

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09374

研究課題名(和文) Xp11.2転座腎細胞癌多段階発がん機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the multi-step carcinogenesis mechanism in Xp11.2 translocation renal cell carcinoma

研究代表者

神波 大己 (Kamba, Tomomi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：20402836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Xp11.2転座型腎細胞癌では、転写因子TFE3が融合遺伝子を形成している。我々は、融合TFE3(PRCC-TFE3)が癌遺伝子誘導細胞老化(OIS)を引き起こす事を見出した。そこで、CRISPR/Cas9スクリーニングを行い、PRCC-TFE3によるOISに必須な分子としてCCNCを得た。CDK8はCCNCと共にメディエーターを制御するが、その阻害剤はPRCC-TFE3によるOISを抑制した。PRCC-TFE3の転写標的遺伝子は、CDK8阻害剤により発現が低下した。メディエーターはPRCC-TFE3の転写機能に重要な役割を果たしており、Xp11.2転座型腎細胞癌の新規治療標的候補になる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Xp11.2転座型腎細胞癌は比較的予後の悪い腎細胞癌であり、進行例に対して確立した治療方法が存在しない。その発がん分子機構は、融合TFE3が恒常活性型の転写因子として働く事と考えられる。しかし、この発がん分子機構に基づいて、新規治療方法の開発に結び付ける研究はこれまで無かった。本研究では融合TFE3の転写機能には、転写制御分子複合体のメディエーターが重要な役割を果たしていることを世界で初めて明らかにするとともに、メディエーターがXp11.2転座型腎細胞癌の新規治療標的となる可能性を示した。以上の点で、本研究成果は学術的、社会的意義があると考えられる。

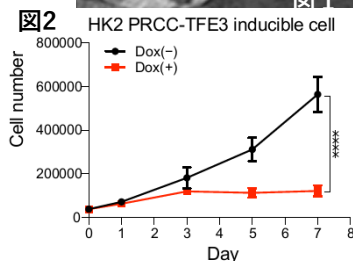
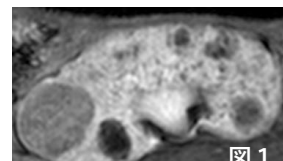
研究成果の概要(英文)：In Xp11.2 translocation renal cell carcinoma, the transcription factor TFE3 forms a fusion gene. We discovered that the fusion TFE3 (PRCC-TFE3) induces oncogene-induced senescence (OIS). Therefore, we performed CRISPR/Cas9 screening and identified CCNC as a molecule essential for PRCC-TFE3-induced OIS. CDK8 regulates the mediator complex together with CCNC, and its inhibitor suppressed PRCC-TFE3-induced OIS. The expression of PRCC-TFE3 transcriptional target genes was reduced by CDK8 inhibitors. The mediator complex plays a crucial role in the transcriptional function of PRCC-TFE3 and represents a potential novel therapeutic target for Xp11.2 translocation renal cell carcinoma.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：転座型腎細胞癌 メディエーター

1. 研究開始当初の背景

Xp11.2 転座型腎細胞癌は、転座により X 染色体上の転写因子 TFE3 が融合遺伝子を形成し、恒常活性型の転写因子として機能することで生じる腎細胞癌である。我々は腎臓特異的融合 TFE3 (PRCC-TFE3) 発現マウスを作製することで、PRCC-TFE3 が腎細胞癌を発生させる事を明らかにした (図 1)。一方で PRCC-TFE3 は、ヒト腎臓近位尿管上皮細胞由来の HK2 細胞やヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に発現誘導させると、細胞増殖を抑制する事を見出した (図 2)。個体においてがん遺伝子として働く PRCC-TFE3 が、どのようにこの細胞増殖抑制を乗り越えて発がんを惹き起こすのかは不明である。以上の背景から、転座型腎細胞癌発がんの背景には、段階的発癌過程が存在するに違いないと考え、本研究の着想に至った。



2. 研究の目的

PRCC-TFE3 発現誘導による細胞増殖抑制の回避に必要な遺伝子変異を、CRISPR/Cas9 によるゲノムワイドスクリーニングにより探索し、アンバイアスに同定する。同定した遺伝子の特徴から、PRCC-TFE3 による細胞増殖抑制の回避に必要なシグナル経路を明らかにし、転座型腎細胞癌の段階的な発がん分子機構を明らかにする。更にその機構に基づき、新規治療方法の開発基盤を形成する。

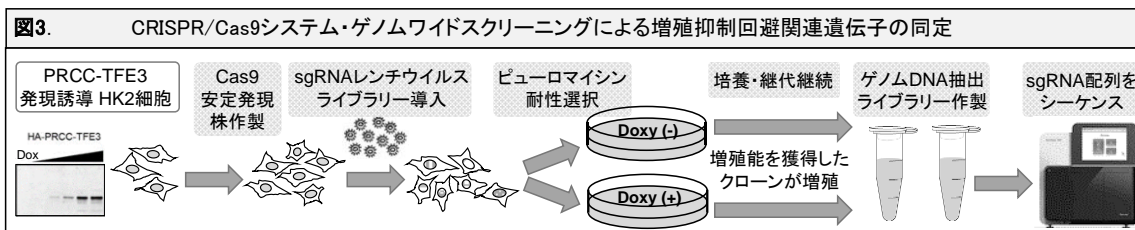
3. 研究の方法

(1) PRCC-TFE3 発現誘導による細胞増殖抑制の詳細な解析

細胞周期の解析、細胞周期関連分子の発現、細胞老化の有無を解析し、PRCC-TFE3 の発現による細胞増殖抑制の性質を明らかにする。

(2) PRCC-TFE3 による細胞増殖抑制を回避するのに必要な遺伝子の、CRISPR/Cas9 システムによるゲノムワイドスクリーニング

図 3 の様に、PRCC-TFE3 発現誘導 HK2 細胞を親株に、Cas9 安定発現細胞株を樹立する。sgRNA 発現レンチウイルスベクターライブラリーを MOI=0.3-0.5 で感染させ、選択薬剤としてピューロマイシンを加えつつ Doxycycline 添加有無に分けて培養を継続する。Dox(-), (+) の培養細胞からそれぞれゲノム DNA 抽出・ライブラリー作製・次世代シーケンスを行う事で、PRCC-TFE3 発現による増殖抑制を回避して増殖している細胞群で、濃縮されている gRNA 配列を同定する。



(3) PRCC-TFE3 による細胞増殖抑制回避に関与するシグネチャーの抽出と検証

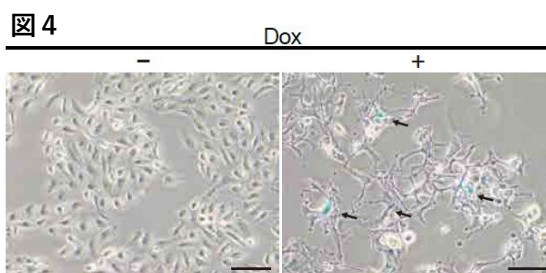
ゲノムワイドスクリーニングで同定した標的遺伝子群に対して Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) やパスウェイ解析をはじめとしたバイオインフォマティクス解析を行い、PRCC-TFE3 による細胞増殖抑制の回避に関与するシグナル経路を抽出する。さらにこれらの経路のカギとなる候補遺伝子を個別に CRISPR/Cas9 システムによりノックアウトし、PRCC-TFE3 発現による増殖抑制が回避されるか否かを検証する。また、解析対象のシグナル経路の阻害剤等を用いて増殖抑制への効果を検証する。

4. 研究成果

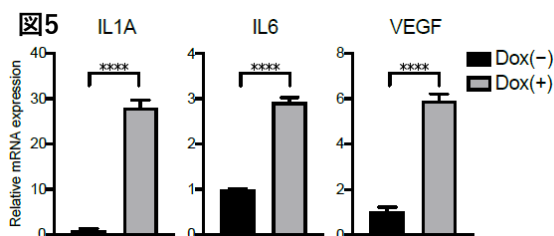
【研究の主な成果】

(1) PRCC-TFE3 発現による細胞増殖抑制は細胞老化の誘導による

ドキシサイクリン依存的 PRCC-TFE3 発現誘導 HK2 細胞の細胞周期を解析したところ、PRCC-TFE3 発現により G0/G1 期で細胞周期が停止していることが明らかになった。また、PRCC-TFE3 発現細胞は老化細胞様の形態を示したことから、老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼ (SA- β -Gal) 活性を SA- β -gal 染色で評価した。その結果、PRCC-TFE3 発現細胞で SA- β -gal 活性の亢進を認めた (図 4)。更に細胞老

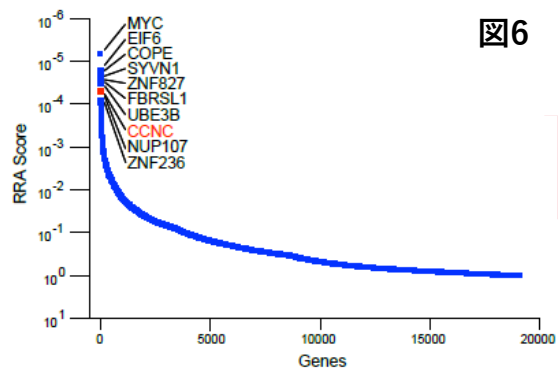


化関連分泌形質(SASP)を評価するために、SASP 因子である IL1A, IL6, VEGF の発現を qRT-PCR で定量したところ、PRCC-TFE3 発現細胞において SASP 因子の発現亢進を認めた(図5)。以上の結果から、がん遺伝子である PRCC-TFE3 は、癌遺伝子誘導細胞老化 (oncogene-induced senescence; OIS) を引き起こす事が明らかになった。



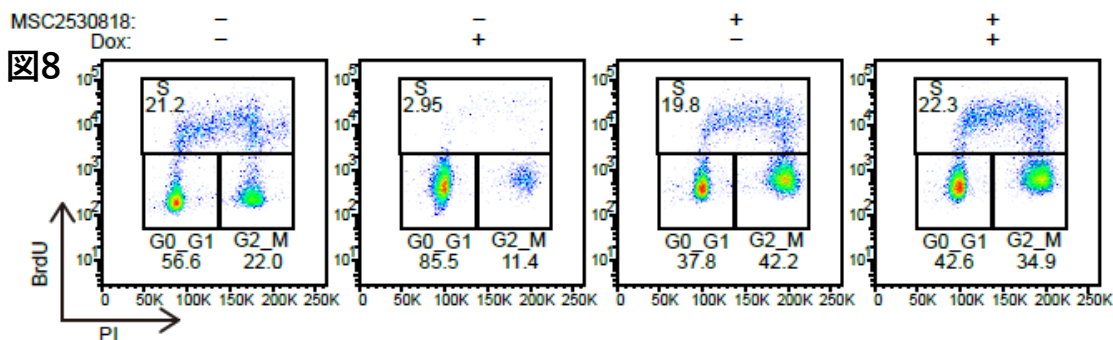
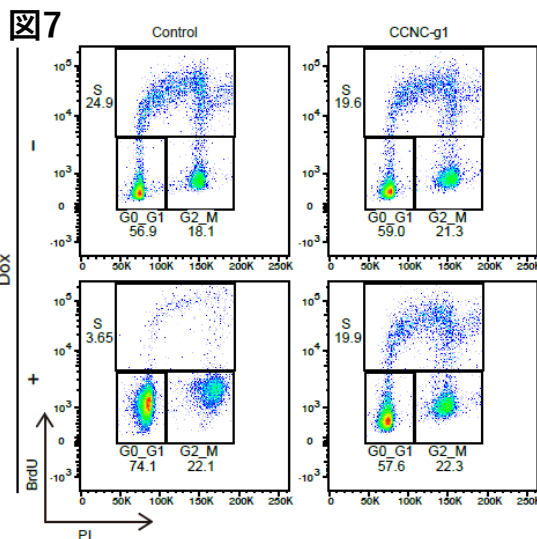
(2) PRCC-TFE3 による OIS 誘導に必須な分子として CCNC を同定

PRCC-TFE3 による OIS に必須な分子を同定する目的で、CRISPR/Cas9 ゲノムワイドスクリーニングを行った。PRCC-TFE3 発現誘導により濃縮していた上位 10 のガイド RNA の内、細胞増殖に関与するものは MYC と CCNC であった(図6)。そこで PRCC-TFE3 発現誘導 HK2 細胞を親株に MYC 又は CCNC のノックアウト細胞を作製した。これらの細胞を用いて PRCC-TFE3 発現誘導による細胞増殖抑制を評価したところ、CCNC ノックアウト細胞においてのみ、PRCC-TFE3 発現誘導による細胞増殖の抑制が見られなくなった。CCNC をノックアウトした細胞では PRCC-TFE3 発現誘導による細胞周期停止が見られず(図7)、SA-β-gal 活性の亢進を認めず、SASP 因子の発現増加も抑制された。以上より CCNC は PRCC-TFE3 がその機能を発揮し、OIS を引き起こすために必須な分子であることが明らかになった。



(3) メディエーターは PRCC-TFE3 による OIS 誘導に必須である

CCNC はメディエーターの構成因子であり、CDK8 とメディエーターキナーゼモジュールを形成し、転写を制御する。そこで PRCC-TFE3 発現誘導 HK2 細胞を CDK8 阻害剤 (MSC2530818) で処理し、PRCC-TFE3 発現誘導による OIS を評価した。CDK8 阻害剤処理により、PRCC-TFE3 発現誘導による細胞周期停止が見られず(図8)、SA-β-gal 活性の亢進を認めず、SASP 因子の発現増加も抑制された。これらの結果から、メディエーターは PRCC-TFE3 による OIS 誘導に必須であることが明らかになった。



(4) メディエーターは PRCC-TFE3 の転写機能発揮に重要な役割を果たす

メディエーターは転写因子と RNA ポリメラーゼ II を橋渡しする転写制御分子複合体であることから、融合 TFE3 による転写に重要な役割を果たすのではないかと考えた。そこで PRCC-TFE3 及び CCNC に対してクロマチン免疫沈降を行い、PRCC-TFE3 の標的塩基配列の定量的 PCR を行った。その結果、PRCC-TFE3 と CCNC が複合体を形成して標的遺伝子に結合している事を示す結果が得られた。

次に、PRCC-TFE3 の標的遺伝子の発現における、メディエーターの役割を調べる目的で、ドキシサイクリン依存的 PRCC-TFE3 発現誘導 HK2 細胞を、ドキシサイクリンの有無及び CDK8 阻害剤 (MSC2530818) の有無下で培養し、RNA シーケンシングで網羅的遺伝子発現解析を行った(図9)。

その結果、PRCC-TFE3の発現誘導により発現が増加する遺伝子のうち 52%において、CDK8 阻害剤処理による発現低下を認めた。

以上の結果からメディエーターは、PRCC-TFE3 の標的遺伝子上で PRCC-TFE3 と複合体を形成し、その転写機能発揮に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

更に、PRCC-TFE3 による OIS を乗り越えてがん化した、ヒト転座型腎細胞癌細胞株 (UOK124:PRCC-TFE3, UOK109:NONO-TFE3) においても、CDK8 阻害剤が融合 TFE3 の転写標的遺伝子の発現を抑制することを確認した。また、UOK124 細胞株の軟寒天コロニー形成能は、CDK8 阻害剤の添加で抑制された (図 10)。これらの結果は、メディエーターが転座型腎細胞癌の新規治療標的候補となる事を示唆する。

【国内外における位置づけとインパクト】

融合 TFE3 が OIS を引き起こすという報告や、メディエーターが融合 TFE3 の転写機能発揮に重要な役割を果たすという報告は、国内外ともに無い。また、本研究はメディエーターが転座型腎細胞癌の新規治療標的候補となり、CDK8 阻害剤の新規治療薬としての可能性を示すという点においてインパクトがあると考えられる。

【今後の展望】

我々は現在、マウス転座型腎細胞癌の同種同所移植系を用いて、CDK8 阻害剤の抗がん効果を評価している。本研究は転座型腎細胞癌の新規治療方法開発基盤となり得、さらなる研究の発展が期待される。

【当初予期していない事象が起きたことにより得られた新たな知見】

当初我々は、転座型腎細胞癌発がんにおいて、PRCC-TFE3 の発現に続く段階的発がん過程が存在すると考え、本研究の着想に至った。一方、PRCC-TFE3 発現誘導による細胞増殖抑制を解析したところ、PRCC-TFE3 が OIS を引き起こしていることが明らかになった。そこで PRCC-TFE3 による OIS に必須な分子を見出すことにより、PRCC-TFE3 の機能制御が可能になるのではないかと考え、CRISPR/Cas9 システムによるゲノムワイドスクリーニングを進めた。その結果、PRCC-TFE3 の機能発揮に必須な分子として CCNC を見出し、本研究の発展へと繋がった。

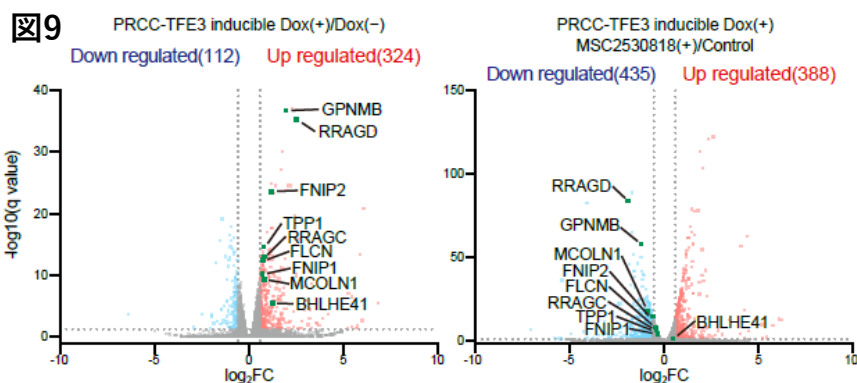
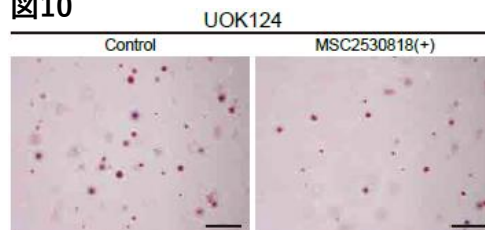


図10



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Funasaki Shintaro, Mehanna Sally, Ma Wenjuan, Nishizawa Hidekazu, Kamikubo Yasuhiko, Sugiyama Hiroshi, Ikeda Shuji, Motoshima Takanobu, Hasumi Hisashi, Linehan W. Marston, Schmidt Laura S., Ricketts Chris, Suda Toshio, Oike Yuichi, Kamba Tomomi, Baba Masaya	4. 巻 113
2. 論文標題 Targeting chemoresistance in Xp11.2 translocation renal cell carcinoma using a novel polyamide?chlorambucil conjugate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2352 ~ 2367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15364	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 -

1. 著者名 Hidekazu Nishizawa, Masaya Baba, Mitsuko Furuya, Ikuma Kato, Ryoma Kurahashi, Yumi Honda, Yoshiki Mikami, Yoji Nagashima, Masatoshi Eto, Tomomi Kamba	4. 巻 4(6)
2. 論文標題 t(6;11) renal cell carcinoma. A case report successfully diagnosed by using fluorescence in situ hybridization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IJU Case Reports	6. 最初と最後の頁 375, 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iju5.12353	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西澤秀和、船橋慎太郎、穴見俊樹、倉橋竜磨、元島崇信、村上洋嗣、矢津田旬二、馬場理也、神波大己
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 genome wide screening による転座型腎細胞癌の転写制御機構の解明
3. 学会等名 第33回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hidekazu Nishizawa, Shintaro Funasaki, Ryoma Kurahashi, Takuya Segawa, Takanobu Motoshima, Yoji Murakami, Junji Yatsuda, Masaya Baba, Tomomi Kamba
2. 発表標題 Elucidation of Transcriptional regulation in Translocation Renal Cell Carcinoma Using CRISPR/Cas9 Genome-Wide Screening
3. 学会等名 Advancements in Urology 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 西澤秀和、舟崎慎太郎、倉橋竜磨、脊川卓也、元島崇信、村上洋嗣、矢津田旬二、馬場理也、神波大己
2. 発表標題 Elucidation of the carcinogenic mechanism of translocation renal cell carcinoma by CRISPR/Cas9 genome-wide screening
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西澤秀和、舟崎慎太郎、倉橋竜磨、脊川卓也、元島崇信、村上洋嗣、矢津田旬二、馬場理也、神波大己
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 genome wide screening mediated clarification of carcinogenesis by a fusion TFE3
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西澤秀和
2. 発表標題 Xp11.2転座腎細胞癌多段階発がん機構の解明
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西澤秀和
2. 発表標題 CRISPR/Cas9ゲノムワイドスクリーニングを用いた転座型腎細胞癌の発がん機構の解明
3. 学会等名 第32回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西澤秀和
2. 発表標題 CRISPR/Cas9ゲノムワイドスクリーニングを用いた融合遺伝子TFE3による発がんメカニズムの解明
3. 学会等名 第31回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西澤秀和
2. 発表標題 Xp11.2転座型腎細胞癌多段階発がん機構の解明
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔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	馬場 理也 (Baba Masaya) (10347304)	熊本大学・国際先端医学研究機構・准教授 (17401)	

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
---------	---------