

令和元年6月14日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08348

研究課題名(和文)腎尿細管特異的SAV1ノックアウトマウスによる腎癌悪性化のメカニズム解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of RCC malignant transformation using renal tubule specific SAV1 knockout mice

研究代表者

松浦 恵子 (MATSUURA, KEIKO)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00291542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Hippo pathwayの主要因子であるSAV1遺伝子が淡明細胞性腎癌の悪性化に関わることをin vivoで解析するため、腎尿細管のみでSAV1単独あるいはVHL遺伝子とともに欠失するノックアウトマウスを作成した。SAV1両アレル欠失(ホモ)マウスでは腎嚢胞の形成と、尿細管上皮細胞の細胞数の増加・重層化・核の大型化が認められた。SAV1に加えてVHLも欠失すると、出生数は少なかったがSAV1欠失マウスで見られた嚢胞壁の異型は改善する傾向にあった。以上より、SAV1遺伝子は腎臓の尿細管上皮の核の大きさを制御し、腎構造の維持に重要な生理機能を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎癌の動物モデルとして、本研究では腎尿細管に特異的なSAV1欠失により、細胞異型や細胞増殖、腎発生の異常が認められた。つまり、腫瘍抑制に働くHippoパスウェイが、VHL-HIF1パスウェイ以外でも腎の発生や癌化に関わることを初めて明らかにした。また、Hippoパスウェイがin vivoでどのように他のパスウェイと関係するかをパスウェイ解析やVHLとのダブルノックアウトマウスによって明らかにした。したがって、新たな腎発生や癌化のメカニズムの発見だけでなく、既存の分子標的治療薬がターゲットとしているVHL-HIF1パスウェイでは根治し得ない高悪性度腎癌の治療開発の礎となった。

研究成果の概要(英文)：SAV1 is a core component of the Hippo pathway. To analyze its implication in malignant transformation of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), I generated kidney-specific SAV1- or SAV1 and VHL-knockout mice. I observed many renal cysts in kidneys of SAV1 knockout mice. Renal tubular epithelial cells showed high cellularity and multiple layering, including enlargement of their nuclei. Furthermore, VHL deletion combined with SAV1 deletion was likely to inhibit cellular abnormalities shown in SAV1 knockout mice, although double knockout mice were rarely generated. These results suggest that SAV1 plays important roles for regulation of nuclear size of renal epithelial cells, and the maintenance of renal structure under physiological conditions.

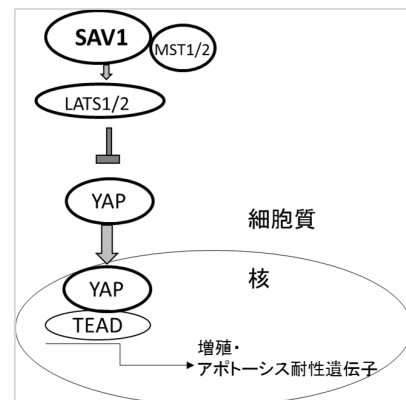
研究分野：医歯薬学

キーワード：腎癌 悪性化 ノックアウトマウス SAV1

1. 研究開始当初の背景

腎淡明細胞癌(clear cell renal cell carcinoma: ccRCC)は組織学的核異型によって high grade 群と low grade 群に分類され、high grade 群は low grade 群よりも明らかに予後不良である。したがって、high grade 群と low grade 群では異なるゲノム異常の存在が想定される。私はこれまで ccRCC のゲノムプロファイルをアレイ CGH 法を用いてゲノムワイドに解析し、最も高頻度(80%以上)に検出される 3p loss は low grade と high grade 間で検出頻度に差を認めなかったが、14q loss は low grade よりも high grade で有意に高頻度に検出される($p < 0.05$)ことを発見した(J Pathol., Yoshimoto et al., 2007)。つまり、3p loss は low grade ccRCC 発症に必須であり、それに 14q loss が付加されることが high grade ccRCC への transformation に重要であることが強く示唆された。したがって、14q loss 領域に存在して loss によって発現低下する遺伝子の中には high grade ccRCC の病態に関わる癌抑制遺伝子が含まれる可能性が示唆された。さらに、私はこれらの知見にもとづいて 14q

loss 領域を探索して、がん抑制遺伝子候補 SAV1 遺伝子を同定した(BMC cancer, Matsuura et al., 2011)。興味深いことに SAV1 遺伝子が発現低下した腎癌細胞株に SAV1 を強制発現させたところ、増殖能は低下し、さらにアポトーシスの亢進を認め、腎癌における SAV1 発現低下は腫瘍細胞の増殖能亢進やアポトーシス抑制をもたらすものと推測された。SAV1 は細胞増殖を抑制するシグナル伝達経路である Hippo パスウェイの core component であることが知られており(右図)したがって、SAV1 発現低下による Hippo シグナル



の抑制が腎癌細胞に増殖能の亢進やアポトーシスの抑制をもたらす可能性が示唆された。そこで私はその可能性を確かめるために、まず SAV1 発現低下腎癌細胞に SAV1 を強制発現させ、Hippo シグナルを解析したところ、Hippo シグナルの分子ターゲットである癌蛋白質 YAP のリン酸化は亢進し、TEAD 転写活性は抑制されていた。つまり腎癌細胞における SAV1 発現低下が、Hippo シグナルの抑制をもたらすことを示した。

さらに、SAV1 遺伝子を導入した腎癌細胞を SCID mouse に移植したところ、SAV1 発現細胞株を移植した腫瘍は control に比べてサイズが有意に小さかった。また増殖マーカーである Ki67 の発現は control に比べて有意に少なかったことから、SAV1 の増殖抑制機能が移植実験によっても確かめられた。したがって、これまでの研究成果から、私は high grade 腎癌において高頻度に検出される SAV1 の発現低下が腎癌細胞の増殖やアポトーシス制御を通して腎癌の悪性化に関与していると考えた。

2. 研究の目的

本研究では

- (1) SAV1 を腎臓のみで欠失させるマウス(conditional knockout mouse)を作製し、腎臓の形態を観察する。また SAV1 は Hippo シグナルの重要な core component であり、Hippo シグナルの分子は他の臓器癌で発現低下、細胞内局在異常がみられ、癌抑制遺伝子として機能しているとの報告があることから、腎臓での Hippo シグナル分子の発現や細胞内局在の発現を詳細に解析して、SAV1 を含む Hippo パスウェイ全体が腎癌の発症と悪性化に関わる可能性を明らかにする。
- (2) 腎尿管特異的に VHL 遺伝子ノックアウトしたマウスが既に当教室で作製済みであるので、

これと新たに作製された腎特異的 SAV1 遺伝子ノックアウトマウスとかけ合わせることによって、2 遺伝子のダブルノックアウトマウスを作製し、形態（とくに腎嚢胞や腎癌の発生）を観察する。

(3) SAV1 単独、VHL 単独あるいは SAV1/VHL ダブルノックアウトマウスに発生した嚢胞あるいは腫瘍の組織から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、ノックアウトマウスでの腎嚢胞あるいは腎腫瘍のゲノム異常の比較によって、SAV1 遺伝子の欠失あるいは VHL 遺伝子の欠失に伴って変化する下流のパスウェイの同定を行う。

以上の解析から、SAV1 遺伝子の発現低下がどのように腎細胞癌の発癌や悪性化に関わるかを調べる。また SAV1 遺伝子および既知の腎癌抑制遺伝子 VHL 遺伝子との腎特異的ダブルノックアウトマウスを作製し、個体レベルでの解析を行い、初めての腎癌モデルマウスの作製を目指す。

3. 研究の方法

(1) SAV1 ノックアウトマウス作製のためのターゲティングベクターを導入し樹立した ES 細胞株を用いたキメラマウスの作出と FLP マウスとの交配

樹立された ES 細胞をマウスの胚に注入(インジェクション)し、偽妊娠マウスの子宮に移植してキメラマウス(正常の遺伝子と SAV1 が失われた遺伝子の両方を持つマウス)を作成する。体毛の色により選出し、尾の一部から DNA を抽出し PCR(Exon3 を挟んだプライマーペアを設計)にて遺伝子組み換えの有無を確認する。

ベクターに入っていた余分な配列を FLP マウスと交配させることによって切り取り、SAV1 ノックアウト FI-FLP マウスを作る。

腎尿管特異的遺伝子プロモーターに Cre(loxP 配列に働き、遺伝子を切り取ることができる)を持つトランスジェニックマウスと上記マウスを交配する。

尿管特異的に SAV1 を欠失したマウスが作成されたことを、PCR で確認する。

(2) SAV1 および VHL ダブルノックアウトマウスの作製

VHL コンディショナルノックアウトマウスは既に作製済みである。そこで(2)で作成したマウスとの交配を行う。それぞれのコンディショナルノックアウトマウスは、染色体上でヘテロあるいはホモ両方でノックアウトされる可能性がある。すなわち、SAV1 ホモ/VHL ホモ、SAV1 ホモ/VHL ヘテロ、SAV1 ヘテロ/VHL ホモ、SAV1 ヘテロ/VHL ヘテロの4種類のダブルノックアウトマウス、それぞれを PCR で genotyping する。

(3) ノックアウトマウスの腎組織の形態学的解析

作製したノックアウトマウスについて生後 8 か月、12 か月、18 か月後腎組織を採取する。HE 染色により、嚢胞あるいは充実性細胞増生、異型の有無を観察する。

増殖マーカー Ki-67, PCNA, DNA 損傷マーカー H2AX を用いて免疫組織学的に解析する。

腎尿管の構造や他の腎臓構成細胞(ヘンレ係蹄、集合管、糸球体、血管、間質)の違いを観察するため、各構成細胞に反応する抗体を用いて免疫組織学的あるいは蛍光免疫組織学的にレーザー共焦点顕微鏡 LSM710(Zeiss 社)により詳細な構造異常を解析する。

(4) Hippo パスウェイの活性化の検討

腎臓のパラフィンブロックを用いて、SAV1 を含む Hippo パスウェイコンポーネントに対する抗体で免疫染色を行ない、それぞれのタンパク質の発現と YAP, TAZ の細胞内局在(核への移行)を調べる。それぞれのノックアウトマウスによりどのような違いがあるのか解析する。

(5) ノックアウトマウスの腎組織の網羅的遺伝子発現解析およびパスウェイ解析

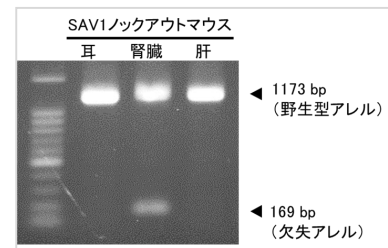
それぞれのノックアウトマウスの腎組織の一部を凍結保存し、クリオスタットを用いて薄切後 RNA を抽出する (RNeasy: Quiagen 社)。バイオアナライザー (Agilent 社) により RNA の質を確認後、Quick Amp Labeling kit, 4x44K Whole Human Genome array 及び Oligo Hybridization Kit (全て Agilent 社) を用いて cRNA を合成・ラベリング後ハイブリダイズする。洗浄後、DNA マイクロアレイスキャナー (Agilent 社) によりアレイ上の蛍光シグナルを検出し、数値化したのち、Gene Spring GX software により解析する。

トランスクリプトーム解析によって、コントロールマウスと比較して有意に発現変動を認める遺伝子を抽出する。

抽出された遺伝子を IPA (Ingenuity Pathway Analysis) を用いてパスウェイ解析し、遺伝子発現変動により有意に変化するパスウェイの同定をおこなう。

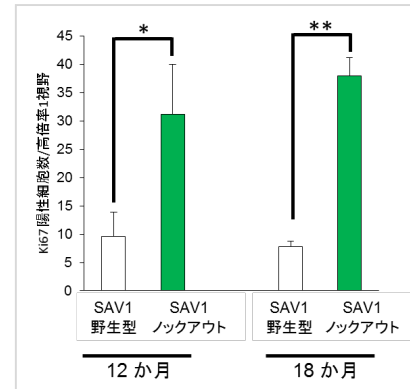
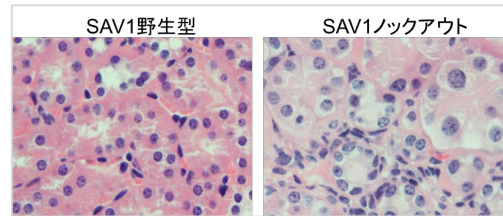
4. 研究成果

(1) マウスの尾の一部から DNA を抽出し PCR (Exon3 を挟んだプライマーペアを設計) にて遺伝子組み換えの有無を確認した。その後、尿細管特異的に SAV1 を欠失したマウスが作成されたことを、PCR で確認した (右図)。



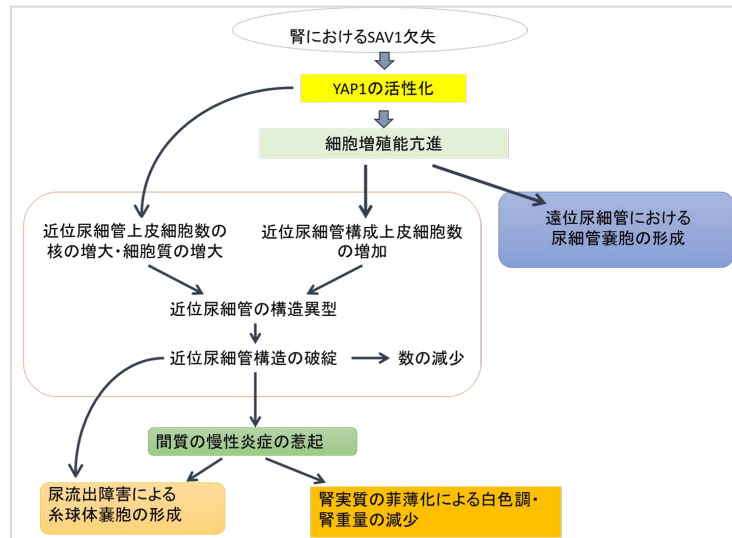
(2) SAV1 片アレル欠失 (ヘテロ) と両アレル欠失 (ホモ) マウス

について、腎組織の形態変化、Hippo シグナル分子の活性化状態を示す YAP1 の細胞内局在などを解析した。まず、生後 6 か月、12 か月、18 か月後腎組織を採取し、嚢胞あるいは充実性細胞増生、異型の有無を観察した。すると、生後 6 か月の時点から SAV1 ホモマウスに特異的に尿細管上皮細胞の細胞数の増加・重層化・核の大型化を認めた (右図)。加えて、糸球体嚢胞や尿細管嚢胞の形成が認められ、加齢とともに数は増加した。また間質の慢性炎症所見の増悪を認めた。増殖マーカー Ki67 を用いた免疫組織学的解析では、Ki67 陽性の尿細管上皮細胞の数はコントロールマウスに比べ有意に増加し増殖能の亢進を認めた (右図)。一方、SAV1 ヘテロマウスの腎では明らかな組織学的所見は認められなかった。次に、腎尿細管の各構成細胞に反応する抗体を用いて免疫組織学的あるいは蛍光免疫組織学的に詳細に解析した。また YAP1 の細胞内局在を蛍光免疫組織学的に解析した。すると SAV1 ホモマウスでは加齢とともに近位尿細管数が減少し、腎尿細管上皮細胞での YAP1 の核内移行がみられた。



(3) ノックアウトマウスの腎組織の一部から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイによりトランスクリプトーム解析および IPA (Ingenuity Pathway Analysis) を用いてパスウェイ解析により、TGF β パスウェイへの影響が示唆され、Hippo パスウェイの異常が腎臓の尿細管上皮の核の大きさあるいはネフロン構造の変化に関わっていることとともに、TGF β パスウェイとのクロストークが示唆された。

(4) VHL ホモマウスとの交配により得られたダブルノックアウトマウスを作成した。個体数は少なかったが、観察した限り、嚢胞壁の異型の増強は認められなかった。これらのことから、VHL と SAV1 は独立して腎の構造変化に関わっていることが示唆された。少数ではあるが、SAV1 ノックアウトマウスに観られた異型がむしろダブルノックアウトでは改善しているものも見られた。ただし、SAV1 のホモマウスあるいは、VHL とのダブルノックアウトマウスの繁殖数が少なかった。以上のことから SAV1 遺伝子は腎臓の尿細管上皮の核の大きさを制御し、ネフロン構造の維持に重要な生理機能を果たしていることを明らかにすることができた。今後詳細な組織学的検証を行うことにより、腎組織形成への遺伝子欠失の影響を調べたい。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Hijiya N, Shibata T, Daa T, Hamanaka R, Uchida T, Matsuura K, Tsukamoto Y, Nakada C, Iha H, Inomata M, Moriyama M. Overexpression of cannabinoid receptor 1 in esophageal squamous cell carcinoma is correlated with metastasis to lymph nodes and distant organs, and poor prognosis. *Pathol Int.*, 67(2), 83-90, 2017. 【査読有】, doi: 10.1111/pin.12495

Kuroda N, Yorita K, Sasaki N, Ishihara A, Matsuura K, Daa T, Mori S, Sasaki A, Mikami S, Shigematsu K, Nagashima Y. Clinicopathological study of 5 cases of renal cell carcinoma with t(6;11)(p21;q12). *Pol J Pathol.*, 68(1), 66-72, 2017. 【査読有】, doi: 10.5114/pjp.2017.67617

Takahashi M, Tsukamoto Y, Kai T, Tokunaga A, Nakada C, Hijiya N, Uchida T, Daa T, Nomura T, Sato F, Mimata H, Matsuura K, Moriyama M. Downregulation of WDR20 due to loss of 14q is involved in the malignant transformation of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci.*, 107(4): 417-423, 2016. 【査読有】, doi: 10.1111/cas.12892

Kai T, Tsukamoto Y, Hijiya N, Tokunaga A, Nakada C, Uchida T, Daa T, Iha H, Takahashi M, Nomura T, Sato F, Mimata H, Ikawa M, Seto M, Matsuura K, Moriyama M. Kidney-specific knockout of Sav1 in the mouse promotes hyperproliferation of renal tubular epithelium through suppression of the Hippo pathway. *J. Pathol.*, 239(1): 97-108, 2016. 【査読有】, doi: 10.1111/cas.12892

Hirashita Y, Tsukamoto Y, Yanagihara K, Fumoto S, Hijiya N, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Kodama M, Okimoto T, Daa T, Seike M, Iha H, Shirao K, Murakami K, Moriyama M. Reduced phosphorylation of ribosomal protein S6 is associated with sensitivity to MEK inhibition in gastric cancer cells. *Cancer Sci.*, 107(12): 1919-1928, 2016. 【査読有】, doi: 10.1111/cas.13094

Hijiya N, Tsukamoto Y, Nakada C, Tung Nguyen L, Kai T, Matsuura K, Shibata K, Inomata M, Uchida T, Tokunaga A, Amada K, Shirao K, Yamada Y, Mori H, Takeuchi I, Seto M, Aoki M, Takekawa M, Moriyama M. Genomic Loss of DUSP4 Contributes to the Progression of Intraepithelial Neoplasm of Pancreas to Invasive Carcinoma. *Cancer Res.*, 76(9): 2612-2625, 2016. 【査読有】, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1846

〔学会発表〕(計 11 件)

甲斐 友喜, 松浦 恵子, 塚本 善之, 高橋 美香, 中田 知里, 内田 智久, 泥谷 直樹, 佐藤 文憲, 守山 正胤, 三股 浩光
腎特異的ノックアウトマウスモデルにおいて、SAV1 loss は Hippo pathway の抑制により腎尿管上皮細胞に過剰増殖をもたらす
第 104 回 日本泌尿器科学会総会 仙台国際センター (宮城県仙台市) 2016

Tomoki Kai, Keiko Matsuura, Yoshiyuki Tsukamoto, Mika Takahashi, Naoki Hijiya, Fuminori Sato, Masatsugu Moriyama, Hiromitsu Mimata. Genetic deletion of SAV1 enhances proliferation and nuclear irregularity in renal tubular epithelial cells
American Urological Association's 2016, San Diego Convention Center (San Diego, CA), May 10, 2016

高橋 美香, 松浦 恵子, 甲斐 友喜, 徳永 暁憲, 佐藤 文憲, 三股 浩光, 守山 正胤
WDR20 は淡明細胞型腎細胞癌の悪性化に関与する
第 104 回 日本泌尿器科学会総会 仙台国際センター (宮城県仙台市) 2016

Mika Takahashi, Tomoki Kai, Akinori Tokunaga, Takeo Nomura, Fuminori Sato, Keiko Matsuura, Masatsugu Moriyama, Hiromitsu Mimata. Identification of WDR20 as a new tumor suppressor gene preferentially altered in high-grade clear cell renal cell carcinoma.
American Urological Association's 2016, San Diego Convention Center (San Diego, CA), May 10, 2016

高橋 美香, 松浦 恵子, 甲斐 友喜, 徳永 暁憲, 佐藤 文憲, 守山 正胤, 三股 浩光,
WDR20 は淡明細胞型腎細胞癌の悪性化に関与する
第 25 回 泌尿器科分子・細胞研究会 ハイアットリージェンシー大阪 (大阪府大阪市) 2016

甲斐 友喜, 松浦 恵子, 塚本 善之, 高橋 美香, 中田 知里, 内田 智久, 泥谷 直樹, 佐藤 文憲, 守山 正胤, 三股 浩光
腎尿管特異的ノックアウトマウスモデルにおいて、SAV1 loss は Hippo pathway の抑制により腎尿管上皮細胞に過剰増殖・核の大型化をもたらす
第 25 回 泌尿器科分子・細胞研究会 ハイアットリージェンシー大阪 (大阪府大阪市) 2016

Tomoki Kai, Keiko Matsuura, Naoki Hijiya, Fuminori Sato, Takashi Kobayashi, Masatsugu Moriyama, Hiromitsu Mimata. Re-expression of SAV1 inhibits renal tumor growth in vivo through downregulation of TGF beta pathway
第 67 回 西日本泌尿器科学会総会 福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2015

Mika Takahashi, Keiko Matsuura, Tomoki Kai, Akinori Tokunaga, Takeo Nomura, Fuminori Sato, Masatsugu Moriyama, Hiromitsu Mimata. WDR20 is involved in the malignant transformation of clear cell renal cell carcinoma 8ccRCC)
第 67 回 西日本泌尿器科学会総会 福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2015

Tomoki Kai, Keiko Matsuura, Chisato Nakada, Yoshiyuki Tsukamoto, Naoki Hijiya, Fuminori Sato, Masatsugu Moriyama, Hiromitsu Mimata. Re-expression of SAV1 inhibits Renal Tumor Growth in vivo. 35th Congress of the Societe Internationale D' Urologie, Melbourne Convention and Exhibition Centre (Melbourne, Australia) October 15-18, 2015

甲斐 友喜, 松浦 恵子, 泥谷 直樹, 佐藤 文憲, 小林隆志, 守山 正胤, 三股 浩光
腎細胞癌移植モデルにおいて SAV1 は TGF-b pathway を抑制することで腫瘍増生を阻害する
第 103 回 日本泌尿器科学会総会 石川県立音楽堂 (石川県金沢市) 2015

高橋 美香, 松浦 恵子, 甲斐 友喜, 徳永 暁憲, 佐藤 文憲, 三股 浩光, 守山 正胤,
淡明細胞型腎細胞癌(ccRCC)の悪性化に関与する遺伝子の探索
第 103 回 日本泌尿器科学会総会 石川県立音楽堂 (石川県金沢市) 2015

〔その他〕

ホームページ : <http://www.med.oita-u.ac.jp/biology/>

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。