

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07236

研究課題名(和文) 稀少腎細胞がんの個別化治療戦略確立を目指した基盤研究

研究課題名(英文) Basic research for the development of personalized therapeutic strategies against a rare renal cell carcinoma

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)・講師

研究者番号：90555757

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)：本研究では、独自開発した稀少がんであるXp11.2転座型腎細胞がんモデルマウスを用い、早期診断に利用可能な尿中バイオマーカーの探索、およびXp11.2転座型腎細胞がんの発症・進展の分子機構について検討を行った。その結果、尿中エクソソーム内に含まれるmiR-204-5pが早期診断に利用可能な新規バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。さらに、腎がん病態の進展が、がん細胞由来ANGPTL2によって促進されることを明らかにした。また、本研究過程において、がん間質由来ANGPTL2は、抗腫瘍免疫応答の活性化を促進することで、がん抑制に作用することも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、稀少がんであるが故に治療法や診断マーカーの研究開発が困難なXp11.2転座型腎細胞がんについて、そのモデルマウスを独自に開発し、早期診断に利用可能な新規バイオマーカーや新規治療標的分子を解明するなど、その成果はXp11.2転座型腎細胞がんの個別化治療戦略の確立に寄与するものである。さらに、本研究の成果は、ANGPTL2シグナルを介した抗腫瘍免疫応答制御の解明といった学術的意義も有する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we challenged to identify urinary biomarkers for early diagnosis of Xp11.2 translocation renal cell carcinoma (tRCC) and examined molecular mechanisms underlying the development and progression of Xp11.2 translocation renal cell carcinoma. Our results showed that miR-204-5p in urinary exosomes could be a useful biomarker for early diagnosis of patients with Xp11.2 tRCC. We also demonstrated that tumor cell-derived ANGPTL2 accelerates the progression of Xp11.2 tRCC, suggesting that ANGPTL2 signaling could be a novel therapeutic target. Moreover, we showed that tumor stroma-derived ANGPTL2 suppresses tumor progression by facilitating the activation of anti-tumor immune responses.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：腎細胞がん ANGPTL2 尿中バイオマーカー miRNA がん免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

罹患者数が少ない稀少がんは、患者数が少ないが故に診断法及び治療法開発も十分ではなく、受けられる医療も肺がんや乳がんなどの主要ながんに比べて明らかに不利な状況が生じている。腎がんは他の主要ながんに比べて罹患者数が少ないことに加え、早期では無症状であることから、検診の際に行われる超音波やCT検査により偶然発見される場合が多く、早期診断に有用なバイオマーカーも確立されていない。なかでも 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腎がんであり、その原因遺伝子として Xp11.2 転座によって生じる転写因子 TFE3 の融合遺伝子が複数同定されているが、病態発症・進展の詳細な分子機構は明らかとなっていない。また、診断においては摘出した腎がん組織における TFE3 タンパク質の核内蓄積や FISH 法による転座の有無を確認することで行われており、早期での発見が難しいのが現状である。さらに、患者数が非常に少ないことに加え、有用な疾患動物モデルもないため、診断法や治療法の研究開発も困難な状況にある。

本来、TFE3 は栄養飢餓などのストレスに応答して活性化することで核内へと移行し、細胞代謝やオートファジーに関連する遺伝子発現を活性化する。一方、TFE3 融合遺伝子の翻訳産物である恒常活性型 TFE3 キメラタンパク質は常に核内へ移行し、持続的に TFE3 標的遺伝子の発現を誘導することで病態発症・進展に繋がると考えられている。従って、Xp11.2 転座型腎細胞がんの発症・進展に寄与する恒常活性型 TFE3 キメラタンパク質の標的遺伝子を同定し、その中から治療標的や診断マーカーになり得る標的分子を明らかにすること、さらに基礎研究に必要な疾患動物モデルを確立することが、病態発症・進展の分子機構解明のみならず、Xp11.2 転座型腎細胞がんの早期発見と治療といった個別化治療戦略の確立においても重要である。

2. 研究の目的

我々は、これまでにアンジオポエチン様因子 (ANGPTL) ファミリー分子の1つである ANGPTL2 が発がんやがん細胞の浸潤・転移を促進すること、がん細胞における ANGPTL2 シグナル抑制が転移抑制に繋がるとを明らかにした。最近、我々は、Xp11.2 転座型腎細胞がん原因遺伝子である PRCC-TFE3、NonO-TFE3、または PSF-TFE3 をヒト尿細管上皮細胞に過剰発現することによって誘導される遺伝子群の共通遺伝子に ANGPTL2 が含まれること、クロマチン沈降法により実際に PRCC-TFE3 タンパク質が ANGPTL2 転写制御領域に結合し、転写を活性化していることを見出した。さらに、PRCC-TFE3 を尿細管上皮細胞特異的に高発現する遺伝子改変マウスを作製し、このマウスがヒトと同様に腎細胞がんを発症することを確認しており、Xp11.2 転座型腎細胞がんモデルマウスの開発に成功した。さらに、同モデルマウスでは尿細管上皮細胞における ANGPTL2 の発現が亢進していたことから、ANGPTL2 は TFE3 キメラタンパク質の標的遺伝子であり、ANGPTL2 が Xp11.2 転座型腎細胞がんの発症・進展に関わっている可能性が示唆された。

尿は非侵襲的かつ簡便に採取できることから、新規バイオマーカー探索試料としての重要性が認識されている。また、血液をはじめとする体液中にマイクロ RNA (miRNA) が存在し、がん患者の血液中では特定の miRNA 量が増加することから、新規がん診断法としての血中 miRNA 測定が注目されている。特に、体液中のエクソソームには多数の miRNA が含まれており、我々は、開発したモデルマウスの尿サンプルを用い、尿中エクソソーム内の miRNA を網羅的に解析し、腎細胞がんを発症したモデルマウスの尿中で特異的に含有量が増加する miRNA を複数見出した。さらに、これらの miRNA は、腎細胞がん発症前のモデルマウスにおいても増加していたことから、当該 miRNA が TFE3 キメラタンパク質の標的遺伝子であり、Xp11.2 転座型腎細胞がんの早期診断に利用可能なバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

以上のこれまでの我々の研究成果および本研究に関する準備研究の成果に基づき、本研究では、我々が開発した Xp11.2 転座型腎細胞がんモデルマウスを用い、Xp11.2 転座型腎細胞がん病態の発症・進展の分子機構解明、早期診断に利用可能な新規バイオマーカーの同定といった Xp11.2 転座型腎細胞がんの新規治療戦略や早期診断法開発に向けた基盤研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) Xp11.2 転座型腎細胞がんの早期診断に利用可能な新規バイオマーカーの同定

30 週齢の Xp11.2 転座型腎細胞がんモデルマウスおよびがんを発症しないコントロールマウスより尿を採取し、尿中エクソソーム内の miRNA の網羅的解析を行った。さらに、網羅的解析によって同定されたバイオマーカー候補の miRNA について、腎がん病態発症前 (20 週齢) および発症後 (40 週齢) の Xp11.2 転座型腎細胞がんモデルマウスおよび同週齢のコントロールマウスの尿中エクソソームにおける存在量を再検討し、二次スクリーニングを行った。また、Xp11.2 転座型腎細胞がんモデルマウスの腫瘍組織より樹立した初代がん細胞株、PRCC-TFE3 融合遺伝子を有するヒト Xp11.2 転座型腎細胞がん細胞株 (UOK120 および UOK124) およびドキシサイクリン依存的に PRCC-TFE3 の発現を誘導可能なヒト胎児由来腎細胞株 HEK293 を用い、バイオマーカー候補 miRNA について、細胞内および培養上清中に分泌されたエクソソーム中の発現量を評価した。

(2) Xp11.2 転座型腎細胞がん病態の発症・進展の分子機構解明

TFE3 融合遺伝子によって ANGPTL2 の発現が誘導されることから、Xp11.2 転座型腎細胞がん病態の発症・進展における ANGPTL2 発現上昇の意義を検討するため、尿細管上皮特異的に Angptl2 をノックアウトもしくは全身で Angptl2 をノックアウトした Xp11.2 転座型腎細胞がんモデルマ

ウスを作製し、腎がん病態の進展や生存期間を検討した。さらに、マウスメラノーマ細胞株 (B16F10) を Angpt12 ノックアウトマウスに移植した担がんマウスモデルを作製し、腫瘍の成長や生存期間を検討するとともに、腫瘍組織内の免疫細胞や間質細胞について組織学的解析やフローサイトメトリー解析を行い、ANGPTL2 シグナルとの関連を検討した。また、ANGPTL2 の受容体として報告されている PirB のノックアウトマウスまたは野生型マウスを用いてマウス骨髄由来樹状細胞を調製し、組換えマウス ANGPTL2 タンパク質を添加し培養した樹状細胞における遺伝子発現解析やシグナル解析を行うことで、樹状細胞の活性化と ANGPTL2 との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) Xp11.2 転座型腎細胞がんの早期診断に利用可能な新規バイオマーカーの同定

尿中エクソソーム内の miRNA の網羅的解析を行った結果、Xp11.2 転座型腎細胞がんモデルマウスにおいて 15 種類の miRNA がコントロールマウスに比べて増加していることが明らかとなった。そこでさらに、これらの miRNA について腎がん病態発症前 (20 週齢) および発症後 (40 週齢) の Xp11.2 転座型腎細胞がんモデルマウスおよび同週齢のコントロールマウスの尿中エクソソームを用い、二次スクリーニングを行ったところ、miR-204-5p および miR-211-5p の量が Xp11.2 転座型腎細胞がんモデルマウスで著明に上昇しており、腎がん病態を発症していない 20 週齢においても増加していることが明らかとなった。そこで、これらの miRNA が、がん細胞に由来するものであるか検討するため、Xp11.2 転座型腎細胞がんモデルマウスの腫瘍組織より樹立した初代がん細胞株を用いて検討を行った。その結果、マウス尿細管上皮細胞株 (M-1) では miR-204-5p および miR-211-5p の発現が全く検出されないのに対し、初代がん細胞株では、これらの miRNA が豊富に発現していた。さらに、培養上清中に分泌されたエクソソーム中に miR-204-5p および miR-211-5p が存在していることも確認された。これらの結果から、miR-204-5p および miR-211-5p を含む尿中エクソソームは主にごん細胞から分泌されたものであることが示唆された。

次に、これらの miRNA 発現が PRCC-TFE3 によって誘導されている可能性を検討するため、ドキシソサイクリン依存的に PRCC-TFE3 の発現を誘導可能な HEK293 細胞株における発現を検討した。その結果、PRCC-TFE3 の発現を誘導することで、miR-204-5p および miR-211-5p の発現が有意に上昇することが明らかとなり、これらの miRNA が PRCC-TFE3 によって発現制御されていることが示唆された。最後に、ヒトにおいても miR-204-5p および miR-211-5p がバイオマーカーとして利用可能か検討するため、ヒト Xp11.2 転座型腎細胞がん細胞株を用い、細胞における発現および培養上清中に分泌されたエクソソーム中の各 miRNA 量を検討した。その結果、ヒト尿細管上皮細胞株 (HK-2) に比べ、ヒト Xp11.2 転座型腎細胞がん細胞株では細胞内およびエクソソーム中の miR-204-5p 量が有意に増加していることが明らかとなった。一方、miR-211-5p の発現は、ヒト尿細管上皮細胞株および Xp11.2 転座型腎細胞がん細胞株のいずれにおいても検出されなかった。以上より、miR-204-5p が、Xp11.2 転座型腎細胞がんの早期診断に利用可能な新規バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

(2) Xp11.2 転座型腎細胞がん病態の発症・進展の分子機構解明

野生型のモデルマウスと尿細管上皮特異的 Angpt12 ノックアウトモデルマウスの腎がん病態の進展と生存期間を解析したところ、尿細管上皮特異的 Angpt12 ノックアウトモデルマウスでは、野生型のモデルマウスに比べ腎がん病態の進展が抑制され、生存期間の延長が認められた。これまでに我々は、がん細胞由来の ANGPTL2 が様々ながんの進展を促進することを明らかにしていることから、Xp11.2 転座型腎細胞がんにおいてもがん細胞由来 ANGPTL2 が、がん促進作用を有することが明らかとなった。一方、全身で Angpt12 をノックアウトしたモデルマウスでは、予想に反し、野生型モデルマウスに比べてがん病態が増悪し、その生存期間も短縮することが明らかとなった。全身で Angpt12 をノックアウトしたモデルマウスではがん細胞に加え、がん組織に存在する間質細胞も ANGPTL2 を欠失していることから、がん間質由来 ANGPTL2 はがん抑制に作用することが示唆された。

そこで、次に、Angpt12 ノックアウトマウスにマウスメラノーマ細胞株を皮下移植し、がんの成長を検討したところ、野生型マウスに比べてノックアウトマウスにおけるがんの成長が促進されていることが明らかとなった。さらに、がん組織において ANGPTL2 を発現している間質細胞を探索したところ、PDGFR 陽性の線維芽細胞が ANGPTL2 を豊富に発現していることが明らかとなった。また、メラノーマ細胞株を移植した Angpt12 ノックアウトマウス由来の腫瘍組織および全身で Angpt12 をノックアウトした Xp11.2 転座型腎細胞がんモデルマウス由来の腫瘍組織では、CD8⁺ T 細胞が減少していることを見出した。そこで、PDGFR 陽性の線維芽細胞由来 ANGPTL2 が抗腫瘍免疫活性化に関わっている可能性を検討したところ、ANGPTL2 が樹状細胞の活性化および成熟を促進することで、抗腫瘍免疫の活性化に寄与していることが明らかとなった。

これまでに ANGPTL2 の受容体として $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンおよび PirB が報告されている。そこで、ANGPTL2 によるマウス骨髄由来樹状細胞の活性化に対する、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンに対する中和抗体の効果を検討したが、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの阻害では ANGPTL2 による活性化は抑制されなかった。一方、PirB ノックアウトマウスの骨髄由来樹状細胞を ANGPTL2 処理したところ、野生型マウスの骨髄由来樹状細胞に比べ著しく活性化が抑制され、ANGPTL2 が PirB を介して樹状細胞を活性化することが明らかとなった。また、ANGPTL2-PirB 経路を介した樹状細胞活性化のメカニズムを詳細に検討したところ、ANGPTL2 は PirB を介して Notch シグナルを活性化し、樹

状細胞の活性化を促進していることが明らかとなった。

以上より、がん細胞由来 ANGPTL2 はがん進展を促進するのに対し、がん間質細胞由来 ANGPTL2 はがん抑制に作用すること、ANGPTL2 によるがん抑制のメカニズムとして、ANGPTL2 が PirB を介して Notch シグナル経路を活性化することで樹状細胞の成熟・活性化を促進し、CD8⁺ T 細胞による抗腫瘍免疫応答を活性化することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Horiguchi H, Kadomatsu T, Kurahashi R, Hara C, Miyata K, Baba M, Osumi H, Terada K, Araki K, Takai T, Kamba T, Linehan WM, Moroishi T, Oike Y.	4. 巻 33
2. 論文標題 Dual functions of angiotensin-like protein 2 signaling in tumor progression and anti-tumor immunity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes Dev	6. 最初と最後の頁 1641-1656
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/gad.329417.119	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 Kurahashi R, Kadomatsu T, Baba M, Hara C, Itoh H, Miyata K, Endo M, Morinaga J, Terada K, Araki K, Eto M, Schmidt LS, Kamba T, Linehan WM, Oike Y.	4. 巻 110
2. 論文標題 MicroRNA-204-5p:A novel candidate urinary biomarker of Xp11.2 translocation renal cell carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1897-1908
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14026	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 該当する
1. 著者名 Baba M, Furuya M, Motoshima T, Lang M, Funasaki S, Ma W, Sun HW, Hasumi H, Huang Y, Kato I, Kadomatsu T, et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 TFE3 XP11.2 translocation renal cell carcinoma mouse model reveals novel therapeutic targets and identifies GPNMB as a diagnostic marker for human disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Cancer Res	6. 最初と最後の頁 1613-1626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-18-1235	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 該当する
1. 著者名 Kadomatsu T, Oike Y.	4. 巻 165
2. 論文標題 Roles of angiotensin-like proteins in regulation of stem cell activity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 309-315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz005	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 Horiguchi H, Kadomatsu T, Miyata K, Terada K, Sato M, Torigoe D, Morinaga J, Moroishi T, Oike Y.	4. 巻 40
2. 論文標題 Stroma-derived ANGPTL2 establishes an anti-tumor microenvironment during intestinal tumorigenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 55-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-020-01505-7	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 -

1. 著者名 Kiyohara M, Aoi J, Kajihara I, Otuka S, Kadomatsu T, Fukushima S, Ihn H.	4. 巻 47
2. 論文標題 Serum anti-p53 autoantibodies in angiosarcoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 849-854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15416	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 Osumi H, Horiguchi H, Kadomatsu T, Tashiro K, Morinaga J, Takahashi T, Ikeda K, Ito T, Suzuki M, Endo M, Oike Y.	4. 巻 111
2. 論文標題 Tumor cell-derived angiopoietin-like protein 2 establishes a preference for glycolytic metabolism in lung cancer cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1241-1253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14337	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5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 門松 毅
2. 発表標題 加齢関連疾患とアンジオポエチン様因子2シグナル
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門松 毅
2. 発表標題 アンジオポエチン様因子2シグナルによる代謝制御変容と加齢関連疾患
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門松 毅，尾池雄一
2. 発表標題 加齢関連疾患の発症・進展とアンジオポエチン様因子2シグナル
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門松 毅，尾池雄一
2. 発表標題 アンジオポエチン様因子2シグナルによる加齢関連疾患の発症・進展の分子機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuyoshi Kadomatsu, Haruki Horiguchi, Yuichi Oike
2. 発表標題 Intercellular communication via angiopoietin-like protein 2 signaling in the regulation of anti-tumor immunity
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 門松 毅	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 115
3. 書名 アンチ・エイジング医学 特集 老化と炎症 5. 慢性炎症とサルコペニア	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>熊本大学 大学院生命科学研究部 分子遺伝学講座 http://www.kumamoto-u-molgen.jp</p>

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
連携研究者	馬場 理也 (BABA Masaya) (10347304)	熊本大学・国際先端医学研究機構・准教授 (17401)	
連携研究者	遠藤 元誉 (ENDO Motoyoshi) (40398243)	産業医科大学・医学部・教授 (37116)	

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

米国	NIH			
----	-----	--	--	--