

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04975

研究課題名(和文)腎癌多段階発癌機構の解明と革新的治療法開発の基盤形成

研究課題名(英文)Clarification of the multistage carcinogenesis and basis of the innovative therapeutics for Renal Cell Carcinoma

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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん抑制遺伝子FLCNの欠損を認めるBHD関連腎細胞癌と、転座による融合TFE3遺伝子を認める転座型腎細胞癌を対象に、遺伝子改変マウス、ヒト臨床検体、細胞株を用い、発がん分子機構の解明、発がん促進的に働く遺伝子変異の解析、新たな診断・治療方法の開発を目的として研究を進めた。FLCNは代謝制御を介して細胞内シグナルを制御している事を見出した。BHD関連腎細胞癌では、FLCNの欠損と併せてクロマチン再構成関連遺伝子に高率に変異を認めた。融合TFE3が異常な機能を獲得した転写因子として発がんに寄与する事を明らかにした。さらに転座型腎細胞癌の診断に有効なマーカーを同定し、臨床検体で有効性を確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on two kinds of renal cell carcinoma (RCC), BHD associated RCC whose responsible gene is a tumor suppressor FLCN, and Xp11.2 translocation RCC (tRCC) that expresses chimeric TFE3 produced by Xp11.2 translocation. We utilized genetically engineered mice, human RCC tissues and cell lines to study molecular mechanisms for RCC development, identify driver gene mutations, and develop new diagnostic markers or therapeutics for RCC. We clarified that FLCN altered intracellular signaling through the regulation of cellular metabolism. We then demonstrated that chromatin remodeling genes were frequently mutated in BHD associated RCC. We also demonstrated that chimeric TFE3 proteins worked as oncogenic transcription factors by acquiring altered functions. Finally, we identified a diagnostic marker for tRCC and confirmed its efficacy using human tRCC samples.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌 がん抑制遺伝子 Birt-Hogg-Dube症候群 転座型腎細胞癌

1. 研究開始当初の背景

散発性腎細胞癌のおよそ8割を占める淡明細胞型腎細胞癌(ccRCC)においては、*VHL*ががん抑制遺伝子の機能欠損がおよそ90%の症例に認められる。近年の次世代シーケンスによる大規模ゲノム変異解析から、淡明細胞型腎細胞癌(ccRCC)において、発がんに促進的に働くと考えられるドライバー遺伝子変異が明らかにされており(Nature Genet. 45;2013, Nature. 499)、他のがんと同様に腎細胞癌においても多段階発癌説が当てはまると考えられる。一方で淡明細胞型腎細胞癌以外の腎細胞癌においては、発がんの初期過程の遺伝子変異(がん抑制遺伝子の機能欠損やがん遺伝子の活性化)は明らかにされつつあるものの、これらの遺伝子変異による発がん分子機構は未だ未解明である。更には、これらのがん抑制遺伝子の機能欠損やがん遺伝子の活性化に加えて、発がんに促進的に働くドライバー遺伝子変異やその発がんに果たす役割も未解明である。

2. 研究の目的

本研究では、その発がん分子機構が未解明である、Birt-Hogg-Dubé (BHD) syndrome 関連腎細胞癌と、Xp11.2転座型腎細胞癌の2種類の腎細胞癌に焦点を絞り、その発がん分子機構の解明、発がんに促進的に働くドライバー遺伝子変異の解析、さらにはこれらの解析結果に基づいた新たな診断・治療方法の開発を目的とする。

我々はこれまでに、BHD syndrome 関連腎細胞癌においては、*FLCN*がん抑制遺伝子の胚細胞変異に加えて、体細胞変異又はLOHにより、*FLCN*の機能が欠損していることを見出してきた。更に、腎臓上皮細胞特異的に*Flcn*を欠損する遺伝子改変マウス(コンディショナル*Flcn*ノックアウトマウス)を作製・解析し、*Flcn*の完全欠損により腎臓上皮細胞が直ちに制御不能な増殖フェーズに入る事を見出した。しかしこのマウスは腎臓上皮細胞が単層を維持したまま過剰に増殖するのみで腎細胞癌は形成せず、*Flcn*の完全欠損は腎細胞癌の発がんには必要であるが充分では無いと考えられた。そこで本研究では、*FLCN*自体のがん抑制遺伝子としての機能を解析するとともに、*FLCN*の欠損と協調して発がんに促進的に働くと考えられるドライバー遺伝子変異の解析を進める。

Xp11.2転座型腎細胞癌は2004年にWHOにより新たに定義された腎細胞癌で、X染色体11番短腕の転座により、この部位に存在する転写因子TFE3をコードする遺伝子が他の遺伝子と融合し、キメラ遺伝子を形成している。これまでにXp11.2転座型腎細胞癌の患者検体において、様々なキメラ遺伝子が発見され報告されているが、そのすべてがTFE3蛋白質のC端側に存在し、DNA結合能を有するbHLH-Zip構造を維持したキメラ蛋白質をコードしている。このことから、

転座により生じたキメラTFE3が、癌遺伝子産物である異常な転写因子として機能し、発がんを促進すると考えられる。本研究では、キメラTFE3が実際にかん遺伝子として腎細胞癌の発がんに寄与するのか。キメラTFE3が発がんに寄与するのであれば、転写因子としてどのように機能するのかを解析する。さらに、転座によりキメラTFE3が生じることが腎細胞癌の発がんに必要な充分なのか、充分で無いのであれば、どのようなドライバー遺伝子変異が必要なのかを解析する。

Xp11.2転座型腎細胞癌は散発性成人腎細胞癌の数%との報告があり、比較的稀である。一方でその診断のためには、免疫染色によるTFE3の核内局在を示す必要がある。さらに転座の証明の為に、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)法によるTFE3の分離やRT-PCRによる融合遺伝子の同定などが必要となる。これらの理由の為に、診断に至らないXp11.2転座型腎細胞癌が少なからず存在することが予想される。さらに診断に至る症例数が少ないことから、本邦におけるXp11.2転座型腎細胞癌の実態が正確に把握されていないのが現状である。本研究ではXp11.2転座型腎細胞癌の発がん分子機構の解明と共に、診断に有益なマーカーの開発も目指す。

3. 研究の方法

- (1) *Flcn*欠損遺伝子改変マウスの解析による*Flcn*の機能解析
- (2) BHD症候群関連腎細胞癌臨床検体におけるドライバー遺伝子変異の解析
- (3) Xp11.2転座型腎細胞癌マウスモデルの作製と解析
- (4) キメラTFE3発現誘導細胞株を用いたキメラTFE3の転写機能の解析
- (5) Xp11.2転座型腎細胞癌の診断マーカー候補の同定と臨床検体による評価

4. 研究成果

(1) *Flcn*の腎臓上皮細胞特異的な欠損は、転写因子*Pgc1α*の発現亢進を介してミトコンドリアの生合成、酸化リン酸化の亢進が認められる。このことから、*Flcn*が細胞の代謝制御を介して細胞の増殖・分化を制御している可能性が考えられた。我々は破骨細胞分化の系を用いて、*Flcn*-*Tfe3*軸が細胞の酸化リン酸化と核酸代謝を劇的に制御していることを見出した。*Flcn*欠損破骨前駆細胞において、プリン作動性シグナル経路が活性化して破骨細胞への分化に促進的に働いていることを発見した。質量分析によるメタボライト定量によって、BHD関連ヒト腎細胞癌組織においても正常腎臓組織に比してプリン代謝物が増加していることを確認し、腎細胞癌においてもプリン作動性シグナルの関与が示唆された。

(2) BHD syndrome 関連腎細胞癌29検体において全エクソンシーケンスを行った。淡明

細胞型腎細胞癌における *PBRM1* や *BAP1* の様に、共通して高頻度に変異を認めるドライバー遺伝子変異は認めなかった。しかし 29 検体中 17 検体において、様々なクロマチン再構成関連遺伝子に変異を認め、*BHD syndrome* 関連腎細胞癌の発がんにおいては、*FLCN* の機能欠損に加えてクロマチン再構成の異常が発がんに促進的に働く事が強く示唆された。

(3) *Xp11.2* 転座型腎細胞癌のヒト検体で認めた *PRCC-TFE3* 融合遺伝子の発現カセットを、マウス *Rosa26* 領域に挿入したノックインマウスを作製した。このマウスは *Cre* 組み換え酵素存在下で *PRCC-TFE3* を発現する為、腎臓尿管上皮特異的な *Cre* トランスジェニックマウス (*Cadherin16-Cre*) と交配し、表現型を解析した。*PRCC-TFE3* の発現により尿管上皮細胞の増殖亢進と尿管の拡張、腺腫形成が認められた。7 か月齢以上では高率に腎癌を発症し、転座により生じたキメラ *TFE3* が癌遺伝子として機能していることが示された。一方で *PRCC-TFE3* を発現している細胞が全て癌化するわけでは無い事より、*PRCC-TFE3* の発現は発がんには必要だが充分では無いと考えられた。ドライバー遺伝子候補として、臨床検体情報よりクロマチン再構成関連遺伝子を同定した。このクロマチン再構成関連遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを作製し、*PRCC-TFE3, Casherin16-Cre* マウスと交配を進めた。

(4) 3 種類のキメラ *TFE3(SFPQ-TFE3, PRCC-TFE3, NONO-TFE3)* と野生型 *TFE3* のドキシサイクリン発現誘導細胞株を作製し、網羅的遺伝子発現解析により、キメラ *TFE3* 及び野生型 *TFE3* の発現誘導による遺伝子発現プロファイルの変化を解析した。キメラ *TFE3* の発現誘導により、野生型 *TFE3* の発現誘導とは異なる遺伝子発現変化が観察された。さらに、クロマチン免疫沈降シーケンシングを行う事により、キメラ *TFE3* 及び野生型 *TFE3* のゲノムへの結合様式を比較検討した。キメラ *TFE3* は野生型 *TFE3* とは異なるゲノム上の分布を示す事が明らかになった。

(5) *Xp11.2* 転座型腎細胞癌マウスモデルの腎臓を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、診断マーカーの候補遺伝子を探索した。診断マーカー候補の一つである膜糖タンパク質 *GNPMB* に関して、ヒト *Xp11.2* 転座型腎細胞癌検体で免疫染色を行い、有益な診断マーカーとなり得ることを確認した。

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 27 件)

1. 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. *Journal of Bone and Mineral Research*. ; 2018, in press (査読有)

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. doi: 10.1093/hmg/ddy181. [Epub ahead of print] (査読有)
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. doi: 10.1111/pin.12684. (査読有)
4. 矢尾正祐, 蓮見壽史, 近藤慶一, 中井川昇. 遺伝性腎がん. *最新医学* 73 巻 Page398-404 (2018. 03) (総説)
5. Furuya M, Kobayashi H, Baba M, Ito T, Tanaka R, Nakatani Y. Splice-site mutation causing partial retention of intron in the *FLCN* gene in Birt-Hogg-Dubé syndrome: a case report. *BMC Med Genomics.* 2018;11:42. doi: 10.1186/s12920-018-0359-5. (査読有)
6. Tanegashima T, Yamaguchi Y, Hamanoue H, Yao M, Furuya M, Aihara M. Clinical features of Birt-Hogg-Dubé syndrome: A Japanese case with pulmonary cysts, fibrofolliculomas and renal cell carcinoma. *J Dermatol.* 2017;44:1409-1411. doi: 10.1111/1346-8138.13711. (査読有)
7. Kuroda N, Ohe C, Kato I, Furuya M, Baba M, Nagashima Y, Nakatani Y, Murakami I, Zhou M, Michal M, He O, Amin MB. Review of hereditary leiomyomatosis renal cell carcinoma with focus on clinical and pathobiological aspects of renal tumors. *Pol J Pathol.* 2017;68:284-290. doi:10.5114/pjp.2017.73920. (査読有)
8. 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.* 2017;26:354-366. doi: 10.1093/hmg/ddw392. (査読有)
9. 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;97:343-351. doi: 10.1038/labinvest. (査読有)
 10. Tomita Y, Fukasawa S, Shinohara N, Kitamura H, Oya M, Eto M, Tanabe K, Kimura G, Yonese J, Yao M, Motzer RJ, Uemura H, McHenry MB, Berghorn E, Ozono S. Nivolumab versus everolimus in advanced renal cell carcinoma: Japanese subgroup analysis from the CheckMate 025 study. *Jpn J Clin Oncol.* 2017;47:639-646. doi: 10.1093/jjco/hyx049. (査読有)
 11. Motoshima T, Komohara Y, Ma C, Dewi AK, Noguchi H, Yamada S, Nakayama T, Kitada S, Kawano Y, Takahashi W, Sugimoto M, Takeya M, Fujimoto N, Oda Y, Eto M. PD-L1 expression in papillary renal cell carcinoma. *BMC Urol.* 2017;17:8. doi:10.1186/s12894-016-0195-x. (査読有)
 12. Motoshima T, Komohara Y, Horlad H, Tsukamoto H, Fujita M, Saito Y, Tanoue K, Kasejima Y, Sugiyama Y, Kawano Y, Nishimura Y, Takeya M, Eto M. CXCL10 and CCL2 mRNA expression in monocytes is inversely correlated with the HLA-DR lower fraction of monocytes in patients with renal cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2016;11:1911-1916. (査読有)
 13. 長嶋洋治, 廣井敦子, 板垣裕子, 山本智子, 澤田達男: 病理診断の現状と展望, VII. 腎癌の検査・診断腎癌の診断 病理診断, 新腎・泌尿器癌 (上) *日本臨牀* 75 (増刊6): 198-202, 2017.
 14. 蓮見壽史, 矢尾正祐. 腎癌 腎癌の分子生物学と発癌機序 癌遺伝子・癌抑制遺伝子. *日本臨床* 75 巻増刊6 新腎・泌尿器癌 (上) Page47-52(2017.08) (総説)
 15. 江藤正俊, 腎細胞癌の新たな治療選択—免疫チェックポイント阻害薬を中心に—, *癌と化学療法* 44: 667-673, 2017
 16. 長嶋洋治, 山本彩, 中島怜子, 森田賢, 福田洋典, 高木敏男, 近藤恒徳: 腎細胞癌病理分類の変遷と WHO2016 分類の改訂点. *画像診断* 2017, 37:1427-1438.
 17. 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.* 2016;90:403-412. doi: 10.1111/cge.12807. (査読有)
 18. Kato I, Iribe Y, Nagashima Y, Kuroda N, Tanaka R, Nakatani Y, Hasumi H, Yao M, Furuya M: Fluorescence and chromogenic in situ hybridization of CEN17q may be useful for pathological diagnosis of chromophobe renal cell carcinomas associated with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Hum Pathol* 2016; 52:74-82. doi: 10.1016/j.humpath.2016.01.004. (査読有)
 19. Sawazumi T, Kato I, Tanaka M, Tanaka Y, Yamanaka S, Kuroda N, Yao M, Nagashima Y, Ohashi K. Xp11.2/TFE3 traslocation-associated renal cell carcinoma with multilocular cystic structures in an elderly patient. A case report. *Int J Clin Exp Pathol* 2016;9:3987-3998. (査読有)
 20. Yan M, Audet-Walsh É, Manteghi S, Dufour CR, Walker B, Baba M, St-Pierre J, Giguère V, Pause A. Chronic AMPK activation via loss of FLCN induces functional beige adipose tissue through PGC-1 α /ERR α . *Genes Dev.* 2016;30:1034-46. doi: 10.1101/gad.281410.116. (査読有)
 21. 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 Cells.* 2016;34:1068-82. doi: 10.1002/stem.2293. (査読有)
 22. Hasumi H, Baba M, Hasumi Y, Furuya M, Yao M. Birt-Hogg-Dubé syndrome: Clinical and molecular aspects of recently identified kidney cancer syndrome. *Int J Urol.* 2016;23:204-10. doi: 10.1111/iju.13015. (査読有)
 23. 江藤正俊, 難治性腎がんの治療., *URO-LO* 21 (4): 91-97, 2016
 24. 江藤正俊, 腎細胞癌治療における最近のトピックス., *癌と化学療法* 43 (1): 50-53, 2016
 25. 馬場理也, 腎がん発生の分子メカニズム—腎がん研究からわかってきたがんの病態基盤—. *実験医学*, 2016;34:1256-1261
 26. Hasumi H, Baba M, Hasumi Y, Lang M,

- Huang Y, Oh HF, Matsuo M, Merino MJ, Yao M, Ito Y, Furuya M, Iribe Y, Kodama T, Southon E, Tessarollo L, Nagashima K, Haines DC, Linehan WM, Schmidt LS. Folliculin-interacting proteins Fnip1 and Fnip2 play critical roles in kidney tumor suppression in cooperation with Flcn. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:E1624-31. doi: 10.1073/pnas.1419502112. (査読有)
27. 蓮見 壽史, 馬場 理也, 古屋 充子, 矢尾 正祐. Birt-Hogg-Dube (BHD) 症候群. *泌尿器外科* 28 卷 10 号 Page1607-1612 (2015. 10) (総説)

[学会発表] (計 8 件)

1. Baba M. Essential role of tumor suppressor Flcn in the regulation of cell proliferation and differentiation through metabolism, JSPS & NUS Joint 2nd symposium "New Horizons in Normal and Cancer Stem Cell Research", 2018
2. 馬場理也. 遺伝性腎癌症候群～その歴史と医学への貢献～、日本生理人類学会第 76 回大会, 2017
3. 馬場理也. Sleeping Beauty transposon mutagenesis によるマウス腎癌関連ゲノム変異の解析、第 48 回腎癌研究会, 2017
4. Baba M. Clarification of the molecular mechanism for cancer development in Xp11.2 translocation renal cell carcinoma, AACR Annual Meeting 2017, 2017
5. 馬場理也. 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
6. Baba M. Metabolic regulation of cell proliferation and differentiation by Flcn-Pgc1 α -axis, 2nd Kumamoto IRCMS International Symposium 17th Kumamoto AIDS seminar, 2016
7. Baba M. Clarification of the molecular mechanism for cancer development in Xp11.2 translocation renal cell carcinoma, The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2015
8. Baba M. Xp11.2 translocation RCC mouse model, The Sixth Birt Hogg Dubé Symposium, 2015

[図書] (計 4 件)

1. Baba M, Schmidt LS, Linehan WM. Renal Cell Carcinoma - Molecular Features and Treatment Updates, Chapter 2; Hereditary Renal Cell Carcinoma, Springer, 2017, 19-82

2. 馬場理也、江藤正俊. Year Book of RCC 2016 :がんの不均一性と進化・進展, メディカルビュー社, 2017, 19-29
3. 長嶋洋治、鬼塚裕美、澤田杏理: 3 章 腎腫瘍の概要と鑑別診断 淡明細胞型腎細胞癌, 都築豊徳、青笹克之(編) 癌診療指針のための病理診断プラクティス 腎・尿路/男性生殖器腫瘍, pp94-105, 中山書店(東京), 2016.
4. 長嶋洋治、岩本和香子: 3 章 腎腫瘍の概要と鑑別診断 集合管癌、都築豊徳、青笹克之(編) 癌診療指針のための病理診断プラクティス 腎・尿路/男性生殖器腫瘍, pp122-126, 中山書店(東京), 2016

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

江藤 正俊 (ETO, MASATOSHI)

九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 90315078

(3) 研究分担者

矢尾 正祐 (YAO, MASAHIRO)

横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 00260787

(4) 研究分担者

長嶋 洋治 (NAGASHIMA, YOJI)

東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10217995

(5) 研究分担者

古屋 充子 (FURUYA, MITSUKO)

横浜市立大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 10361445