

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670025

研究課題名(和文)腎癌術後検体のマウス連続継代移植による癌悪性化機能分子の探索

研究課題名(英文) Identification of a molecule involved in tumor progression using a patient-derived xenograft model

研究代表者

辻川 和丈 (TSUJIKAWA, KAZUTAKE)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10207376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：最も典型的な腎細胞がんである淡明型腎細胞がん(ccRCC)の分子標的治療薬の創製においては、ccRCCの悪性化の分子機序を理解する必要がある。この研究ではccRCC患者術後検体をマウスに移植した腫瘍モデルを作製した。さらにその腫瘍の継代移植により組織学的に腎細胞がんの悪性化像を認めた。この結果はこのマウスがccRCCの悪性化機序解明や治療創薬に有望なモデルとなることを示した。またccRCCの悪性化に関わる分子としてLOX-like protein 2 (LOXL2)を発見した。LOXL2はインテグリン 5/1の発現を制御することにより腫瘍悪性化に関わっていることも突き止めた。

研究成果の概要(英文)：Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the most popular subtype of renal cell carcinoma (RCC). Early-stage ccRCC is curable by clinical surgery, but approximately one-third of all patients present locally metastatic cancer at the time of diagnosis. Therefore, an understanding of the molecular mechanisms of ccRCC progression is crucial for the discovery of molecular-targeted therapies. In the present study, we have established patient-derived xenograft models of ccRCC. The tumors serially transplanted in mice pathohistologically showed high-grade phenotypes. On the other hand, we found LOX-like protein 2 (LOXL2) that is involved in the progression of ccRCC. Our findings suggest that LOXL2 is a potent regulator of integrin 5/1 protein levels and functions in a tumor-promoting capacity in ccRCC.

研究分野：細胞生理学

キーワード：淡明型腎細胞がん 患者がん組織移植マウス LOXL2 悪性化 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

腎癌は成人の癌の数%を占める悪性腫瘍である。腫瘍直径が 5 cm 以下の場合、症状として現れることが少なく、早期発見が遅れる原因となっている。また TNM 病期分類における T 分類により解析すると、T1、T2、T3b+c、T4 の順で予後不良であることが統計的に知られている。しかし、他の癌腫同様その悪性化機序は不明のままである。その原因の 1 つは臨床癌の悪性化を動物レベルで追跡することが難しいことが上げられる。一方腎癌の治療は、外科的手術療法が主であるが、他の癌腫と大きく異なり、腎癌手術は非転移原発腫瘍症例のみではなく、転移症例や転移巣に対しても行われる。また薬物療法に関して有効な抗がん剤がないことから、術前に薬物治療がなされることは少ない。このことは、腎癌術後検体を使用し、それをマウスで継代することができれば、癌の悪性化機序に迫ることができる重要な情報を得ることができるのではないかと発想に至った。

申請者は、これまで前立腺癌、膀胱癌などの治療標的分子の探索と評価を進めてきた (Curr. Cancer Drug Targets, 2012. Clin. Cancer Res., 2012. Cancer Res., 2012), その研究において泌尿器科医の協力を得る体制を確立した。さらに癌細胞の xenograft 移植や遺伝子の網羅的発現解析基盤技術の構築も進めてきた。

2. 研究の目的

現在、癌の悪性化機序の研究では、術後臨床検体を用いた遺伝子、タンパク質の発現解析結果を病理所見に基づくステージごとに集計し、統計的処理により相関性を推測するのが一般である。しかし、臨床癌の悪性化変化を実験動物で継続的に追跡できれば、癌悪性化機序の理解において極めて重要な知見を得ることになる。本申請研究では、全ステージで、かつ術前化学療法等が成されず外科手術が行われる腎癌の中でも最も一般的な型である淡明腎細胞癌 (clear cell renal cell carcinoma: ccRCC) に着目し、その各ステージの術後検体を NOD SCID マウスに xenograft 移植し、さらに継代することにより新しいモデルマウスを確立することを第一の目的とする。そして腎癌臨床組織や各継代腫瘍を用いて、申請者の所有する技術 (病理組織作成、遺伝子の網羅的発現解析、癌細胞機能解析) を総合し、腎癌悪性化機序解析を試みるものである。その成果は腎癌診断・治療創薬に対する新規標的分子の同定とともに、癌悪性化機序解明に新知見を提供することが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 検体

大阪大学医学部泌尿器科で外科的摘出された ccRCC 検体をインフォームドコンセントを得て使用する。また生化学的解析においては

pT 分類 (癌原発巣の病理学的分類) が pT1 ~ pT4 の腫瘍を使用した。なお使用検体に関しては pMN 分類 (N: リンパ節転移、M: 遠隔転移の有無)、Fuhrman Grade の情報も得て検討項目とした。

(2) 腎癌のマウス xenograft 移植

NOD SCID マウス (チャールスリバー) を使用した xenograft モデルを作製した。摘出腫瘍を約 5 mm 角に切断し、マウス背部皮下に 2 か所移植した。移植後の腫瘍の増殖変化は腫瘍体積を (長径) × (短径)² × 0.5 の式により算出した。腫瘍体積が約 100 mm³ になった時点で腫瘍を摘出し、一部を用いて継代再移植を行った。残りの腫瘍を用いて下記に記載する方法で組織化学的解析、遺伝子発現の網羅的解析、ならびに機能解析を行った。

(3) 病理組織学的検討

腫瘍を 10%ホルマリンで固定後、パラフィンブロックを作製した。ミクロトームを用いて切片を作製した後、ヘマトキシリン&エオシン染色し、病理診断を行った。

(4) RNA 抽出

RNA later ICE Frozen Tissue Transition Solution (Ambion) 中で保存した凍結腫瘍組織片に QIAzol (Qiagen) と破砕用 5.5mm ステンレスビーズを入れ、Micro smash MS-100 (TOMY) を用いて破砕してホモジネートを得た。この組織ホモジネートを用いて全自動核酸抽出装置 QIAcube (Qiagen) により、200 nt 以上の RNA を RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) で、200 nt 以下の miRNA 含有 RNA は miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出精製した。精製 RNA の純度の確認には、全自動チップ電気泳動システム Experion Automated Electrophoresis station (BIO-RAD) を用い、指標とする RQI (RNA Quality Indicator) が 7 以上のものを分解性が少ない RNA として実験に使用した。

(5) mRNA 解析の網羅的発現解析

Total RNA 100 ng を用いて、Ambion WT Expression Kit (Applied Biosystems) により cDNA 合成を行った。得られた cDNA 5.5 μg を GeneChip WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix) により断片化、ビオチン化した。ビオチン化された cDNA をもとに Hybridization Cocktail を作成後、GeneChip Human Exon 1.0 ST Array (Affymetrix) に注入し、45、60 rpm で 17 時間 hybridization を行った。Hybridization 終了後、Fluidics Station (Affymetrix) を使用して GeneChip Hybridization Wash and Stain Kit (Affymetrix) により array の自動洗浄・染色を行い、GeneChip Scanner 3000 によりスキャンした。データ解析は、GeneSpring 12.1 (Agilent Technologies) を用いた。

(6) LOXL2 real-time PCR 解析

Light cycler (Roche) または、CFX96 Real-Time System (BIO-RAD) の測定機械を用いた。Light cycler を使用した際には、2

×SYBR Premix Ex Taq (Takara) 5 μ L、10 μ M primer (forward 鎖, reverse 鎖) 各 0.2 μ L (終濃度 ; 0.2 μ M) づつ、MiliQ 水 3.6 μ L を添加後測定を開始した。また、CFX96 Real-Time System を使用した際には light cycler 使用時の倍量の反応液を用いた。LOXL2 mRNA 量の定量には以下のプライマーを用いた。

Forward: TTCCCTGGGGAGAGGGACATACA

Reverse: TTCTTCATGGGGTCCAGTGACA

PCR 条件は、95 30 秒 94 15 秒、60 10 秒、72 15 秒を 50 サイクル 72 15 秒 40 30 秒とした。

(7) siRNA のトランスフェクション

Small interfering RNA (siRNA) のトランスフェクションには lipofectamin RNAi MAX (Invitrogen) を使用した。LOXL2 に対する siRNA は Sigma-Aldrich 社より購入した以下の配列のものを用いた。またネガティブコントロールとして B-Brige 社より購入した Control siRNA を使用した。

Control siRNA : auccgcgcgauaguacguaTT

LOXL2 siRNA #1 : gccacataggtggttccttcaTT

LOXL2 siRNA #2 : agtaaagaagcctgcgtggtcTT

(8) Wound healing assay

siRNA トランスフェクション 24 時間後の 786-0 細胞を 24 well plate に 100% コンフルエントとなるよう再播種し 24 時間培養後、チップの先で well 底を引っ掻き傷 (wound) を付けた。無血清 RPMI-1640 に置換し 12 時間の培養後、顕微鏡下にて写真を撮影し、傷面積を Image J により数値化することで定量した。

(9) xCELLigence による細胞浸潤能解析

siRNA トランスフェクション 24 時間後の 786-0 細胞を 0.025% EDTA 処理で剥離し、予め 20% の BD Matrigel Basement Membrane Matrix High Growth Factor Reduced (Becton, Dickinson and Company) でコートしておいた xCELLigence 細胞浸潤モニタリング用プレート (CIM-plate) に 20000 細胞ずつ播種しモニタリングを開始した。

(10) Western blot

サンプルは 2 x SDS sample buffer (1 M Tris-HCl 125 mM, グリセロール 20%, 2-メルカプトエタノール 10%, sodium dodecyl sulfate : SDS 5%, bromophenol blue : BPB 少量) により可溶化し、95 5 分間の denature 処理を施した。この lysate を 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて泳動し、polyvinylidene difluoride 膜 (Millipore) に転写後、下記抗体を用いて western blot を行った。得られたバンドは LAS 4000 mini (GE Healthcare) を用いて検出した。使用抗体 : 抗 LOXL2 抗体 (Ambion)、抗 -actin 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 ITG 2、ITG 3、ITG V、ITG 3 抗体 (BD Biosciences)

4. 研究成果

(1) 腎癌 PDX マウスの作製

腎癌術後検体を免疫不全マウスに移植して PDX マウスの作製を行った。腫瘍が形成されたマウスを用いて、腫瘍の継代移植も進めた。図 1 には、腎摘除術+腫瘍塞栓摘除術をされた 86 歳女性の腎癌組織 (cT3bNOM0、グレード 3) の組織を示す。細胞質の染色性がない典型的な淡明型腎細胞癌 ccRCC 像である。この検体を免疫不全マウスに移植し、3 回まで継代して摘出して組織染色を行った結果を図 2 に示す。組織型が少し異なっていることが分かる。継代 3 回目 (P3) の四角で囲った部分の拡大像を図 3 に示す。明らかに核は大小不同で、異型性も確認できる。これは一般的により悪性度の高い癌で認められる組織像である。この結果は、マウスでの継代により選択圧がかかり、より悪性度の高い

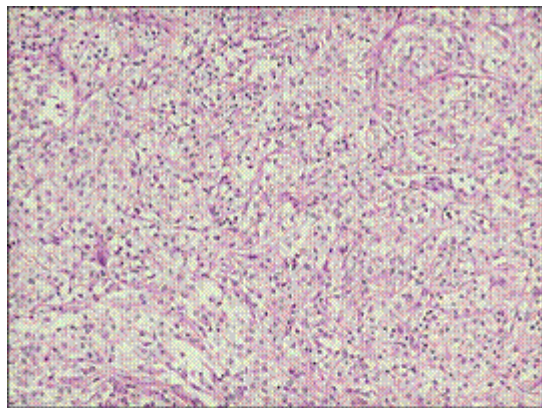


図 1 腎癌術後検体の組織染色

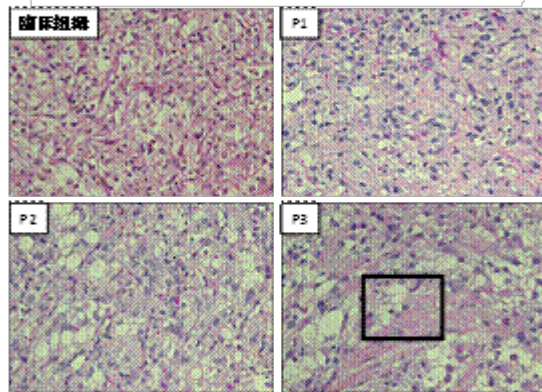


図 2 術後検体と 3 回までの継代腫瘍

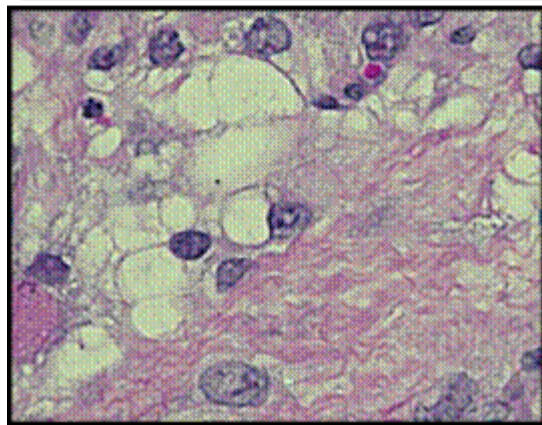


図 3 継代 3 回目の腫瘍組織の拡大図

腎癌細胞が増殖したことを示唆するものである。

(2) 腎癌 PDX マウス

腎癌術後検体のマウス継代移植作成状況を図4に示す。全部で11種のPDXマウス作製が出来ている。また継代12回目(P12)まで完了した腫瘍も取得できた。これにより、さらなる詳細な解析と腎癌創薬モデルマウ

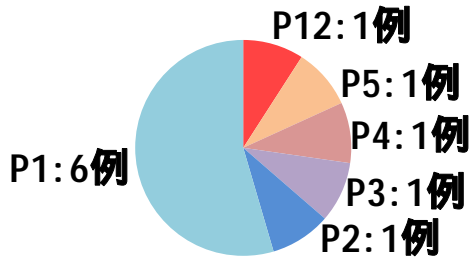


図4 腎癌 PDX マウスの作製状況
スへの応用が期待できるようになった。

(3) 腎癌で高発現する遺伝子 LOXL2 の同定

腎癌術後検体を用いた mRNA の網羅的発現解析により、腎癌の悪性化に関わる遺伝子の同定を進めた。その結果、Lysyl oxidase like 2 (LOXL2) が候補遺伝子として同定できた。そこでまず ccRCC 臨床検体における LOXL2 mRNA 発現を非癌部と癌部が揃っている 31 組について real-time PCR で確認した。その結果、癌部において予想されたように有意な増加が認められた(図5)。また T 分類、Stage、Grade の異なる 90 例の ccRCC 癌部検体を追

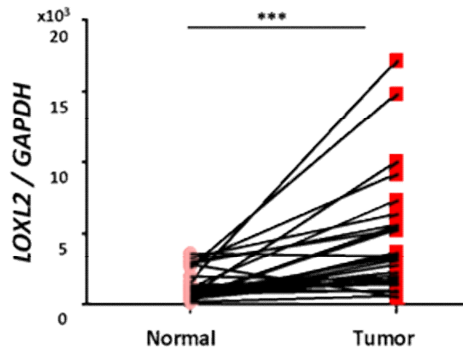


図5 LOXL2 mRNA の腎癌検体の正常部、癌部における発現解析

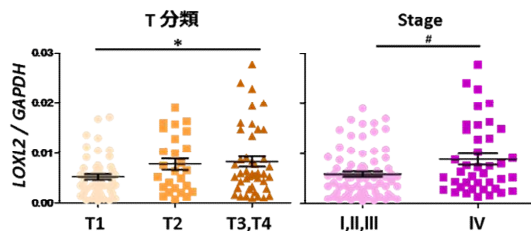


図6 腎癌術後検体の T 分類、ステージに基づく LOXL2 mRNA 発現比較

加し Real-time PCR を行ったところ、LOXL2 mRNA 発現量が、原発巣の大きさ、Stage に相関するという結果を得た(図6)。これらの結果より、LOXL2 が ccRCC の腫瘍増大や浸潤転移に寄与することが示唆された。

(4) LOXL2 の機能解析

LOXL2 は腎癌で高発現し、その発現と悪性度が相関する。そこで LOXL2 の機能を解明するために siRNA と腎癌細胞 786-O 用いたノックダウン実験を行った。その結果、腎癌細胞の遊走能(図7A)、浸潤能(図7B)が抑制されることが分かった。よって腎癌細胞において LOXL2 はこれらの機能を促進させることにより悪性化に寄与している可能性が示唆された。

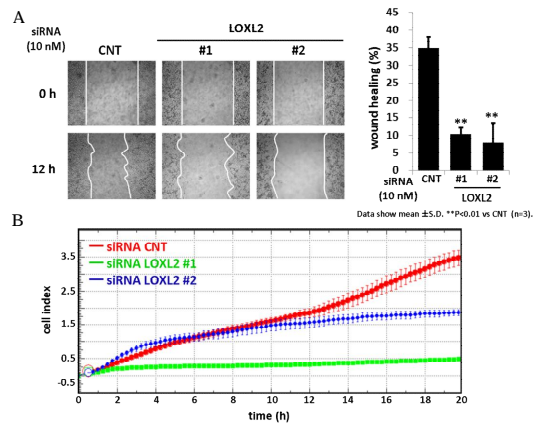


図7 腎癌細胞 786-O における LOXL2 siRNA の遊走能(A)、浸潤能(B)に対する作用解析

(5) LOXL2 の腎癌細胞遊走能、浸潤能促進作用機序の解析

siRNA を用いた実験により、LOXL2 が腎癌細胞の遊走能、浸潤能を制御していることが明らかになった。そこで、その機序を解明する目的で、マイクロアレイデータ解析結果に基づきインテグリンファミリーに焦点を当てた。そこでその発現を western blot により解析した結果、インテグリン V、3 の顕著な発現低下が認められた(図8)。

LOXL2 ノックダウンにより見られた表現型とインテグリン 5 発現の関連性を評価するため、インテグリン 5 ノックダウン実験を行った。その結果、インテグリン 5 ノックダウンにより LOXL2 ノックダウン時と同

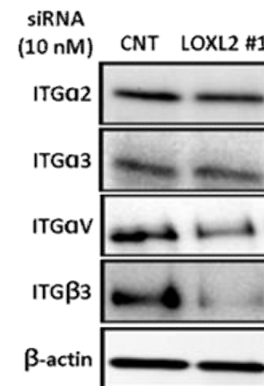


図8 LOXL2 siRNA による 786-O 細胞のインテグリン発現

様に増殖能に変化は認められなかったが、遊走能が有意に低下した (図 9)。これらの結

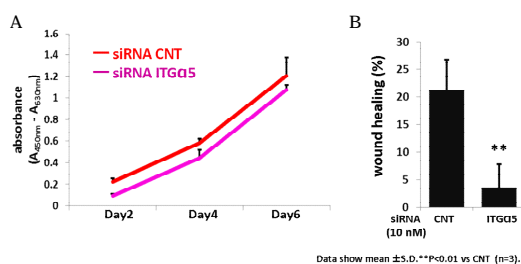


図 9 インテグリン 5 ノックダウンによる細胞増殖 (A)、遊走 (B) に対する影響

果より、LOXL2 ノックダウン時に見られた細胞形態や遊走能についてはインテグリン 5 を介していることが示唆された。そこで、ccRCC 臨床検体を用いてタンパク質レベルで、LOXL2 やインテグリンの発現を検証した。その結果、LOXL2、インテグリン 5 は grade に相関して増加する発現パターンを認めた (図 10)。この結果は、腎癌において LOXL2 高発現はインテグリン 5 の発現促進を誘導し、それを介した遊走能の促進、つまり悪性化に寄与していることが示された。

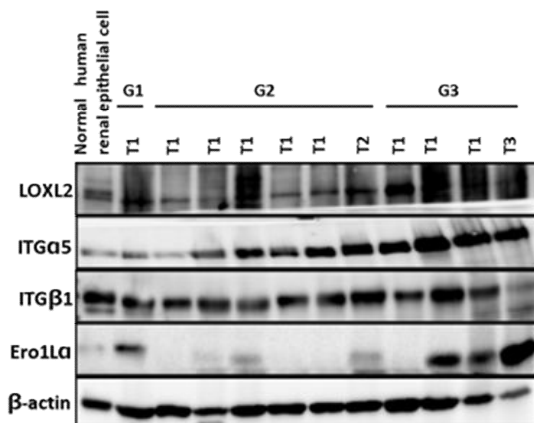


図 10 腎癌臨床検体における LOXL2、インテグリンのタンパク質発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Jingushi K, Ueda Y, Kitae K, Hase H, Egawa H, Ohshio I, Kawakami R, Kashiwagi Y, Tsukada Y, Kobayashi T, Nakata W, Fujita K, Uemura M, Nonomura N, Tsujikawa K.

miR-629 Targets TRIM33 to Promote TGF /Smad Signaling and Metastatic Phenotypes in ccRCC. Mol Cancer Res., 査読有, 13(3):2015, 565-74, (2015). doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0300.

Hase H, Jingushi K, Ueda Y, Kitae K, Egawa H, Ohshio I, Kawakami R, Kashiwagi Y, Tsukada Y, Kobayashi T, Nakata W, Fujita

K, Uemura M, Nonomura N, Tsujikawa K. LOXL2 status correlates with tumor stage and regulates integrin levels to promote tumor progression in ccRCC. Mol Cancer Res., 査読有, 12(12), 2014:1807-17. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0233.

〔学会発表〕(計 3 件)

廣瀬 遼, 神宮司 健太郎, 江川 博, 川上 竜司, 塚田 陽平, 柏木 悠里, 小林 巧明, 北惠 郁緒里, 上田 裕子, 深田 宗一郎, 中田 渡, 藤田 和利, 植村 元秀, 野々村 祝夫, 辻川 和文, 「泌尿器科癌 PDX モデルマウスを用いた 癌悪性化メカニズムの解析」, 日本薬学会第 135 年会、デザイン・クリエティブセンター神戸、2015 年 3 月 26 日

柏木 悠里, 長谷 拓明, 神宮司 健太郎, 上田 裕子, 北惠 郁緒里, 中田 渡, 藤田 和利, 植村 元秀, 野々村 祝夫, 辻川 和文, 「淡明細胞型腎細胞癌において高発現する miR-122 の機能解析」, 日本薬学会第 134 年会、熊本大学、2014 年 3 月 29 日

神宮司 健太, 上田 裕子, 川上 竜司, 辻川 和文, 「淡明細胞型腎細胞癌における miR-629 の高発現と核酸創薬に向けた機能解析」, 第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会、国立京都国際会館、2013 年 6 月 13 日

〔その他〕

ホームページ等：
<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b008/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻川 和文 (TSUJIKAWA, Kazutake)
大阪大学薬学研究科・教授
研究者番号：10207376

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

野々村 祝夫 (NONOMURA Iwao)
大阪大学医学系研究科泌尿器科・教授
研究者番号：30263263

植村 元直 (UEMURA Motonao)
大阪大学医学系研究科泌尿器科・教授
研究者番号：40631015

藤田 和利 (FUJITA Kazutoshi)
大阪大学医学系研究科泌尿器科・教授
研究者番号：50636181