

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830090

研究課題名(和文) 新規高血圧関連遺伝子HCaRGは腎細胞癌の腫瘍形成を抑制する

研究課題名(英文) Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG) inhibits ErbB receptor-driven kidney cancer growth

研究代表者

松田 裕之 (MATSUDA, Hiroyuki)

日本大学・医学部・研究医員

研究者番号：10646037

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)：高血圧症や糖尿病は臓器障害を引き起こすだけでなく、腎癌の独立した危険因子であることが報告されているが、その成因は明らかになっていない。HCaRGは腎尿細管に強く発現し、障害後の再生をコントロールしている。このHCaRGを高発現させた腎細胞癌細胞では、癌細胞の増殖が抑制され、プログラム細胞死が増加していた。この細胞をマウスの皮下に移植したところ、HCaRGは腫瘍の増大や血管新生を抑制した。高血圧病態下の腎臓は常にストレスを受けており修復のために常にHCaRGの発現が亢進している。しかし、HCaRGの発現が低下した場合には、HCaRGによる修復作用が失われ腎細胞癌のリスクが高まると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG) is mainly expressed in renal proximal tubules and its overexpression in transgenic mice reduces mortality after acute kidney injury. We demonstrate that HCaRG overexpression in mouse RCC cells led to smaller tumor size with less tumor vascularization in a homograft tumor model. Cancer cells overexpressing HCaRG maintain a more differentiated phenotype, thus delaying cell-cycle progression. Additionally, several cells undergo necroptosis with mitotic catastrophe in parallel, occurring independently of apoptosis. Mechanistically, HCaRG promotes de-phosphorylation of HER2/ErbB2, which is mediated by epigenetic gene silencing of EGFR and ErbB3 via promoter methylation. As a result, downstream MAPK and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways are inactivated. Taken together, our data suggest a role for HCaRG in the inhibition of tumor progression as a natural inhibitor of the ErbB signals in kidney cancer.

研究分野：腎臓病

キーワード：HCaRG 腎細胞癌 間葉上皮移行 プログラム細胞死 ErbB受容体

1. 研究開始当初の背景

日本の高血圧症患者は 3000 万人を超え、高血圧症は心血管系臓器障害および腎臓障害を引き起こすことが知られている。高血圧症性腎臓障害の予防・治療にはレニン・アンジオテンシン系抑制薬が広く使用されており、臓器障害の原因遺伝子を標的とした遺伝子治療薬の研究も行われている。また、高血圧症は腎臓の独立した危険因子であることが最近までに報告されている。欧州やアジアで行われた大規模な疫学調査により、高血圧症患者は正常血圧の人と比べて 2~4 倍も腎細胞癌のリスクが高いということが明らかになっている。しかし、なぜ高血圧症が腎細胞癌を引き起こすのか、明確な成因はまだ明らかになっていない。

Hypertension-related, Calcium-regulated gene (HCaRG/COMMD5)は、Montreal 大学の Tremblay 教授らのグループにより 2000 年に初めて報告された新規遺伝子である。HCaRG は特に遺伝的高血圧動物の腎尿細管に強く発現しており、培養細胞の実験において腎臓の細胞の増殖・分化・移動などに関与していることが報告されている。HCaRG を尿細管に高発現させた遺伝子改変マウスでは、HCaRG が急性腎障害後の尿細管の修復を促進させていることが分かっている(引用文献 1)。急性腎不全モデルの一つである腎虚血・再灌流障害モデルを用いたこの実験において HCaRG は、① HCaRG 高発現遺伝子改変マウスの腎障害後の生存率を 2.5 倍も野生型マウスと比べて改善させ、② 腎障害を組織学的にも、腎機能的にも野生型マウスに比べて速やかに改善させ、③ 細胞増殖停止やアポトーシスなどの細胞増殖サイクルを制御する p53 経路とは独立した p21 の発現を誘導し、虚血により障害を受け脱分化した尿細管上皮細胞の細胞増殖を抑制し、再分化を促進させた。これらの結果より、HCaRG は生体内でも尿細管上皮細胞の分化・成熟化を促し、細胞増殖を抑制していることが明らかになった。

癌細胞に共通な主な特徴として、① 無秩序な細胞増殖、② 増殖抑制に対する抵抗性、③ 細胞の不死化、④ 血管新生の誘導、⑤ 細胞浸潤・移動の亢進などが挙げられる。尿細管上皮から発生し腎臓の約 80%を占める腎細胞癌群の HCaRG レベルは、正常腎群に比べて明らかに低下している。これらの知見より、高血圧病態下の腎臓は常にストレスを受けており修復のために HCaRG の発現が亢進しているが、遺伝的要因など何らかの原因で HCaRG の発現が低下した場合に、HCaRG による細胞のコントロールが失われ腎臓障害や腎細胞癌のリスクが高まるのではないかと推測した。

2. 研究の目的

本研究は、HCaRG の腎細胞癌における抗腫瘍効果を検討し、HCaRG を利用した新しい腎細胞

癌の予防や治療薬への臨床応用に展開するための研究基盤を確立することである。具体的な研究項目は、(1) HCaRG の癌細胞の増殖・細胞周期、プログラム細胞死、移動・浸潤に与える影響、(2) 腫瘍形成を抑制するメカニズム・シグナル伝達経路の解明 (3) 癌モデル動物を用いた生体内における HCaRG の腫瘍形成(腫瘍の増大、血管新生、転移など)抑制効果と予防効果を検証する事である。

3. 研究の方法

(1) HCaRG の細胞増殖、細胞周期に対する影響とその作用メカニズムの解明

Montreal 大学の Tremblay 教授より提供を受けた HCaRG 発現ベクターを用いてマウス腎細胞癌細胞株(Renca 細胞)に HCaRG を高発現させた HCaRG-Renca 細胞を確立した。コントロールにはコントロールベクターを導入したコントロール-Renca 細胞を用いた。癌細胞の増殖は細胞増殖アッセイキットを用いて検討し、細胞周期はフローサイトメーターを用いて分析することで、HCaRG が細胞周期のどこで作用し細胞増殖を抑制しているのかを明らかにした。また、これまでに HCaRG-Renca 細胞では、腫瘍形成の主要なシグナル伝達系である RAS/MAP キナーゼ経路や PI3 キナーゼ/Akt 経路の活性が抑制されており、上流の ErbB 受容体の発現や活性が HCaRG により抑制されたことによるものであることを明らかにしてきた。そこでクローニングした ErbB 受容体のプロモーターを用いて、プロモーター活性に与える HCaRG の影響を検討した。また HCaRG は細胞の分化を誘導するので(引用文献 1)、同時に癌細胞における間葉上皮移行なども検討した。

(2) HCaRG のプログラム細胞死誘導の作用機序の解明

これまでに HCaRG がアポトーシスに影響を与えない事を明らかにしてきた(引用文献 1)。そこで、アポトーシス以外のプログラム細胞死について腎細胞癌細胞を用いて検討した。方法としては低酸素下や低栄養下での、オートファジーによる細胞死や、ネクローシスについて分析した。

(3) HCaRG の細胞移動・浸潤に対する作用の検討

癌細胞の特徴の一つである細胞浸潤、移動の亢進について HCaRG-Renca 細胞を用いて検討を行った。細胞移動については創傷治癒実験を、細胞浸潤についてはマトリゲルチャンバーを用いて評価した。

(4) HCaRG を導入した腎細胞癌細胞を用いた HCaRG の腫瘍形成に対する影響

HCaRG-Renca 細胞またはコントロール-Renca 細胞を同種のマウスの皮下に移植し、腫瘍の増大を観察した。腫瘍の大きさは週に 2 回ノギスを用いて計測し、4 週間後に腫瘍を摘出

した。RAS/MAP キナーゼ や PI3 キナーゼ/Akt 経路などの遺伝子発現を Real-time PCR 法、ウェスタンブロット法、免疫染色法を用いて検討した。血管新生については、PI3 キナーゼ/Akt 経路の下流にあり血管内皮細胞増殖因子である VEGF の血液中濃度を ELISA 法で測定し、造血幹細胞マーカでもある CD34 を用いて摘出した腫瘍内の新生血管を免疫染色法にて評価した。

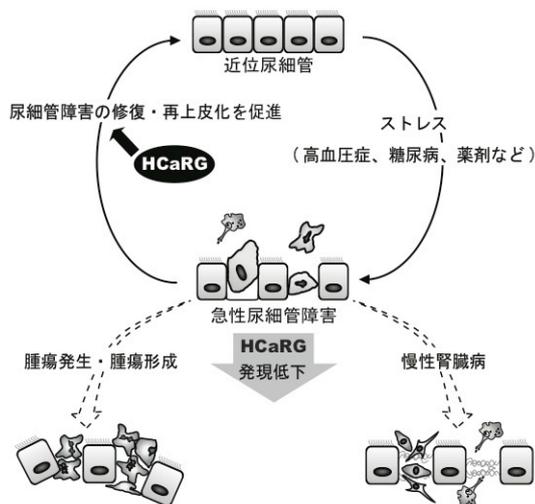
4. 研究成果

当施設附属病院で腎癌摘出手術を受けられた患者の腎尿管において HCaRG の発現が低下していた腎癌患者の腫瘍径は、HCaRG の発現が高かった患者の腫瘍径よりも明らかに大きく、予測される予後も悪化していた。そこで、腎細胞癌に対する HCaRG の抗腫瘍効果を明らかにするため HCaRG を高発現させた腎細胞癌細胞株 (Renca 細胞) を用いて、腫瘍細胞の表現型、増殖、プログラム細胞死について検討した。HCaRG は、p21 を介し腫瘍細胞の間葉上皮移行を促進した。その結果、細胞周期の進行がコントロール細胞に比べて約 3 倍遅くなり、結果的に細胞増殖が抑制されていた。さらに HCaRG はアポトーシスに関与しないが、分裂期細胞死を伴ったネクロトーシスを誘導することが分かった。腎細胞癌細胞における HCaRG は、腫瘍細胞の増殖を抑制し、Type III プログラム細胞死を誘導することで、腫瘍の成長を抑制する効果を示すことが明らかになった。一方で、腎細胞癌細胞の移動能を促進し、腫瘍細胞の浸潤能を高めていることも確認された。しかし、同じように HCaRG が腫瘍の成長抑制効果を示した皮膚癌の細胞では、癌細胞の移動能や浸潤能は抑制されており、癌の転移に与える HCaRG の影響については今後更なる検討が必要であると考えられた。

次に、HCaRG 高発現腎細胞癌細胞をマウスの皮下に同種移植したところ、HCaRG は生体内においても腫瘍形成を抑制することが分かった。また、CD34 陽性の腫瘍内血管の新生も抑制することが分かった。更に、新しい腎癌治療法開発のための新たな分子標的探索のため、腫瘍形成に関わるシグナル伝達系の解析を進めた。HCaRG は EGFR と ErbB3 のプロモーター領域の hypermethylation を介して、これらの ErbB 受容体の発現を抑制し、多くの悪性腫瘍でその過剰発現が報告され、癌治療の標的分子とされている HER2/ErbB2 の活性化を低下させていることが分かった。これらの受容体の下流にある RAS/MAP キナーゼや PI3 キナーゼ/Akt/mTOR 経路の活性化も抑制されていることが分かった。

高血圧や糖尿病病態下の腎臓は常に障害を受けており、このような腎臓では尿管修復のために HCaRG の発現が亢進していると考えられる。しかし、遺伝的な要因や過度な障害で HCaRG の発現が低下した場合に、HCaRG による尿管上皮細胞の修復作用が失われ、

不完全な細胞修復により慢性腎臓病や腎細胞癌のリスクが高まるのではないかと考えられた。



今後、正常尿管における HCaRG の発現を高めることができれば、慢性腎臓病や腎癌の新たな予防法につながるのではないかと期待された。現在、これらの研究成果をまとめ、論文投稿中である。

<引用文献>

1. Matsuda H, Lavoie JL, Gaboury L, Hamet P, Tremblay J. HCaRG accelerates renal tubular repair after ischemia kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2011, 22 ;2077-2089.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Hiroyuki Matsuda, Pavel Hamet, Johanne Tremblay. Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG/COMMD5) and kidney diseases: HCaRG accelerates tubular repair. *J Nephrol.* 査読有, 2014, 27(4):351-60.

[学会発表] (計 7 件)

1. 池田 迅、松田裕之、福田昇、相馬正義、Pavel Hamet, Johanne Tremblay. 正常尿管に発現する HCaRG は尿管の修復を促し、腫瘍形成を抑制する: 第 58 回日本腎臓学会学術総会、名古屋国際会議場 愛知県名古屋市、2015. 6. 7

2. 池田 迅、松田裕之、藤原恭子、Suzanne Cossette, Louis Gaboury, 山口健哉、福田 昇、相馬正義、Pavel Hamet, Johanne Tremblay. 高血圧関連遺伝子 HCaRG の腎細胞癌における予後予測因子として有用性と腫瘍形成抑制作用: 第 50 回 高血圧関連疾患モデル学会学術総会、和歌山県立医科大学 和歌山県和歌

山市、2014. 12. 05

日本大学・医学部・研究医員
研究者番号：10646037

3. 松田裕之、福田昇、相馬正義、Pavel Hamet, Johanne Tremblay. HCaRG は腎細胞癌の増殖を抑制する：高血圧症と腎癌発症リスクの新たな関連性：第 57 回 日本腎臓学会学術総会、パシフィコ横浜 神奈川県横浜市、2014. 7. 6

4. 松田裕之、Julie L. Lavoie、Suzanne Cossette、Pavel Hamet、Johanne Tremblay. Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG/COMMD5) accelerates the regeneration of renal tubular epithelial cells after acute renal injury: 第 2 回 IRG Meeting、品川プリンスホテル 東京都港区、2014. 01. 18

5. 松田裕之、藤原恭子、Suzanne Cossette、Louis Gaboury、山口健哉、福田昇、相馬正義、Pavel Hamet、Johanne Tremblay. 新規高血圧関連遺伝子 HCaRG は腎細胞癌の形成を抑制する：高血圧症と腎癌発症リスクの新たな関連性：第 36 回 日本高血圧学会学術総会、大阪国際会議場 大阪府大阪市、2013. 10. 24

6. 松田裕之、Julie L. Lavoie、Suzanne Cossette、Louis Gaboury、福田昇、相馬正義、Pavel Hamet、Johanne Tremblay: 高血圧関連遺伝子 Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG/COMMD5) は急性腎障害後の尿細管上皮の修復を促進させる：第 49 回 高血圧関連疾患モデル学会学術総会、日本大学会館 東京都千代田区、2013. 09. 07

7. 松田裕之、藤原恭子、Suzanne Cossette、Louis Gaboury、山口健哉、福田昇、相馬正義、Pavel Hamet、Johanne Tremblay. 新規高血圧関連遺伝子 HCaRG は腎細胞癌の形成を抑制する：A novel link between hypertension and risk of kidney cancer: 第 49 回 高血圧関連疾患モデル学会学術総会、日本大学会館 東京都千代田区、2013. 09. 06

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

研究代表者

松田 裕之 (MATSUDA, Hiroyuki)