

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07684

研究課題名（和文）好中球依存的肺転移促進機構を標的とした新たな腎癌治療法の開発

研究課題名（英文）Epigenetic remodelling shapes inflammatory renal cancer and neutrophil-dependent metastasis

研究代表者

江幡 正悟（Ehata, Shogo）

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90506726

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）：腎同所性移植法を用いて進行腎癌を再現し、癌細胞の性質を調べることで、腎癌肺転移の分子メカニズムの解明を試みた。その結果、進行腎癌の癌細胞は、ケモカインを強力に産生することで腫瘍内炎症を惹起し、活性化された好中球が肺転移の成立に重要な働きをしていることを明らかにした。同時に、進行腎癌の癌細胞ではアポトーシス誘導に重要なミトコンドリア分子をコードする遺伝子の発現が低下していることも、腎癌の転移に関係することを見いだした。さらに、腎の微小環境が腫瘍を構成する癌細胞群の不均一性の維持に大きな役割を果たすことも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎癌の進展や転移にはいくつかのエピゲノムの異常が関与していることが明らかになった。特に、腎癌細胞では好中球の動態を制御する遺伝子にヒストン修飾が生じ、腫瘍内炎症が誘導され、好中球依存的に肺転移することが明らかになった。同時に、DNAメチル化が潜在的な癌抑制遺伝子UQCRHの発現低下を誘導し、癌細胞にアポトーシス耐性をもたらしている可能性が示唆された。BET阻害剤やメチルk阻害剤を用いてこれらのエピゲノム制御機構を減弱することで、腎癌の肺転移を抑えられる可能性が示唆されるなど、新たな治療薬の開発につながる成果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：In the present study, the molecular mechanism of lung metastasis of renal cancer cells was analyzed by reproducing advanced renal cancer using the renal orthotopic transplantation technique. As a result, we found that cancer cells of advanced renal carcinoma induce tumor-intrinsic inflammation through the production of chemokines, and that activated neutrophils play an important role in the establishment of lung metastasis. We also revealed that the expression of genes encoding mitochondrial molecules related to the induction of apoptosis is down-regulated in cancer cells of advanced renal cancer. Furthermore, our results indicate that the renal microenvironment plays a pivotal role in the maintenance of the heterogeneity of the renal cancer cell population.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：腎がん 転移 エピゲノム 炎症 アポトーシス がん微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では、国民の二人にひとりが生涯のうちに癌に罹患し、三人にひとりが癌で死亡する。特に癌の転移は癌患者の予後を大きく左右する。中でも腎癌は、画像診断技術の向上から早期診断が可能になり、罹患数が年々増加している。早期腎癌の症例は根治的腎摘除術が奏功し、良好な治療成績が得られている一方で、転移を有する進行腎癌の症例に対しては、安定した効果が期待できる治療は確立されていない。分子標的薬も開発されているが、これらは腫瘍増殖抑制効果を認めるものの、完全寛解に至る例はまれである。また重篤な副作用の懸念から、既存の分子標的薬は治療域が狭く、より安全性の高い薬剤の開発が待たれている。

2. 研究の目的

本研究では、腎癌の肺転移の分子メカニズムを解析し、新たに特異性の高い治療法の開発を目指す。具体的には、転移能を有する腎癌細胞と有さない腎癌細胞の特性を比較し、肺転移の成立に中心的に働く分子群を同定し、それらの発現制御機構に立脚した治療法を開発する。

3. 研究の方法

解析対象として、転移能の高い腎癌細胞株を樹立し、その株の特性を理解する必要がある。そこで本研究では、腎同所性移植に着目した。ヒト腎細胞癌細胞(親株)をマウス腎に同所性に移植し、癌細胞を腎微小環境内で腫瘍を形成させ、一定期間の後に腫瘍組織より腎癌細胞を単離し、再度移植するサイクルを繰り返すことで、肺転移能を有する株(高転移株)を作成した(図1)。

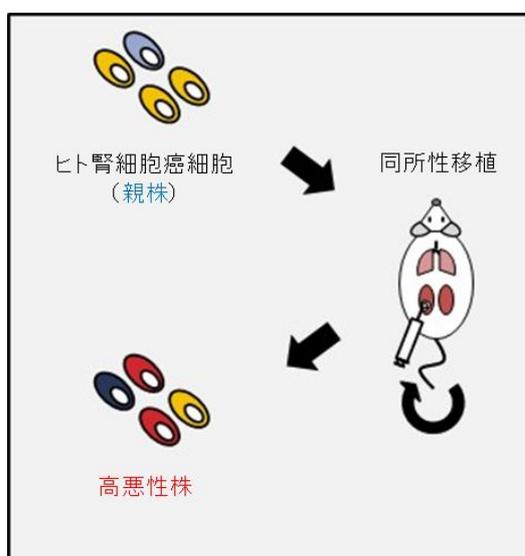


図1：同所性移植を応用した腎癌細胞高悪性株の樹立。
(文献の figure を改変)

そして、親株と高転移株の特性を比較し、高悪性株に特異的に獲得されている悪性形質や、その形質獲得に寄与する分子メカニズムを探索した。具体的には、高悪性株におけるエピゲノム変異(ヒストン修飾：下記研究成果(1)、またDNAメチル化：下記研究成果(2))あるいは癌微小環境と腎癌細胞の heterogeneity：下記研究成果(3)に焦点をあてた解析を行った。

4. 研究成果

(1) 本項では、腎癌細胞における腫瘍内在性炎症とヒストン修飾の関連に着目した研究を行った。上記の研究の方法で樹立した高悪性株の原発腫瘍や肺転移の組織には好中球が多く浸潤しており、高悪性株は腫瘍内在性炎症を誘発する形質を有していることがわかった。好中球数を減少させる抗体を用いた実験から、好中球には血管新生や癌細胞の肺への生着を促進させる作用があり、高悪性株は好中球依存的に肺転移することがわかった。一方で、この形質は高悪性株に特有で、親株では確認されなかったため、形質獲得には、癌細胞の腎微小環境への曝露が重要であると予想された。

次に、高悪性株で腫瘍内在性炎症を誘発する制御因子を探索した。次世代シーケンサーを用いた解析から、高悪性株では CXCL1、CXCL2、CXCL5、CXCL8 など複数のケモカインの発現が同時に上昇していることがわかった。これらの遺伝子のゲノム領域近傍ではスーパーエンハンサーが形成され、その領域に一致して、アセチル化ヒストンのリーダータンパク BRD4 の結合が見られた。そこで BRD4 を標的とする BET 阻害剤を亜株に加えたところ、これらケモカイン遺伝子発現が一様に低下した。さらに亜株移植マウスに対して、BET 阻害剤を投与したところ、原発腫瘍に浸潤する好中球が減少し、肺転移が抑制されることが確認された。以上から、腎微小環境との相互作用により、腎癌細胞では好中球の動態を制御する遺伝子にエピゲノム変化が生じ、腫瘍内在性炎症が誘導され、好中球依存的に肺転移することが明らかになった。さらに BET 阻害剤を用いてこのエピゲノム制御機構を減弱することで、腫瘍内在性炎症が抑制され、腎癌の肺転移を抑えられる可能性が示唆された (図 2)。

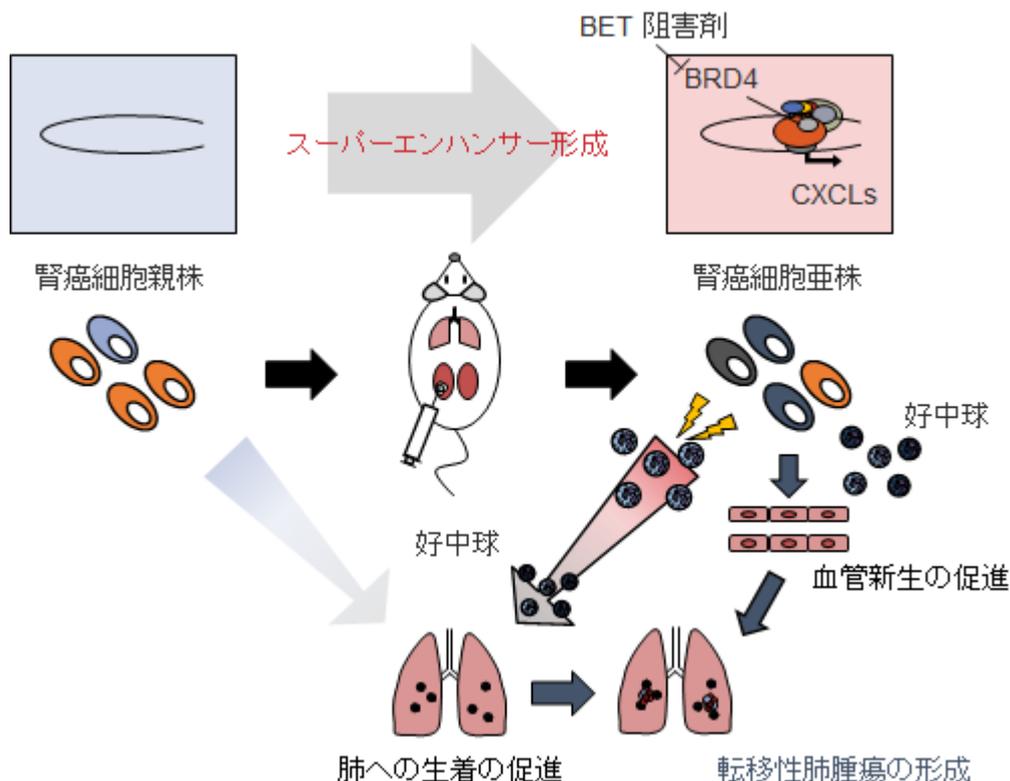


図 2：腎癌細胞における腫瘍内在性炎症と転移促進機構の関連。
また腫瘍内在性炎症を制御するエピゲノム機構を標的とした治療の可能性。
(文献の figure を改変)

(2) 最近の多くの研究により、腎細胞癌では、高度に DNA メチル化が観察され、それが予後不良と相関していることが明らかにされている。しかしながら、腎癌の進展や転移に關与する具体的なメチル化遺伝子は同定されておらず、その詳細な意義は未だ不明である。そこで本項ではゲノムワイドな解析を行い、腎癌細胞における DNA メチル化酵素 (DNMT) の標的の同定を試みた。さらに DNMT の細胞生存制御への機能を検討した。上記の研究の方法で樹立した高悪性株では、DNMT3B の発現が上昇していることが確認された。5-aza-dC による前処置により、高悪性株にはアポトーシスが誘導され、移植後の原発腫瘍の形成が抑制されることが示された。次に、メチル化アレイを行い、RNA シークエンスによる遺伝子発現データを照合させ、メチル化により発現低下を受ける遺伝子を検索した。その結果、ミトコンドリア複合体 III の構成要素の一つである UQCRH が腎癌のメチル化標的として抽出された。臨床検体を用いた免疫組織化学的解析を行ったところ、正常な腎組織に比べ、腎癌組織では UQCRH の発現が低いことが明らかになり、UQCRH の発現低下が臨床的にも重要であることが示唆された。さらにノックダウンもしくは過剰発現系の実験から、UQCRH 発現が低下した腎癌細胞では、アポトーシス誘導刺激に応じて本来起こるべきミトコンドリアから細胞質への

cyt c の放出が減弱し、細胞死に至らず、*in vivo* での原発腫瘍形成の促進をもたらすことがわかった。
 以上から、DNA メチル化が潜在的な癌抑制遺伝子 UQCRH の発現低下を誘導し、癌細胞にアポトーシス耐性をもたらしている可能性が示唆された。これらの結果は、抗癌剤耐性の分子機構の解明にも貢献する可能性もあるなど、既存の薬剤の有効性を向上させるための重要な知見となることが期待された（図 3）。

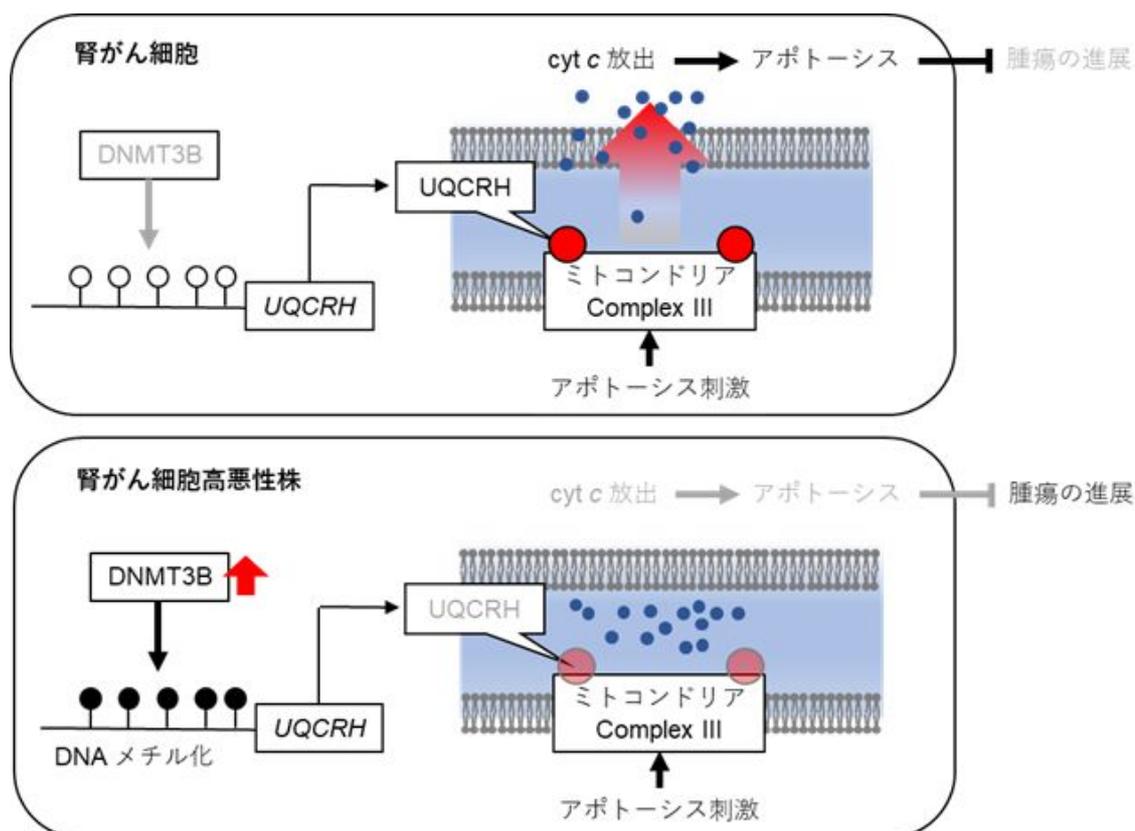


図 3 : DNMT3B による UQCRH のメチル化を介した腎癌細胞のアポトーシス抵抗性。
 (文献の figure を改変)

(3) 腫瘍内の不均一性は治療抵抗性、再発、転移などに寄与しているとされる。本研究では腎細胞癌の癌幹細胞マーカーとして報告のある endoglin (CD105) 発現の不均一性に着目し、endoglin 陽性細胞の腫瘍進展における役割および癌幹細胞性を検証した。
 上記の研究の方法で樹立した高悪性株では、親株に比べ endoglin 陽性細胞の割合が増加していた。また endoglin 陽性細胞は endoglin 依存性に高い足場非依存的増殖能を示した（図 4）。一方で幹細胞性・未分化性を示唆するマーカー群の発現は endoglin 陽性細胞で必ずしも高くなく、陰性細胞への分化も見られなかった。また限界希釈法を用いたマウス腎同所性移植モデルにおいても、endoglin 陽性細胞は陰性細胞と同等の腫瘍形成能を示すに留まり、むしろ皮下・肺・脳といったそれぞれの微小環境に依存して異なった腫瘍形成能を示した。
 以上より、endoglin 陽性細胞を頂点としたヒエラルキー様のモデルは今回の系では合致せず、腎の微小環境が腫瘍の不均一性の維持に大きな役割を果たしていると考えられた。また、実験的なモデルで腫瘍細胞の増殖能を評価する際には、微小環境による腫瘍形成能の違いを考慮する必要があると示唆された。

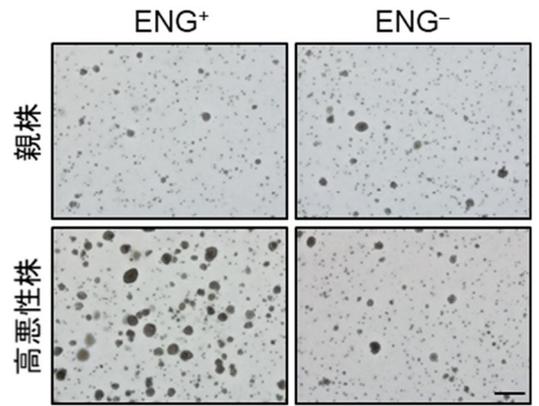
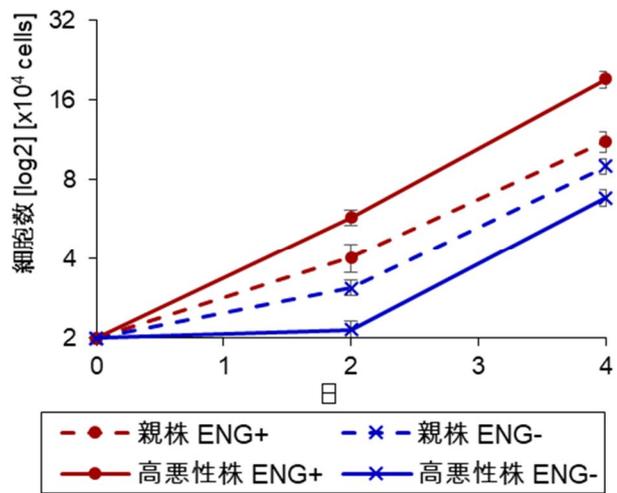


図 4：腎癌細胞高悪性株中の endoglin 陽性細胞は高い増殖能（左）および高い足場非依存性（右）を示す。
（文献の figure を改変）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Taguchi Luna, Miyakuni Kosuke, Morishita Yasuyuki, Morikawa Teppei, Fukayama Masashi, Miyazono Kohei, Ehata Shogo	4. 巻 22
2. 論文標題 c Ski accelerates renal cancer progression by attenuating transforming growth factor signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 465-475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14018	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 Nishida Jun, Momoi Yusaku, Miyakuni Kosuke, Tamura Yusuke, Takahashi Kei, Koinuma Daizo, Miyazono Kohei, Ehata Shogo	4. 巻 110
2. 論文標題 Epigenetic remodelling shapes inflammatory renal cancer and neutrophil-dependent metastasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 2063-2074
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-020-0491-2	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 Momoi Y, Nishida J, Miyakuni K, Kuroda M, Kubota SI, Miyazono K, Ehata S.	4. 巻 112
2. 論文標題 Heterogenous expression of endoglin marks advanced renal cancer with distinct tumor microenvironment fitness.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 3136-3149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15007.	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 Miyakuni K, Nishida J, Koinuma D, Nagae G, Aburatani H, Miyazono K, Ehata S.	4. 巻 16
2. 論文標題 Genome-wide analysis of DNA methylation identifies the apoptosis-related gene UQCRH as a tumor suppressor in renal cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Oncol.	6. 最初と最後の頁 732-749
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1878-0261.13040.	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21件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 江幡正悟、宮國昂介、西田純、宮園浩平
2. 発表標題 同所性移植を応用した腎癌の進展の分子メカニズムの解析
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田純、高橋恵生、江幡正悟、宮園浩平
2. 発表標題 腎細胞がんの好中球を介した肺転移機構に対するBET阻害剤の効果の検討
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田純、桃井悠作、田村佑介、高橋恵生、鯉沼代造、江幡正悟、宮園浩平
2. 発表標題 BET阻害剤の炎症を標的とした腎がん転移抑制効果
3. 学会等名 文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究 細胞社会ダイバーシティの統合的解明と制御 第4回公開シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮國昂介、西田純、江幡正悟、宮園浩平
2. 発表標題 微小環境との相互作用を介した腎がん細胞のアポトーシス耐性獲得
3. 学会等名 文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究 細胞社会ダイバーシティの統合的解明と制御 第4回公開シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田純、高橋恵生、江幡正悟、宮園浩平
2. 発表標題 腎細胞がんのエンハンサーリモデリングは好中球を介した肺転移機構を誘導する
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shogo Ehata, Kosuke Miyakuni, Jun Nishida, Kohei Miyazono
2. 発表標題 Analysis of molecular mechanism of renal cancer progression using serial orthotopic transplantation model
3. 学会等名 FASEB “ The TGF-beta Superfamily Conference: Signaling in Development and Disease ” (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江幡正悟、宮國昂介、西田純、宮園浩平
2. 発表標題 微小環境との相互作用を介した腎がん細胞のアポトーシス耐性獲得
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田純、田村佑介、高橋恵生、鯉沼代造、江幡正悟、宮園浩平
2. 発表標題 BET阻害剤の炎症を標的とした腎がん転移抑制効果
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮國昂介、西田純、江幡正悟、宮園浩平
2. 発表標題 腎がんは腎微小環境との相互作用を介してアポトーシス耐性を獲得する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮國昂介、西田純、江幡正悟、宮園浩平
2. 発表標題 DNAメチル化を介した腎がん細胞のアポトーシス耐性獲得の分子機構
3. 学会等名 文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究 細胞社会ダイバーシティーの統合的解明と制御 第5回公開シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江幡正悟、西田純、鯉沼代造、宮園浩平
2. 発表標題 腎がんの肺転移に対するBET阻害剤の有用性
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shogo Ehata, Jun Nishida, Kosuke Miyakuni, Daizo Koinuma, Kohei Miyazono
2. 発表標題 BET inhibitor suppresses neutrophil-dependent lung metastasis of inflammatory renal cancer cells
3. 学会等名 AACR Virtual Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kosuke Miyakuni, Jun Nishida, Shogo Ehata, Kohei Miyazono
2. 発表標題 DNA methylation enhances apoptosis resistance of renal cancer cells through the control of mitochondria related gene expression
3. 学会等名 AACR Virtual Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shogo Ehata, Kosuke Miyakuni, Jun Nishida, Kohei Miyazono
2. 発表標題 Mitochondrial dysfunction in renal cancer progression
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kohei Miyazono, Shogo Ehata, Jun Nishida, Kei Takahashi
2. 発表標題 Mechanisms of neutrophil-dependent metastasis of inflammatory renal cell caecinoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江幡正悟、宮國昂介、西田純、宮園浩平
2. 発表標題 Genome-wide analysis of DNA methylation identifies apoptosis-related gene UQCRH in renal cancer
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮國昂介、西田純、江幡正悟、宮園浩平
2. 発表標題 DNA methylation enhances apoptosis resistance of renal cell carcinoma cells
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ehata S, Nishida J, Miyakuni K, Koinuma D, Miyazono K.
2. 発表標題 Molecular mechanism of neutrophil-dependent metastasis of inflammatory renal cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮國昂介、西田純、鯉沼代造、江幡正悟、宮園浩平
2. 発表標題 腎細胞がんはDNAメチル化を介してアポトーシス耐性を獲得する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桃井悠作、西田純、宮國昂介、江幡正悟、宮園浩平
2. 発表標題 淡明細胞型腎細胞癌におけるendoglin陽性細胞のがん幹細胞としての評価
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江幡正悟
2. 発表標題 好中球を介した腎がん肺転移の分子メカニズムの解明と新たな治療の可能性
3. 学会等名 第49回和歌山腫瘍研究会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------