

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09694

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子FLCNの代謝および膜輸送制御に着目した腎腫瘍化機構の解析研究

研究課題名(英文) Elucidation of renal tumorigenesis under FLCN deficiency

研究代表者

蓮見 壽史 (HASUMI, Hisashi)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：40749876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：FLCN結合タンパク質を網羅的に解析し、候補結合タンパク質については、免疫沈降や、ノックアウトマウスを用いた生理的意義の解析を行いました。一方で、FLCN欠失による腎の腫瘍化機構を調べるために、VHL病、BHD症候群や遺伝性平滑筋腫腎癌症候群などの様々な遺伝性腎癌に発生した腎癌のシングルセル発現解析を行い、BHD腎癌が集合管介在細胞の分化に重要なFOXI1やその下流遺伝子の高発現から集合管の介在細胞と似た発現パターンを示すことや、転写レベルでの腫瘍内不均一性を示すことを明らかにしました。さらには遺伝子変異毎にがん微小環境が異なることを示し、精密医療開発の基盤を構築致しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、FLCNの膜輸送における役割が解明され、今後、膜輸送という全く新しい経路を標的とした新規腎癌治療薬の開発が期待できます。さらに今回のシングルセル発現解析により、詳細な腎腫瘍化機構の解明がなされただけでなく、免疫環境を含めたがん微小環境が明らかとなりました。これらの発見は腎癌細胞に対する新規治療薬開発ならびに免疫チェックポイント阻害剤や血管新生阻害剤などの腎癌の標準薬物療法の精密化につながります。

研究成果の概要(英文)：We have identified novel FLCN interacting partners and are investigating physiological meaning of those interactions using animal models. Furthermore, we have conducted single cell RNA-seq of BHD-associated kidney cancer and found that BHD-associated kidney cancer exhibits molecular profiling similar to that of intercalating cell of collecting duct, transcriptomic intratumor heterogeneity (tITH) and differentially expressed genes including SLC4A4, HERC1, PLAAT4 and MIF. We also revealed distinct tumor microenvironment which is unique to each hereditary kidney cancer. These findings provides mechanistic insights into renal tumorigenesis as well as an opportunity to develop novel therapeutics and diagnostics to hereditary and sporadic kidney cancers.

研究分野：腎癌

キーワード：遺伝性腎癌 BHD症候群 シングルセル発現解析 がん微小環境 免疫チェックポイント阻害剤 腫瘍内不均一性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

家族性腎癌症候群、Birt-Hogg-Dubé (BHD)症候群の原因遺伝子として同定された folliculin (FLCN)は、腎臓細胞の増殖を直接制御する重要な腎癌抑制遺伝子です。FLCN は Differentially expressed in neoplastic versus normal cells (DENN)ドメインを有し、現在までに様々な低分子量 GTP アーゼが基質候補として報告されておりますが、それらの膜輸送における生理的意義を含めて、とても議論のあるところとなっております。そのために哺乳動物に存在する全ての Rab GTP アーゼ (ヒト 62 種類、マウス 58 種類) を対象とした網羅的解析を行い、FLCN が制御する Rab GTP アーゼを絞り込む必要がありました。一方で、BHD 症候群に発生する腎癌の発生機構は十分には明らかにされておらず、腎癌精密医療開発のためにその腫瘍化機構を明らかにすることは急務となっております。

## 2. 研究の目的

本研究は、FLCN の膜輸送制御を標的とする新規腎癌治療薬の開発基盤の確立を目的としました。現在までに様々な低分子量 GTP アーゼが FLCN の基質候補として報告されておりますが、膜輸送における生理的意義を含めて、とても議論のあるところとなっております。そこで本研究では、哺乳動物に存在する全ての Rab GTP アーゼを対象に網羅的に解析を行うことにより FLCN が制御する Rab GTP アーゼを絞り込み、その膜輸送における生理的意義を、FLCN 欠失細胞株や FLCN 欠失マウスモデルを用いて調べました。

上記に加えて、BHD 症候群に発生する腎癌の発生機構を明らかにするために、シングルセル発現解析を行いました。

## 3. 研究の方法

FLCN/FNIP 複合体と、哺乳動物に存在する全ての Rab GTP アーゼ (ヒト 62 種類、マウス 58 種類) 間の、蛋白-蛋白相互作用を、Nano Temper Monolith NT.115 や、免疫沈降法を用いて網羅的に解析しました。また、FLCN/FNIP 複合体の有無で、Rab GTP アーゼの GDP/GTP 交換速度が変化するかを、哺乳類に存在する全ての Rab GTP アーゼについて網羅的に調べました。さらに、絞り込まれた Rab GTP アーゼの膜輸送および腎臓細胞増殖における生理的意義を、FLCN 欠失細胞株および FLCN 欠失マウスモデルを用いて検証しました。そのために、超解像顕微鏡(Leica TCS SP8 STED3x)を用いて、FLCN 欠失細胞における Rab GTP アーゼの細胞内局在を観察しました。また、LC/MS スペクトロメトリーを用いて、FLCN 依存的な Rab GTP アーゼ結合蛋白を網羅的に調べました。さらに、クライオ電子顕微鏡を用いて、Rab GTP アーゼが結合した時に、FLCN/FNIP 複合体がどのような形態変化を起こすかについて観察を試みました。Rab GTP アーゼの活性型である GTP フォームや、Rab GTP アーゼ関連遺伝子を、FLCN 欠失細胞株やマウス FLCN 欠失腎臓において強制発現し、それぞれ細胞増殖速度や、マウス腎臓重量に与える影響を観察しました。

さらに本研究では、BHD 症候群に発生する腎癌の発生機構を明らかにするために、シングルセル発現解析を行いました。

## 4. 研究成果

FLCN 結合タンパク質を網羅的に解析し、候補結合タンパク質については、免疫沈降や、ノックアウトマウスを用いた生理的意義の解析を行いました。新規結合タンパク質については、現在、マウスモデルや *in vitro* にて生理的意義を解析中です。

一方で、FLCN 欠失による腎の腫瘍化機構を調べるために、VHL 病、BHD 症候群や遺伝性平滑筋腫腎癌症候群などの様々な遺伝性腎癌に発生した腎癌のシングルセル発現解析を行い、BHD 腎癌が集合管介在細胞の分化に重要な FOXI1 やその下流遺伝子の高発現から集合管の介在細胞と似た発現パターンを示すことや、転写レベルでの腫瘍内不均一性を示すことを明らかにしました (図 1, 4) (DOI: 10.1016/j.isci.2022.104463)。さらには遺伝子変異毎にがん微小環境が異なることを示し、精密医療開発の基盤を構築致しました (図 2, 3)。

図1 腎がんと正常腎臓のシングルセル解析

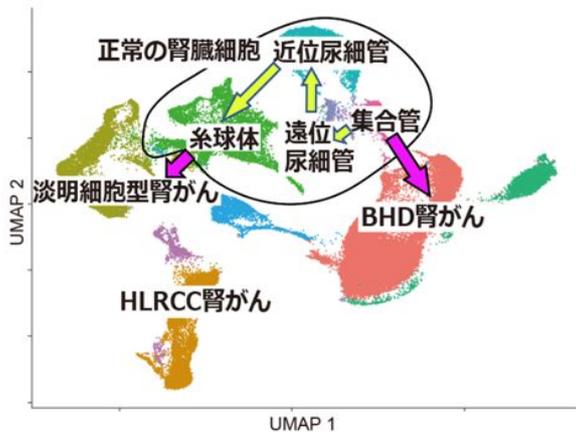
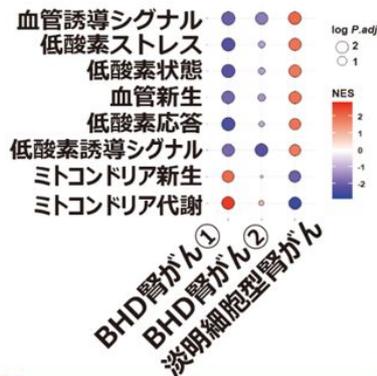
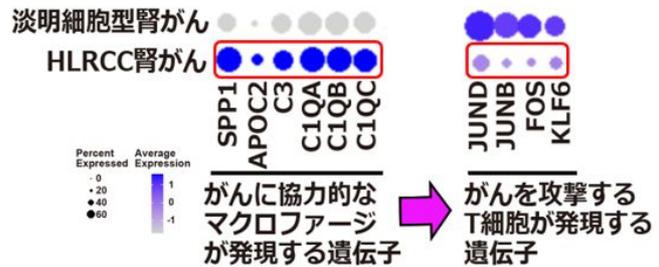


図2 腎がん組織の中の血管の性質



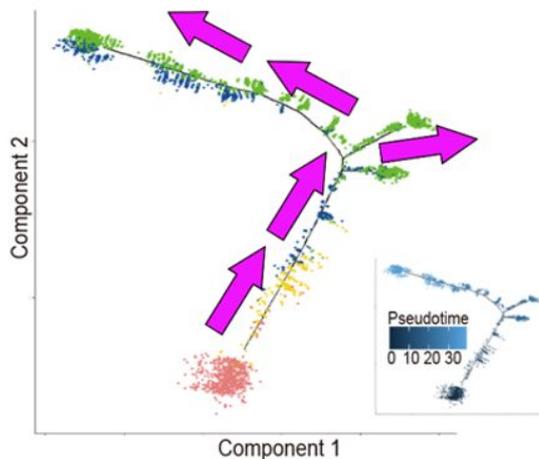
淡明細胞型腎がんの血管では低酸素反応が、  
BHD腎がんの血管ではミトコンドリア代謝が  
亢進していた。

図3 腎がん組織の中の免疫環境



HLRCC腎がんではマクロファージが  
T細胞にがんへの攻撃をやめさせていた。

図4 腎がんの腫瘍内不均一性



- FOXI1を発現するBHD腎がん細胞
- L1CAMを発現するBHD腎がん細胞
- 集合管の介在細胞
- 集合管の主細胞

BHD腎がんは、がん細胞になった後に、  
まったく異なる性質を持つ2種類のがん  
細胞 (FOXI1またはL1CAM発現細  
胞) に分かれていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tai-Nagara Ikue, Hasumi Yukiko, Hasumi Hisashi, Funasaki Shintaro, Satou Yorifumi, Kubota Yoshiaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Blood and lymphatic systems are segregated by the FLCN tumor suppressor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Isono Yasuhiro, Furuya Mitsuko, Kuwahara Tatsu, Schmidt Laura S., Linehan W. Marston, Kodama Tatsuhiko, Yao Masahiro, Oridate Nobuhiko, Hasumi Hisashi	4. 巻 522
2. 論文標題 FLCN alteration drives metabolic reprogramming towards nucleotide synthesis and cyst formation in salivary gland	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 931 ~ 938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Furuya Mitsuko, Iribe Yasuhiro, Hasumi Hisashi, Iwashita Hiromichi, Ohta Junichi, Kitamura Hiroshi, Nakajima Takahiko, Yoshida Takahiro, Nakagawa Masahiro, Tanaka Reiko, Yao Masahiro	4. 巻 73
2. 論文標題 Clinicopathological and molecular features of hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer-associated renal cell carcinomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 819 ~ 825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Furuya Mitsuko, Hasumi Hisashi, Yao Masahiro, Nagashima Yoji	4. 巻 111
2. 論文標題 Birt Hogg Dube syndrome associated renal cell carcinoma: Histopathological features and diagnostic conundrum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 15 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14255	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 Isono Yasuhiro, Furuya Mitsuko, Schmidt Laura S., Linehan W. Marston, Kodama Tatsuhiko, Yao Masahiro, Oridate Nobuhiko, Hasumi Hisashi	4. 巻 522
2. 論文標題 FLCN alteration drives metabolic reprogramming towards nucleotide synthesis and cyst formation in salivary gland	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 931 ~ 938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.184	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 Ito Kazuto, Yokomizo Akira, Tokunaga Shoji, Arai Gaku, Sugimoto Mikio, Akakura Koichiro, Hasumi Hisashi, Sakai Hideki, Ouraji Akiko, Oki Ryo, Kashiwagi Eiji, Kobori Yoshitomo, Hirama Hiromi, Kitoh Hiroki, Uemura Hiroji, Hakariya Tomoaki, Suzuki Kazuhiro	4. 巻 203
2. 論文標題 Diagnostic Impacts of Clinical Laboratory Based p2PSA Indexes on any Grade, Gleason Grade Group 2 or Greater, or 3 or Greater Prostate Cancer and Prostate Specific Antigen below 10 ng/ml	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 83 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/JU.0000000000000495	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 Furuya Mitsuko, Hasumi Hisashi, Yao Masahiro, Nagashima Yoji	4. 巻 111
2. 論文標題 Birt Hogg Dub? syndrome associated renal cell carcinoma: Histopathological features and diagnostic conundrum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 15 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14255	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 Baba Masaya, Furuya Mitsuko, Hasumi Hisashi, Huang Ying, Hasumi Yukiko, Suda Toshio, Schmidt Laura S., Linehan W. Marston	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 Molecular Cancer Research	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 Kanehira Koki, Yano Yukiko, Hasumi Hisashi, Fukuhara Hideo, Inoue Keiji, Hanazaki Kazuhiro, Yao Masahiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Fluorescence Enhancement Effect of TiO2 Nanoparticles and Application for Photodynamic Diagnosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3698 ~ 3698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20153698	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 Tabei Tadashi, Nakaigawa Noboru, Kaneta Tomohiro, Ikeda Ichiro, Kondo Keiichi, Makiyama Kazuhide, Hasumi Hisashi, Hayashi Narihiko, Kawahara Takashi, Izumi Koji, Osaka Kimito, Muraoka Kentaro, Teranishi Jun-ichi, Miyoshi Yasuhide, Yumura Yasushi, Uemura Hiroji, Kobayashi Kazuki, Inoue Tomio, Yao Masahiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Early assessment with 18F-2-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography/computed tomography to predict short-term outcome in clear cell renal carcinoma treated with nivolumab	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 298 ~ 298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-019-5510-y	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 Tatenuma Tomoyuki, Kawahara Takashi, Hayashi Narihiko, Hasumi Hisashi, Makiyama Kazuhide, Nakaigawa Noboru, Kishida Takeshi, Miyoshi Yasuhide, Yao Masahiro, Uemura Hiroji	4. 巻 2019
2. 論文標題 The Pretherapeutic Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio for Docetaxel-Based Chemotherapy Is Useful for Predicting the Prognosis of Japanese Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/2535270	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 蓮見 壽史, 矢尾 正祐	4. 巻 9
2. 論文標題 遺伝性腎がんのup-to-date	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腎臓内科・泌尿器科	6. 最初と最後の頁 483 ~ 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 蓮見壽史、磯野泰大、古屋充子、馬場理也、矢尾正祐、折館伸彦
2. 発表標題 唾液腺においてFLCN欠失が引き起こす代謝変化とその腫瘍化における意義
3. 学会等名 第26回日本遺伝性腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蓮見壽史
2. 発表標題 International Session I 「Treatment strategy for rare hereditary RCC」
3. 学会等名 第50回腎癌研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hisashi Hasumi, Masahiro Yao	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 5
3. 書名 Lynch Syndrome-Associated Urological Malignancies	

〔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
研究分担者	矢尾 正祐  (Yao Masahiro)  (00260787)	横浜市立大学・医学研究科・客員教授    (22701)	

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