

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10598

研究課題名(和文)腎癌骨転移における膜結合型タンパクの機能解析と新規治療法の確立

研究課題名(英文)Functional analysis of membrane-anchored proteins in RCC bone metastasis and development of new targeted treatment

研究代表者

向井 尚一郎(Mukai, Shoichiro)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：10315369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ルシフェラーゼを導入した786-0腎細胞癌株を心注し、骨転移マウスモデルを作成した。骨転移巣と皮下に移植した腎癌細胞の発現解析では、骨転移巣で有意にHGFとマトリプテースの発現が亢進しており、HAI-2の発現が低下していた。また骨転移巣では有意にMETのリン酸化が亢進していた。恒常的にHAI-2をノックダウンした同細胞では、マトリプテースの発現が亢進しており、pro-HGF依存性に浸潤能、遊走能が亢進した。腎細胞癌の骨転移巣では、リガンド依存性にMETのリン酸化が亢進しており、HAI-2がそのregulatorである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we employed a mouse model of RCC bone metastasis to clarify the significance of the HGF/MET signaling axis and the regulator of HGF activator inhibitor type-2 (HAI-2). Luciferase-transfected 786-0 cells were injected into the left cardiac ventricle of mice to prepare the mouse model of bone metastasis. The formation of bone metastasis was confirmed by whole-body bioluminescent imaging, and specimens were extracted. Expression of HGF/MET-related molecules was analyzed. As a result, expression of HGF and matriptase was increased in bone metastasis compared with control, while that of HAI-2 was decreased. Furthermore, we confirmed increased phosphorylation of MET in bone metastasis. The expression of matriptase was upregulated, and both invasiveness and motility were increased significantly by knockdown of HAI-2. The significance of ligand-dependent MET activation in RCC bone metastasis is considered, and HAI-2 may be an important regulator in this system.

研究分野：泌尿器科

キーワード：腎細胞癌 骨転移 MET HAI-2

## 1. 研究開始当初の背景

骨転移微小環境において、癌細胞に対し多大な影響を与える種々の増殖因子には、細胞外環境においてプロテアーゼによる活性化を必要とするものが多く含まれる。例えば、癌の上皮・間葉転化 (EMT) 現象において TGF-と同様に重要な作用因子となる HGF は癌間質線維芽細胞 (CAF) から活性の無い前駆体として分泌され、マトリペーテースやヘプシン等の活性化酵素による限定分解により活性化される (文献 1-3)。このように活性の無い前駆体タンパク質として分泌され、特異的な活性化プロテアーゼによって細胞外環境でプロセッシングを受けて初めて生理機能を発揮する増殖因子としては、HGF の他にマクロファージ刺激蛋白 (MSP)、血小板由来増殖因子 (PDGF)-C、PDGF-D、VEGF-C、VEGF-D などがあげられる。正常組織においては、マトリペーテースをはじめとする 6 種類の TTSP はクニツツ型細胞膜結合型セリンプロテアーゼインヒビターの HGF activator inhibitor (HAI) により厳密に制御されているが、癌においてはそのシステムの破綻が報告されている。実際に、マトリペーテースやヘプシンの発現亢進と HAI の発現低下が腎細胞癌の病期進行と不良な予後に正の相関を示すことが我々を含む複数の報告で明らかとなった (文献 4-5)。さらに我々は、腎細胞癌の骨転移巣において、癌細胞および破骨細胞にマトリペーテースが高発現していることを報告した (文献 6)。以上のような背景から、申請者は腎細胞癌の骨転移巣において、マトリペーテースを中心とする TTSP による種々の増殖因子や u-PA、PAR-2 の活性化が、癌細胞の増殖・進展に促進的に作用し治療抵抗性の要因となっているという仮説を立てた。すなわち、骨転移巣における TTSP の活性阻害により、複数の増殖因子のシグナル系、プロテアーゼ活性 (u-PA など)、PAR-2 の活性化を制御することが可能と考えられる。その中で HAI は単独で、マトリペーテースやヘプシンを含む 6 種類の TTSP の活性を強力に阻害するプロテアーゼインヒビターであり、選択性も高い。治療面における本研究の中心と考えている。

## 2. 研究の目的

本研究は、腎の淡明細胞癌の骨転移について、マウスの骨転移モデルを用いて解析するものである。これまでの報告から、骨転移の形成、維持、進展において、骨環境における豊富な種々の増殖因子とその活性化亢進が促進的に作用しており、治療抵抗性の一要因であると考えられる。そこで、申請者は、これら多くの増殖因子の活性化能力を持つマトリペーテースを中心とした細胞膜結合型セリンプロテアーゼの (TTSPs) に着目し、その活性制御により骨転移への新規骨転移治療法を確立したいと考えた。制御因子の中で、

単独で複数の増殖因子活性化酵素に対し阻害効果を持つ細胞膜結合型セリンプロテアーゼ制御因子 (HAIs) を治療面の有力な候補と考えている。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨転移マウスモデルの作成と、転移巣における TTSPs、HAI の発現解析

#### a. 腎癌細胞株における発現解析

培養腎癌細胞株である MRT-1、Caki-1、Caki-2、786-0、A498 及び、腎癌骨転移巣から樹立された RBM1-IT4 における対象分子の発現を RNA、蛋白レベルで確認する (RT-PCR、western blot)。

#### b. 骨転移マウスモデル (心腔内注入法) の作成と解析

研究目的の文献 7 を参考に腎癌細胞株 (786-0 を予定) をマウス心腔内に注入し、骨転移モデルを作成する。骨転移巣組織における対象分子の発現を RNA、蛋白レベルで確認し、使用した親株との比較検討を行う。さらに、免疫染色にて対象分子の発現を病理組織学的所見と共に解析する。

### (2) 骨転移形成過程における TTSPs の機能解析

#### a. マウスモデルを用いた解析

実験 1 の結果を基に、接種培養細胞における特定の分子のノックダウンや強制発現を行い、骨転移形成能の違いを比較検討する。

### 3. 形成された骨転移巣における TTSPs、HAI の機能解析と新規治療法の探索

実験 1-b の解析結果を基に治療標的候補となる分子を選定する。

#### a. 培養細胞を用いた解析

骨転移巣から採取し再培養した腎癌細胞もしくは RBM1-IT4 を用いた *in vitro* の実験系で、標的分子の、骨転移微小環境における機能を解析する。具体的には癌細胞自体の機能 (増殖能、浸潤能、抗アポトーシス能、運動性) の変化を評価し、骨芽細胞もしくは破骨細胞と共培養することによりその影響を解析する。

#### b. マウスモデルを用いた解析

形成された骨転移に対し、これまでの実験から推定される骨転移の維持に最も寄与している分子を標的とした活性阻害 (治療) を行い、転移巣の縮小効果を比較検討する。実験 2-a と同様に、ゾレドロン酸や RANKL 阻害剤を併用することにより、治療効果が増幅されるかについても検討する。

#### 【文献】

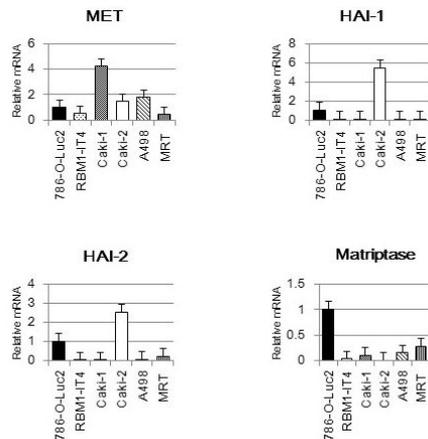
1. Kataoka H et al: Cancer Metast Rev, 22: 223-236, 2003
2. Benvenuti S. et al: J Cell Physiol, 213: 316-325, 2007

3. Betsunoh H, Mukai S et al: Cancer Sci 98: 491-498, 2007
4. Miller GS et al: Cell Tissue Res in press, 2012
5. Antalis TM et al: Biochem J, 428: 325-346, 2010
6. Mukai S et al: Hum Cell 28: 44-50, 2015
7. Strube A et al: Clin Exp Metastasis, 27: 319-330, 2010

#### 4. 研究成果

##### (1) 腎細胞癌細胞株における発現解析

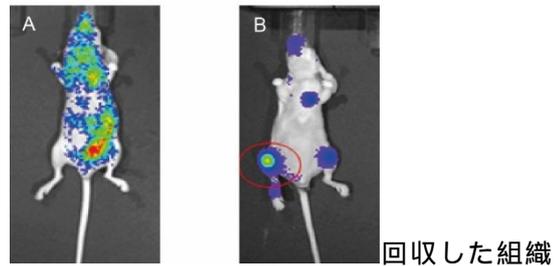
RT-qPCR の結果 (786-0-Luc2 を基準とした相対値) を下図に示す。



使用した細胞株は、いずれも腎細胞癌の細胞株で、American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)より購入した Caki-1、Caki-2、A498 と、K. Weber 先生 (Penn Medicine, PA, USA) の許可を得て、高知大学泌尿器科の辛島尚先生からご譲りいただいた RBMIT-4 (骨転移巣より樹立)、786-0 細胞にルシフェラーゼの恒常的遺伝子導入を行った 786-0 細胞を使用した。全ての細胞に MET の発現はみられたが、Caki-1 に最も高発現していた。HA-1 は Caki-2 に高発現しており、HAI-2 は Caki-2 と 786-0-Luc2 細胞に発現していたが、他の細胞株では発現が低下していた。マトリプテースは 786-0-Luc2 細胞に発現が確認された。

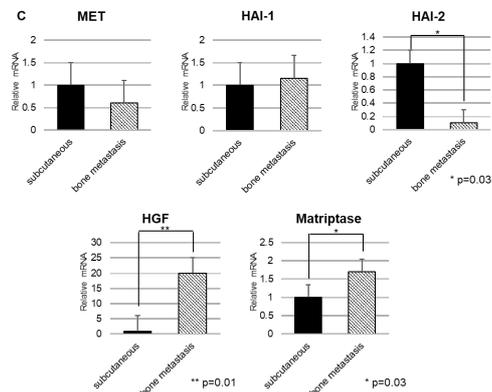
##### (2) 骨転移マウスの作製とサンプルの解析

宮崎大学医学部動物実験ガイドラインの承認 (2013-536) を得た後、Strube A ら (Clin Exp Metastasis, 2010) の報告に記載されている手技に準じて、female athymic nude (BALB/AJcl-nu/nu) mice の左心室に 786-0-Luc2 細胞を注入した。注入直後の成功例を右上図 A に示す。6 週間後に骨転移の形成を確認し (B、赤丸)、組織サンプルを回収、抽出した。またコントロールとして別の nude mouse の皮下に 786-0-Luc2 細胞を移植し、6 週間後に組織を回収した。

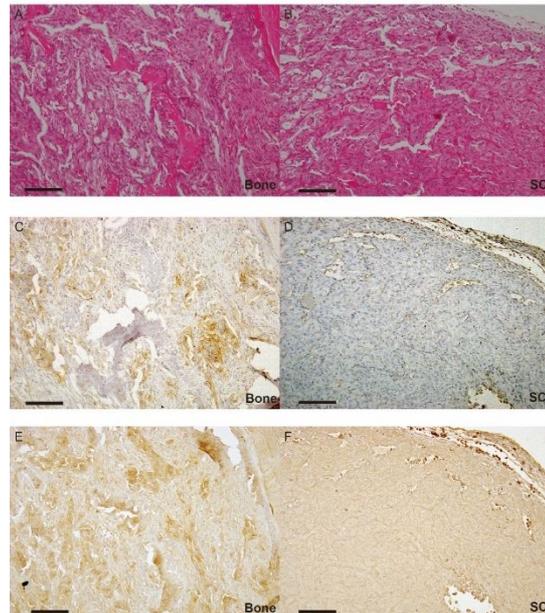


回収した組織

から RNA を抽出し、RT-qPCR を行った (下図 C) と、骨転移巣では、皮下移植と比較して、有意に HAI-2 の発現が低下していた。一方で、骨転移相では有意に HGF やその活性化酵素であるマトリプテースの発現が亢進していた。MET や HAI-1 の発現量には有意差を認めなかった。次に、回収したサンプルの組織学的解析と免疫組織染色を行った。



下図の A、C、D は骨転移巣、B、D、F は皮下移植部の組織である。

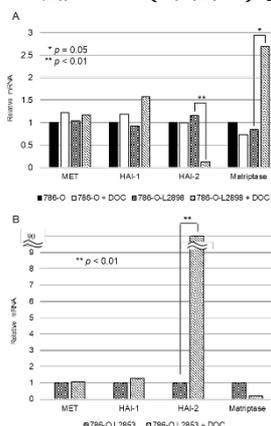


HE 染色 (A、B) では、骨転移巣 (A) において、腫瘍組織内に紡錘型の形態を呈する細胞が多く認められた。MET (トータル MET) の免疫染色 (E、F) では、骨転移と皮下でその発現に有意な差は認められなかったが、MET のリン酸化 (C、D) は明らかに有意に骨転移巣 (C) で亢進していた。以上の結果から、骨転移巣では、HGF とその活性化酵素であるマト

リプテースの発現が亢進しており、さらにマトリプテース活性を制御する HAI-2 の発現が低下しているために、HGF の活性化が亢進し、リガンド依存性に MET のリン酸化が増強され、癌の進展に促進的に作用している可能性が高いと考えられた。また、このシステムを制御する上で、HAI-2 が最も重要な因子であると考え、テトラサイクリン発現誘導システムを用いた HAI-2 の恒常的ノックダウン細胞 (786-0-L2898) と恒常的強制発現細胞 (786-0-L2853) を作製した。

### (3) HAI-2 恒常的ノックダウン細胞 (786-0-L2898) と HAI-2 恒常的強制発現細胞 (786-0-L2853) における HGF 関連分子の発現解析

786-0-Luc2 細胞ならびに 786-0-L2898 細胞における MET、HAI-1、HAI-2、マトリプテースの発現をドキシサイクリン 0.5 $\mu$ g/ml 投与下で確認した (下図 A)。



ドキシサイクリンは 786-0-Luc2 細胞における MET、HAI-1、HAI-2、マトリプテースの発現に有意な影響を与えなかった。786-0-L2898 ではドキシサイクリン依存性に HAI-2 の発現が有意に低下し、さらに興味深いことにマトリプテースの発現が有意に亢進した。一方 786-0-L2853 細胞では、ドキシサイクリン依存性に HAI-2 の発現が有意に亢進し、有意差はみられなかったがマトリプテースの発現が低下する傾向が見られた。

### (4) HAI-2 が 786-0-Luc2 細胞に与える機能的影響に関する解析

#### 細胞増殖能に与える影響について

786-0-Luc2 細胞ならびに HAI-2 の恒常的ノックダウン細胞 (786-0-L2898) と恒常的強制発現細胞 (786-0-L2853) を用いてドキシサイクリン 0.5 $\mu$ g/ml 投与下で MTS 細胞増殖アッセイを行ったが、細胞間に有意差はみられなかった。HAI-2 が 786-0-Luc2 細胞の増殖能に与える影響は少ないと考えられた。

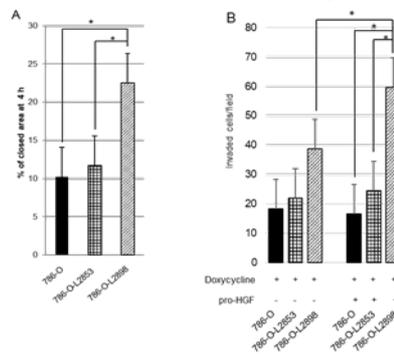
#### 遊走能に与える影響について

786-0-Luc2 細胞ならびに HAI-2 の恒常的ノックダウン細胞 (786-0-L2898) と恒常的強制発現細胞 (786-0-L2853) を用いてドキシサイク

リン 0.5 $\mu$ g/ml 投与下で創傷治癒アッセイを行ったところ、下図 A のように HAI-2 のノックダウンにより、786-0-Luc2 細胞の遊走能が有意に亢進した。一方で、HAI-2 の強制発現は遊走能に影響を与えなかった。

#### 浸潤能に与える影響について

786-0-Luc2 細胞ならびに HAI-2 の恒常的ノックダウン細胞 (786-0-L2898) と恒常的強制発現細胞 (786-0-L2853) を用いてドキシサイクリン 0.5 $\mu$ g/ml 投与下でマトリジェル細胞浸潤アッセイを行った。その結果、HAI-2 のノックダウンにより 786-0-Luc2 細胞の浸潤能が亢進した (下図 B 左)。さらに pro-HGF (最終濃度 40 ng/mL) の添加により、浸潤能はさらに有意に亢進した (下図 B 右)。以上より、HAI-2 ノックダウンによる pro-HGF の活性化が (MET のリン酸化を介して) 浸潤能の亢進に寄与している可能性が推察された。またこの実験系で pro-HGF の活性化を促進する酵素として、**研究成果 3** の結果からマトリプテースが候補として考えられた。



### (5) 786-0-Luc2 細胞の遊走能、浸潤能亢進に直接関与する分子の探索

次に 786-0-Luc2 細胞ならびに HAI-2 の恒常的ノックダウン細胞 (786-0-L2898) と恒常的強制発現細胞 (786-0-L2853) をドキシサイクリン 0.5 $\mu$ g/ml 投与下で培養した後、RNA を抽出、RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array system を用いて、84 種類の癌の転移に關与する分子の発現量の変化を解析した。その結果、HAI-2 のノックダウンにより、chemokine ligand 7 (CCL7) と chemokine receptor 4 (CXCR4) の up-regulation が、また HAI-2 の強制発現により、CXCR4 と matrix metalloproteinase 9 (MMP9) の down-regulation が確認された。また HAI-2 のノックダウンにより、E-cadherin (cadherin 1) もわずかに down-regulate されていた。これらの分子は 786-0-Luc2 細胞の遊走能や浸潤能に影響を与えている可能性が高いため、今後の研究で解析していきたい。

Gene Symbol	Gene Name	786-0-L2898 Fold Change	786-0-L2853 Fold Change
CCL7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	4.29	1.33
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin	-1.08	1.72

CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2.57	-2.45
MMP9	Matrix metalloprotease 9	1.69	-7.29

## 結論

ルシフェラーゼを恒常的に遺伝子導入した 786-0-Luc2 腎細胞癌株を心注し、骨転移マウスモデルを作成した。骨転移巣と皮下に移植した腎細胞癌の発現解析では、骨転移巣で有意に HGF とマトリプテースの発現が亢進しており、HAI-2 の発現が低下していた。また骨転移巣では有意に MET のリン酸化が亢進していた。骨転移巣では、HGF とその活性化酵素であるマトリプテースの発現が亢進しており、さらにマトリプテース活性を制御する HAI-2 の発現が低下しているために、HGF の活性化が亢進し、リガンド依存性に MET のリン酸化が増強され、癌の進展に促進的に作用している可能性が高いと考えられた。このシステムを制御する上で、HAI-2 が最も重要な因子であると考へ、テトラサイクリン発現誘導システムを用いた HAI-2 の恒常的ノックダウン細胞 (786-0-L2898) と恒常的強制発現細胞 (786-0-L2853) を作製した。恒常的に HAI-2 をノックダウンした同細胞では、マトリプテースの発現が亢進しており、pro-HGF 依存性に浸潤能、遊走能が亢進した。腎細胞癌の骨転移巣では、リガンド依存性に MET のリン酸化が亢進しており、HAI-2 がその regulator である可能性が示唆された。また、HAI-2 に連動して 786-0-Luc2 の遊走、浸潤能に關与する因子として、CCL7、CXCL4、MMP9 および E-cadherin 等の分子が候補として推測された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Koji Yamasaki, Shoichiro Mukai, Satoru Sugie, Takahiro Nagai, Kozue Nakahara, Toyoharu Kamibeppu, Hiromasa Sakamoto, Noboru Shibasaki, Naoki Terada, Yoshinobu Toda, Hiroaki Kataoka and Toshiyuki Kamoto. Dysregulated HAI-2 plays an important role in renal cell carcinoma bone metastasis through ligand-dependent MET phosphorylation. *Cancers* 2018, 10(6), 190; <https://doi.org/10.3390/cancers10060190> - 8 June 2018
2. Kamimura T, Kida K, Takeda M, Sato S, Fujii M, Inoue M, Tsukino H, Mukai S,

Nanashima A, Nakamura K, Kamoto T. Surgical intervention for renal cell carcinoma with inferior vena cava extension combined with laparoscopic procedure. *Res Rep Urol*. 2017 Jun 19;9:107-112.

3. Katayama Y., Kamibeppu T., Nishii R., Mukai S., Wakeda H., Kamoto T.: CT evaluation of acupuncture needles inserted into sacral foramina. *Acupunct Med*. 2016, 34(1): 20-26.
4. Sugie S, Mukai S, Yamasaki K, Kamibeppu T, Tsukino H, Kamoto T. Plasma macrophage-stimulating protein and hepatocyte growth factor levels are associated with prostate cancer progression. *Hum Cell*. 2016, 29(1):22-29.
5. Sugie S, Mukai S, Yamasaki K, Kamibeppu T, Tsukino H, Kamoto T. Plasma macrophage-stimulating protein and hepatocyte growth factor levels are associated with prostate cancer progression. *Hum Cell*. 2016, 29(1):22-29.
6. Mukai S, Yorita K, Kawagoe Y, Katayama Y, Nakahara K, Kamibeppu T, Sugie S, Tsukino H, Kamoto T, Kataoka H. : Matriptase and MET are prominently expressed at the site of bone metastasis in renal cell carcinoma: immunohistochemical analysis. *Hum Cell* 2015 28(1) : 44-50.
7. Sugie S, Mukai S, Yamasaki K, Kamibeppu T, Tsukino H, Kamoto T. Significant Association of Caveolin-1 and Caveolin-2 with Prostate Cancer Progression. *Cancer Genomics Proteomics*. 2015, 12(6):391-396.
8. Mukai S, Yorita K, Yamasaki K, Nagai T, Kamibeppu T, Sugie S, Kida K, Onizuka C, Tsukino H, Kamimura T, Kamoto T, Kataoka H. Expression of human kallikrein 1-related peptidase 4 (KLK4) and MET phosphorylation in prostate cancer tissue: immunohistochemical analysis. *Hum Cell*. 2015, 28(3):133-142.
9. Ishizaki H, Nakashima S, Hamada T, Nishida T, Maehara N, Ikeda T, Tsukino H, Mukai S, Kamoto T, Kondo K.: Laparoscopic anterior pelvic exenteration for locoregionally advanced rectal cancer directly invading the urinary bladder: A case report of low anterior resection with en bloc cystectomy for sphincter preservation. *Asian J Endosc Surg*. 2015 8(3):343-346

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Takahiro Nagai, Koji Yamasaki, Shoichiro Mukai. HAI-2 regulates the invasive growth of RCC cells in bone metastasis through suppression of matriptase-induced HGF/MET pathway. 16th Urological Association of Asia Congress 2018, 17th, April, 2018, Kyoto
2. Koji Yamasaki, Shoichiro Mukai. HAI-2 regulates the invasive growth of RCC cells in bone metastasis through suppression of matriptase-induced HGF activation. American Urological Association annual meeting 2018, 15th, May, 2017, Boston, MA, USA
3. Shoichiro Mukai. HAI-2 regulates the growth of RCC cells in bone metastasis through suppression of matripatese. The 34<sup>th</sup> Korea -Japan Urological Congress, 2017, 9, 23, Gyeong-ju, Korea
4. 山崎浩司, 向井尚一郎. 腎細胞癌における HGF/MET pathway を介したマトリプテース及び HAI の骨転移抑制. 第 27 回泌尿器分子・細胞研究会, 2018, 2, 3, 東京

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

向井 尚一郎 (Shoichiro Mukai)

宮崎大学・医学部発達泌尿生殖医学講座泌尿器科学分野・准教授

研究者番号：10315369

### (2)研究分担者

賀本 敏行 (Toshiyuki Kamoto)

宮崎大学・医学部発達泌尿生殖医学講座泌尿器科学分野・教授

研究者番号：00281098

片岡 寛章 (Hiroaki Kataoka)

宮崎大学・医学部病理学講座腫瘍再生病態学分野・教授

研究者番号：10214321

杉江 悟 (Satoru Sugie)

宮崎大学・医学部発達泌尿生殖医学講座泌尿器科学分野・医員

研究者番号：50626140 ( 辞退 )

山崎 浩司 (Koji Yamasaki)

宮崎大学・医学部発達泌尿生殖医学講座泌尿器科学分野・医員

研究者番号：30777355