

令和元年6月17日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11020

研究課題名(和文) FLCN遺伝子および細胞内代謝経路に着目した腎癌腫瘍化機構の解析研究

研究課題名(英文) Elucidation of renal tumorigenesis driven by FLCN deficiency

研究代表者

蓮見 壽史 (Hasumi, Hasashi)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：40749876

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)：私達はBirt-Hogg-Dube (BHD)症候群の原因遺伝子であるfolliculin (FLCN)の機能解析を行っております。2019/4月までに私達は、幾つかの重要な発見(Hum Mol Genet, 26: 354, 2017)(Hum Mol Genet, 27: 2712, 2018)を報告するとともに、BHD関連腎癌から樹立した細胞株およびFLCN欠失腎臓検体を用いたリン酸化プロテオーム解析を完了し、腎臓増殖に関係する経路を複数同定しました。これらは新規腎癌治療薬を開発する上で鍵となるデータであると考えられ、今後、論文化し報告する予定です。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少性遺伝性腎癌症候群の研究は、その他の一般的な非遺伝性の腎癌に対する治療薬開発に役立ちます。私達は本研究課題において、FLCNという希少性遺伝性腎癌症候群の原因遺伝子に変異を起こした時にリン酸化される蛋白質を、プロテオーム解析技術を用いて網羅的に調べ、いくつかの重要なリン酸化蛋白質を同定いたしました。蛋白質のリン酸化は、細胞増殖などに重要な役割を担っていることがあり、一方で蛋白質をリン酸化するキナーゼと呼ばれる酵素はその阻害剤が既に存在することが多いため、本研究で得られたデータは新規腎癌治療薬開発に役立つと考えられます。今後、私達はこの成果を論文化し報告する予定です。

研究成果の概要(英文)：We are studying renal tumorigenesis under the deficiency of FLCN, a renal tumor suppressor and a causative gene for Birt-Hogg-Dube (BHD) hereditary kidney cancer syndrome. In this effort, we have reported several key findings (Hum Mol Genet, 26: 354, 2017) (Hum Mol Genet, 27: 2712, 2018) as well as have completed high-throughput analysis of phosphorylated protein profiles in FLCN-deficient kidney cancer cell lines and in Flcn-deficient murine kidneys, and identified several pathways critical for renal tumorigenesis driven by FLCN-deficiency. Because protein kinases may trigger cell proliferation under tumor suppressor deficiency and could be targets for molecular targeting agents, we are going to publish these data to provide mechanistic insights into renal tumorigenesis as well as foundations for the development of novel therapeutics for kidney cancer.

研究分野：腎癌

キーワード：腎癌抑制遺伝子 FLCN 癌と代謝 膜輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

私達はこれまで、遺伝性腎癌を突破口として、腎癌の発生・進展に關与する遺伝子を解明し、新たな診断・治療法の開発を目指し長年研究を進めてきました。研究分担者の矢尾は最も代表的な遺伝性腎腫瘍症候群である von Hippel-Lindau(VHL)病に關して、その原因遺伝子の単離の段階から 30 年以上に渡り関わり、VHL 遺伝子が VHL 病の原因遺伝子のみならず、腎癌病理組織型のなかで最も頻度の高い淡明細胞型の主要な原因遺伝子であることを明らかにし、引き続き研究分担者の近藤は VHL の機能解析を進め、HIF(hypoxia inducible factor)依存的な血管新生が腎癌細胞の腫瘍化に重要であることを示しました。これらの研究成果は現在の腎腫瘍の組織型分類(2004 年 WHO 腎腫瘍分類)の確立とともに、進行転移性腎癌の標準治療となっている血管新生阻害薬、mTOR 阻害薬などの分子標的薬の理論的背景として、少なからず貢献してきたものと考えております。このように腎癌ではその 5%を占めるに過ぎない遺伝性腎癌の研究が、散発性腎癌の新規治療薬開発基盤の確立につながることを期待できるため、現在までに見つかっている VHL 以外の腎癌抑制遺伝子が欠失した時に引き起こされる表現型を丁寧に紐解くことが重要であると考えられています。

### 2. 研究の目的

BHD 症候群は比較的最近認知された遺伝性腎癌症候群で、腎細胞癌、線維毛包腫、肺嚢胞を三徴とする常染色体優性遺伝性の腫瘍多発疾患であり、約 30%の患者に嫌色素性腎癌やオンコサイト - マなどからなる混成腫瘍が発生します。2002 年に米国 NIH/NCI の研究グループによって、folliculin (FLCN)が原因遺伝子として同定され、その後も同グループが世界的にも中心となって BHD 研究を推し進め、腎臓特異的な FLCN ノックアウトマウスが、重量が 10 倍にも達する増殖性嚢胞様の腎を形成することから、FLCN が腎尿細管細胞の増殖を制御していることが明らかとなりました (J Natl Cancer Inst, 100:149, 2008)。本研究代表者の蓮見も、2007 年から NIH/NCI の研究グループに留学・参加し、以後その一員として精力的に解析を進めてきました。まず、2006 年および 2008 年に、FLCN の結合蛋白として、folliculin-interacting protein1 および 2(FNIP1 と FNIP2)を同定し、FNIP1 および FNIP2 が共に細胞内エネルギーセンサーである AMPK(AMP-activated protein kinase)に結合することを報告しました (Proc Natl Acad Sci U S A, 103:15552, 2006, Gene, 415:60, 2008)。さらに、全身ホモの FLCN ノックアウトマウスは D6.5 で胎生致死であり、臓側内胚葉の空胞化を認め、栄養の取り込み障害が示唆されること (Proc Natl Acad Sci U S A, 106:18722, 2009)、腎臓特異的 FLCN ノックアウトマウスに形成される増殖性嚢胞様腎が mTORC1 の亢進を示し、ラパマイシンが部分的に有効であることを報告しました (J Natl Cancer Inst, 100:149, 2008)。また、代謝に重要な臓器である骨格筋および心臓における FLCN ノックアウトマウスの表現型から、FLCN はミトコンドリア代謝を制御する転写共役因子 PGC1 $\alpha$  依存的な細胞内エネルギー恒常性に重要であることを明らかにしました (J Natl Cancer Inst, 104:1750, 2012, Hum Mol Genet, 23:5706, 2014)。これにより従来、嫌色素性腎細胞癌とオンコサイト - マは電子顕微鏡上ミトコンドリアに富んでいるという報告が多数なされてきましたが、そのメカニズムに FLCN 経路が関与している可能性が示唆されました。さらに蓮見は FNIP1 と FNIP2 のノックアウトマウスを作成し、FLCN と FNIP1/2 が協調的に働いており、筋肉、心臓、免疫系では FNIP1 のみのノックアウトで FLCN ノックアウト同様の表現型が得られること、腎臓では FNIP1 と FNIP2 のダブルノックアウトにて FLCN ノックアウト同様の表現型が得られることを明らかにしました。つまり、FLCN の細胞内代謝制御や腎癌抑制機能を含めた様々な役割は FNIP1/2 との結合を通じて行われていること、FNIP1 と FNIP2 が癌抑制において重複する機能を有することが明らかとなりました (Proc Natl Acad Sci U S A, 112:E1624, 2015)。このように、FLCN/FNIP1/FNIP2 複合体は腎細胞増殖の恒常性保持に重要な機能を持ち、その機能欠失による異常増殖の機序を解明することにより、新規腎癌治療薬の開発基盤が確立されることが期待できます。FLCN は two-hit theory に基づく典型的な癌抑制遺伝子ですが (Proc Natl Acad Sci U S A, 106:18722, 2009)、その 1 ゲノム変異から起こる発癌のメカニズムはいまだ解明されておらず、その最初のステップである FLCN や FNIP1/FNIP2 の機能喪失により引き起こされる細胞内シグナル伝達系の変化を捉えることが重要であると考えられます。そこで本研究は、FLCN 欠失下の腎細胞異常増殖を引き起こすシグナルを標的とした新規腎癌治療薬開発基盤の確立のために、今までに樹立してきた FLCN の有無で細胞増殖が変化する様々な系に対してリン酸化プロテオーム解析を行い、腎細胞の異常増殖を引き起こすリン酸化シグナル経路の詳細を明らかにすることを目的としました。

### 3. 研究の方法

FLCN 欠失腎癌細胞株からレンチウイルスを用いてドキシサイクリン依存的に FLCN を安定発現する細胞株 (W3) を作成すると同時に、FLCN 欠失マウス線維芽細胞からレンチウイルスを用いてドキシサイクリン依存的に FLCN を安定発現する細胞株 (ZfXa) を作成し、リン酸化プロテオームを行いました。さらに、腎臓特異的 FLCN ノックアウトマウスに発生する増殖性嚢胞様腎のリン酸化プロテオーム解析を行いました。細胞培養、マウスからの腎検体採取、蛋白抽出およびリン酸化蛋白質の精製、脱塩処理は全て研究代表者・蓮見の研究室で行い、LC/MS スペクトロメトリーを用いた解析は、本研究の研究協力者である横浜市立大学生命医科学研究

科プロテオーム科学研究室、平野久博士（特任教授）の御退官後に研究室を引き継がれた木村弥生博士（准教授）に依頼しました。腎臓のリン酸化プロテオームについては、腎臓特異的 FLCN ノックアウトマウスが生後1週ほどから増殖性嚢胞様腎の組織学的形態変化を示すため、生後1、3、5日目で検討し、コントロール腎臓とノックアウト腎臓とで蛋白質プロファイリングが異なる生後1日目で行うこととし、コントロール腎臓とノックアウト腎臓をそれぞれ6検体ずつ採取し、リン酸化プロテオームを行いました。

#### 4. 研究成果

FLCN 欠失腎臓細胞株からレンチウイルスを用いてドキシサイクリン依存的に FLCN を安定発現する細胞株 (W3) を作成すると同時に、FLCN 欠失マウス線維芽細胞からレンチウイルスを用いてドキシサイクリン依存的に FLCN を安定発現する細胞株 (ZfXa) を作成し、リン酸化プロテオームを行ったところ、1114 個のリン酸化蛋白質が同定されました。その中から FLCN 欠失下で有意に増えているリン酸化蛋白質 102 個に着目し、STRING (<http://string-db.org/>) を用いて評価しました。W3 と ZfXa で共通して変化しているリン酸化蛋白質として Actg1 と Etl4 が同定され、また過去の報告で FLCN との関連が報告されている分子として、Cdk1 と Grem1 が同定されました (図1)。

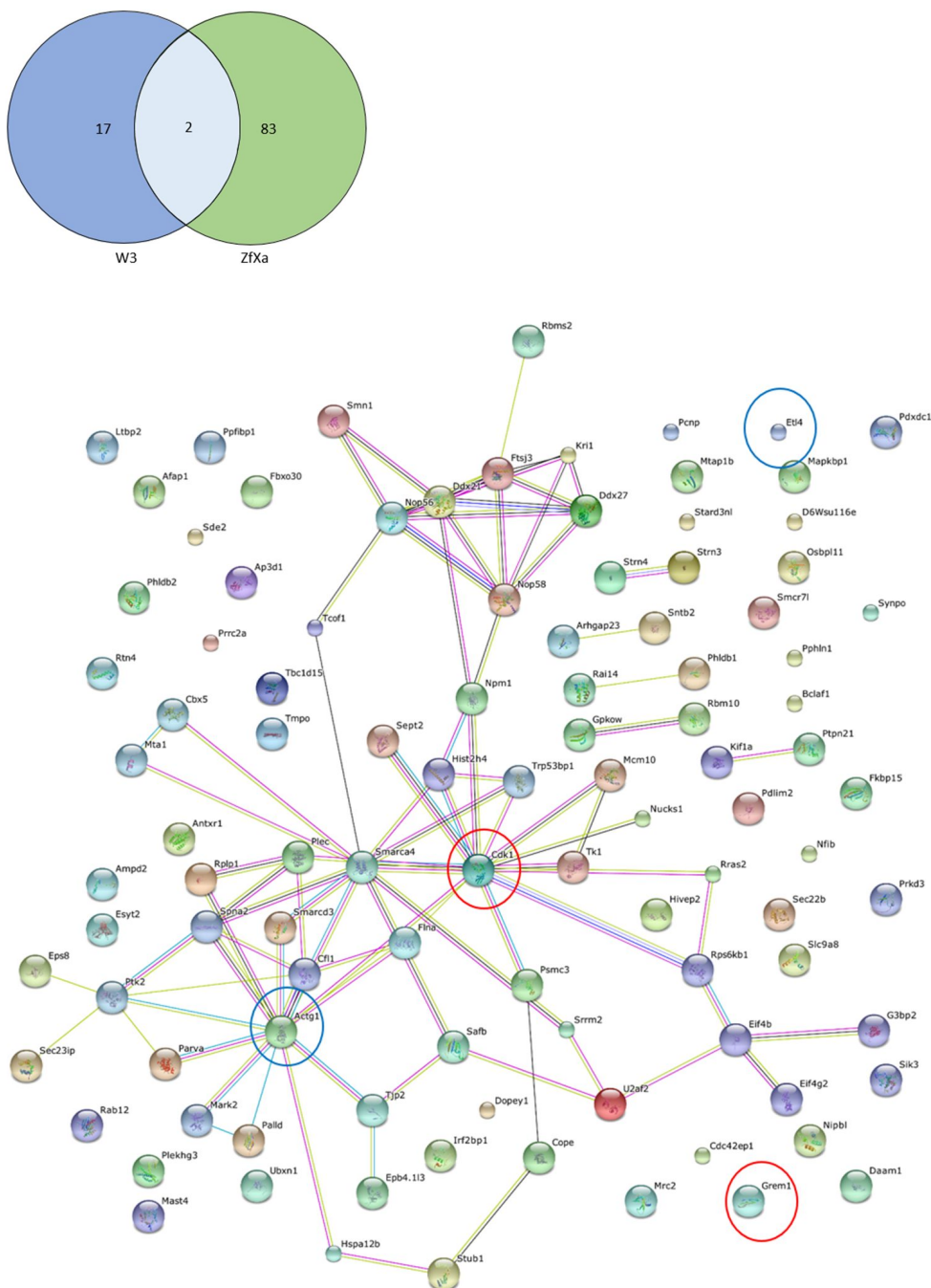


図1：FLCN 欠失細胞株にて変化の見られたリン酸化蛋白質

次に、K 平均法を用いてクラスタリングを施行したところ、FLCN 欠失細胞では Ribosome biogenesis, DNA metabolic process, mTOR signaling pathway, Regulation of actin cytoskeleton が変化していることが明らかとなり、これらの細胞内経路の変化が FLCN 欠失下での腎細胞異常増殖を引き起こしていると考えられました ( 図 2 )

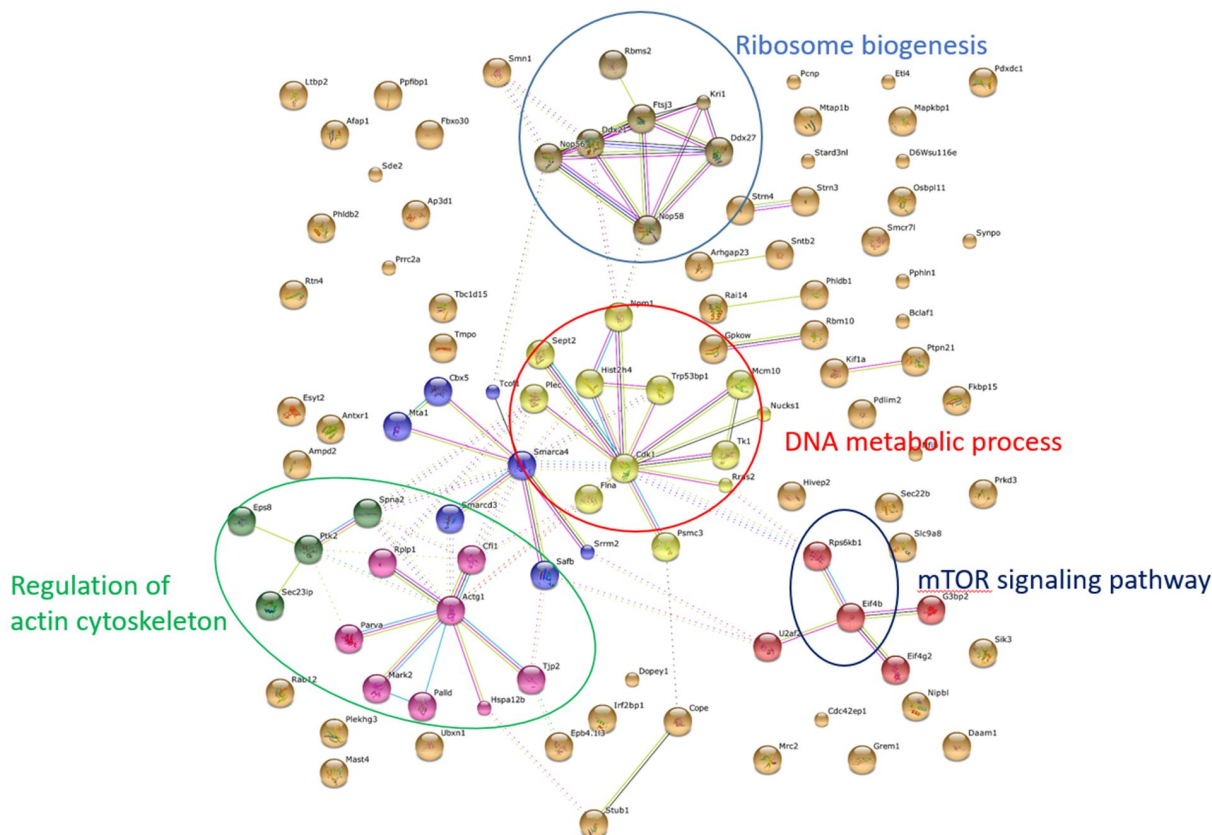


図 2 : FLCN 欠失細胞株にて変化の見られたリン酸化蛋白質および、それらが位置する経路

さらに、生後 1 日目の、FLCN ノックアウト腎臓とコントロール腎臓をそれぞれ 6 検体ずつ採取し、プロテオームおよびリン酸化プロテオームを行ったところ、2152 個の蛋白質および 1475 個のリン酸化蛋白質が同定され、FLCN ノックアウト腎臓にて有意に増えているリン酸化蛋白質として、Hmga2, Sap130, Iws1, Pphln1, Smarca4, Hirip3 などのエピゲノムに参与する分子、Ckap4, Ssh3, Pdlim5 などの細胞骨格に参与する分子、Nucks1 などの細胞周期に参与する分子、Ndr1 などの ER ストレスに参与する分子を同定することができました ( 図 3 )。私達は以前、BHD 関連腎癌の全エクソームシーケンスにて、クロマチン再構成遺伝子群の変異を明らかにしましたが、本研究での FLCN 欠失細胞のリン酸化プロテオームの結果は、FLCN 欠失下での代謝およびエピゲノムの破綻が BHD 関連腎癌の発生を引き起こすという私達のこれまでの報告を支持するものと考えられました。

pathway	gene	Max fold change KO/CT	ttest
epigenome	Hmga2	5.37	0.024
epigenome	Sap130	19.32	0.009
epigenome	Iws1	6.85	0.022
epigenome	Pphln1	3.45	0.039
epigenome	Smarca4	7.83	0.044
epigenome	Hirip3	3.71	0.021
cytoskeleton	Ckap4	4.98	0.023
cytoskeleton	Ssh3	3.15	0.032
cytoskeleton	Pdlim5	2.97	0.041
cell cycle	Nucks1	4.02	0.031
ER stress	Ndr1	15.82	0.043

図 3 : FLCN ノックアウト腎臓にて有意に増えているリン酸化蛋白質

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)(全て査読あり)

1. Baba M, Furuya M, Motoshima T, Lang M, Funasaki S, Ma W, Sun HW, Hasumi H, Huang Y, Kato I, Kadomatsu T, Satou Y, Morris N, Karim BO, Ileva L, Kalen JD, Wilan Krisna LA, Hasumi Y, Sugiyama A, Kurahashi R, Nishimoto K, Oyama M, Nagashima Y, Kuroda N, Araki K, Eto M, Yao M, Kamba T, Suda T, Oike Y, Schmidt LS, Linehan WM. TFE3 Xp11.2 Translocation Renal Cell Carcinoma Mouse Model Reveals Novel Therapeutic Targets and Identifies GPNMB as a Diagnostic Marker for Human Disease. *Mol Cancer Res*. 2019 [Epub ahead of print]
2. Hasumi H, Furuya M, Tatsuno K, Yamamoto S, Baba M, Hasumi Y, Isono Y, Suzuki K, Jikuya R, Otake S, Muraoka K, Osaka K, Hayashi N, Makiyama K, Miyoshi Y, Kondo K, Nakaigawa N, Kawahara T, Izumi K, Teranishi J, Yumura Y, Uemura H, Nagashima Y, Metwalli AR, Schmidt LS, Aburatani H, Linehan WM, Yao M. BHD-associated kidney cancer exhibits unique molecular characteristics and a wide variety of variants in chromatin remodeling genes. *Hum Mol Genet*. 2018 [Epub ahead of print]
3. Matsumoto K, Udaka N, Hasumi H, Nakaigawa N, Nagashima Y, Tanaka R, Kato I, Yao M, Furuya M. Histopathological analysis of aggressive renal cell carcinoma harboring a unique germline mutation in fumarate hydratase. *Pathol Int*. 2018 [Epub ahead of print]
4. Baba M, Endoh M, Ma W, Toyama H, Hirayama A, Nishikawa K, Takubo K, Hano H, Hasumi H, Umemoto T, Hashimoto M, Irie N, Esumi C, Kataoka M, Nakagata N, Soga T, Yao M, Kamba T, Minami T, Ishii M, Suda T. Folliculin Regulates Osteoclastogenesis Through Metabolic Regulation. *J Bone Miner Res*. 2018 Oct;33(10):1785-1798.
5. Hasumi H, Yao M. Hereditary kidney cancer syndromes: Genetic disorders driven by alterations in metabolism and epigenome regulation. *Cancer Sci*. 2018 Mar;109(3):581-586.
6. Furuya K, Kawahara T, Narahara M, Tokita T, Fukui S, Imano M, Mitome T, Ito Y, Izumi K, Osaka K, Yokomizo Y, Hayashi N, Hasumi H, Nawata S, Kawano T, Yao M, Uemura H. Measurement of serum isoform [-2]proPSA derivatives shows superior accuracy to magnetic resonance imaging in the diagnosis of prostate cancer in patients with a total prostate-specific antigen level of 2-10 ng/ml. *Scand J Urol*. 2017 Aug;51(4):251-257.
7. Ito H, Kondo K, Kawahara T, Kaneta T, Tateishi U, Ueno D, Namura K, Kobayashi K, Miyoshi Y, Yumura Y, Makiyama K, Hayashi N, Hasumi H, Osaka K, Yokomizo Y, Teranishi JI, Hattori Y, Inoue T, Uemura H, Yao M, Nakaigawa N. One-month assessment of renal cell carcinoma treated by everolimus using FDG PET/CT predicts progression-free and overall survival. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017 May;79(5):855-861.
8. 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-Dubé syndrome. *Lab Invest*. 2017 Mar;97(3):343-351.
9. 家族性腫瘍症候群と腎細胞癌 : 蓮見壽史、矢尾正祐 *病理と臨床* 2017 35(10): 910 -914
10. 癌遺伝子・癌抑制遺伝子 : 蓮見壽史 *日本臨牀* 2017 75(6): 47-52
11. 遺伝性腎細胞癌基礎研究の進歩 蓮見壽史 *日本臨牀* 2017 75(6): 148-156
12. 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, Metwalli AR, Marston Linehan W, Schmidt LS.: H255Y and K508R missense mutations in tumour suppressor folliculin (FLCN) promote kidney cell proliferation. *Hum Mol Genet*. 26(2):354-366. 2017.
13. 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-Dubé syndrome. *Clin Genet*. 90(5):403-412. 2016.
14. Kawahara T, Fusayasu S, Izumi K, Yokomizo Y, Ito H, Ito Y, Kurita K, Furuya K, Hasumi H, Hayashi N, Myoshi Y, Miyamoto H, Yao M, Uemura H.: Bone management in Japanese patients with prostate cancer: hormonal therapy leads to an increase in the FRAX score. *BMC Urol*. 16(1):32. 2016.
15. Kato I, Iribe Y, Nagashima Y, Kuroda N, Tanaka R, Nakatani Y, Hasumi H, Yao M, Furuya M.: Fluorescent and chromogenic in situ hybridization of CEN17q as a potent useful diagnostic marker for Birt-Hogg-Dubé syndrome-associated chromophobe renal cell carcinomas. *Hum Pathol*. 52:74-82. 2016.
16. Nakaigawa N, Kondo K, Tateishi U, Minamimoto R, Kaneta T, Namura K, Ueno D, Kobayashi

- K, Kishida T, Ikeda I, Hasumi H, Makiyama K, Kubota Y, Inoue T, Yao M. FDG PET/CT as a prognostic biomarker in the era of molecular-targeting therapies: max SUVmax predicts survival of patients with advanced renal cell carcinoma. BMC Cancer. 8;16:67. 2016.
17. Baba M, Toyama H, Sun L, Takubo K, Suh HC, Hasumi H, Nakamura-Ishizu A, Hasumi Y, Klarmann KD, Nakagata N, Schmidt LS, Linehan WM, Suda T, Keller JR.: Loss of Folliculin Disrupts Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Homeostasis Resulting in Bone Marrow Failure. Stem Cell 34(4):1068-82. 2016
18. Hasumi H, Baba M, Hasumi Y, Furuya M, Yao M.: Birt-Hogg-Dube syndrome: Clinical and molecular aspects of recently identified kidney cancer syndrome. Int J Urol. 23(3):204-10. 2016.

〔学会発表〕(計9件)

1. 蓮見壽史：BHD 関連腎癌の分子背景. 第24回日本家族性腫瘍学会学術集会、兵庫県、2017
2. 蓮見壽史：BHD 関連腎癌の発癌機構解析. 第26回泌尿器分子細胞研究会、大分県、2017
3. 蓮見壽史：BHD 関連腎癌の発癌機構解析, 第105回日本泌尿器科学会総会、鹿児島県、2017
4. 蓮見壽史：BHD 関連腎癌の発癌機構解析, 第48回腎癌研究会、東京都、2017
5. 蓮見壽史：BHD 関連腎癌の発癌機構解析, 第23回日本家族性腫瘍学会学術集会、北海道、2017
6. 蓮見壽史：ゲノム変異から紐解く腎癌分子機構. 東海核医学セミナー、愛知県、2016
7. 蓮見壽史：腎癌抑制遺伝子 FLCN におけるミスセンス変異の病原性の検討, 第81回日本泌尿器科学会東部総会、青森県、2016
8. 蓮見壽史：腎癌抑制遺伝子 FLCN におけるミスセンス変異の病原性の検討, 第47回腎癌研究会、東京都、2016
9. 蓮見壽史：腎癌抑制遺伝子 FLCN におけるミスセンス変異の病原性の検討, 第22回日本家族性腫瘍学会学術集会、愛媛県、2016

〔その他〕

1. International Journal of Urology, Top Cited Article Award 2018
2. 第24回日本家族性腫瘍学会学術集会 最優秀演題賞

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：矢尾 正祐

ローマ字氏名：Masahiro Yao

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：00260787

研究分担者氏名：近藤 慶一

ローマ字氏名：Keiichi Kondo

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：附属病院

職名：准教授

研究者番号(8桁)：80363836

(2)研究協力者

研究協力者氏名：平野 久

ローマ字氏名：Hisashi Hirano

研究協力者氏名：マールストーン リネハン

ローマ字氏名：W. Marston Linehan

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。