

京都大学	博士（医学）	氏名	寒野 徹
論文題目	JunB promotes cell invasion and angiogenesis in <i>VHL</i> -defective renal cell carcinoma (JunBはVHL癌抑制遺伝子不活化を有する腎細胞癌の浸潤能と血管新生を促進する)		
(論文内容の要旨) 【背景】 Von Hippel-Lindau (VHL)癌抑制遺伝子は腎細胞癌の主たる組織型である淡明型腎細胞癌(ccRCC)の大多数において不活化されており、それに伴うhypoxia inducible factor (HIF)の異常な活性化がccRCCの進展に関与すると考えられている。実際、HIFやVEGFなどのHIF標的遺伝子をターゲットにした分子標的療法が腎癌治療に臨床応用されているが、その効果は不十分である。一方、VHL遺伝子は他の癌抑制機能も有しており、特に転写因子JunBの制御を介してVHL病の褐色細胞腫発生に関与するが、ccRCCにおける本経路の役割は解析されていない。 【目的】 VHL/JunB経路がccRCCの進展に寄与するかどうかを明らかにすることを目的とした。 【方法】 JunB 蛋白の発現解析を行うために、ccRCC 臨床検体を用いた免疫染色を行った。次に JunB の機能解析を行うために、VHL-/-ccRCC 細胞株においてlentivirusによるshRNAを用いたJunB knockdownを行い、loss of functionを解析した。同様にVHL+/+ccRCC細胞株においてretrovirusによるJunB強制発現を行い、gain of functionを解析した。さらに <i>in vivo</i> におけるJunBの機能解析を行うため、皮下及び腎被膜下のnude mouse xenograft modelを作製し、腫瘍増生能、浸潤能、血管新生能を検討した。またJunBの制御遺伝子を探索するために、PCR arrayを用いた網羅的遺伝子解析を行い、候補遺伝子に対しルシフェラーゼアッセイによる転写機能解析、shRNAまたは中和抗体による機能阻害実験を行った。 【結果】 ccRCC 臨床検体において、VHL不活化を有するccRCCではVHL野生型症例に比べJunB発現増強を認めた。VHL-/-ccRCC細胞株に野生型VHLやHIFを発現させたsubcloneを解析では、JunBの発現と浸潤能は正の相関を示し、かつHIFの発現と無関係であった。次にJunBの細胞浸潤能亢進への直接的な影響を検討するためVHL-/-細胞株におけるJunB knockdown、VHL+/+細胞株におけるJunB強制発現を行うと、JunBが <i>in vitro</i> の浸潤能を制御することが明らかになった。またxenograft modelにて、JunBが <i>in vivo</i> の腫瘍増生、血管新生と浸潤能に関与した。PCR Arrayを用いた網羅的な解析および転写機能解析により、JunBがMMP-2やCCL2を制御していることが明らかとなった。MMP-2 knockdownやCCL2中和抗体などにより <i>in vivo</i> での腫瘍増生や血管新生が抑制されたので、MMP-2やCCL2はJunBの主要な下流因子と考えられた。 【結論】 VHL 遺伝子不活化に伴う JunB の活性化が MMP-2 や CCL2 を介して ccRCC における浸潤や血管新生に関与していると考えられた。HIF/VEGF 経路を標的とした既存の薬剤の効果は十分ではなく、VHL/JunB 経路は ccRCC の血管新生や浸潤転移に対する新規分子標的になりうると考えられた。			

(論文審査の結果の要旨)

Von Hippel-Lindau (VHL)癌抑制遺伝子は淡明型腎細胞癌(ccRCC)の大多数において不活化されており、それに伴うHIFの活性化がccRCCの進展に寄与すると考えられている。一方、VHL 遺伝子はJunB の制御を介してVHL病の褐色細胞腫発生に関与するが、ccRCCにおけるJunBの役割は解析されておらず、本研究ではJunBがccRCCの進展に寄与するかを検討した。ccRCC 臨床検体を用いた免疫染色でVHL不活化を有するccRCCではJunB発現増強を認めた。JunB機能解析のためVHL-/-細胞株におけるJunB knockdown、wt-VHL細胞株におけるJunB強制発現を行うと、JunBが*in vitro*の浸潤能、*in vivo*の腫瘍増生、血管新生を正に制御することが明らかになった。PCR Arrayを用いた網羅的解析および転写機能解析により、JunBがMMP-2やCCL2を制御していることが明らかとなった。MMP-2 knockdownやCCL2中和抗体により*in vivo*での腫瘍増生や血管新生が抑制され、MMP-2やCCL2はJunBの主要な下流因子と考えられた。以上よりVHL遺伝子不活化に伴うJunBの活性化がMMP-2やCCL2を介してccRCCの浸潤や血管新生に寄与すると考えられた。

以上の研究は腎細胞癌進展の解明に貢献し、新規治療標的発見に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成23年12月21日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降