

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590415

研究課題名(和文) Hippoパスウェイの腎癌悪性化に関わるメカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of Hippo pathway in RCC malignant transformation

研究代表者

松浦 恵子 (MATSUURA, KEIKO)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：00291542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：淡明細胞性腎癌の悪性化に関わることが報告されたSAV1遺伝子は、Hippoパスウェイのコンポーネントのひとつであるが、腎癌細胞株において増殖能を抑制した。またヒト腎癌症例でもSAV1の発現が抑制された症例はYAP1が核に集積していた。さらにSAV1を強制発現させた腎癌安定発現株をマウスに移植したところ、コントロールに比べて腫瘍サイズが有意に小さかった。パスウェイ解析により、これらの腫瘍ではTGFβパスウェイが抑制されていた。以上よりSAV1を含むHippoパスウェイは腫瘍抑制性に働き、SAV1の発現低下はTGFβパスウェイを介して淡明細胞性腎癌の悪性化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：SAV1, a component of the Hippo pathway, has been reported to be involved in malignant transformation of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). In this study, we found that re-expression of SAV1 inhibited RCC cell proliferation in vitro. In addition, immunohistochemistry frequently demonstrated nuclear localization of YAP1 in ccRCC cases with SAV1. Furthermore, tumors injected with SAV1 stable cell lines showed a decrease of tumor size and growth rate, compared with those of control. Pathway analysis revealed that TGFβ signaling was found to be inhibited in tumors with SAV1 stable cell lines. Based on these data, it is suggested that Hippo pathway including SAV1 acts as tumor suppressor, and downregulation of SAV1 is implicated in malignant formation in ccRCC through TGFβ signaling.

研究分野：医歯薬学

キーワード：泌尿生殖器・内分泌 腎癌 Hippoパスウェイ SAV1

1. 研究開始当初の背景

腎臓明細胞癌 (clear cell renal cell carcinoma: ccRCC) の悪性度を規定する因子としては、stage(癌の広がり)と並んでgrade (組織学的核異型度) が重要であることはよく知られており、gradeは3段階(本邦の腎癌取り扱い規約)もしくは4段階(WHO分類)に分類され、high grade (WHO分類では3ならびに4)はlow grade (WHO分類では1ならびに2)よりも明らかに予後不良である。したがって、high grade 群とlow grade群では異なるゲノム異常の存在が想定された。

これまで我々はそのような観点からccRCCのゲノムプロファイルをアレイCGH法を用いてゲノムワイドに解析してきた。これまでの解析で、ccRCCでしばしば観察された5q, 7q, 16pのgain(増幅)、3p, 4q, 8p, 9q, 14qのloss(欠失)のうちで、最も高頻度(80%以上)に検出される3p lossはlow gradeとhigh grade間で検出頻度に差を認めなかったが、14q lossはlow gradeよりもhigh gradeで有意に高頻度に検出される($p < 0.05$)ことを発見した。つまり、14q lossはhigh grade ccRCCに特徴的なゲノム異常であり、14q loss領域に存在してlossによって発現低下する遺伝子の中にはhigh grade ccRCCの病態に関わる癌抑制遺伝子が含まれる可能性が示唆された。さらに、14q lossを有する症例では例外なく3p lossが検出されることから、14q lossは3p lossの後に加わったゲノム異常であると推測された(J. Pathol., Yoshimoto, Matsuura et al., 2007)。私は、その後これらの知見にもとづいて14q loss領域に存在すると考えられる癌抑制遺伝子の単離を試みてきた。

まず、腎癌細胞株8種類のアレイCGH解析とトランスクリプトーム解析を行い、14q lossによって発現低下する遺伝子を抽出したところ、SAV1遺伝子のコピー数減少によって遺伝子発現が有意に低下することを見出した。さらに重要なことに、調べた8つの腎

癌細胞株中の1株において、14q22.1に位置するSAV1遺伝子が homozygous loss していることを見いだした(BMC cancer, Matsuura et al., 2011)。SAV1蛋白質はHippoパスウェイと呼ばれる細胞増殖の促進とアポトーシスの抑制をもたらすシグナル伝達経路のコア・コンポーネントの一つであることが知られている。つまり、SAV1を含むHippoパスウェイの異常を解析し腎癌の悪性化に関わるメカニズムを解明することが、腎癌の新しい治療法の開発につながることを期待される。

2. 研究の目的

本研究では、

(1) SAV1の発現低下を認めた腎癌細胞にSAV1遺伝子を遺伝子導入することで、SAV1発現低下の腎癌細胞の増殖抑制や細胞死誘導能への影響を解析する。

(2) 逆にSAV1が発現低下していない腎癌細胞におけるSAV1発現をshRNAを用いて強制的に発現抑制させ、SAV1の機能を確認する。

(3) SAV1以外のHippoシグナル分子が他の臓器癌で発現低下、細胞内局在異常がみられ、癌抑制遺伝子として機能しているとの報告があることから、腎癌においてSAV1以外のHippoシグナル分子の発現や細胞内局在の発現を詳細に解析して、SAV1を含むHippoパスウェイ全体が腎癌の発症と悪性化に関わる可能性を明らかにする。

以上の研究により、high grade腎癌において高頻度に検出されるSAV1の発現低下が腎癌細胞の増殖やアポトーシス制御に関わるか否か、つまりSAV1遺伝子が腎癌の新しい癌抑制遺伝子であるか否かを解明する。さらにHippoパスウェイが腎癌の悪性化に関わるメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) SAV1遺伝子の組み換えレンチウイルスの作製と機能解析

SAV1 遺伝子の cDNA を Gateway system (Invitrogen) によりレンチウイルスベクター pLenti7.3/V5-DEST (Invitrogen) に組み込み、pLenti7.3/V5-SAV1 プラスミドを作製・生成する。empty vector をコントロールとする。

プラスミドを ViraPower Packaging Mix (Invitrogen) とともに、Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて HEK293T 細胞にトランスフェクションする。

48 時間後、細胞上清を採取・精製し、超遠心 (24,000rpm 4hr) によって濃縮し組み換えウイルスとする。

作製した組み換えウイルスを遺伝子の発現低下している腎癌細胞株に、適切な感染比のもと Polybrene とともに導入して一過性発現させ、細胞増殖能を測定する (MTS assay)。またアポトーシス活性 (caspase3 活性) を ELISA system で測定する。

SAV1 遺伝子をウイルスベクター pLenti6.3/V5-DEST (Invitrogen) に組み込み、(1) - と同様に組み換えウイルスを作製し、SAV1 発現の低い腎癌細胞株に導入する。抗生物質 blasticidin (Invitrogen) で選択し stable clone を複数単離する。Empty vector から作製した clone をコントロールとする。

(2) 腎癌細胞株における Hippo パスウェイの活性化の検討

SAV1 の発現低下している細胞株と、それに SAV1 を導入した細胞株、および SAV1 の発現低下していない細胞株から各々タンパク質を回収する。

Hippo パスウェイシグナル分子 MST1/2, LATS1/2, YAP と各々のリン酸化タンパク質に反応する抗体を用いてウエスタン法でリン酸化状態の変化を確認する。

の各抗体を用いて、細胞の蛍光免疫染色を行ない、それぞれのタンパク質の発現

を確認するとともに、SAV1 の発現によって転写制御因子 YAP のリン酸化と核移行が影響されるか否か (細胞内局在の確認) についてレーザー共焦点顕微鏡 LSM710 (Zeiss 社) で解析する。

腎癌細胞株を 6 well plate で培養し、pGL4.35 (9xUAS Gal4 すると GAL4-TEAD を Lipofectamine2000 を用いて cotransfection する。lysate を採取し、Dual-luciferase Reporter Assay kit (Promega) により luciferase reporter assay を行う。Renilla luciferase reporter pRL-CMV plasmid (Promega) で normalize する。

(3) 腎癌症例における Hippo パスウェイの活性化の検討

腎癌のパラフィンブロックを用いて、SAV1 を含む Hippo パスウェイコンポーネントに対する抗体で免疫染色を行ない、それぞれのタンパク質の発現と YAP の細胞内局在 (核への移行) を調べる。

の結果と、それぞれの腎癌症例の grade との相関を調べることによって、Hippo パスウェイの不活性化 (コンポーネントのタンパク質発現低下や YAP の核局在) が high grade 腎癌に特徴的であるかどうかを検討する。

(4) SAV1 遺伝子導入腎癌細胞の SCID mouse への移植モデルによる増殖並びに転移能の解析

前述の (1) で得られた clone を SCID mouse の皮下あるいは腎被膜下に移植して、腫瘍の増殖 (大きさ、浸潤、転移) についてコントロールと比較することにより、SAV1 遺伝子が実際にマウスの生体内でも腫瘍増殖の抑制に関わっているかを解析する。

(5) トランスクリプトーム解析とパスウェイ解析によるターゲットの同定

SAV1の発現低下している細胞株と、それに SAV1 を導入した細胞株、および SAV1 の発現低下していない細胞株と、それに SAV1 siRNA (Invitrogen) を導入した細胞株から各々RNA (RNeasy: Quiagen 社) を回収する。バイオアナライザー(Agilent 社)により RNA の質を確認後、Quick Amp Labeling kit, 4x44K Whole Human Genome array 及び Oligo Hybridization Kit (全て Agilent 社)を用いて cRNA を合成・ラベリング後ハイブリダイズする。洗浄後、DNA マイクロアレイスキャナー (Agilent 社)によりアレイ上の蛍光シグナルを検出し、数値化したのち、Gene Spring GX software により解析する。

トランスクリプトーム解析によって、遺伝子導入した細胞に有意に発現変動を認める遺伝子を抽出する。

抽出された遺伝子を IPA (Ingenuity Pathway Analysis) を用いてパスウェイ解析し、遺伝子発現変動により有意に変化するパスウェイの同定を行う。

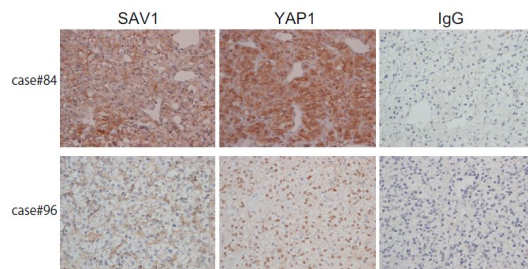
4. 研究成果

(1) SAV1 遺伝子の組み換えレンチウイルスの作製と機能解析を行った。empty vector をコントロールとして、SAV1 遺伝子腎癌細胞株に遺伝子導入し、細胞増殖能あるいはアポトーシスを測定したところ、SAV1を導入した細胞株では増殖能が抑制され、アポトーシスが亢進した。逆にsav1 siRNAでノックダウンした細胞では増殖能が亢進し、アポトーシスが抑制された。

遺伝子導入した細胞株からタンパク質を回収し、ウエスタン法でHippo パスウェイシグナル分子LATS1/2, YAPのリン酸化状態の変化を確認すると、SAV1を導入した細胞株ではLATS1/2のリン酸化が亢進し、YAPのリン酸化も亢進した。

(2) 腎癌症例のパラフィン切片を免疫染色

し、SAV1の低下した症例(例:下図Case96)ではYAPは核に染まるが、逆にSAV1が低下していない症例(例:下図Case84)ではYAPが細胞質に染まることがわかり、統計学的に有意であった。以上のことから、SAV1の発現がYAPの核移行やシグナル伝達にin vitro、ヒト腎癌症例で関わっていることが証明できた。



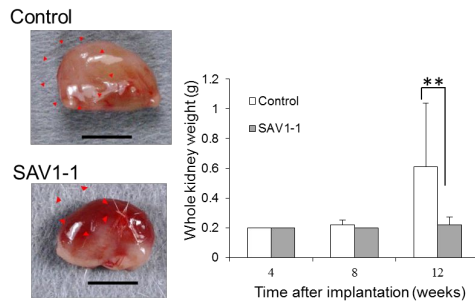
(3) ヒト腎癌症例で 75 例のパラフィンブロックを、抗 SAV1 抗体および抗 YAP1 抗体で免疫染色し、SAV1 の発現が抑制された症例は YAP1 が核に集積し、それは悪性度の高い症例で認められる傾向であることを見出した。

		nuclear grade		
		low	high	total
YAP1	Cytoplasmic pattern*	15	22	37
	Nuclear pattern**	7	31	38
total		22	53	75
		Fisher's exact test $p = 0.0445$		

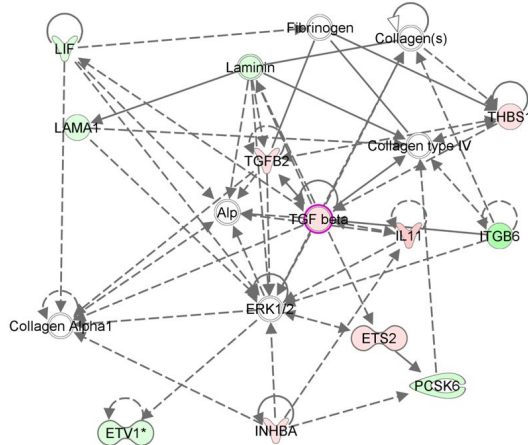
*Cytoplasmic pattern; YAP1 is mainly localized in cytoplasm of tumor
**Nuclear pattern; YAP1 is mainly localized in nucleus of tumor cells

(4) SAV1 を強制発現させた腎癌細胞株の安定発現株を樹立し、下流のシグナルの状態を YAP のリン酸化状態をウエスタンプロットで調べると、SAV1-1, SAV1-2 は control と比較して YAP のリン酸化が増加した。また、YAP1 を coactivator とする TEAD の転写活性をリポーターアッセイで調べたところ、TEAD3 のリポーター活性は SAV1-1 で control 細胞に比べて有意に低かった。

(5) これらの細胞株を SCID mouse に移植したところ、12 週目で移植した腫瘍の大きさを比較すると、SAV1-1 は control に比べて有意に腫瘍サイズが小さかった。このことから SAV1 遺伝子はマウスの生体内でも腫瘍増殖の抑制に関わっていることがわかった。



(6) マウスへの移植モデルの腫瘍から抽出した RNA を用いて、増殖抑制のメカニズムを検討した。具体的には、control を移植した腫瘍と、SAV1-1 を移植した腫瘍とで、発現している遺伝子にどのような違いがあるかを調べるために、各々の腫瘍から抽出した RNA を用いて expression array を行った。SAV1 発現細胞株を移植した腫瘍で有意に変動した遺伝子を抽出しパスウェイ解析したところ、TGF パスウェイが有意に変動していることがわかった。そこで腫瘍より抽出したタンパク質を用いて Western blot 法により TGF パスウェイを構成する分子の発現を調べたところ、SAV1 発現細胞株を移植した腫瘍では TGF パスウェイが抑制されていることがわかった。これらの解析により、SAV1 が vivo において少なくとも一部では TGF パスウェイを介して腫瘍の増殖を抑制していることが示唆された (論文準備中)。



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9件)

Narimatsu T, *Matsuura K, Nakada C, Tsukamoto Y, Hijiya N, Kai T, Inoue T, Uchida T, Nomura T, Sato F, Seto M, Takeuchi I, Mimata H, *Moriyama M. Downregulation of NDUFB6 due to 9p24.1-p13.3 loss is implicated in metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Medicine*, Jan;4(1):112-24, 2015, 査読有

Matsuura K, Inoue T, Kai T, Yano S, Kashima K, Yokoyama S, Sato F, Nomura T, Mimata H, Moriyama M, Kuroda N, Nagashima Y. Molecular analysis of a case of renal cell carcinoma with t(6;11)(p21;q12) reveals a link to a lysosome-like structure. *Histopathology*, 64(2), p306-309, 2014, 査読有

Ohe C, Kuroda N, Matsuura K, Kai T, Moriyama M, Sugiguchi S, Terahata S, Hosaka N, Hes O, Michal M, Matsuda T, Uemura Y. Chromophobe renal cell carcinoma with neuroendocrine differentiation/morphology: A clinicopathological and genetic study of three cases. *Hum Pathol*, 1, p31-39, 2014, 査読有

Hirai K, Nomura T, Yamasaki M, Inoue T, Narimatsu T, Chisato Nakada PD, Yoshiyuki Tsukamoto PD, Matsuura K, Sato F, Moriyama M, Mimata H. The Vav3 oncogene enhances the malignant potential of prostate cancer cells under chronic hypoxia. *Urol Oncol*, 32(2), p101-109, 2014, 査読有

Kuroda N, Ohe C, Kawakami F, Mikami S, Furuya M, Matsuura K, Moriyama M, Nagashima Y, Zhou M, Petersson F, López JI, Hes O, Michal M, Amin MB. Clear cell papillary renal cell carcinoma: a review. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(11), p7312-7318, 2014, 査読有

Kuroda N, Tanaka A, Sasaki N, Ishihara A, Matsuura K, Moriyama M, Nagashima Y, Inoue K, Petersson F, Martignoni G, Michal M, Hes O. Review of renal carcinoma with t(6;11)(p21;q12-13) with focus on clinical and pathobiological aspects. *Histol Histopathol*, 28(6), p685-690, 2013, 査読有

Matsuo M, Nakada C, Tsukamoto Y, Noguchi T, Uchida T, Hijiya N, Matsuura K, Moriyama M. MiR-29c is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell proliferation by targeting RCC2. **Mol Cancer**, 12(1):15, 2013, 査読有

Nomura T, Yamasaki M, Hirai K, Inoue T, Sato R, Matsuura K, Moriyama M, Sato F, Mimata H. Targeting the Vav3 oncogene enhances docetaxel-induced apoptosis through the inhibition of androgen receptor phosphorylation in LNCaP prostate cancer cells under chronic hypoxia. **Mol Cancer**, 8(12):27, 2013, 査読有

Yoshioka S, Tsukamoto Y, Hijiya N, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Takeuchi I, Seto M, Kawano K, *Moriyama M. Genomic profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. **PLoS One**, 8(2):e56165, 2013, 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

甲斐友喜, 松浦恵子, 中田千里, 塚本善之, 泥谷直樹, 佐藤文憲, 小林隆志, 守山正胤, 三股浩光
ヒト腎細胞癌移植モデルマウスにおいて SAV1 遺伝子は腫瘍増殖を抑制する
第 73 回日本癌学会
2014 年 9 月 27 日 神奈川県横浜市

甲斐友喜, 松浦恵子, 泥谷直樹, 守山正胤, 三股浩光
腎細胞癌移植モデルにおいて SAV1 遺伝子は腫瘍増殖を抑制する
第 102 回 日本泌尿器科学会総会
2014 年 4 月 24 日 兵庫県神戸市

甲斐友喜, 松浦恵子, 泥谷直樹 佐藤文憲 守山正胤, 三股浩光
ヒト腎細胞癌移植モデルマウスにおいて SAV1 遺伝子は腫瘍増殖を抑制する
第 23 回泌尿器科分子・細胞研究会
2014 年 3 月 15 日 山形県山形市

甲斐友喜, 松浦恵子, 泥谷直樹, 守山正胤, 三股浩光
ヒト腎細胞癌移植モデルマウスにおける癌抑制遺伝子候補 SAV1 遺伝子の抗腫瘍効果の検討
第 101 回日本泌尿器科学会
2013 年 4 月 27 日 北海道札幌市

成松隆弘, 松浦恵子, 泥谷直樹, 中田知里, 井上享, 野村威雄, 竹内一郎, 瀬戸加太, 佐藤文憲, 守山正胤, 三股浩光

腎臓明細胞癌の転移に関わるゲノム異常の蓄積

第 101 回日本泌尿器科学会
2013 年 4 月 27 日 北海道札幌市

井上享, 松浦恵子, 長嶋洋治, 野村威雄, 佐藤文憲, 守山正胤, 三股浩光
Mucinous tubular and spindle cell carcinoma(MTSCC)の網羅的ゲノム異常解析
第 101 回日本泌尿器科学会
2013 年 4 月 26 日 北海道札幌市

Inoue T, Matsuura K, Nakata C, Nomura T, Sato F, Nagashima Y, Ohyama C, Habuchi T, Tomita Y, Takahashi S, Ogawa O, Nonomura N, Matsubara A, Nakagawa M, Moriyama M, Mimata H
Identification of unique genomic profiles of collecting duct carcinoma
2012 AUA Annual Meeting
2012 年 5 月 20 日 Atlanta USA

松浦恵子, 中田知里, 成松隆弘, 塚本善之, 野村威雄, 佐藤文憲, 三股浩光, 瀬戸加太, 守山正胤
腎細胞癌の悪性化に関わる Hippo パスウェイの異常
第 101 回日本病理学会総会
2012 年 4 月 27 日 東京都新宿区

成松隆弘, 松浦恵子, 泥谷直樹, 中田知里, 井上享, 野村威雄, 竹内一郎, 瀬戸加太, 佐藤文憲, 守山正胤, 三股浩光
網羅的ゲノム解析による腎癌転移関連遺伝子の同定と解析
第 100 回日本泌尿器科学会総会
2012 年 4 月 22 日 神奈川県横浜市

井上享, 松浦恵子, 長嶋洋治, 成松隆弘, 野村威雄, 佐藤文憲, 守山正胤, 三股浩光
集合管癌の網羅的ゲノム異常解析
第 100 回日本泌尿器科学会総会
2012 年 4 月 22 日 神奈川県横浜市

〔図書〕(計 1 件)

松浦恵子, 守山正胤
文光堂 2013 11 16 第 1 版 第 1 刷
腫瘍病理鑑別診断アトラス 腎癌
(長嶋洋二・黒田直人・松寄理 編集)
IV 特殊検査法(分子生物学的手法)
p27-p35

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 恵子 (MATSUURA KEIKO)
大分大学 医学部 分子病理学 准教授
研究者番号: 00291542

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者