

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09382

研究課題名(和文) 唾液腺腫瘍自然発生モデルマウスの確立とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Establishment salivary gland-targeted Flcn knockout mice

研究代表者

折館 伸彦 (ORIDATE, Nobuhiko)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：90312355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、FLCN、FNIP1&FNIP2遺伝子コンディショナルノックアウトマウス (FLCN f/f、FNIP1 f/f & FNIP2 f/f) と唾液腺特異的にCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスMMTV-Creを交配し、唾液腺特異的FLCNノックアウトマウスおよび唾液腺特異的FNIP1/FNIP2ノックアウトマウスの作製を行った。対照群として、ヘテロノックアウトマウス(FLCN f/+ Cre +、FNIP1 f/+ FNIP2 f/+ Cre +)の作製を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺腫瘍は種類が多彩でありながら頻度は高くない。加えて、樹立された細胞株が少なく、疾患モデル動物もないため、腫瘍発生・進展メカニズムの研究に用いる材料が極めて限られ、その解明が進んでいなかった。疾患モデル動物については、例えば大腸癌研究でヒトの家族性大腸腺腫症の疾患モデル動物であるAPCノックアウトマウスが作製され、腫瘍形成メカニズムの解明に多大な貢献があったように、唾液腺腫瘍でも自然発生モデルマウスの確立が望まれていた。本研究で作製された疾患モデルマウスを用いて、唾液腺における遺伝子発現・タンパク質発現を網羅的に解析することが可能となり、腫瘍形成メカニズムを解明する端緒とすることができた。

研究成果の概要(英文)：FLCN is a tumor suppressor gene which controls energy homeostasis through regulation of a variety of metabolic pathways including mitochondrial oxidative metabolism and autophagy. Birt-Hogg-Dub&#233; (BHD) syndrome which is driven by germline alteration of the FLCN gene, predisposes patients to develop salivary gland tumors. Here, we report metabolic roles for FLCN in the salivary gland. Salivary gland-targeted Flcn knockout mice developed cytoplasmic clear cell formation in ductal cells with increased mitochondrial biogenesis, upregulated mTOR-S6K pathway, upregulated TFE3-GPNMB axis and upregulated lipid metabolism. Proteomic and metabolite analysis using LC/MS and GC/MS revealed that Flcn inactivation in salivary gland triggers metabolic reprogramming towards the pentose phosphate pathway which consequently upregulates nucleotide synthesis and redox regulation, further supporting that Flcn controls metabolic homeostasis in salivary gland.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：唾液腺特異的ノックアウトマウス 条件特異的遺伝子破壊 FLCN

## 1. 研究開始当初の背景

唾液腺腫瘍は種類が多彩でありながら頻度は高くない。加えて、樹立された細胞株が少なく、疾患モデル動物もないため、腫瘍発生・進展メカニズムの研究に用いる材料が極めて限られ、その解明が進んでいない。

疾患モデル動物については、例えば大腸癌研究でヒトの家族性大腸腺腫症の疾患モデル動物である APC ノックアウトマウスが作製され、腫瘍形成メカニズムの解明に多大な貢献があったように、唾液腺腫瘍でも自然発生モデルマウスの確立が望まれていた。これに対し、本研究の分担者蓮見壽史博士(横浜市立大学泌尿器科助教)は家族性腎癌症候群である BHD 症候群の責任遺伝子 FLCN とその結合タンパク質 FNIP1, FNIP2 の欠失が唾液腺に腫瘍形成をきたすことを示唆する実験結果を得ていたため、これらを用いた疾患モデル動物を作製し、それを用いて研究を進めることに思い至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、疾患モデル動物の作製および、ノックアウトマウスの唾液腺のトランスクリプトーム解析・リン酸化プロテオーム解析からの、疾患に関連する細胞内シグナル伝達系の同定と腫瘍形成メカニズム解明であった。目的達成のため、下記の実験計画を立案した。

- 1) FLCN, FNIP1 および FNIP2 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスと唾液腺特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを交配し、唾液腺特異的ノックアウトマウスを作製する。
- 2) 唾液腺特異的ノックアウトマウスの唾液腺について光学顕微鏡で形態学的変化を、電子顕微鏡でミトコンドリアの形態・数の変化を検討する。
- 3) 唾液腺特異的ノックアウトマウスの唾液腺に対して、DNA マイクロアレイ・リン酸化プロテオーム解析を行うことにより、唾液腺において FLCN・FNIP1/FNIP2 の機能に参与する細胞内シグナル伝達系を同定し、その検証実験を行う。

## 3. 研究の方法

1) 対象とする FLCN, FNIP1 はホモで欠損すると D6.5 で胎生致死であることがわかっており、FLCN, FNIP1/FNIP2 の解析にはコンディショナルノックアウトの作製が必要である (Hasumi Y, et al, 2009)。コンディショナルノックアウト(条件特異的遺伝子破壊)とは、標的となる遺伝子領域を Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟んだ遺伝子座を持つマウス (floxed マウス: f と表記) と、組織特異的に Cre リコンビナーゼを発現しているマウスとかけ合わせることで、特定の臓器の細胞のみで標的遺伝子の破壊を起こすことができる手法で、これにより致死性遺伝子の解析が可能となる。

研究代表者は、分担者より FLCN, FNIP1 および FNIP2 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスを既に受領し、米国立衛生研究所が作製した唾液腺特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス MMTV-Cre を受領する準備を整えている。

今回、FLCN, FNIP1&FNIP2 遺伝子コンディショナルノックアウトマウス (FLCN f/f、FNIP1 f/f & FNIP2 f/f) と唾液腺特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス MMTV-Cre を交配し、唾液腺特異的 FLCN ノックアウトマウスおよび唾液腺特異的 FNIP1/FNIP2 ノックアウトマウスの作製を行う。対照群として、ヘテロノックアウトマウス (FLCN f/+ Cre +、FNIP1 f/+ FNIP2 f/+ Cre +) の作製も行う。

FLCN ノックアウトマウス、FNIP1 ノックアウトマウス、FNIP2 ノックアウトマウスと、MMTV-Cre トランスジェニックマウスの交配から、唾液腺特異的 FLCN ノックアウトマウスおよび唾液腺特異的 FNIP1/FNIP2 ノックアウトマウスを作製するが、目的とするジェノタイプ、つまり唾液腺特異的 FLCN ノックアウトマウスまたは唾液腺特異的 FNIP1/FNIP2 ノックアウトマウスが得られる確率はそれぞれ 1/4 または 1/8 であり、唾液腺腫瘍の組織学的検討、唾液腺における FLCN・FNIP1/FNIP2 の発現解析に必要な検体数を確保する。

2) 唾液腺特異的 FLCN, FNIP1/FNIP2 ノックアウトマウスの唾液腺を週齢 8 週で摘出、標本を作製、ヘマトキシリン・エオシン染色し評価する。染色後、対照群と唾液腺の形態学的変化を光学顕微鏡で比較する。また、過去の報告で、FLCN, FNIP1/FNIP2 はミトコンドリア代謝との関与が示唆されているので、透過型電子顕微鏡を用いてミトコンドリアの形態・数を評価する。

組織学的検討に十分量の検体が得られた後は、以降に行う細胞内シグナル伝達系の同定のための検体として、唾液腺を摘出し液体窒素で凍結保存しておく。8 週齢以前に著明な唾液腺の腫脹もしくは唾液腺機能低下にともなう摂食障害による体重増加不良を認めるようであれば、8 週齢以前の摘出を検討する。反対に、8 週齢で十分な組織学的変化を得られない場合は 8 週齢以降の

抽出を検討する。

さらに、FLCN・FNIP1/FNIP2の有無によって変動する mRNA、タンパク質、リン酸化タンパク質の網羅的として、ノックアウトマウスの唾液腺を用いた mRNA 発現のトランスクリプトーム解析、質量分析計によるプロテオーム解析およびリン酸化に焦点を当てたリン酸化プロテオーム解析を行う。組織検体は臓器ごとにリン酸化タンパク質抽出方法の条件が異なる可能性がある。そのため検体のホモジナイズの方法やバッファー条件などの条件検討を含め、リン酸化プロテオーム解析は年単位の時間を要すると予想される。

いずれも唾液腺特異的ノックアウトマウスと対照群の唾液腺検体を用い、個体間の差や検体抽出の手技の影響を可能な範囲で除去する目的で各群 3 検体以上用い評価する。用いる検体の週齢に関しては組織学的検討を元に決定する。

これらから得たデータを解析することにより、FLCN・FNIP1/FNIP2 が関与する細胞内シグナル伝達系の同定を行う。

#### 4 . 研究成果

FLCN、FNIP1&FNIP2 遺伝子コンディショナルノックアウトマウス (FLCN f/f、FNIP1 f/f & FNIP2 f/f) と唾液腺特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス MMTV-Cre を交配し、唾液腺特異的 FLCN ノックアウトマウスおよび唾液腺特異的 FNIP1/FNIP2 ノックアウトマウスの作製を行った。対照群として、ヘテロノックアウトマウス (FLCN f/+ Cre +、FNIP1 f/+ FNIP2 f/+ Cre +) の作製も行った。

唾液腺特異的 FLCN ノックアウトマウスまたは唾液腺特異的 FNIP1/FNIP2 ノックアウトマウスが得られる確率はそれぞれ 1/4 または 1/8 であるため、唾液腺腫瘍の組織学的検討、唾液腺における FLCN・FNIP1/FNIP2 の発現解析に必要な検体数を確保するために時間を要したが、唾液腺特異的 FLCN ノックアウトマウスの唾液腺を週齢 8 週で抽出、標本作製、ヘマトキシリン・エオシン染色し評価する。染色後、対照群と唾液腺の形態学的変化を光学顕微鏡で比較した。過去の報告では、FLCN はミトコンドリア代謝との関与が示唆されていたため、透過型電子顕微鏡を用いてミトコンドリアの形態・数を評価した。組織学的検討に十分量の検体が得られたので、将来に行う細胞内シグナル伝達系の同定のための検体として、唾液腺を抽出し液体窒素で凍結保存した。

FLCN is a tumor suppressor gene which controls energy homeostasis through regulation of a variety of metabolic pathways including mitochondrial oxidative metabolism and autophagy. Birt-Hogg-Dubé (BHD) syndrome which is driven by germline alteration of the FLCN gene, predisposes patients to develop kidney cancer, cutaneous fibrofolliculomas, pulmonary cysts and less frequently, salivary gland tumors. Here, we report metabolic roles for FLCN in the salivary gland as well as their clinical relevance. Screening of salivary glands of BHD patients using ultrasonography demonstrated increased cyst formation in the salivary gland. Salivary gland tumors that developed in BHD patients exhibited an upregulated mTOR-S6R pathway as well as increased GPNMB expression, which are characteristics of FLCN-deficient cells. Salivary gland-targeted Flcn knockout mice developed cytoplasmic clear cell formation in ductal cells with increased mitochondrial biogenesis, upregulated mTOR-S6K pathway, upregulated TFE3-GPNMB axis and upregulated lipid metabolism. Proteomic and metabolite analysis using LC/MS and GC/MS revealed that Flcn inactivation in salivary gland triggers metabolic reprogramming towards the pentose phosphate pathway which consequently upregulates nucleotide synthesis and redox regulation, further supporting that Flcn controls metabolic homeostasis in salivary gland. These data uncover important roles for FLCN in salivary gland; metabolic reprogramming under FLCN deficiency might increase nucleotide production which may feed FLCN-deficient salivary gland cells to trigger tumor initiation and progression, providing mechanistic insight into salivary gland tumorigenesis as well as a foundation for development of novel therapeutics for salivary gland tumors.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Isono Y, Furuya M, Kuwahara T, Sano D, Suzuki K, Jikuya R, Mitome T, Otake S, Kawahara T, Ito Y, Muraoka K, Nakaigawa N, Kimura Y, Baba M, Nagahama K, Takahata H, Saito I, Schmidt LS, Linehan WM, Kodama T, Yao M, Oridate N, Hasumi H.	4. 巻 522
2. 論文標題 FLCN Alteration Drives Metabolic Reprogramming Towards Nucleotide Synthesis and Cyst Formation in Salivary Gland	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 931-938
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.11.184.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	蓮見 壽史  (HASUMI HISASHI)  (40749876)	横浜市立大学・医学部・助教    (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関