

平成30年 5月14日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06836

研究課題名(和文) 転写制御異常による稀少がん発症・進展の分子機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms underlying development and progression of rare cancers caused by alteration of transcriptional regulation

研究代表者

門松 毅 (Kadomatsu, Tsuyoshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：90555757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、稀少がんの病態発症・進展の分子機構を転写制御機構の変容の観点から検討した。Xp11.2転座型腎細胞がんでは、原因遺伝子であるTFE3融合遺伝子によるANGPTL2の発現誘導が、その病態発症・進展に寄与している可能性が示唆された。骨肉腫では、原発巣内の微小環境変化により、骨肉腫細胞におけるTET2依存的DNA脱メチル化を介してIL-6発現が上昇し、IL-6シグナルによって骨肉腫細胞での接着分子の発現や代謝リプログラミングが亢進することで、肺転移が促進されることを解明した。さらに、骨肉腫細胞におけるIL-6シグナル抑制が肺転移に対する新規治療戦略となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the molecular mechanisms underlying development and progression of rare cancers from the point of view of alteration of transcriptional regulatory mechanisms. We found that TFE3 fusion gene, which is a causative gene for Xp11.2 translocation renal cell carcinoma, increases the ANGPTL2 expression and that TFE3 fusion gene-mediated ANGPTL2 induction could be implicated in development and progression of Xp11.2 translocation renal cell carcinoma. In addition, we showed that changes in tumor microenvironments in the primary tumor tissue increase the IL-6 expression in osteosarcoma cells through TET2-mediated DNA demethylation and that IL-6 signaling accelerates lung metastasis by enhancing the expression of an adhesion molecule and metabolic reprogramming in osteosarcoma cells. Moreover, our current results suggested that inhibition of IL-6 signaling in osteosarcoma cells could be a novel therapeutic approach for lung metastasis in osteosarcoma.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：稀少がん 転写制御 がん微小環境

1. 研究開始当初の背景

がんは世界規模で増加の一途をたどっており、がんの罹患率、死亡率の増加は社会的な問題となっている。肺がん、胃がん、大腸がん、子宮がん、乳がんといった主要ながんについては、その発症・進展の分子機構解明や診断法および治療法の開発が精力的に進められてきた。しかし、稀少がんについては、患者数が少ないことから病態メカニズムの解明、診断法や治療法の研究開発が進みにくい状況にあり、主要ながんに比べ対策が非常に遅れている。近年、このような稀少がん対策における状況を改善する必要性が強く認識されてきている。

我々は、これまでに ANGPTL ファミリー分子の1つである ANGPTL2 が、慢性炎症を基盤病態とする様々な疾患の発症・進展に関与する炎症関連因子であることを明らかにしてきた。慢性炎症は発がんやがんの進展・転移にも関与しており、我々は正常組織における ANGPTL2 の持続的な発現増加が発がんに関与することを明らかにした。さらに、がん細胞においては腫瘍微小環境の変化により ANGPTL2 発現が誘導され、がん細胞から分泌された ANGPTL2 がオートクリンまたはパラクリン的に作用し、がん細胞の遊走能や浸潤能、腫瘍血管新生を促進することで、高い転移能を示すことを明らかにした。さらに、我々は、低酸素や低栄養などの腫瘍微小環境により骨肉腫細胞における ANGPTL2 プロモーター領域の DNA 脱メチル化が誘導され、ANGPTL2 発現が誘導されることで、骨肉腫細胞が高い転移能を獲得することを明らかにした。

Xp11.2 転座型腎細胞がんは、小児や若年者に発症する予後不良な稀少がんである。その原因遺伝子として、Xp11.2 の転座によって生じる basic helix-loop-helix leucine zipper 型転写因子である TFE3 の融合遺伝子が同定されている。これまでに 5 種類の TFE3 関連融合遺伝子が同定されており、そのうちの 1 つは胞巣状軟部肉腫の原因遺伝子としても報告されている。いずれの TFE3 関連融合遺伝子からも恒常活性型の TFE3 融合タンパク質が生じ、これが常に核内に留まることで TFE3 標的遺伝子の転写を持続的に活性化していると考えられる。しかし、TFE3 関連融合遺伝子による稀少がんの発症・進展の分子機構については明らかとなっていない。

2. 研究の目的

最近、Xp11.2 転座型腎細胞がんや胞巣状軟部肉腫の原因遺伝子である TFE3 融合遺伝子によって発現誘導される遺伝子群と胞巣状軟部肉腫細胞において発現が亢進している遺伝子群に共通した遺伝子に ANGPTL2 が含まれることが報告された。持続的な ANGPTL2 の発現上昇は、慢性炎症を惹起し、発がんやがんの浸潤・転移の促進に繋がることから、TFE3 関連融合タンパク質による ANGPTL2 の持続的な発現上昇が、Xp11.2 転座型腎細胞がん

や胞巣状軟部肉腫の発症・進展の分子基盤となっていることも考えられる。

TFE3 融合遺伝子による ANGPTL2 発現誘導機構、ANGPTL2 発現と Xp11.2 転座型腎細胞がんの発症率や病態進展との関連解明、および十分に解明されていない腫瘍微小環境による骨肉腫細胞での DNA 脱メチル化を介した転移活性化機構を明らかにし、これら稀少がんの発症・進展の分子機構解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) TFE3 融合遺伝子による ANGPTL2 発現誘導機構を明らかにするため、ヒト ANGPTL2 の転写開始点上流約 3kbp の領域を含む ANGPTL2 レポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行い、TFE3 融合タンパク質による ANGPTL2 発現誘導に関わる転写制御領域を検討した。さらに、クロマチン免疫沈降法を用いて、TFE3 融合タンパク質と ANGPTL2 プロモーター領域との結合を評価した。

(2) ANGPTL2 発現と Xp11.2 転座型腎細胞がんの発症率や病態進展との関連を解明するため、TFE3 融合遺伝子を尿細管上皮細胞特異的に持続的に高発現する Xp11.2 転座型腎細胞がんモデルマウスを作製し、その病態進展と ANGPTL2 発現との関連を検討した。

(3) 腫瘍微小環境による骨肉腫細胞での DNA 脱メチル化を介した転移活性化機構を明らかにするため、ヒト骨肉腫細胞株 (SaOS2) と同細胞を免疫不全マウスに移植し、肺転移したがん細胞を再培養することで樹立した肺転移株 (SaOS2-LM) を用いて qPCR アレイによる網羅的遺伝子発現解析、DNA メチル化解析、細胞代謝解析、シグナル解析を行なった。さらに、SaOS2 および SaOS2-LM 細胞を尾静脈より免疫不全マウスに投与し、肺組織でのがん細胞の生着能を検討した。また、DNA 脱メチル化酵素である TET2 をノックダウンした SaOS2 細胞を移植し、DNA メチル化レベルを検討するとともに、肺転移能を評価した。さらに、SaOS2 細胞を移植したマウスに治療標的分子に対する中和抗体を投与し、肺転移や生存期間を評価した。

4. 研究成果

(1) ヒト尿細管上皮細胞株を用いて、ヒト ANGPTL2 レポーターアッセイを行ったところ、コントロールに比べ TFE3 融合遺伝子を過剰発現させた場合、ANGPTL2 レポーター活性の有意な上昇を認めた。そこで、転写開始点上流部分を段階的に短くした ANGPTL2 レポータープラスミドを複数作製し、同様に解析を行ったところ、TFE3 融合タンパク質が結合すると考えられる制御領域を見出した。また、同制御領域に変異を導入したレポータープラスミドでは TFE3 融合遺伝子によるレポーターの活性化が認められなかった。そこで、ANGPTL2 転写開始点上流に存在する同制御領域に TFE3 融合タンパク質が結合するかクロマチン免疫沈降法を用いて解析を行ったと

ころ、同制御領域への TFE3 融合タンパク質の結合が確認された。これらの結果から、TFE3 融合タンパク質は、本件研究において ANGPTL2 転写開始点上流で同定された制御領域への結合を介して、ANGPTL2 の発現を誘導していることが明らかとなった。

(2) TFE3 融合遺伝子を尿細管上皮細胞特異的に持続的に高発現する Xp11.2 転座型腎細胞がんモデルマウスを作製した。このマウスでは、30 週齢までに腎腫大、尿細管上皮細胞の異常増殖、腎線維化を認め、淡明細胞がんや乳頭状腎細胞がんタイプのがん細胞が出現するなど、Xp11.2 転座型腎細胞がん患者と同様の症状を示すことを明らかにした。さらに、コントロールマウスとがんを発症したモデルマウスの腎臓組織における ANGPTL2 発現をウエスタンブロット解析にて検討したところ、モデルマウスにおける ANGPTL2 発現の上昇が認められた。以上の結果から、TFE3 融合遺伝子による ANGPTL2 発現誘導が、Xp11.2 転座型腎細胞がんの発症・進展との連関が示唆された。

(3) ヒト骨肉腫細胞株 (SaOS2) と同細胞を免疫不全マウスに移植し、肺転移したがん細胞を再培養することで樹立した肺転移株 (SaOS2-LM) を用いて qPCR アレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、以前我々が報告した ANGPTL2 に加え、IL-6 の発現が SaOS2-LM 細胞において著明に上昇していることを見出した。また、SaOS2 細胞を低酸素環境で培養した場合も ANGPTL2 と IL-6 の発現が誘導された。これらの結果から、ANGPTL2 と同様に IL-6 も骨肉腫細胞の転移を促進している可能性が考えられた。以前我々は、腫瘍微小環境により ANGPTL2 プロモーター領域の DNA 脱メチル化がその発現誘導に関わっていることを明らかにした。そこで、IL-6 プロモーター領域の DNA メチル化レベルを検討したところ、SaOS2 細胞に比べ、SaOS2-LM 細胞や免疫不全マウスに移植した SaOS2 細胞においてそのメチル化レベルが有意に低下していた。次に、IL-6 プロモーター領域の DNA 脱メチル化機構について検討するため、DNA 脱メチル化酵素である TET ファミリーの発現を SaOS2 細胞において検討したところ、TET2 が豊富に発現し、その発現が低酸素刺激によって増加したことから、TET2 をノックダウンした SaOS2 細胞を樹立し、低酸素環境における IL-6 の発現誘導、IL-6 プロモーターの DNA 脱メチル化、同細胞の肺転移能について解析した。その結果、TET2 ノックダウンによって、低酸素環境における IL-6 の発現誘導、DNA 脱メチル化が有意に抑制された。さらに、TET2 ノックダウン細胞を免疫不全マウスに移植した場合、原発巣のサイズに差を認めないが、肺転移が有意に抑制されたことから、TET2 を介した脱メチル化による ANGPTL2 や IL-6 といった遺伝子発現誘導が骨肉腫の肺転移促進に寄与していることが示唆された。

骨肉腫細胞の転移促進機構における IL-6 の機能について検討を行うため、SaOS2 または SaOS2-LM 細胞を尾静脈より免疫不全マウスに投与し、肺組織でのがん細胞の生着能を検討した。その結果、移植後 7 週目では SaOS2 細胞は生着していないのに対し、SaOS2-LM 細胞は肺への生着が認められた。さらに、我々は、SaOS2 細胞に比べ SaOS2-LM 細胞では接着分子 ICAM-1 が高発現していること、ICAM-1 の発現が IL-6 によって促進されていることを見出した。実際、SaOS2-LM 細胞における IL-6 のノックダウンは ICAM-1 の発現低下および肺への生着能低下が認められた。また、SaOS2 細胞と SaOS2-LM 細胞の細胞代謝を解析したところ、SaOS2 細胞に比べ SaOS2-LM 細胞では解糖系代謝が亢進していることを見出した。さらに、SaOS2-LM 細胞では解糖系遺伝子発現の制御に関わる HIF-1 α タンパク質レベルが亢進しており、IL-6 による ERK シグナル活性化が HIF-1 α タンパク質レベル増加に寄与していることが明らかとなった。実際、IL-6 受容体に対する中和抗体や ERK 活性化に関わる MEK の阻害剤で SaOS2-LM 細胞を処理した場合、HIF-1 α タンパク質レベル、解糖系遺伝子発現レベルおよび解糖系代謝の低下が認められた。以上より、IL-6 は ICAM-1 発現誘導による肺組織への生着や MEK-ERK-HIF-1 α 経路を介した解糖系代謝亢進による骨肉腫の転移促進に寄与していることが明らかとなった。

以上の結果より、IL-6 シグナルの抑制が骨肉腫の肺転移に対する新規治療戦略となる可能性が示唆された。そこで、SaOS2 細胞を移植した免疫不全マウスに IL-6 受容体に対する中和抗体を投与し、その効果を検討したところ、コントロール抗体を投与したマウスと比べ原発巣のサイズに差を認めないが、肺転移が有意に抑制され、その生存期間も有意に延長した。

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 2 件)

- ① Itoh H, Kadomatsu T, Tanoue H, Yugami M, Miyata K, Endo M, Morinaga J, Kobayashi E, Miyamoto T, Kurahashi R, Terada K, Mizuta H, Oike Y. TET2-dependent IL-6 induction mediated by the tumor microenvironment promotes tumor metastasis in osteosarcoma. *Oncogene* 2018, in press
DOI: 10.1038/s41388-018-0160-0
査読有
- ② Oike Y, Kadomatsu T, Endo M. The role of ANGPTL2-induced chronic inflammation in lifestyle diseases

and cancer. Inflamm. Regen. 35, 2015,
193-202
DOI: 10.2492/inflammregen.35.193
査読有

〔学会発表〕(計 3件)

- ① 門松 毅、Role of angiopoietin-like protein 2 in tumor development and metastasis、「新規バイオ医薬ピロール・イミダゾール (PI) ポリアミドの創薬開発国際シンポジウム」平成 28 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム、2017 年 2 月 24 日、日本大学桜門会館 (東京都)
- ② 門松 毅、伊藤 仁、尾池 雄一、がん微小環境変化による組織恒常性維持機構の活性化とがん病態進展の分子機構、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ③ 門松 毅、尾池 雄一、生活習慣病・がんの共通分子機構と SASP としてのアンジオポエチン様因子 2 シグナル、BMB 2015 (第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会)、2015 年 12 月 3 日、神戸ポートピアホテル (神戸市)

〔図書〕(計 5件)

- ① 門松 毅、尾池 雄一、メディカルレビュー社、日本抗加齢学会誌 アンチ・エイジング医学 特集:免疫老化とアンチエイジング 4、2017、13、38-43
- ② 門松 毅、尾池 雄一、メディカルレビュー社、Pharma Medica 特集:摂食調節機構とその破綻に伴う疾患群、2016、34、43-47
- ③ 門松 毅、尾池 雄一、メディカルレビュー社、血管医学 特集:臓器の記憶と血管代謝ニッシュ、2015、16、21-28
- ④ 門松 毅、尾池 雄一、羊土社、膨大なデータを徹底整理する サイトカイン・増殖因子キーワード事典、2015、420、287-289
- ⑤ 門松 毅、尾池 雄一、北隆館、別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患「慢性炎症制御による加齢関連疾患治療の展望」、2015、170、103-109

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kumamoto-u-molgen.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門松 毅 (KADOMATSU, Tsuyoshi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 90555757

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

遠藤 元誉 (ENDO, Motoyoshi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 40398243

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