

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17501
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2022
課題番号：18K07070
研究課題名(和文) Hippoパスウェイをターゲットとした腎癌悪性化モデルマウスの作製と治療応用

研究課題名(英文) Generation of mouse models of renal cancer malignant transformation targeting Hippo pathway and therapeutic application

研究代表者
松浦 恵子 (Matsuura, Keiko)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00291542
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、腎癌の発症と悪性化を模倣するモデルを作製する目的で、腎臓でHippoパスウェイの構成分子SAV1と、癌抑制遺伝子VHL遺伝子がノックアウトされるマウスを作成した。SAV1ホモノックアウトマウスは腎重量の低下と腎機能障害を伴い生後すぐに死亡した。組織学的に異型を伴う腎嚢胞の形成が見られYAPの活性化を伴っていた。VHLホモノックアウトマウスの腎嚢胞とは組織学的に異なっていた。SAV1とVHLのダブルノックアウトマウスも生後すぐに死亡した。いずれも腎癌の発症には至らなかったが、Hippoパスウェイの不活化による異型腎嚢胞発症モデルマウスが作成できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
腎癌の発症と悪性化を模倣するモデルを作製し、新たな治療法の開発を目指した。腎発生異常をきたしたため、癌の発症には至らなかったが、新たに腎臓の正常発生にSAV1が関わっていることを証明できた。また異型を伴う腎嚢胞を形成するモデルマウスの作成ができたことから、異型を伴う腎嚢胞が持つ病態を解析する礎となる研究としての意義を持つと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, with the aim of creating a model that mimics the development and malignant transformation of renal cancer, I generated mice in which the Hippo pathway component SAV1 and the tumor suppressor gene VHL gene were knocked out in the kidney. SAV1 homo-knockout mouse died soon after birth with reduced kidney weight and renal dysfunction. Histologically, these mice showed renal cyst formation with atypia, accompanied by activation of YAP. These renal cysts were histologically distinct from those in VHL homo-knockout mice. SAV1 and VHL double homo-knockout mice also died shortly after birth. Although none of these mice developed renal cancer, a mouse model for the development of atypical renal cysts was generated by inactivation of the Hippo pathway.

研究分野：実験病理学

キーワード：Hippoパスウェイ ノックアウトマウス 腎癌

1. 研究開始当初の背景

腎淡明細胞癌(clear cell renal cell carcinoma: ccRCC)は組織学的核異型によって高悪性度群(G1, G2)と低悪性度群(G3, G4)に分類され、高悪性度群は低悪性度群よりも明らかに予後不良である。したがって、高悪性度群と低悪性度群では異なるゲノム異常の存在が想定される。これまで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、最も高頻度(80%以上)に検出される3p lossは低悪性度と高悪性度間で検出頻度に差を認めなかったが、14q lossは低悪性度よりも高悪性度で有意に高頻度に検出される($p < 0.05$)ことを発見した(J Pathol., Yoshimoto et al., 2007)。つまり、3p lossは低悪性度 ccRCC発症に必須であり、それに14q lossが付加されることが高悪性度 ccRCCへの悪性化に重要であることが強く示唆された。したがって、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高悪性度 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、これらの知見にもとづいて14q loss領域を探索して、がん抑制遺伝子SAV1遺伝子を同定した(BMC cancer, Matsuura et al., 2011)。SAV1遺伝子はHippoパスウェイのcore componentである。我々はSAV1遺伝子の腎特異的ノックアウトマウスを作成し、個体レベルでSAV1遺伝子の発現低下がどのように腎細胞癌の発癌や悪性化に関わるかを調べた。SAV1遺伝子が欠失ただけでは腎細胞癌は発症しなかったが、腎重量の減少と嚢胞形成、尿細管細胞数の増加、核異型が認められた(J Pathol., Kai et al., 2016)。一方これまで、3pに存在するVHL遺伝子の遺伝子変異やメチル化による不活性化がHIF1の恒常的活性化をもたらし、その下流のVGEF, PDGFの活性化がccRCCの発癌に重要であると報告されてきた(Clark et al., Kid Int, 2009)。しかし、VHLの腎特異的ノックアウトマウスでは、腎嚢胞は形成されるが細胞異型等は認められていない。VHL + BAP1あるいはVHL + p53遺伝子のノックアウトマウスでは腎癌が認められるが(Albers et al., EMBO Mol Med, 2013)、ヒト症例において腎癌では他の固形癌と異なりp53の遺伝子異常を示す症例は少ないこと、さらに腎癌悪性化には3p lossでなく14q lossが必要であることから、ノックアウトマウスで欠失させた遺伝子は、必ずしもヒトで認められる高悪性度 ccRCCの遺伝子異常と一致していない。

実際のccRCC症例に見られる遺伝子異常を持つモデルマウスの作成こそが、予後不良な高悪性度 ccRCCのメカニズムの解明と治療の開発に必須なのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、ccRCCの発症と悪性化を忠実に模倣するモデルを作製する目的で、腎臓だけで癌抑制遺伝子VHLとSAV1の遺伝子が両方ノックアウトされるマウスを作成する。さらに遺伝子欠失の時期が生後数週間たってから起きる誘導性のノックアウトマウスとする。癌の進行・進展の過程を忠実に再現できるモデルマウスの作製により、腎癌の発生から悪性化に至るメカニズムを解明するだけでなく、Hippoパスウェイをターゲットとした治療の有効性を証明することにより、真に予後不良な高悪性度腎癌の治療標的を明確にし、モデルマウスを用いた治療法の評価系を構築することを目指す。

3. 研究の方法

(1) ノックアウトマウスの作成

SAV1を腎臓のみで欠失させるマウスを作成するため、SAV1(fl/fl)と腎尿細管プロモーター下にCreが発現するマウス(Six2-Cre(+/-))を交配させ、*Sav1*ノックアウトマウス(SAV1^{-/-})を樹立した。同様にVHL(fl/fl)とSix2-Cre(+/-)を交配させ、尿細管特異的にVHL遺伝子ノックアウトマウス(VHL^{-/-})を樹立した。さらにVHL, SAV1遺伝子のダブルノックアウトマウス3種類(SAV1^{-/-};VHL^{+/-})(SAV1^{+/-};VHL^{+/-})(SAV1^{+/-};VHL^{-/-})を樹立した。ダブルヘテロノックアウトマウス(SAV1^{+/-};VHL^{+/-})も同様に樹立した。

(2) ノックアウトマウスの表現型の解析

生存率、体重、腎重量、腎機能(BUN, creatinineを測定)を解析した。

組織学的腎形態(とくに腎嚢胞や腎癌の発生)および免疫組織化学的解析を行った。蛍光免疫染色は、レーザー共焦点顕微鏡にて観察した(Zeiss, LSM710)。使用抗体はAQP1, AQP2, NCC, YAP1, SAV1, Ki67である。

4. 研究成果

(1) マウスの生存率、体重・腎重量・腎肉眼所見および腎機能

腎特異的ホモノックアウトマウス $SAV1^{-/-}$ は生後 8 週までに全例死亡した。そこで、生後 5 週までに限定して解析したところ、体重は生後 3 週から、腎重量は生後 1 週からコントロールやヘテロノックアウトマウス ($SAV1^{+/-}$) と比較して有意に低下していた (図 1)。 $SAV1^{-/-}$ の腎臓は小さく白色調を示した (図 1)。

腎機能はコントロールと比較し、腎機能障害 (BUN, creatin(CRE)の上昇) が有意に認められた (図 2)。

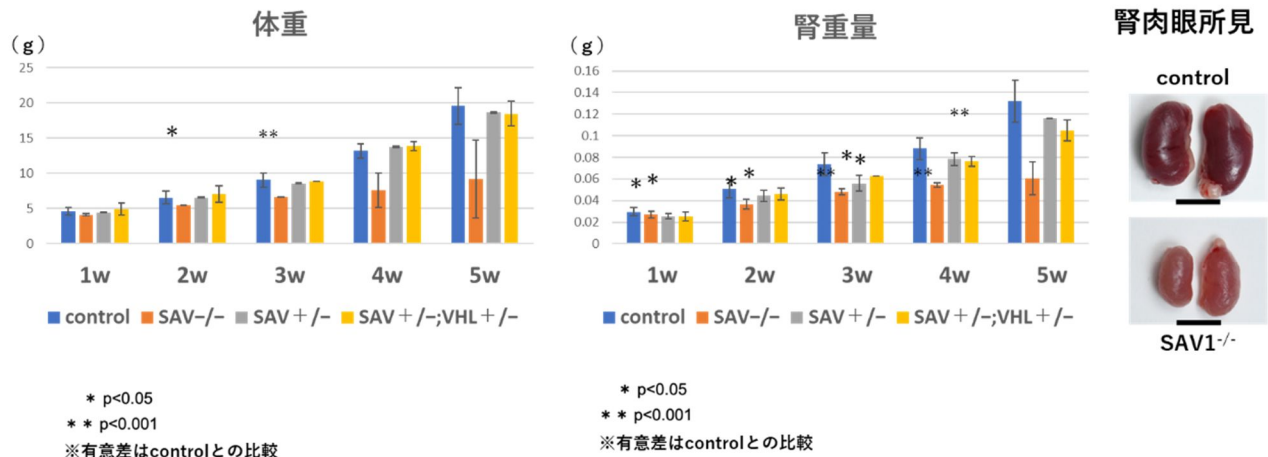


図 1 週別(1w~5w)の体重・腎重量・肉眼所見

$SAV1$ ヘテロノックアウトマウス ($SAV1^{+/-}$) は生存率はコントロールマウスと差はなく、体重減少は見られないが、腎重量はやや低下し、腎機能の軽度の障害が見られた (図 2)。

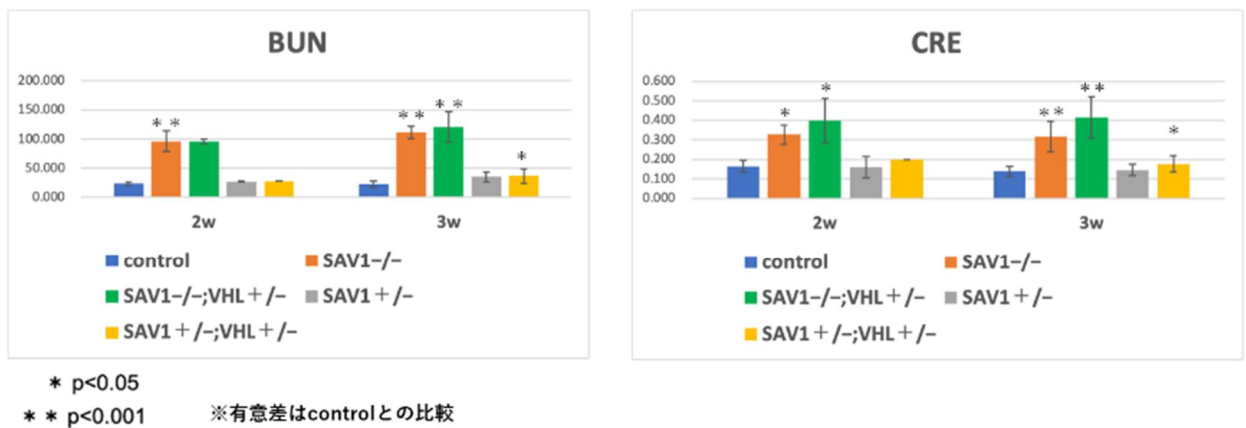


図 2 週別(2w, 3w)の腎機能検査

$VHL^{-/-}$ は、生後 19 週までに全例死亡し、体重、腎重量ともに低下していたが、 $SAV1^{-/-}$ マウスよりその低下はやや軽度だった。

ダブルノックアウトマウス 3 種類 ($SAV1^{-/-};VHL^{-/-}$) ($SAV1^{-/-};VHL^{+/-}$) ($SAV1^{+/-};VHL^{-/-}$) はいずれも出生数が少なく、また生まれても 5~8 週までには死亡した。いずれも体重・腎重量の減少、あるいは腎機能障害単独のノックアウトマウスである $SAV1^{-/-}$ あるいは $VHL^{-/-}$ と比較すると強かった。ダブルヘテロノックアウトマウス ($SAV1^{+/-};VHL^{+/-}$) は長期に生存した。体重や腎重量はコントロールと有意差はなかったが、腎機能はやや低下していた。(図 1, 2)

(2) 組織学的および免疫組織学的解析

$SAV1^{-/-}$ の腎臓は生後すぐ (0 週) から尿細管の拡張が見られ、生後 1 週からは嚢胞となり、以降嚢胞サイズが増大した。生後 3 週以降には核の位置が不規則となり、極性の乱れが見られた (図 3)。しかし腎癌の形成はみられなかった。誘導性 $SAV1^{-/-}$ でも尿細管の拡張が一部で確認されたが腎癌の発症には至らなかった。

免疫組織学的解析により、近位尿細管のマーカである AQP1 では、生後 0 週からコントロールと比較すると陽性が減少していた(図 4)。また SAV1^{-/-}の腎臓では YAP1 の核への移行が見られ(図 5)、Ki-67 染色陽性細胞が多かった。

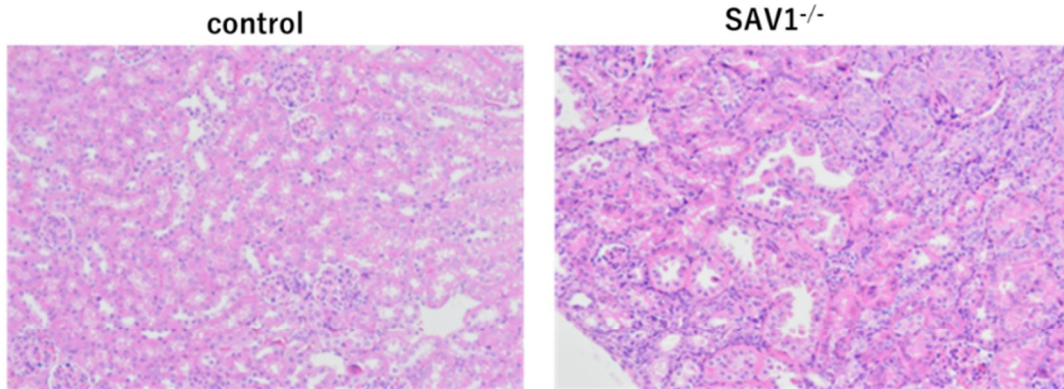


図 3 マウス腎臓(生後4週)の腎組織学的解析(HE染色 x40)

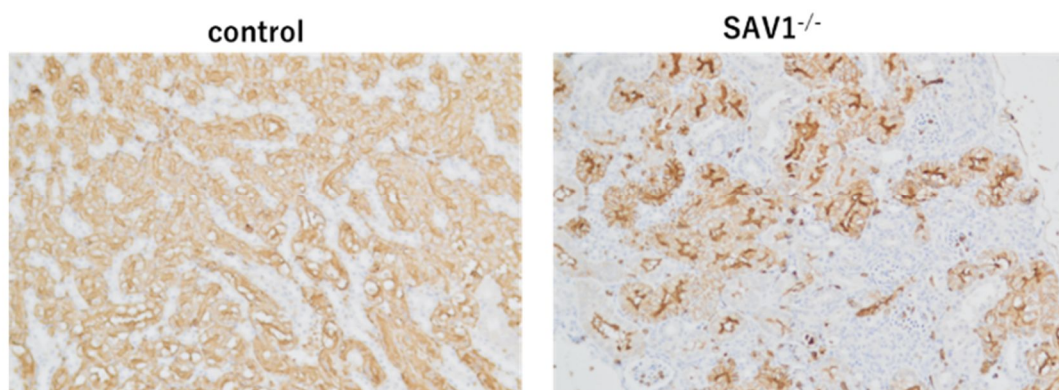


図 4 AQP1 (腎近位尿細管マーカー) の免疫組織化学染色(x40)

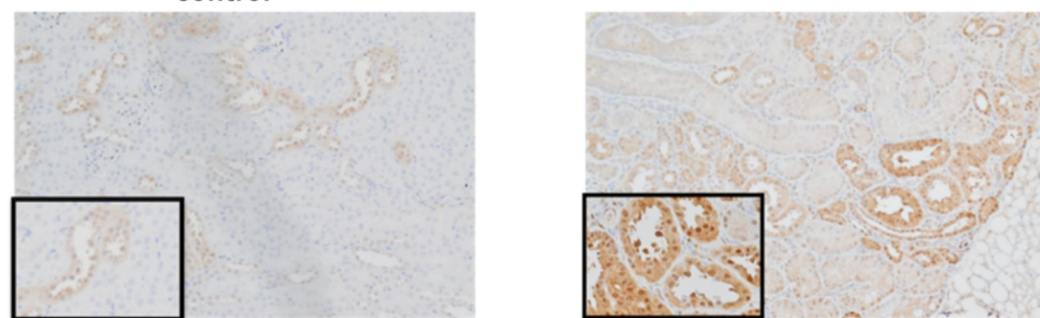


図 5 YAP1の免疫組織化学染色(x40, 四角の中はx100)

VHL^{-/-}は生後 5 週には嚢胞が認められたが、嚢胞内に突出する構造異型や核異型はみられなかった。また生後すぐには嚢胞は明らかではなかった。(図 6)。免疫組織化学的に AQP1 の減少もやや見られたが SAV1^{-/-}マウスの減少より軽度であった。また嚢胞壁の多くは AQP1 陽性を示すものが多かった(図 6)。

ダブルノックアウトマウス 3 種類 (SAV1^{-/-};VHL^{-/-})(SAV1^{-/-};VHL^{+/-})(SAV1^{+/-};VHL^{-/-}) はいずれも嚢胞形成がみられ、SAV1^{-/-};VHL^{+/-}は SAV1^{-/-}の嚢胞に類似し、SAV1^{+/-};VHL^{-/-}は VHL^{-/-}の嚢胞に類似していた。いずれにも腎癌の形成は認められなかった。

ダブルヘテロノックアウトマウス (SAV1^{+/-};VHL^{+/-})でも腎癌の形成はみられず、硝子化した糸球体が認められた。

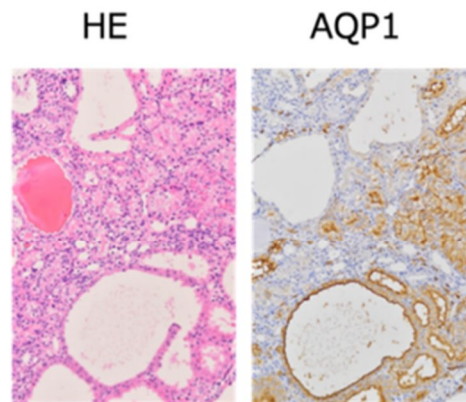


図6 VHL^{-/-}の組織学的および免疫組織化学染色(x40)

(3) 考察

SAV1^{-/-}では、近位尿細管の形成不全が示唆された。また構造異型が見られる嚢胞では主に遠位尿細管の性質をもつ細胞が内腔に突出するように増殖していた。これらのことから SAV1^{-/-}マウスでは、腎癌を発症する以前に腎機能障害をきたし、早期に死亡することが示唆された。YAP1 の核移行が認められたことから、SAV1^{-/-}マウスの腎臓では Hippo パスウェイの抑制による YAP1 の活性化を介して近位尿細管が発生異常を示し、また構造異型を伴う異常な細胞の増殖をもたらしたと考えられる。

VHL^{-/-}は SAV1^{-/-}マウスとは明らかに異なる表現型を示していた。すなわち SAV1^{-/-}マウスに見られた構造異型はみられず、細胞増殖ではなく、拡張した嚢胞形成に寄与していることが示唆された。

ダブルノックアウトマウスでは SAV1^{-/-}あるいは VHL^{-/-}の相乗効果が認められたが拮抗するものではなかった。またヘテロノックアウトマウスではホモノックアウトマウスで見られた発生異常はほとんどみられなかった。VHL と Hippo パスウェイとの関連について、ノックアウトマウスを用いて解析した報告はこれまでなかったので、新しいモデルマウスとして、今後さらに詳細に解析していきたい。

腎発生に関わる分子の一つとして、本研究で初めて SAV1 が関与していることを見出した。また VHL とは異なり、尿細管の正常な極性や構造を保つことに重要であることを明らかにした。ただし、ヒト腎癌を模倣するモデルマウスの樹立には至らなかったため、今後、腎臓での効果的誘導性ノックアウトマウスの作成を工夫し、あるいは他の遺伝子を組み合わせたヒト腎癌のモデルマウス作成を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuura K, Kushio S, Imai H, Kudo H, Wakuda H, Otani N, Kuranari M, A Sekiguchi A, Ohyama T, Uemura N	4. 巻 16(4)
2. 論文標題 Association between psychomotor function and ALDH2 genotype after consuming barley shochu: A randomized crossover trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clin Trans Sci	6. 最初と最後の頁 686-693
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cts.13482	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 -
1. 著者名 Hasegawa H, Hayashi K, Akita Y, Une Y, Huffman MA, Matsuura K	4. 巻 108(4)
2. 論文標題 Developmental Stages of <i>Grassenema procaviae</i> Petter, 1959 (Cosmocercoidea: Atractidae) Found in the Stomach of Cape Hyrax (<i>Procavia capensis</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Parasitol	6. 最初と最後の頁 366-373
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1645/21-117	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hasegawa, H., McLennan, M. R., Huffman, M. A., Matsuura, K.	4. 巻 107(2)
2. 論文標題 Notes on Morphology and Life History of <i>Probstmayria gombensis</i> (Nematoda: Cosmocercoidea: Atractidae), Parasitic in Eastern Chimpanzees, <i>Pan troglodytes schweinfurthii</i> , in Bulindi, Uganda	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Parasitol	6. 最初と最後の頁 155-162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1645/20-88.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakada C, Hijiya N, Tsukamoto Y, Yano S, Kai T, Uchida T, Kimoto M, Takahashi M, Daa T, Matsuura K, Shin T, Mimata H, Moriyama M.	4. 巻 251(1)
2. 論文標題 A transgenic mouse expressing miR-210 in proximal tubule cells shows mitochondrial alteration: possible association of miR-210 with a shift in energy metabolism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pathol	6. 最初と最後の頁 12-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/path.5394.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松浦 恵子、吉田 知弘、池田 八果穂、甲斐 友喜、守山 正胤、三股 浩光
2. 発表標題 腎特異的SAV1ノックアウトマウスは、VHL欠失とは異なる表現型を示す
3. 学会等名 第109回 日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------