

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14370

研究課題名(和文)腎癌発癌過程における代謝シフト・ミトコンドリア機能の役割の解明

研究課題名(英文)Clarifying the significance of the shift to aerobic glycolysis and the role of mitochondrial function in kidney cancer development

研究代表者

馬場 理也 (Baba, Masaya)

熊本大学・国際先端医学研究機構・准教授

研究者番号：10347304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん組織における糖代謝はミトコンドリアによる酸化的リン酸化よりも解糖系が優位になっている。この糖代謝の状態はがん細胞の増殖・進展に有利に働くと考えられている。この代謝シフトやミトコンドリア活性が発がん過程に果たす役割は未知の部分が多い。本研究は、ある種の遺伝性腎癌では転写因子TFE3の活性化を伴いミトコンドリア機能が亢進しているという研究成果に基づき、TFE3が活性化している腎癌における糖代謝機構の変化とミトコンドリアの役割解明を目的とする。各種発現誘導細胞株や腎癌発がんマウスモデルの作製・解析により、ミトコンドリアにより産生されるATPがシグナル分子として発癌に寄与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Aerobic glycolysis predominates over mitochondrial oxidative phosphorylation in cancer. Cancer cells utilize this metabolic shift to aerobic glycolysis to drive proliferation and progression. However, the significance of this metabolic shift and the role of mitochondrial function during cancer development remains to be determined. Previously, we reported that mitochondrial biogenesis was upregulated with increased transcriptional activity of TFE3 in a rare type of hereditary renal cell carcinoma (RCC). This research aims to clarify the significance of the shift to aerobic glycolysis and the role of mitochondrial function in TFE3 translocation RCC, in which TFE3 transcriptional activity is constitutively activated by translocation. We have generated and analyzed a variety of TFE3-inducible stable cell lines and a mouse model of TFE3 translocation RCC, and found a potential function of ATP produced in the mitochondria as a signaling molecule which may contribute to cancer development.

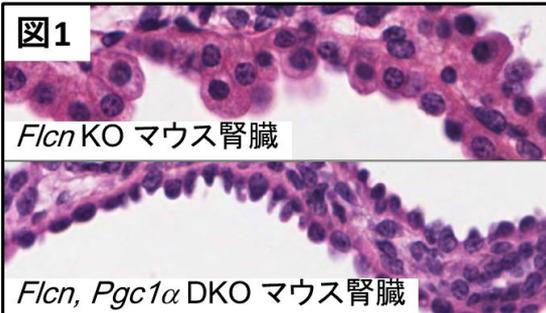
研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌 糖代謝 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

一般に癌組織ではミトコンドリアによる酸化リン酸化よりも好氣的解糖系が優位になっており、この状態が癌細胞の増殖に有利に働いていると考えられている。この代謝シフトが発癌過程のどの段階で起こっているのかは未知であり、また発癌過程におけるミトコンドリアの役割も未解明な部分が多い。

研究者はこれまでに遺伝性腎癌症候群 (BHD 症候群) の原因となる、癌抑制遺伝子 (*FLCN*) の機能解析を行い、*Flcn* ノックアウトマウスの作成と解析を通して、*Flcn* が欠損した細胞では増殖が亢進し、野生型 TFE3 の転写活性が亢進していることを明らかにし、腎癌の発生において TFE3 の活性化が重要な役割を果たす可能性を示してきた。また *Flcn* ノックアウトマウスではミトコンドリア機能のマスター転写因子である *PGC1 α* の活性化により、ミトコンドリア機能が亢進していることを明らかにした。更に、*Flcn*、*Pgc1 α* ダブルノックアウトマウスではミトコンドリアの機能亢進が抑制され、胞体が大きく過形成を示す異常な形態の細胞が一切認められなくなった (図 1)。



散発性腎癌の中で、2004 年に新たなサブタイプとして定義された Xp11.2 転座腎細胞癌は、X 染色体上にコードされる転写因子 TFE3 が転座により他の様々な遺伝子と融合遺伝子を形成していることが知られている。この融合 TFE3 はどれもが C 末端側の basic-helix-loop-helix leucine zipper 構造を維持していることから、DNA 結合能を有する活性型の転写因子として機能し、発がんに関与することが示唆される。しかし発がんの詳細な分子機構は未解明の部分が多い。

以上の学術的背景とこれまでの研究成果を踏まえ、*PGC1 α* の転写活性亢進を介したミトコンドリア機能の活性化が、転座腎癌の発癌に重要な役割を果たす可能性が高いと考えられる

2. 研究の目的

本研究では Xp11.2 転座腎細胞癌を対象として、TFE3 転座腎癌発がんマウスモデルと融合 TFE3 発現誘導細胞株を作製・解析することにより、腎癌の発がん過程における糖代謝機構の変化及びミトコンドリアの果たす役割を解明する事を目的とする。

3. 研究の方法

- (1) TFE3 発現誘導細胞株の樹立と解析
ヒト尿細管上皮由来細胞株やその他の細胞株を親株として、ドキシサイクリン依存的に融合 TFE3 又は野生型 TFE3 を発現する発現誘導細胞株を樹立し、多角的に解析する。
- (2) 転座腎癌発がんマウスモデルの樹立と解析

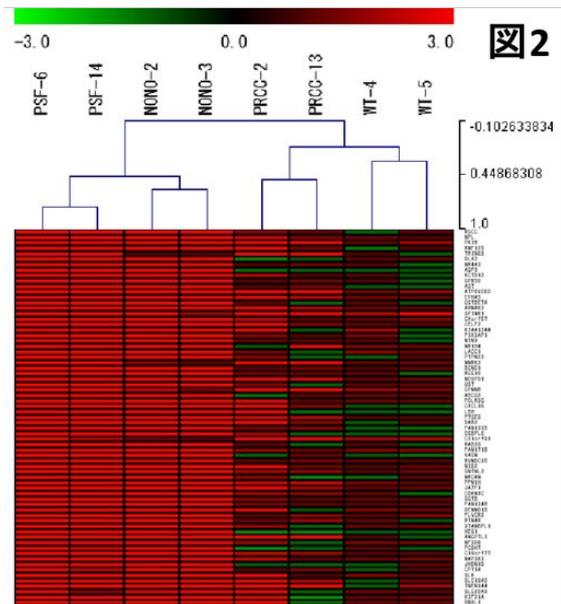
Cre 組み換え酵素依存的に発現が誘導される融合 TFE3 (PRCC-TFE3) 発現カセットを *Rosa26* 領域にノックインしたマウス個体 (*Isl-Rosa-PRCC-TFE3*) を作製し、腎臓上皮特異的に Cre 組み換え酵素を発現するトランスジェニックマウス (*Ksp-Cre*) と交配し、転座腎癌発がんマウスモデルを樹立する。さらにその表現型を詳細に観察し、多角的に解析する。

- (3) 転座腎癌発がんマウスモデルにおける *Pgc1 α* ノックアウトの解析

転座腎癌発がんマウスモデル (*Isl-Rosa-PRCC-TFE3*, *KSP-Cre*) へ *Pgc1 α* コンディショナルノックアウトアレル (*Pgc1 α -flox*) を導入し、*Isl-Rosa-PRCC-TFE3*, *Pgc1 α flox/flox*, *KSP-Cre* マウスを作製する。*Isl-Rosa-PRCC-TFE3*, *KSP-Cre* マウスをコントロールとして、*Pgc1 α* ノックアウトによるミトコンドリア機能の抑制が発がんに及ぼす効果を解析する。

4. 研究成果

- (1) 融合 TFE3 発現誘導細胞株の樹立と解析
3 種の異なる融合 TFE3 発現誘導細胞株並びに野生型 TFE3 発現誘導細胞株を複数ずつ樹立し、網羅的遺伝子発現解析を行った。(図 2)



- (2) 転座腎癌発がんマウスモデルの樹立と解析

作製した

Isl-Rosa-PRCC-TFE3,
KSP-Cre マウスは、4
か月齢頃から微小な腎
癌を発症しはじめ、9か
月齢にはMRIでも検出
可能な腎癌を認めた(図
3)。網羅的遺伝子発現
解析により、(1)で作
製・解析した細胞株にお
いて、融合 TFE3 の発
現誘導により発現が亢進する遺伝子群との
有意な相関が認められた。



(3) 転座腎癌発がんマウスモデルにおける *Pgc1α* ノックアウトの解析

転座腎癌発がんマウスモデル
(*Isl-Rosa-PRCC-TFE3*, *KSP-Cre*) と *Pgc1α*
コンディショナルノックアウトマウスの交
配を行い、目的とするマウスのコホートを
得た。

(4) TFE3 活性化とミトコンドリア機能 -ATP シグナル経路

(1)(2)及びTFE3の核内局在を人為的に制
御することでTFE3の活性化を制御できる細
胞株の解析結果より、ある種の ATP レセプ
ターの発現がTFE3の活性化により劇的に増
加することを見出した。ミトコンドリアの活
性化と ATP 産生増加、ATP レセプターを介
したシグナル経路の活性化が、腎癌の発がん
機構に役割を果たす可能性が示唆される。

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6件)

Furuya M, Hasumi H, Baba M, Tanaka R,
Iribe Y, Onishi T, Nagashima Y,
Nakatani Y, Isono Y, Yao M.
Establishment and characterization of
BHD-F59RSVT, an immortalized cell line
derived from a renal cell carcinoma in
a patient with Birt-Hogg-Dube syndrome,
Laboratory Investigation, 2017
Mar; 97(3):343-351. doi:
10.1038/labinvest. (査読有り)

Hasumi H, Hasumi Y, Baba M, Nishi H,
Furuya M, Vocke CD, Lang M, Irie N,
Esumi C, Merino MJ, Kawahara T, Isono
Y, Makiyama K, Warner AC, Haines DC,
Wei MH, Zbar B, Hagenau H, Feigenbaum
L, Kondo K, Nakaigawa N, Yao M, et
al. H255Y and K508R missense mutations
in tumour suppressor folliculin (FLCN)
promote kidney cell proliferation.,
Human Molecular Genetics, 2017 Jan
15;26(2):354-366. doi:

10.1093/hmg/ddw392. (査読有り)

Furuya M, Yao M, Tanaka R, Nagashima Y,
Kuroda N, Hasumi H, Baba M, Matsushima
J, Nomura F, Nakatani Y, Genetic,
epidemiologic and clinicopathologic
studies of Japanese Asian patients
with Birt-Hogg-Dube syndrome.,
Clinical Genetics, 2016
Nov;90(5):403-412. doi:10.1111/cge.12
807. (査読有り)

Yan M, Audet-Walsh E, Manteghi S, Rosa
Dufour C, Walker B, Baba M, St-Pierre
J, Giguere V, Pause A, Chronic AMPK
activation via loss of FLCN induces
functional beige adipose tissue
through PGC-1 /ERR., *Genes &
Development*, 2016 May 1;30(9):1034-46.
doi: 10.1101/gad.281410.116. (査読有
り)

Baba M, Toyama H, Sun L, Takubo K, Suh
H-C, Hasumi H, Nakamura-Ishizu A,
Hasumi Y, Klarmann KD, Schmidt LS,
Linehan WM, Suda T, Keller JR, Loss of
Folliculin disrupts hematopoietic
stem cell quiescence and homeostasis
resulting in bone marrow failure., *Stem
Cells*, 2016 Apr;34(4):1068-82. doi:
10.1002/stem.2293. (査読有り)

Hasumi H, Baba M, Hasumi Y, Furuya M,
Yao M, Birt-Hogg-Dubé syndrome:
Clinical and molecular aspects of
recently identified kidney cancer
syndrome. *International Journal of
Urology*, 2016 Mar;23(3):204-10. doi:
10.1111/iju.13015. (査読有り)

[学会発表](計21件)

Masaya Baba, Ying Huang, Takanobu
Motoshima, Hisashi Hasumi, Mitsuko
Furuya, Yukiko Hasumi, Masahiro Yao,
Yuichi Oike, Tomomi Kamba, Laura S.
Schmidt, W. Marston Linehan,
Clarification of the molecular
mechanism for cancer development in
Xp11.2 translocation renal cell
carcinoma, AACR Annual Meeting, April
4, 2017, Washington D.C., USA

馬場理也、古屋充子、蓮見壽史、加藤生
真、長嶋洋治、黒田直人、高橋 渡、河
野吉昭、元島宗信、矢尾正祐、江藤正俊
GPNMB は TFE3 活性化腎細胞癌の診断マー
カーとして有用である、第 68 回西日本泌
尿器科学会総会、2016 年 11 月 26 日、下
関

馬場理也、古屋充子、蓮見壽史、黄 瑩、加藤生真、Martin Lang、長嶋洋治、黒田直人、入江信子、江角千晴、羽野博之、高橋渡、河野吉昭、杉山豊、田上憲一郎、山口隆大、Laura S. Schmidt、江藤正俊、中谷行雄、矢尾正祐、W. Marston Linehan、GPNMB は TFE3 活性化腎細胞癌の診断マーカーとして有用である、第 47 回腎癌研究会、2016 年 7 月 9 日、東京

蓮見壽史、馬場理也、古谷充子、矢尾正祐、腎癌抑制遺伝子 FLCN におけるミスセンス変異の病原性についての検討、第 47 回腎癌研究会、2016 年 7 月 9 日、東京

古屋充子、入部康弘、蓮見壽史、馬場理也、長嶋洋治、加藤生真、中谷行雄、矢尾正祐、Birt-Hogg-Dubé 症候群における腎癌の分子病理学的検討、第 75 回日本癌学会総会、2016 年 10 月 6 日、横浜

中谷行雄、矢尾正祐、蓮見壽史、長嶋洋治、馬場理也、野村文夫、加藤生真、古屋充子、Birt-Hogg-Dubé 症候群患者における腎がん以外の諸臓器腫瘍に関する病理学的検討、第 75 回日本癌学会総会、2016 年 10 月 8 日、横浜

蓮見壽史、馬場理也、古谷充子、矢尾正祐、腎癌抑制遺伝子 FLCN におけるミスセンス変異の病原性についての検討、第 81 回日本泌尿器科学会東部総会、2016 年 10 月 8 日、青森

Masaya Baba, Metabolic regulation of cell proliferation and differentiation by Flcn-Pgc1 α -axis, 2nd Kumamoto IRCMS International Symposium and 17th Kumamoto AIDS seminar, Nov 2, 2016, Kumamoto Japan

馬場理也、遺伝性腎細胞癌症候群～BHD 症候群を中心に～、第 11 回 Tokyo Metropolitan Kidney Cancer Meeting (特別講演) 2016 年 2 月 12 日、東京

Masaya Baba, Ying Huang, Hisashi Hasumi, Masahiro Yao, Yoji Nagashima, Mitsuko Furuya, Yuichi Oike, Masatoshi Eto, Laura S. Schmidt, W. Marston Linehan, Clarification of the molecular mechanism for cancer development in Xp11.2 translocation renal cell carcinoma, The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 8, 2015, Nagoya

蓮見壽史、馬場理也、古屋充子、矢尾正祐、腎癌の代謝経路における

FLCN/FNIP1/FNIP2 遺伝子群の重要性、第 74 回日本癌学会総会、2015 年 10 月 10 日、名古屋

入部康弘、矢尾正祐、蓮見壽、長嶋洋治、馬場理也、野村文夫、中谷行雄、古屋充子、Birt-Hogg-Dubé 症候群に発症する腎癌の臨床病理像、遺伝子変異および網羅的染色体解析、第 74 回日本癌学会総会、2015 年 10 月 10 日、名古屋

Baba M, Huang Y, Hasumi H, Furuya M, Hasumi Y, Yao M, Schmidt LS, Linehan WM. Xp11.2 translocation RCC mouse model. 6th BHD Symposium, 2015 年 9 月 24 日、Syracuse, U.S.A.

馬場理也、蓮見壽史、黄瑩、入江信子、長嶋洋治、矢尾正祐、江藤正俊、尾池雄一、須田年生、W. Marston Linehan、Xp11.2 転座腎細胞癌発癌機構の解明、第 46 回腎癌研究会、2015 年 7 月、東京

蓮見壽史、馬場理也、古屋充子、矢尾正祐、BHD 症候群関連腎癌の発生メカニズムの解析、2015 年 6 月、埼玉

〔図書〕(計 3 件)

Baba M, Schmidt LS, Linehan WM、Springer、Renal Cell Carcinoma - Molecular Features and Treatment Updates(Chapter 2; Hereditary Renal Cell Carcinoma, PP.3-68)、2017

馬場理也、江藤正俊、メディカルビュー社、Year Book of RCC 2016 (分担執筆、がんの不均一性と進化・進展、PP.19-29)、2017

馬場理也、羊土社、実験医学 (分担執筆、腎がん発生の分子メカニズムー腎がん研究からわかってきたがんの病態基盤ー、PP.1256-1261)、2016

〔その他〕

ホームページ等

http://ircms.kumamoto-u.ac.jp/research/masaya_baba/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 理也 (MASAYA BABA)

熊本大学・国際先端医学研究機構・准教授
研究者番号：10347304

(2) 連携研究者

瀬藤 光利 (MITSUTOSHI SETOU)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：20302664