

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09674

研究課題名(和文) ヒト化マウスの泌尿器癌モデルを用いた膜結合型タンパクの機能解析と新規治療法の確立

研究課題名(英文) Analysis of transmembrane proteins activity in urological cancers using humanized SCID mouse

研究代表者

向井 尚一郎 (Mukai, Shoichiro)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：10315369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：786-0細胞をヒトHGF産生機能を持つSCIDマウス(以下HGFマウス)とcontrolマウス(通常のSCIDマウス)の皮下に移植してCDXを作成し、増殖能を比較した。その結果、HGFマウスでは有意に786-0細胞の増殖能が亢進していることが確認された。MET阻害剤とHAI-2の強制発現による786-0細胞の増殖抑制効果をin vitroで検証したところ、MET阻害剤にHAI-2の発現が加わるとより強い増殖抑制効果が確認された。次にHGFマウス皮下に786-0細胞を移植して解析した結果、前実験の結果と同様にMET阻害剤にHAI-2を併用することでより強力に増殖能を抑制することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HAI-2によるHGF/METシグナル系阻害の効果を、HGFマウスを用いた実験系で検証した。MET阻害剤とHAI-2を併用することで、より効果的に腎癌細胞の増殖を抑制することができた。実臨床においてHGFの過剰活性化がMET阻害剤耐性の一要因であることから、pro-HGFの活性化阻害に着目した本治療法は、その対策として有用である可能性が高い。また、HGFマウスとcontrolマウスでは、腎癌細胞の増殖能に明確な差がみられた。この増殖能の差は癌周囲で産生されたHGFの生理活性の違いに依存している可能性が非常に高い。ヒト腎癌細胞株のHGF依存性増殖能を正確に検証する上でHGFマウスは有用である。

研究成果の概要(英文)：A transgenic mouse model which expressed human HGF (HGF mouse) was used for in vivo analysis to accurately evaluate the HGF/MET signaling axis. Subcutaneous proliferative activity of 786-0 cells was significantly upregulated in HGF mouse compared with normal SCID mouse. In vitro analysis revealed significant downregulation of 786-0 cells proliferative activity by combined use of MET inhibitor and HAI-2. Subcutaneous proliferative activity of 786-0 cells in HGF mouse model was also downregulated by the dual inhibition (combined use of MET inhibitor and HAI-2).

研究分野：泌尿器科

キーワード：HGF MET HAI-2 ヒト化HGFマウス

1. 研究開始当初の背景

細胞外プロテアーゼ活性の異常亢進、制御機構の破綻が、発癌や癌の浸潤・転移に促進的に作用していることについて、これまでに数多くの報告がある。その中で、細胞膜上で酵素機能を発揮するタイプ（膜結合型）のセリンプロテアーゼ（type II trans membrane serine protease: TTSP）の活性が癌組織で異常亢進していることが、近年認知されつつある。癌細胞の細胞膜上に存在するマトリプテースやヘプシン、trans membrane protease serine (TMPRSS)、TMPRSS4などのTTSPは基質タンパク（増殖因子などの機能タンパクや細胞外マトリックスなど）を活性化・分解することで癌の進展に寄与していると考えられており、なかでもヘプシンはその基質である肝細胞増殖因子前駆体（pro-HGF）、マクロファージ刺激蛋白前駆体（pro-MSP）などの活性化を介して多岐にわたり癌の進展に促進的に作用すると考えられている。一方、これらTTSPのプロテアーゼ活性を制御する因子として細胞膜結合型セリンプロテアーゼインヒビターであるHGF activator inhibitor（HAI）の存在が知られており、生理的環境下では、細胞膜上で適切な活性を発揮したヘプシンは、速やかにHAIにより阻害され、エンドサイトーシスを受ける。しかしながら癌組織では、しばしばHAIの発現が低下し、ヘプシンやTTSPの活性が異常亢進することで、基質タンパクの著しい活性化をきたし、癌の浸潤・転移を促進すると考えられている。例えば、ヘプシンの基質であるpro-HGFとその特異的受容体であるMETのシグナル系機構は癌治療における重要な標的の一つであるが、HGFは主に間質細胞から非活性前駆体として分泌されヘプシンによる限定分解を受けて活性化する。しかしながらHAIの制御が破綻した環境ではHGFの活性化が亢進し、リガンド依存性のMETリン酸化の異常亢進をきたし、細胞内シグナル系を介した癌細胞の浸潤・転移能が増強される。近年MET阻害剤（チロシンキナーゼ阻害型）が開発され、実臨床で使用されているが、リガンドであるHGFの過剰発現とその活性化がMET阻害剤耐性の一要因として問題となっている。

ヒト癌細胞株のHGF依存性の生物学的活性を正確に検証する上での問題点

マウスのHGFは、ヒトのMETに作用しにくいいため、マウスを用いてHGF-METパスウェイの解析を行う際には、細胞株にヒトHGFを内因性に発現させたり、マウスにヒトHGFを直接投与したりする必要があった。そこで我々は、マウスHGF遺伝子をヒトHGF遺伝子に改変したhumanized SCIDマウス（以下HGFマウス）を作製した。このマウスを用いた癌移植モデルを作製することで、よりヒトに近い環境でのMET阻害薬やHGF活性化阻害薬の治療効果を正確に検証できる

2. 研究の目的

本研究は、腎細胞癌について、ヒト癌細胞株を用いてマウスモデル（cell line-derived xenograft: CDX）を作成し、解析するものである。解析対象は、細胞膜結合型セリンプロテアーゼ（TTSP）とその基質であるHGFを中心とした増殖因子やプロテアーゼ受容体などの機能タンパクの働きである。単独で複数のTTSPに対し阻害効果を持つ、細胞膜結合型セリンプロテアーゼ制御因子（HAI）を用いてTTSPを制御し、腎細胞癌および浸潤性膀胱癌の新規治療法を確立したい。特にTTSPの基質である増殖因子が豊富な環境では、転移巣治療における増殖因子の活性化阻害が有効ではないかと考えており、これを検証する。また、ヒトHGF産生機能を持つHGFマウスを用いた癌モデルで解析するため、ヒトの生体内により近い環境での検証が可能である。

3. 研究の方法

（1）HAI-2強制発現株を作成し、in vitroの実験系でHAI-2によるpro-HGF活性化阻害を検証する

TET-on systemを用いた恒常的HAI-2強制発現細胞株の作製

培養腎癌細胞株である786-0はHAI-1およびHAI-2の発現がdownregulateされている。この細胞株にTET-on systemを組み込んだドキシサイクリン誘導性HAI-2強制発現ベクターpCLVi(3G)-

HAI-2-Puro を遺伝子導入し、786-0-HAI2(ドキシサイクリン誘導性 HAI-2 強制発現腎癌細胞株) を作成する。

HAI-2 強制発現による pro-HGF 活性化の阻害効果を検証

786-0 細胞には pro-HGF の活性化酵素であるヘプシンが発現していることをすでに確認している。HAI-2 の強制発現により、ヘプシンの酵素活性が阻害され、pro-HGF 活性化阻害を通じて MET のリン酸化が抑制されるか検証する。

(2) HGF マウスを用いて CDX を作成し、形成されたヒト腎細胞癌における TTSP、HAI の働きを解析し、HAI による治療効果を検証する

HGF マウスと通常の SCID マウス (control マウス) における腎外細胞株の増殖能の比較

HGF マウスにおけるヒト HGF の発現状況を確認する。また HGF マウスと control マウスを用いた CDX を作成し、増殖能を比較する

in vitro の実験系における MET 阻害剤と HAI-2 発現による腎癌細胞の増殖能の阻害効果の比較

MET 阻害剤である SCC244 と cabozantinib、さらに HAI-2 の強制発現による 786-0-HAI2 細胞の増殖抑制効果を検証する (MTS アッセイ)。

in vivo の実験系における MET 阻害剤と HAI-2 発現による腎癌細胞の増殖能の阻害効果の比較

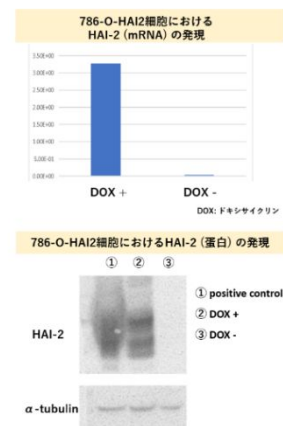
786-0-HAI2 細胞を HGF マウスに移植して CDX を作成し、増殖抑制効果を検証する。

4. 研究成果

1) HAI-2 強制発現株を作成し、*in vitro* の実験系で HAI-2 による pro-HGF 活性化阻害を検証する

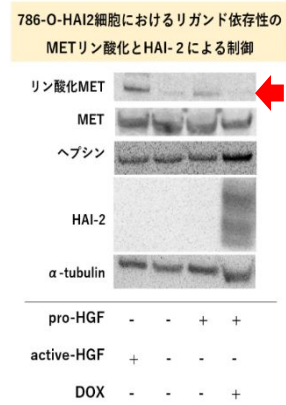
TET-on system を用いた恒常的 HAI-2 強制発現細胞株の作製

786-0 細胞株に TET-on system を組み込んだドキシサイクリン誘導性 HAI-2 強制発現ベクター pCLVi(3G)-HAI-2-Puro を遺伝子導入し、786-0-HAI2 (ドキシサイクリン誘導性 HAI-2 強制発現腎癌細胞株) を作成した。ドキシサイクリン 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を投与し、HAI-2 の発現を検証したところ、mRNA および蛋白レベルで高発現が確認された (右図)。



HAI-2 強制発現による pro-HGF 活性化の阻害効果を検証

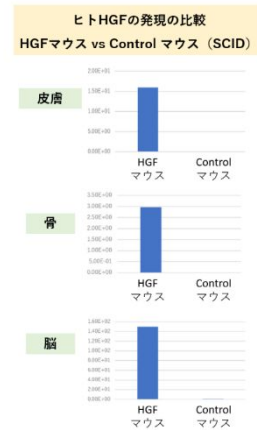
786-0-HAI2 細胞にヘプシンが発現していることを確認し、pro-HGF を添加して、HAI-2 の強制発現により pro-HGF の活性化が阻害され MET のリン酸化が抑制されるか検証したところ、HAI-2 による pro-HGF 活性化阻害を介した MET のリン酸化阻害が確認された(右上図)。左から positive control、negative control、HAI-2 発現なし、HAI-2 発現ありの順である。HAI-2 発現ありのレーンでは MET のリン酸化が抑制されている。



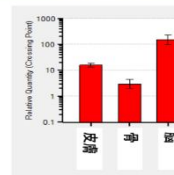
(2) HGF マウスを用いて CDX を作成し、形成されたヒト腎細胞癌における HAI の働きを解析し、HAI による治療効果を検証する

HGF マウスと通常の SCID マウス (control マウス) における腎外細胞株の増殖能の比較

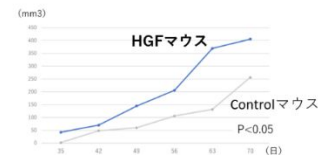
HGF マウスと control マウスにおけるヒト HGF の発現状況 (mRNA) を確認した。右図のように、HGF マウスでヒト HGF が確実に発現していることを確認した。また下図のように、HGF マウスの各臓器におけるヒト HGF の発現状況(mRNA)を確認したところ、脳、皮膚、骨の順に発現量が多いことが確認された。蛋白レベルでも同様の結果が得られた。次に、786-0 細胞を HGF マウスと control マウスの皮下に移植して CDX を作成し、増殖能を比較した(右下図)。その結果、HGF マウスでは有意に 786-0 細胞の増殖能が亢進していることが確認された。



HGFマウスにおけるヒトHGF発現臓器別の比較



皮下移植された786-0細胞の増殖能の比較
HGFマウス vs Control マウス (SCID)



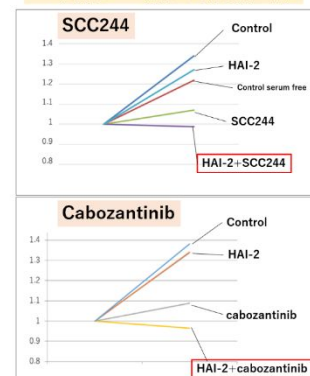
in vitro の実験系における MET 阻害剤と HAI-2 発現による腎癌細胞の増殖能の阻害効果の比較

MET 阻害剤である SCC244 と cabozantinib、さらに HAI-2 の強制発現による 786-0-HAI2 細胞の増殖抑制効果を検証した (MTS アッセイ)。右図のように、SCC244 および cabozantinib により 786-0 細胞の増殖能は抑制されたが、HAI-2 の発現単独では有意な抑制効果はみられなかった。しかしながら、MET 阻害剤に HAI-2 の発現が加わるとより強い増殖抑制効果が確認された。

HGF マウスにおける MET 阻害剤と HAI-2 発現による腎癌細胞の増殖能の阻害効果の比較

HGF マウス皮下に 786-0-HAI2 細胞を移植して CDX を作成し、MET 阻害剤 (今回は MET 単独の阻害効果を持つ SCC244 を選択) を投与、さらにドキシサイクリン誘導性に HAI-2 を発現させ、786-0-HAI2 細胞の増殖抑制効果を検析した。その結果、in vitro での結果と同様に HAI-2 単独での抑制効果は不十分であったが、MET 阻害剤に HAI-2 を併用することでより強力に腎癌細胞の増殖能を抑制することができた(次頁右図)。

786-0細胞の増殖能の比較 (in vitro)
MET阻害剤とHAI-2発現による相乗効果の検証

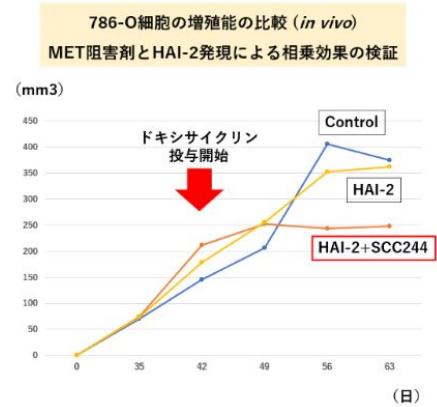


結論

今回の実験では HAI-2 によるヘプシンの酵素活性阻害を介した HGF/MET シグナル系阻害を、腎癌細胞株を用いた *in vitro* および *in vivo* の実験系で検証した。HAI-2 の発現により、MET のリン酸化は阻害されたが、HAI-2 単独での腎癌細胞の増殖能の抑制効果は *in vitro* および *in vivo* ともにやや不十分であった。しかしながら、MET 阻害剤と併用することにより、(MET 阻害剤単独療法よりも) 効果的に腎癌細胞の増殖を抑制することができた。実臨床においても HGF の過剰発現とその活性化が MET 阻害剤耐性の一要因として問題となっていることから、pro-HGF の活性化阻害に着目した本治療法は、その対策として有用である可能性が高いと考えられた。

また、HGF マウスと control マウスでは、786-0 細胞の増殖能に明確な差がみられた。この 2 種類のマウスは同系統の SCID マウスであり、明らかな違いはヒト HGF を産生するか否かのみである。したがってこの増殖能の差は癌周囲で産生された HGF の生理活性の違いに依存している可能性が非常に高い(ヒト HGFの方がヒト MET に作用しやすいと推測される)。このように、*in vivo* の実験系でヒト HGF/MET シグナル系を解析する際は、何らかの形で(本マウスのように)ヒト HGF が存在する環境を作成し検証する必要があると考えられた。本結果はマウスモデルにおいて(我々が調べ得た中では初めて)、ヒト腎癌細胞株のヒト HGF 依存性増殖能を正確に検証したものと考えられた。

今回の実験内容について論文作成中である。また、腎癌における HGF/MET シグナル系の働き、HGF/MET シグナル系を標的とした治療における pro-HGF 活性化阻害の有用性について、総説に記載した。



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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shoichiro Mukai	4. 巻 21
2. 論文標題 Dysregulation of TypeII Transmembrane Serine Proteases and Ligand-Dependent Activation of MET in Urological Cancers.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21082663.	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	賀本 敏行 (Kamoto Toshiyuki) (00281098)	宮崎大学・医学部・教授 (17601)	
研究分担者	片岡 寛章 (Kataoka Hroaki) (10214321)	宮崎大学・医学部・教授 (17601)	
研究分担者	藤井 将人 (Fujii Masato) (10794373)	宮崎大学・医学部・助教 (17601)	
研究分担者	寺田 直樹 (Terada Naoki) (60636637)	宮崎大学・医学部・准教授 (17601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	永井 崇敬 (Nagai Takahiro) (60739994)	宮崎大学・医学部・助教 (17601)	

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