

論文内容要旨

論文題目

淡明型腎細胞癌に対する ERK5 阻害は有望な治療標的である

(ERK5 is a potential therapeutic target for Clear Cell Renal Cell Carcinoma.)

責任講座： 腎泌尿器外科学講座

氏 名： 菅野 秀典

【内容要旨】 (1,200 字以内)

背景と目的：腎細胞癌 (renal cell carcinoma: RCC) は腎の悪性腫瘍で最も頻度が高く、その 70-75%は淡明型腎細胞癌 (clear cell renal cell carcinoma: ccRCC) である。ccRCC の 90%以上が *von Hippel Lindau (VHL)* 遺伝子変異を有する。Extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) は細胞増殖や血管新生、抗アポトーシスに関わると考えられ、他癌種において治療標的としての可能性が示されている。近年、ERK5 は VHL タンパク質 (pVHL) を介したプロセスで分解されることが明らかとなった。高率に *VHL* が不活化している RCC では ERK5 が蓄積していると推定される。また、他癌種において ERK5 はマイクロ RNA である miR143 によって調整されているとの報告があり、RCC においても miR143 が ERK5 発現を制御している可能性がある。

本研究では、ccRCC における ERK5、miR143 の発現と機能の解析、および ERK5 が治療標的となるか、検討した。

方法と対象：2006～2012 年の間に当科で摘出された腎癌の臨床検体 250 例について抗 ERK5 抗体による免疫組織染色を行い、臨床的検討を行った。miR-143 が ERK5 発現に関与するか確認するため pre-miR-143 を腎癌細胞株 A498 に導入し

ERK5 の発現を検討した。臨床検体 48 症例について、定量的 RT-PCR 法により miR-143 の発現を検討した。siRNA 法、特異的阻害剤 XMD8-92 により ERK5 を阻害し、ウエスタンブロット法、細胞増殖アッセイ、アポトーシスアッセイ、A498 細胞株の腫瘍移植マウスモデルにより ERK5 阻害の効果を検討した。

結果：臨床検体での免疫染色にて、ERK5 強発現は 82 例（33.0%）で認め、ERK5 強発現群は発現無し/弱発現群と比較して生存期間と癌特異的生存期間が有意に短かった（log-rank test : $p=0.0197$, $p=0.00271$ ）。腎癌細胞株 5 株のなかで 2 株が ERK5 強発現しており、その 2 株は *VHL* 変異をもち、かつ miR-143 発現が低い傾向があった。さらに臨床検体 48 例では、miR-143 低発現群、正常・高発現群における ERK5 強発現症例の割合は、それぞれ 64.3%、29.4%で、miR-143 低発現症例において ERK5 強発現症例が多かった（ $p=0.0491$ ）。また、miR-143 低発現株 A498 に pre-miR143 導入したところ ERK5 発現低下が見られた。siERK5 法でノックダウンすることで p21 の発現亢進、Bcl-2 発現低下を認めた。XMD8-92 を用いて A498 細胞株を処理することで、ウエスタンブロッティング法で XIAP、Bcl-2 の発現低下、cleaved PARP を確認した。また XMD8-92 処置によって、細胞周期における subG1 期が増加したことをフローサイトメトリーで確認し、アポトーシスアッセイにて容量依存性に caspase3/7 の発現増加を確認し、MTS 法にて細胞生存活性が低下したことを確認した。A498 細胞異種移植マウスにたいして XMD8-92 腹腔内投与を行ったところ、19 日後にコントロール群に比して腫瘍サイズが縮小したことを確認した。

結論： ccRCC において、*VHL* 不活化と miR143 低下により ERK5 発現は亢進する。

ERK5 強発現 ccRCC において、ERK5 阻害は新たな治療戦略となりうる。

令和2年 1 月 10 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：菅野 秀典

論文題目：淡明型腎細胞癌に対する ERK5 阻害は有望な治療標的である

審査委員：主審査委員

飯野 光喜

副審査委員

上野 泰久

副審査委員

比中 千史

審査終了日： 令和2年 1月 7日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

腎悪性腫瘍で最も頻度が高い腎細胞癌の70-75%は淡明型腎細胞癌(ccRCC)であり、その90%以上にVHL遺伝子変異が認められる。近年、細胞増殖や血管新生、抗アポトーシスに関わるERK5が治療標的として注目されており、VHLタンパクやmiR143によって調整されると報告されているがccRCCでの詳細は不明である。本研究では、ccRCCにおけるERK5、miR143の発現と機能を解析し、治療標的としてのERK5の可能性を検討した。

臨床的研究では、腎癌の臨床検体250例で免疫組織染色によるERK5の発現、48例で定量的RT-PCR法によるmiR-143の発現を検討した。結果、臨床検体では82例(33.0%)でERK5が強発現しており、ERK5強発現群は、発現無し/弱発現群と比較して生存期間と癌特異的生存期間が有意に短かった。また、miR-143低発現群、正常・高発現群におけるERK5強発現症例の割合は、それぞれ64.3%、29.4%で、miR-143低発現症例においてERK5強発現症例が有意に多かった。基礎的検討では腎癌細胞株5株の基礎的検討を基に、pre-miR-143を腎癌細胞株A498に導入しERK5の発現を検討するとともに、siRNA法、特異的阻害剤XMD8-92によるERK5阻害効果を、ウェスタンブロット法、細胞増殖アッセイ、アポトーシスアッセイ、A498細胞株の腫瘍移植マウスモデルにて検討した。結果、腎癌細胞株5株では2株でERK5が強発現しその2株にはVHL変異がありmiR-143発現が低い傾向があった。miR-143低発現株A498にpre-miR143導入したところERK5発現は低下し、siRNAによるERK5ノックダウンでp21の発現亢進、Bcl-2発現低下を認めた。XMD8-92でA498細胞株を処理すると、XIAP、Bcl-2の発現低下、cleaved PARPの出現とともに、細胞周期のsubG1期が増加した。また、XMD8-92の用量依存性にcleaved caspase

3/7 の発現は増加し、細胞生存活性は低下した。A498 細胞異種移植マウスに XMD8-92 を腹腔内投与すると、19 日後にコントロール群に比して腫瘍サイズは有意に縮小した。

審査委員会では、1) mRNA の検討がなされていない、2) Bcl-2、p21 の病理組織学的検討がなされていないなどの問題点が指摘された。しかし本研究は、ccRCC において、VHL 不活化と miR143 低下により ERK5 発現は亢進すること、ccRCC 細胞株マウス皮下移植モデルにおいて ERK5 阻害剤 XMD8-92 投与が腫瘍縮小効果を示すことを初めて示したものであり、ERK5 強発現 ccRCC において、ERK5 阻害は新たな治療戦略となりうることを明らかにした貴重な研究であることから、学位授与に値するものと判定した。

(1, 200字以内)