

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06844

研究課題名(和文) 新規高血圧関連遺伝子HCaRGは生活習慣病に起因する腎癌の発症を抑制する

研究課題名(英文) HCaRG/COMMD5 inhibits ErbB receptor-driven clear-cell renal cell carcinoma

研究代表者

松田 裕之(MATSUDA, Hiroyuki)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：10646037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：HCaRGは、腎臓の近位尿細管に発現し、間葉上皮移行を促進する。HCaRGの抗腫瘍効果について明らかにするために、腎細胞癌患者の病理検体を用いて、HCaRGの発現と、病期や予後との関連について検討を行った。腎細胞癌ではHCaRGの発現が低下しており、正常尿細管のHCaRGの発現が高い患者では、HCaRGが低い患者と比べて腫瘍は小さく、5年生存率が改善していた。また、尿細管細胞から分泌されたHCaRGは、腫瘍細胞の増殖や癌幹細胞機能を抑制していた。HCaRGは、腎細胞癌の新たな予後予測因子となるだけでなく、新規の治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG/COMMD5) is highly expressed in renal proximal tubules and accelerates tubular repair by facilitating re-differentiation of injured tubular cells. Sustained hyper-proliferation and de-differentiation are important hallmarks of tumor progression. Cancer cells overexpressing HCaRG maintain a more differentiated phenotype. Its overexpression in mouse renal cell carcinomas (RCC) led to smaller tumor size with less tumor vascularization in a homograft tumor model. Mechanistically, HCaRG promotes de-phosphorylation of EGFR, HER2 and ErbB3. ERK1/2 and AKT which mediate ErbB signaling pathways are inactivated by HCaRG. In addition, HCaRG is underexpressed in human RCCs and more expressed in normal kidneys of patients with favorable prognosis. Taken together, our data suggest a role for HCaRG in the inhibition of tumor progression as a natural inhibitor of the ErbB signals in cancer and as a potential prognostic marker for RCCs.

研究分野：腎臓生理学 腫瘍生物学

キーワード：HCaRG COMMD5 腎細胞癌 EGFR 間葉上皮移行

1. 研究始当初の背景

世界の新規腎癌患者数は約 27 万人であり、約 12 万人の患者が毎年亡くなっている。日本における生活習慣病患者数は、肥満、高血圧症、糖尿病患者を合わせると、延べ 7170 万人と言われ、これらの生活習慣病は心血管系臓器障害および腎臓障害を引き起こすことが知られている。また、欧州やアジアで行われた大規模な疫学調査によると、肥満、高血圧症、糖尿病の患者はそれぞれの正常値の人と比べて 2~4 倍も腎細胞癌のリスクが高く、これらの生活習慣病は腎細胞癌の独立した危険因子であることが報告されている。しかし、なぜこれらの生活習慣病が腎細胞癌を引き起こすのか、明確な成因はまだ明らかになっていない。

Hypertension-related, Calcium-regulated gene (HCaRG/COMMD5)は、Montreal 大学の Tremblay 教授らにより 2000 年に初めて報告された遺伝子である。HCaRG は腎臓の近位尿細管に発現しており、細胞の増殖・分化・移動などに関与している。HCaRG 高発現遺伝子改変マウスを用いて急性腎不全モデルを作製した実験では、HCaRG はアポトーシスを制御する p53 経路とは独立した p21 の発現を誘導し、障害を受け脱分化した尿細管上皮細胞の再分化を促進させ、尿細管の修復を促し、腎障害後の生存率を 2.5 倍も改善させた ①。また、腎細胞癌やメラノーマなどの癌細胞株と正常細胞株で HCaRG の発現を比較したところ、癌細胞株で HCaRG の発現が低下していた。腎細胞癌細胞株に HCaRG の遺伝子を導入すると、癌細胞の間葉上皮移行が促され、細胞周期が抑制され、細胞死が誘導される。これらの知見より、高血圧や高血糖下の腎臓は常にストレスを受けており、修復のために HCaRG の発現が亢進しているが、過度な障害による近位尿細管上皮細胞の脱落などで HCaRG の発現が失われた場合に、尿細管の正常な修復機構が失われ、慢性腎臓病や腎癌のリスクが高まるのではないかと推測した ②。

2. 研究の目的

本研究は生活習慣病などに起因する腎障害と腎細胞癌の発癌リスクの関係を明らかにし、HCaRG の発癌抑制効果とそのメカニズムを解明し、新たな癌の予後予測因子としての可能性と予防法の開発へと応用する研究基盤を確立することを目指し、ヒト腎細胞癌と正常腎における HCaRG の発現変化と予後や発癌に係る生活習慣病との関係性、HCaRG の発癌に係る細胞の癌幹細胞化に与える影響と発癌抑制メカニズム、薬剤性発癌モデル動物を用いた生体内における HCaRG の発癌抑制効果、を検証する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) HCaRG の発現レベルと腎細胞癌の発生・進展・予後や生活習慣病との因果関係

日本大学医学部泌尿器科の協力のもと、1997 年以降に付属病院で腎臓摘出手術を受けた淡明細胞型腎細胞癌患者 117 症例の組織標本を用いて、HCaRG の発現を評価した(臨床審査委員会承認済 RK-131213-9)。標本スライドのうち、癌と正常腎組織が共に含まれているスライドを選択し、HCaRG 抗体を用いて免疫染色を行った。染色されたスライドの発現レベルを 4 段階に分けて評価を行った。次に、診療録より、腎細胞癌診断時の主訴・初期症状、手術時の最大腫瘍径、TMN 分類、Fuhrman 分類、手術後の転帰、既往歴(高血圧症、糖尿病、高脂血症、腎障害)、肥満(BMI)、嗜好(アルコール、タバコ)、服薬歴などをデータベース化し、癌や正常腎における HCaRG の発現レベルとの因果関係を解析した。

(2) HCaRG は癌幹細胞を正常細胞に誘導し、癌発生のリスクや予後を改善するのか

最近、化学療法・放射線・分子標的薬などに耐性を示し、自己複製しつつ癌細胞の供給源となる未分化で悪性な細胞である癌幹細胞が癌治療の標的として注目されている。癌幹細胞の成り立ちには諸説あるが、一度は分化した細胞が慢性的な炎症やストレスに曝され癌幹細胞化したものが、壮年期以降に発症する癌に見られることが報告されている。HCaRG を癌細胞に高発現させると、E-cadherin の発現が上昇し、間葉上皮移行が促進し、癌細胞の分化が促進することが分かっており、腎癌の発症メカニズムには、生活習慣病による長期の炎症ストレスで障害を受け脱分化した尿細管上皮細胞の癌幹細胞化が関与しているのではないかと考えた。そこで、HCaRG 発現ベクターを用いて樹立した HCaRG 安定高発現腎細胞癌細胞株細胞(Renca, RCC23)や siRNA により HCaRG ノックアウト細胞を用いて、スフェアアッセイを行い、癌幹細胞に与える影響を検討した。

(3) 薬剤誘導腎癌発症モデルを用いた生体内における HCaRG の発癌抑制効果

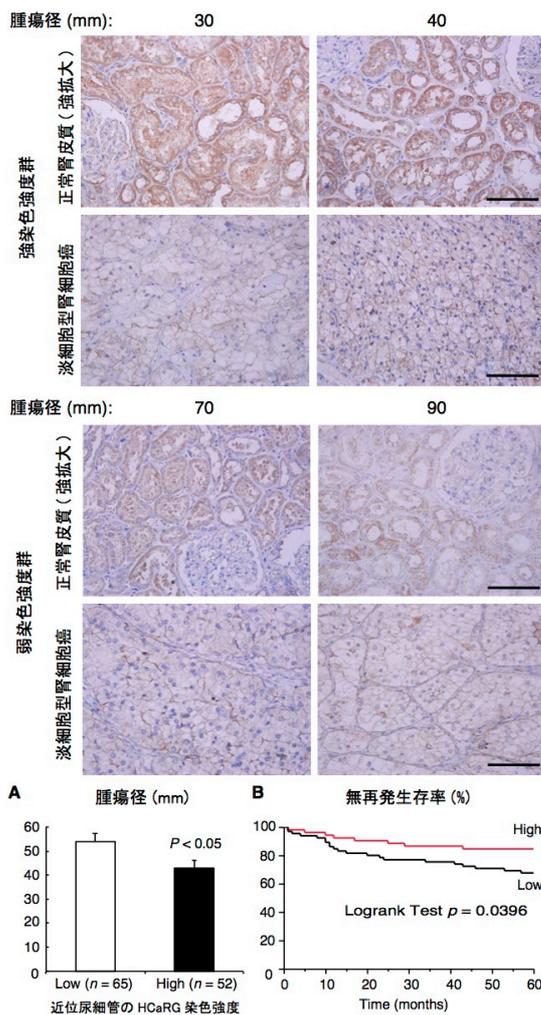
これまでに、HCaRG 高発現癌細胞株細胞をマウスの皮下に同種移植すると、HCaRG が生体内において腫瘍の増大や腫瘍血管新生を抑制することが分かっている。本研究では、HCaRG が腎癌の発生を予防する効果があるのかどうかを明らかにするために、鉄ニトリロ三酢酸の腹腔内反復投与を HCaRG 高発現遺伝子改変マウスに行い、尿細管由来の腎癌を誘導し、腹腔内投与後のマウスを経時的に 24 週間後まで観察し、腎臓における腫瘍の数、腫瘍の新生血管、生存率などの検討を試みた。

4. 研究成果

(1) HCaRG の発現レベルと腎細胞癌の発生・進展・予後や生活習慣病との因果関係

腎細胞癌と同一スライド内の正常腎組織の HCaRG 免疫染色を行った。腫瘍部では、正常尿細管に比べて HCaRG の発現が低下し

ていた(下図)③。また、各症例において、近位尿細管における HCaRG の染色性に差が観られ、腫瘍径の小さい症例(30~40mm)の近位尿細管は強く染色され、腫瘍径が 70 mm 以上の腫瘍径の大きい症例では、腫瘍径の小さい患者に比べて、HCaRG の発現が低下していた。HCaRG 高発現群では最大腫瘍径の平均が 42.9 mm であり、低発現群の平均値 54.0 mm と比べて有意($p = 0.0205$)に小さかった(下図 A)。5 年無再発生存率(recurrence free survival)を、HCaRG 高発現群と低発現群について、Kaplan-Meier 生存曲線を用いて検討したところ、HCaRG 高発現群では、低発現群に比べて有意に($p = 0.0396$)改善していた(下図 B)。



次に、腫瘍部の染色性にあまり差が観られなかったため、正常近位尿細管における HCaRG の発現と、手術時の年齢・性別・腫瘍径・病期との関連について検討を行った。HCaRG 高発現群の平均年齢は 62 歳で、低発現群の 60 歳と比べて明らかな差は観られなかった。117 症例の内訳は男性 83 症例、女性 34 症例と、一般的な腎細胞癌罹患率と同様に男性が約 2 倍と多かった。HCaRG の発現レベルは、女性が男性と比較し低発現群が有意($p = 0.0362$)に多かった。原発腫瘍の大きさと進展度を示す T 分類では、癌が腎臓内に留まり直径が 4 cm 以下である

T1a とそれ以外に分けて比較したところ、HCaRG 高発現群では低発現群に比べて有意($p = 0.0117$)に T1a の症例が多かった。N 分類, M 分類については 2 群間において有意な差は観られなかった。Fuhrman 分類は、HCaRG 高発現群は低発現群に比べて有意($p = 0.0085$)に低く、核異形度が小さく、悪性度が低かった。T1a 及び T1b の計 76 症例について、HCaRG の発現強度と 5 年間の再発との関係について検討を行ったところ、HCaRG 高発現群では低発現群に比べて有意($p = 0.0284$)に 5 年間の再発が少なかった。

HCaRG の発現と、既往歴や嗜好との関係について検討を行った。糖尿病の既往歴は HCaRG 高発現群に多い傾向($p = 0.077$)が観られ、高血圧症は HCaRG 低発現群に多い傾向($p = 0.0716$)が観られた。117 症例中 BMI が 25 以上の患者は 38 名含まれていたが、HCaRG 高発現群と低発現群の間に有意な差は観られなかった。腎癌発生のリスクファクターとされるタバコの喫煙歴のある患者は 117 名中 48 名であったが、2 群間に差は観られなかった。症例数が少なく、今後の検討が必要であるが、ネフローゼ症候群など腎障害の既往のある患者は HCaRG 高発現群に 1 名、低発現群に 6 名おり、そのうち 5 名の透析患者は全て HCaRG 低発現群に含まれていた。そのため、術前の血清クレアチニン値の平均は HCaRG 低発現群で 1.5 mg/dL と高い傾向にあった($p = 0.0993$)。

今回の検討において、HCaRG は腎細胞癌で発現が低下しており、さらに腫瘍径が大きく予後不良であった患者の正常尿細管においても発現が低下していることが明らかになった。我々はこれまでに、培養癌細胞株に強制発現させた HCaRG が、EGFR の発現を抑制し癌細胞の増殖を抑制することを明らかにしてきた③。また、マウスの皮下に同種移植された HCaRG 高発現腎癌細胞株の腫瘍形成は、野性型腎癌細胞株に比べて明らかに抑制される。このことから、近位尿細管上皮細胞に発現した HCaRG が分泌され、腫瘍増大に対して抑制的に働くことで、患者予後の改善に大きく寄与しているのではないかと考えられた。また、正常尿細管上皮細胞の HCaRG が高発現である症例の腫瘍径は小さく、再発率も低かったことから、近位尿細管上皮細胞の HCaRG の発現レベルが腎細胞癌の腫瘍進展や予後予測、術後の再発予測をするためのバイオマーカーとなる可能性が示唆された。そして、HCaRG の発現レベルが腎細胞癌症例において、腎部分切除か腎摘出術かといった術式の選択や術後のフォローアップ方法の指標の 1 つとなることが期待された。

(2) HCaRG は癌幹細胞を正常細胞に誘導し、癌発生のリスクや予後を改善するの

マウス腎上皮細胞株である TCMK-1 細胞に、HCaRG 発現ベクターを導入した

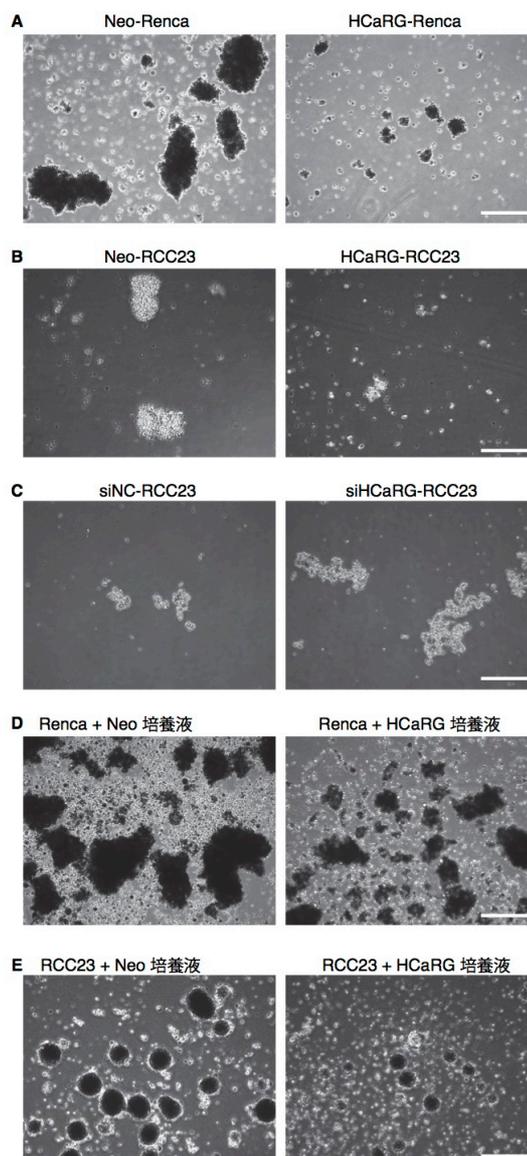
HCaRG-TCMK-1 細胞および Neo-TCMK-1 コントロール細胞より、HCaRG が分泌されているのかどうかを確認したところ、HCaRG-TCMK-1 細胞の培養液中の HCaRG タンパクが、増加していることが確認された。そこで、この分泌された HCaRG が癌細胞に与える影響を確認するために、マウス腎癌細胞株である Renca 細胞を HCaRG-TCMK-1 細胞または Neo-TCMK-1 細胞を培養した培養液中で培養し、腫瘍増殖を検討したところ、培養開始 48 時間以降 HCaRG-TCMK-1 細胞の培養液で培養した Renca 細胞の増殖が抑制されていた。また、HCaRG-TCMK-1 細胞由来の培養液で培養した Renca 細胞では、癌細胞の増殖や維持に重要な ErbB 受容体のうち EGFR と ErbB3 の発現が抑制されていた。

Sphere formation assay を用いて、HCaRG が癌幹細胞に与える影響を検討したところ、sphere の数は HCaRG 安定高発現腎細胞癌細胞株細胞 (HCaRG-Renca 細胞, HCaRG-RCC23 細胞) で、それぞれのコントロール細胞と比べて有意に少なかった (右図 A, B)。また、siRNA を用いて HCaRG のノックダウンしたところ、siHCaRG-RCC23 細胞では siNC-RCC23 コントロール細胞に比べて、有意に sphere 数が増加しており、内在性の HCaRG が sphere 形成を抑制していることが分かった (右図 C)。次に、尿管細胞から分泌された HCaRG が癌細胞の幹細胞性に与える影響を検討するために、HCaRG-TCMK-1 細胞または Neo-TCMK-1 細胞を培養した培養液を用いて同様に sphere formation assay を行った (右図 D, E)。HCaRG-TCMK-1 細胞由来の培養液中で培養された Renca 細胞と RCC23 細胞では、Neo-TCMK-1 細胞由来の培養液中で培養された細胞に比べて、sphere の数は有意に少なく、分泌型 HCaRG により sphere 形成が抑制されることが確認された。

ALDH activity assay を用いて、HCaRG が腎癌細胞株の癌幹細胞性に対して与える影響を検討した。Neo-RCC23 細胞では、DEAB を用いて ALDH 活性を阻害したコントロール細胞群に比べて、ALDRFLUOR 試薬を反応させた群では、ALDH が活性化され、約 18% の細胞の右方移動が観察された。HCaRG-RCC23 細胞では、ALDH の活性化が起こらず、Neo-RCC23 細胞で観察された細胞の右方移動は認められなかった。以上より、HCaRG-RCC23 細胞では Neo-RCC23 細胞と比較し、ALDH の活性化が抑制されており、HCaRG が癌細胞の幹細胞性に対して抑制効果を示すことが分かった。

今回、新たに尿管上皮細胞から分泌された HCaRG がパラクリン様に腎癌細胞に作用し、癌細胞内の ErbB 受容体の発現を抑制し、癌細胞の増殖を抑制することが確認された。この分泌された HCaRG は、腫瘍形成能の指標の一つである sphere 形成も抑制してい

た。これらの結果より、腎細胞癌の発生や進展抑制には正常近位尿管における HCaRG の発現が、深く関わっている可能性が示唆された。



(3) 薬剤誘導腎癌発症モデルを用いた生体内における HCaRG の発癌抑制効果

尿管から分泌された HCaRG が、生体内において抗腫瘍効果を示すのかどうかを確認するため、本研究では、近位尿管特異的 HCaRG 高発現遺伝子改変マウスに、鉄ニトリロ三酢酸の腹腔内反復投与を行い、発癌誘導を試みたが、発癌は確認できなかった。投与回数や投与量を再検討し、今後の課題とした。

<引用文献>

- ① Matsuda H, Lavoie JL, Hamet P, Tremblay J. (他 1 名) HCaRG accelerates tubular repair after ischemic kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 22(11): 2077-2089, 2011.
- ② Matsuda H, Hamet P, Tremblay J.

Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG/COMMD5) and kidney diseases: HCaRG accelerates tubular repair. *J Nephrol.* 27(4) :351-360, 2014.

- ③ Matsuda H, Ikeda J, Ogasawara M, Yamaguchi K, Endo M, Tremblay J. (他 10 名) HCaRG/COMMD5 inhibits ErbB receptor-driven renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 8:69559-69576, 2017.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Matsuda Hiroyuki, Campion Carole G, Fujiwara Kyoko, Ikeda Jin, Cossette Suzanne, Verissimo Thomas, Ogasawara Maiko, Gaboury Louis, Saito Kosuke, Yamaguchi Kenya, Takahashi Satoru, Endo Morito, Fukuda Noboru, Soma Masayoshi, Hamet Pavel, Tremblay Johanne. HCaRG/COMMD5 inhibits ErbB receptor-driven renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 査読有 8: 69559-69576, 2017. DOI:10.18632/oncotarget.18012

[学会発表] (計 7 件)

- ① 松田裕之: 新規腎保護因子 HCaRG/COMMD5 は腎細胞癌の腫瘍形成を抑制する. 第 30 回インターフェックスジャパン, 2017/6/29, 東京ビッグサイト, 東京都江東区
- ② Tremblay Johanne, Campion Carole G, Verissimo Thomas, Cossette Suzanne, Matsuda Hiroyuki, Hamet Pavel: HCaRG/COMMD5 improves kidney repair by regulating EGF receptor trafficking. 27th European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection, 2017/6/17, Italy, Milan
- ③ 松田裕之, 池田迅, 小笠原茉衣子, 矢内充, 福田昇, 相馬正義, Hamet Pavel, Tremblay Johanne: HCaRG は Renal tubular epithelial cell barrier 機能を増強し急性腎障害を予防する. 第 60 回 日本腎臓学会学術総会, 2017/5/26, 仙台国際センター, 宮城県仙台市
- ④ 池田迅, 松田裕之, 福田昇, 矢内充, 相馬正義, Hamet Pavel, Tremblay Johanne: 近位尿細管での HCaRG の発現低下は、慢性腎臓病や腎細胞癌を進展させる原因となる. 第 60 回 日本腎臓学会学術総会, 2017/5/26, 仙台国際センター, 宮城県仙台市
- ⑤ 池田迅, 松田裕之, 福田昇, 相馬正義,

Hamet Pavel, Tremblay Johanne: 新規高血圧関連遺伝子 HCaRG は ErbB 受容体に依存した腎細胞癌の腫瘍増大や血管新生を抑制する. 第 105 回 日本泌尿科学会総会, 2017/4/22, 城山観光ホテル, 鹿児島県鹿児島市

- ⑥ 池田迅, 松田裕之, 藤原恭子, 山口健哉, 高橋悟, 遠藤守人, 福田昇, 相馬正義: HCaRG : a potential novel prognostic marker for renal cell carcinoma inhibiting ErbB receptor-driven tumorigenesis. 第 75 回 日本癌学会学術総会, 2016/10/7, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市
- ⑦ Jin Ikeda, Hiroyuki Matsuda, Kyoko Fujiwara, Kenya Yamaguchi, Satoru Takahashi, Morito Endo, Noboru Fukuda, Masayoshi Soma, Pavel Hamet, Johanne Tremblay: HCaRG is a inhibitor of ErbB receptor-driven tumorigenesis and prognostic for survival in renal cell carcinoma. 17th International SHR Symposium, 2016/9/22, UDX Gallery, 東京都千代田区

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田裕之 (MATSUDA, Hiroyuki)
日本大学・医学部・助教
研究者番号: 10646037

(2) 連携研究者

山口健哉 (YAMAGUCHI, Kenya)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号: 00297813

松本太郎 (MATSUMOTO, Taro)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 50366580

遠藤守人 (ENDO, Morito)
八戸学院大学・健康医療学部・学部長/教授
研究者番号: 10399735

片川まゆみ (KATAKAWA, Mayumi)
日本大学・医学部・研究協力員

研究者番号 : 60645696

(3) 研究協力者

池田 迅 (IKEDA, Jin)

Tremblay Johanne (TREMBLAY, Johanne)