

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14610

研究課題名(和文)膵臓がん形成における(プロ)レニン受容体の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of (pro)renin receptor in the genesis of pancreatic cancer

研究代表者

柴山 弓季 (Shibayama, Yuki)

香川大学・医学部・博士研究員

研究者番号：90401190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、(プロ)レニン受容体[(P)RR]が膵臓癌形成に関与するかを明らかにすることである。ヒト正常膵管上皮細胞を用いて(P)RRを強制発現させると全ゲノムレベルにわたる体細胞突然変異数の増大および染色体再編成を生じることが判明した。また、(P)RR過剰発現細胞集団を免疫不全マウスの腎被膜に移植すると悪性腫瘍の生物学的特性である異型細胞の集積および核の異型性を持つ組織が形成された。さらに(P)RR過剰発現は、DNA複製および修復といったゲノムの安定性に関わるパスウェイの破綻を導くことにより、大規模なゲノム不安定性をもたらすことが判明した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate whether (pro)renin receptor [(P)RR] is involved in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Human whole-genome analysis revealed that aberrant (P)RR expression induced massive chromosomal rearrangements and enhanced the total number of somatic mutations at the global level in human pancreatic ductal epithelial (HPDE) cells, which are capable of transforming into PDAC. (P)RR-expressing HPDE cell population engrafted into the renal subcapsules of immunodeficient mice showed the biological characters of malignant tumour such as atypical cells including abnormal nuclear shapes. (P)RR overexpression also resulted in the failure of genomic stability pathways such as DNA replication, DNA repair and telomere maintenance. In conclusion, our findings demonstrate that aberrant (P)RR expression induces genomic instability by the disorder of genomic stability pathways.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：(プロ)レニン受容体 膵臓がん ゲノム不安定性

1. 研究開始当初の背景

(1)組織傷害に深く関わっているレニン・アンジオテンシン系(RAS)の新規構成因子として、レニンとその前駆物質であるプロレニンが結合する(プロ)レニン受容体(以下、(P)RR)が同定された(J. Clin. Invest., 2002)。その後、(P)RRがRASの活性化を介して心腎疾患などに関与していることが報告されてきた。これに対して申請者らは、(P)RRがWnt/ β -cateninシグナル経路を介して膵臓がんの進展に寄与することを報告した(Sci. Rep., 2015)。

(2)Wnt/ β -cateninシグナル経路が膵臓がんそのものの形成に關与する事実が判明したことや(Cancer Res, 2013)、(P)RR発現の亢進が核異型性の出現(PanIN-2)と同調性を示したことから(Sci. Rep., 2015)、膵臓がんでは普遍的に見られる(P)RR発現の亢進は、膵臓がんの進展だけにとどまらず、ゲノムの恒常性を破綻させ、がん形成そのものに大きく關与する可能性を考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

(1)膵臓がんに形質転換するヒト膵管上皮細胞に(P)RRを強制発現させることによって、ゲノム異常の実態を明らかにする。

(2)(P)RR過剰発現ヒト膵管上皮細胞の悪性化の指標となる足場非依存性増殖能および*in vivo*レベルにおける表現型を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)膵臓がんに形質転換するヒト膵管上皮細胞に対して全長(P)RRに加え、(P)RRはfurinによりシェディングされ(Hypertension, 2009)、細胞質内でN端側およびC端側がそれぞれフラグメント化することから、N-terminal fragment (NTF)およびC-terminal fragment (CTF)のコンストラクトをそれぞれ作製したのち、遺伝子導入を行う。これら3種類の細胞におけるヒトゲノム比較解析を実施する。

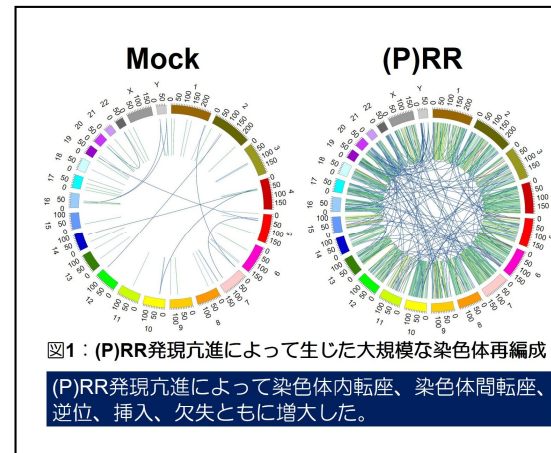
(2)表現型の検討として、(P)RR過剰発現細胞において悪性化への形質転換の指標となる【足場非依存性増殖能】の評価および(P)RR過剰発現細胞のヌードマウスにおける【腫瘍形成能】の把握、さらに(P)RRトランスジェニックマウスで【がんの自然発症率】の評価を実施する。

4. 研究成果

(1)膵臓がんの形質転換するヒト膵管上皮細胞に対して、エピソームベクターを用いて

(P)RRをコードする遺伝子ATP6ap2のストップコドンを除いたコーディングシーケンス領域(1,050 bp)のサブクローニングを実施し、(P)RR過剰発現ヒト膵管上皮細胞を樹立した。さらに、(P)RRの各ドメインの機能解析を実施するために、NTFとCTFの欠失突然変異体を作製した。ヒト正常膵管上皮細胞にそれぞれのコンストラクトを導入し、安定発現細胞株を樹立した。

(2)全長(P)RR過剰発現細胞においてゲノム不安定性の有無を確かめるために、HiSeq2500を用いたヒト全ゲノム解析を実施した。コントロールベクターを導入した細胞と比較して、Bcftool(Bioinformatics, 2009)による変異コールの解析により、ゲノム全体で約2倍の体細胞突然変異量の増大を認めた(コントロール:124,579;(P)RR:239,080;但し、dbSNPに登録されている多型を除いた点突然変異・挿入・欠失)。また、全長(P)RR過剰発現細胞では、エクソン領域における体細胞突然変異数が約2.9倍量増加した。さら



に BreakDancer(Nature methods, 2009)による染色体構造解析から、転座や逆位といった大規模な染色体構造変異が全ゲノムレベルで認められた(図1)。

(3)(P)RRトランスジェニックマウスは、がんの自然発症が認められなかったため、(P)RR過剰発現細胞集団のスフェロイドを5週齢オスのBALB/c免疫不全マウス(nu+/nu+)の腎被膜に移植し、癌組織の形成の有無を検討した。コントロール細胞では組織の形成が認められなかった一方で、(P)RR過剰発現細胞集団は腎被膜移植下で組織の形成が認められた(図2)。(P)RR過剰発現細胞集団で構成された組織の病理学的解析から、悪性腫瘍の特性である異型細胞の集積および核の異型性(図2)テロメアの機能不全によって生じるBFB(切断・融合・架橋;PNAS, 2001)が認められた。このことから(P)RR発現の亢進は、膵臓癌形成に必須の分子メカニズムであることが判明した。

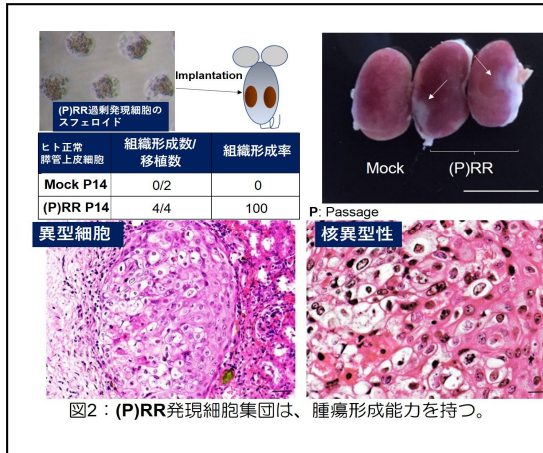


図2: (P)RR発現細胞集団は、腫瘍形成能力を持つ。

(4) (P)RR 過剰発現によって生じるゲノム不安定性の分子メカニズムを明らかにするために、(P)RR の細胞質ドメインが局在する核ラミナおよびクロマチン結合タンパクから構成される難溶性核分画を用いて、nanoscale liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) を実施した。クロマチンに局在を持つ、もしくは DNA 結合タンパクのうち、コントロールおよび (P)RR 過剰発現細胞間で統計的有意差を持つペプチドを用いた分子パスウェイ解析から、(P)RR 過剰発現は、DNA 複製、DNA 修復およびテロメア維持に関わるパスウェイの機能不全をもたらした(図3)。

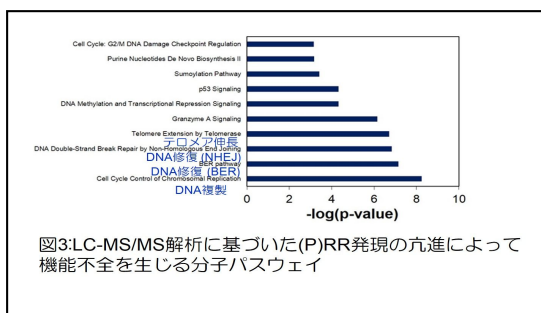


図3: LC-MS/MS解析に基づいた(P)RR発現の亢進によって機能不全を生じる分子パスウェイ

また、全長(P)RR, NTF と CTF の欠失突然変異体を用いて、DNA 修復能力を評価するコメントアッセイおよび DNA 複製ストレスを評価する DNA ファイバーアッセイを実施した。全長(P)RR を導入した細胞および NTF を導入した細胞で DNA 修復および DNA 複製能力の低下(図4)を認めた。つまり、(P)RR の C 末端断片がゲノムの安定性に寄与しているこ

とが判明した。さらに、全長(P)RR の遺伝子導入によって、膵臓がんの初期の遺伝的変化として知られている (Nature Reviews Cancer, 2002) テロメア長が約 22% 短小化する事実も認めた。

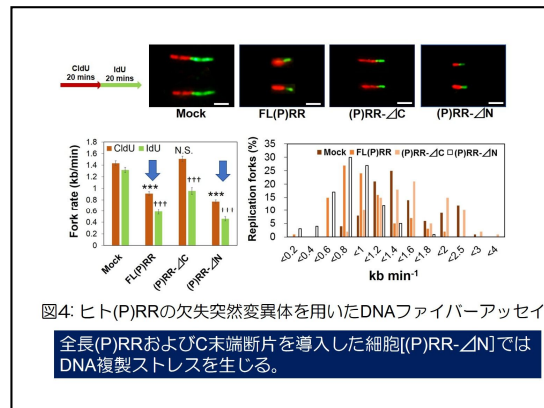


図4: ヒト(P)RRの欠失突然変異体を用いたDNAファイバーアッセイ。全長(P)RRおよびC末端断片を導入した細胞[(P)RR-ΔN]ではDNA複製ストレスを生じる。

(5) ゲノム安定性に関わる複数のパスウェイの破綻を導くことによって、大規模なゲノム不安定性を生じることが考えられた。つまり、(P)RR の C 末端側は、“genomic organizer” としての機能を持つことが明らかになった。

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 4 件)

1. Wang J., Shibayama Y., Kobori H., Liu Y., Kobara H., Masaki T., Wang Z. and Nishiyama, A. (2017) High glucose augments angiotensinogen in human renal proximal tubular cells through hepatocyte nuclear factor-5. *Plos one* 12:e0185600.doi:10.1371/journal.pone.0185600.【査読有】
2. Kouchi, M., Shibayama, Y., Ogawa, D., Miyake, K., Nishiyama, A. and Tamiya, T. (2017) Letter to the Editor. Expression of tissue (pro)renin receptor and concentrations of its soluble form in CSF in adult diffuse gliomas response. *J.Neurosurg.* 127:962-964. doi:10.3171/2017.2. JNS17254.【査読有】
3. Hasan, A., Kittikulsuth, W., Yamaguchi, F., Ansary, T., Rahman, A., Shibayama, Y., Nakano, D., Hitomi, H., Tokuda, M. and Nishiyama A.

(2017) IBMX protects human proximal tubular epithelial cells from hypoxic stress through suppressing hypoxia-inducible factor-1α expression. *Exp. Cell Res.* 58 :343-351. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.07.007. 【査読有】

4. Kouchi, M., **Shibayama, Y.**, Ogawa, D., Miyake, K., Nishiyama, A. and Tamiya, T. (2017) (Pro)renin receptor is crucial for glioma development via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J. Neurosurg.* 127: 819-828. doi: 10.3171/2016.9.JNS16431. 【査読有】

〔学会発表〕(計 12 件)

(2017 年 国内学会)

1. 西山 成、谷内田真一、**柴山弓季** (2017) 膵臓癌治療の新たなアプローチ 第 76 回日本癌学会学術総会【招待講演】

2. **柴山弓季**、安田 純、谷内田真一、西山成(2017)(プロ)レニン受容体発現の亢進は、ヒト膵管上皮細胞のゲノム不安定性を生じる 第 76 回日本癌学会学術総会

3. **柴山弓季**、西山 成 (2017) (プロ)レニン受容体発現の増大によって生じるゲノム不安定性の分子メカニズム 生命科学系学会合同年次大会 (ConsBio2017)

4. 西山 成、**柴山弓季**、小堀浩幸、Wang, J. (2017) 高血糖はヒト近位尿細管のアンジオテンシノーゲンの発現を hepatocyte nuclear factor-5 を介して亢進する 第 90 回日本薬理学会年会

5. Wang, J., **Shibayama, Y.**, Nishiyama, A. (Pro)renin receptor promotes colorectal cancer through Wnt/ β -catenin pathway despite of constructive mutations (2017) 第 40 回日本高血圧学会総会

(2017 年 国際学会)

6. **Shibayama, Y.**, Yasuda, J., Yamazaki, D., Rahman, A., Yachida, S. and Nishiyama, A. (2017) Aberration of (pro)renin receptor induces genomic instability in human pancreatic ductal

epithelial cells. American Association for Cancer Research Annual Meeting.

(2016 年 国内学会)

7. 西山 成、**柴山弓季**、Wang Juan (2016) 大腸がんの病態における(プロ)レニン受容体の関与 第 53 回日本臨床分子医学会学術集会

8. 河内雅章、**柴山弓季**、小川大輔、三宅啓介、西山 成、田宮 隆 (2016) 神経膠腫における Wnt/ β -catenin を介した (pro) renin receptor の発現と役割 第 17 回日本分子脳神経外科学会

9. **柴山弓季**、谷内田真一、西山 成 (2016) 膵臓がんにおける(プロ)レニン受容体と Wnt/ β -catenin 経路を介した腫瘍進展 第 75 回日本癌学会学術総会

10. **柴山弓季**、安田 純、西山 成 (2016) (プロ)レニン受容体過剰発現で生じるヒト膵管上皮細胞のゲノム不安定性 第 39 回日本分子生物学会

(2016 年 国際学会)

11. **Shibayama, Y.**, Yachida, S., Rahman, A. and Nishiyama, A. (2016) (Pro)renin receptor is pivotal for Wnt/ β -catenin-dependent genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. Japan Pancreas Society (JPS) & International Association of Pancreatology (IAP) symposium 7 “Basic research on carcinogenesis” 【招待講演】

12. Wang, J., **Shibayama, Y.**, Nakano, D. Hitomi, H. and Nishiyama, A. (2016) Role of (Pro)renin receptor in the activation of Wnt/ β -catenin pathway in colon cancer. HYPERTENSION SEOUL. 26th Scientific Meeting of the ISH.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

柴山 弓季 (SHIBAYAMA, Yuki)
香川大学・医学部・博士研究員
研究者番号：90401190

(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

西山 成 (NISHIYAMA, Akira)

安田 純 (YASUDA, Jun)

谷内田 真一 (YACHIDA Shinichi)

清元 秀泰 (KIYOMOTO, Hideyasu)

正木 勉 (MASAKI, Tsutomu)

湯澤 由紀夫 (YUZAWA, Yukio)

高井 真司 (TAKAI, Shinji)

高橋 和男 (TAKAHASHI, Kazuo)

山口 央輝 (YAMAGUCHI, Hisateru)

藤沢 良秀 (FUJISAWA, Yoshihide)

山崎 大輔 (YAMAZAKI, Daisuke)

Asadur RAHMAN

藤森 隆行 (FUJIMORI, Takayuki)