

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08405

研究課題名(和文)腎癌悪性化に関わる新たな責任遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel genes responsible for malignant progression in renal cell cancer

研究代表者

守山 正胤 (Masatsugu, Moriyama)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：90239707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高悪性度腎細胞癌で発現が低下している遺伝子を同定し、その中からWDR20とSav1に注目してそれぞれの機能を解析した。WDR20は発現低下している腎癌細胞株に強制発現させると、増殖が抑制され、細胞死が観察されたことから、増殖や生存に関わるがん抑制遺伝子であることが分かった。腎尿細管特異的Sav1欠失マウスを作製したところ、尿細管の増殖の亢進と、核の腫大や不同性が観察された。また慢性炎症も起こっていた。これらの結果からSav1は細胞数や核のサイズ、形の決定に関わるがん抑制遺伝子であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We had identified the genes specifically down-regulated in malignant renal cell carcinomas. Among them, we focused on WDR20 and Sav1 genes and analyzed their functions in the renal cancer cells. When WDR20 gene were introduced into the cancer cells, cell growth was significantly inhibited and apoptosis was induced. Therefore, WDR20 would function as tumor suppressor gene in renal cell carcinomas.

We established a Sav1 conditional knockout mouse which lost Sav1 expression specifically in renal tubes. The mice showed hyperproliferation of renal tubes and variations in cell size and nuclear shape of the epithelium, suggesting that Sav1 is required for the maintenance of growth, nuclear size and structure of renal tubules under physiological conditions, and its deficiency leads to the acquisition of enhanced proliferation of renal epithelial cells.

研究分野：病理学

キーワード：腎細胞癌 悪性化 責任遺伝子 WDR20 Sav1

1. 研究開始当初の背景

私はこれまで腎臓明細胞癌を対象としてマイクロアレイを用いたアレイ CGH 法により、網羅的にゲノムコピー数を解析してきた。その結果、第 14 番染色体長腕 (14q) の欠失が低悪性度腫瘍が高悪性度腫瘍へと進展する際に重要であることを見いだした (J Pathol, 2007)。この知見は 14q 領域に腎癌の悪性化に関わる責任遺伝子 (がん抑制遺伝子) が存在することを示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、欠失する 14q 領域から新たな腎癌の悪性化に関わるがん抑制遺伝子を単離、同定し、その機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

14q 領域の責任遺伝子の同定

14q 領域の欠失がある腎癌細胞株とない細胞株についてマイクロアレイを用いた網羅的発現解析を施行する。両者の発現プロファイルを比較して候補遺伝子を抽出する。さらに TCGA データセットを用いて腎癌患者の予後と相関する遺伝子を絞り込む。

責任遺伝子の機能解析

14q 領域が欠失している腎癌細胞株に抽出した候補遺伝子を導入して、増殖能や浸潤能、生存能等への影響を調べ、関連するシグナルパスウェイの活性化レベルを検討する。

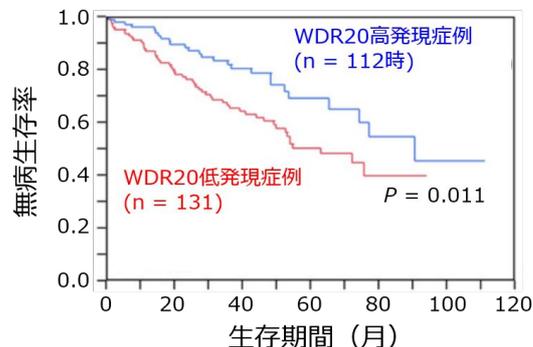
責任遺伝子 Sav1 欠失マウスを作製

腎尿細管特異的に Sav1 を欠失したコンディショナルノックアウトマウスを作製して、組織学的検索を行う。

4. 研究成果

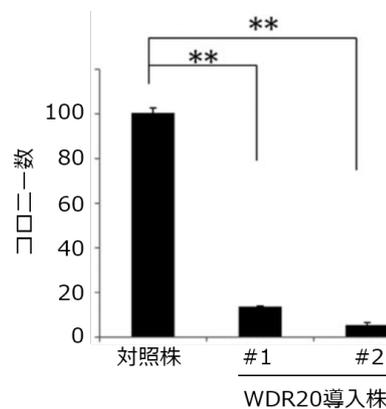
14q 領域の責任遺伝子 WDR20 の同定と機能解析

マイクロアレイを用いた網羅的発現解析の結果から 14q 領域の責任遺伝子候補として WDR20 が抽出された。さらに TCGA データセットを用いて WDR20 の発現レベルと予後との相関を調べると、WDR20 の発現が抑制されている腎癌症例は生存期間が有意に短縮することが明らかになった (下図)。



次に、14q 領域の欠失に伴う WDR20 発現低下の機能的意義の解明を試みた。14q 領域欠失により WDR20 の発現が低下している腎癌細胞

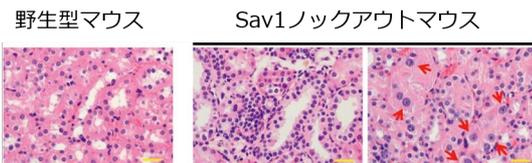
株に WDR20 を導入すると、増殖能が抑制され、アポトーシスが誘導された (下図)。



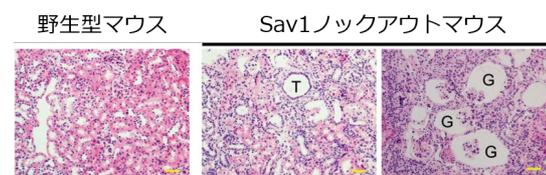
このとき ERK および AKT の活性化レベルが抑制されていたことから、腎細胞癌では WDR20 の発現低下により、ERK および AKT が活性化され、増殖能や生存能が亢進して悪性化することが分かった。本研究内容は、Cancer Science (2016, 107, 417-423) 誌に掲載された。

Sav1 ノックアウトマウスの作製とフェノタイプの観察

腎尿細管特異的 Sav1 ノックアウトマウスを作製した。野生型マウスに比べ、外表奇形や体重および腎重量の変化は見られなかった。組織学的解析により、尿細管上皮細胞の増加や重層化、核の大型化を認めた (下図)。



また、尿細管嚢胞 (下図の T) や子宮体嚢胞 (下図の G) の形成が目立った。



さらに加齢とともに近医尿細管数の減少と間質の慢性炎症所見を認めた。以上の結果から、Sav1 はネフロン構造の維持に重要な生理的機能を果たしていることが示された。また、尿細管細胞の核の大型化と大小不同性を認めたことから、Sav1 は癌細胞の増殖に加えて、高悪性度腎癌の特徴である核の腫大や異性性に関与していることが示唆された。本研究内容は、Journal of Pathology (2016, 239, 97-108) 誌に掲載された。引き続き腫瘍発生の有無等の検索を進めている。

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 14 件)

- 1: Ichimanda M, Hijiya N, Tsukamoto Y, Uchida T, Nakada C, Akagi T, Etoh T, Iha H, Inomata M, Takekawa M, Moriyama M. Downregulation of dual-specificity phosphatase 4 enhances cell proliferation and invasiveness in colorectal carcinomas. *Cancer Sci*. 2018 Jan;109(1):250-258. 査読有 doi: 10.1111/cas.13444.
- 2: Fujishima H, Fumoto S, Shibata T, Nishiki K, Tsukamoto Y, Etoh T, Moriyama M, Shiraishi N, Inomata M. A 17-molecule set as a predictor of complete response to neoadjuvant chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil in esophageal cancer. *PLoS One*. 2017 Nov 14;12(11):e0188098. 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0188098.
- 3: Yamada Y, Matsumoto S, Mori H, Takaji R, Kiyonaga M, Hijiya N, Tanoue R, Tomonari K, Tanoue S, Hongo N, Ohta M, Seike M, Inomata M, Murakami K, Moriyama M. Periportal lymphatic system on post-hepatobiliary phase Gd-EOB-DTPA-enhanced MR imaging in normal subjects and patients with chronic hepatitis C. *Abdom Radiol (NY)*. 2017 Oct;42(10):2410-2419. 査読有 doi: 10.1007/s00261-017-1155-y.
- 4: Aoyagi Y, Nasu K, Kai K, Hirakawa T, Okamoto M, Kawano Y, Abe W, Tsukamoto Y, Moriyama M, Narahara H. Decidualization Differentially Regulates microRNA Expression in Eutopic and Ectopic Endometrial Stromal Cells. *Reprod Sci*. 2017 Mar;24(3):445-455. 査読有 doi: 10.1177/1933719116657894.
- 5: Hijiya N, Shibata T, Daa T, Hamanaka R, Uchida T, Matsuura K, Tsukamoto Y, Nakada C, Iha H, Inomata M, Moriyama M. Overexpression of cannabinoid receptor 1 in esophageal squamous cell carcinoma is correlated with metastasis to lymph nodes and distant organs, and poor prognosis. *Pathol Int*. 2017 Feb;67(2):83-90. 査読有 doi: 10.1111/pin.12495.
- 6: Takaji R, Matsumoto S, Kiyonaga M, Yamada Y, Mori H, Iwashita Y, Ohta M, Inomata M, Hijiya N, Moriyama M, Takaki H, Fukuzawa K, Yonemasu H. Periportal low attenuation associated with liver metastasis from colorectal cancer: evaluation using multi-detector-row CT with pathological correlation. *Jpn J Radiol*. 2017 Jan;35(1):10-15. 査読有 doi: 10.1007/s11604-016-0592-9.
- 7: Hirashita Y, Tsukamoto Y, Yanagihara K, Fumoto S, Hijiya N, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Kodama M, Okimoto T, Daa T, Seike M, Iha H, Shirao K, Murakami K, Moriyama M. Reduced phosphorylation of ribosomal protein S6 is associated with sensitivity to MEK inhibition in gastric cancer cells. *Cancer Sci*. 2016 Dec;107(12):1919-1928. 査読有 doi: 10.1111/cas.13094.
- 8: Morishima M, Iwata E, Nakada C, Tsukamoto Y, Takanari H, Miyamoto S, Moriyama M, Ono K. Atrial Fibrillation-Mediated Upregulation of miR-30d Regulates Myocardial Electrical Remodeling of the G-Protein-Gated K(+) Channel, IK.ACh. *Circ J*. 2016 May 25;80(6):1346-55. 査読有 doi: 10.1253/circj.CJ-15-1276.
- 9: Matsumoto S, Mori H, Kiyonaga M, Yamada Y, Takaji R, Sato F, Mimata H, Hijiya N, Moriyama M, Tanoue R, Tomonari K, Matsumoto T, Hasebe T. Perirenal lymphatic systems: Evaluation using spectral presaturation with inversion recovery T2-weighted MR images with 3D volume isotropic turbo spin-echo acquisition at 3.0T. *J Magn Reson Imaging*. 2016 Oct;44(4):897-905. 査読有 doi: 10.1002/jmri.25244.
- 10: Hijiya N, Tsukamoto Y, Nakada C, Tung Nguyen L, Kai T, Matsuura K, Shibata K, Inomata M, Uchida T, Tokunaga A, Amada K, Shirao K, Yamada Y, Mori H, Takeuchi I, Seto M, Aoki M, Takekawa M, Moriyama M. Genomic Loss of DUSP4 Contributes to the Progression of Intraepithelial Neoplasm of Pancreas to Invasive Carcinoma. *Cancer Res*. 2016 May 1;76(9):2612-25. 査読有 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1846.
- 11: Kai T, Tsukamoto Y, Hijiya N, Tokunaga A, Nakada C, Uchida T, Daa T, Iha H, Takahashi M, Nomura T, Sato F, Mimata H, Ikawa M, Seto M, Matsuura K, Moriyama M. Kidney-specific knockout of Sav1 in the mouse promotes hyperproliferation of renal tubular epithelium through suppression of the Hippo pathway. *J Pathol*. 2016 May;239(1):97-108. 査読有 doi: 10.1002/path.4706.
- 12: Takahashi M, Tsukamoto Y, Kai T, Tokunaga A, Nakada C, Hijiya N, Uchida T, Daa T, Nomura T, Sato F, Mimata H, Matsuura K, Moriyama M. Downregulation of WDR20 due to loss of 14q is involved in the malignant transformation of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2016 Apr;107(4):417-23. 査読有 doi:10.1111/cas.12892.
- 13: Tsukamoto Y, Fumoto S, Noguchi T, Yanagihara K, Hirashita Y, Nakada C, Hijiya N, Uchida T, Matsuura K, Hamanaka R, Murakami K, Seto M, Inomata M, Moriyama M. Expression of DDX27 contributes to colony-forming ability of gastric cancer

cells and correlates with poor prognosis in gastric cancer. Am J Cancer Res. 2015 Sep 15;5(10):2998-3014. 査読有  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4656726/>

14: Uchida T, Miftahussurur M, Pittayanon R, Vilaichone RK, Wisedopas N, Ratanachu-Ek T, Kishida T, Moriyama M, Yamaoka Y, Mahachai V. Helicobacter pylori Infection in Thailand: A Nationwide Study of the CagA Phenotype. PLoS One. 2015 Sep 10;10(9):e0136775. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0136775.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 一万田 充洋, 泥谷 直樹, 塚本 善之, 中田 知里, 衛藤 剛, 伊波 英克, 猪股 雅史, 守山 正胤, 大腸癌における DUSP4 発現低下は増殖能・浸潤能に関与する, 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年
2. 守山 正胤, 甲斐 友喜, 松浦 恵子, 野村 威雄, 佐藤 文憲, 三股 浩光, 高橋 美香, 泌尿器がん研究の最前線 高異型度淡明腎細胞癌における Hippo シグナルの重要性, 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年
3. 清永 麻紀, 山田 康成, 松本 俊郎, 高司 亮, 森 宣, 矢田 一宏, 太田 正之, 猪股 雅史, 泥谷 直樹, 守山 正胤, 中年男性において破裂を契機に発見された膵粘液性嚢胞性腫瘍の一例, 第 53 回日本医学放射線学会秋季臨床大会, 2017 年
4. 麓 祥一, 錦 耕平, 藤島 紀, 柴田 智隆, 衛藤 剛, 白石 憲男, 守山 正胤, 猪股 雅史, From Bench to Bedside 臨床と基礎の連携研究 食道がん化学療法におけるトランスレーショナルリサーチ, 第 42 回日本外科系連合学会学術集会, 2017 年
5. 泥谷 直樹, 塚本 善之, 中田 知里, 甲斐 友喜, 松浦 恵子, 猪股 雅史, 白尾 國昭, 森 宣, 瀬戸 加大, 青木 正博, 武川 睦寛, 守山 正胤, DUSP4 の発現低下は膵上皮内癌から浸潤癌への進展に関与する, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年
6. 内田 智久, 中嶋 桃子, 友 雅司, 泥谷 直樹, 守山 正胤, 選択的血漿交換療法 エバキュア 2A を用いたサイトカイン除去, 第 37 回日本アフエリシス学会学術大会, 2016 年
7. 高橋 美香, 松浦 恵子, 甲斐 友喜, 徳永 暁憲, 佐藤 文憲, 三股 浩光, 守山 正胤, WDR20 は淡明細胞型腎細胞癌の悪性化に関与する, 第 104 回日本泌尿器科学会総会, 2016 年
8. 甲斐 友喜, 松浦 恵子, 塚本 善之, 高橋 美香, 中田 知里, 内田 智久, 泥谷 直樹, 佐藤 文憲, 守山 正胤, 三股 浩光, 腎特異的ノックアウトマウスモデルにおいて, SAV1 loss は Hippo pathway の抑制により腎尿管上皮細胞に過剰増殖をもたらす, 第 104 回日本泌尿器科学会総会, 2016 年
9. 高橋 美香, 松浦 恵子, 甲斐 友喜, 徳

永 暁憲, 佐藤 文憲, 三股 浩光, 守山 正胤, 淡明細胞型腎細胞癌(ccRCC)の悪性化に関与する遺伝子の探索, 第 103 回日本泌尿器科学会総会, 2015 年

10. 甲斐 友喜, 松浦 恵子, 泥谷 直樹, 佐藤 文憲, 小林 隆志, 守山 正胤, 三股 浩光, 腎細胞癌移植モデルにおいて SAV1 は TGF- pathway を抑制することで腫瘍増生を阻害する, 第 103 回日本泌尿器科学会総会, 2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
守山 正胤 (MORIYAMA MASATSUGU)  
大分大学・医学部・教授

研究者番号: 90239707

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号:

(4) 研究協力者  
( )