能も制御する事を初めて明らかにした。更なる研究により、mTORC1/C2 阻害剤が、cadherin の制御を介した進行性腎細胞癌に対する新規治療戦略になる事が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。