

新規腎保護因子HCaRG/COMMD5を標的とした 腎臓病及び腎癌の治療法の開発

松田裕之¹⁾, 舩廣善和²⁾

The therapeutic development targeting HCaRG/COMMD5 for kidney injuries and kidney cancers

Hiroyuki MATSUDA¹⁾, Yoshikazu MASUHIRO²⁾

要旨

Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG) は主に腎尿細管に強く発現し、腎虚血障害後の治癒過程において、尿細管上皮細胞の再分化を促進し、尿細管の治癒を促す分子である。今回、HCaRGの尿細管保護メカニズムを解明するために、近位尿細管特異的HCaRG高発現マウスを用いてシスプラチン腎症を作製し、実験を行った。HCaRG高発現マウスでは、シスプラチン投与後の腎機能障害・尿細管組織障害・アポトーシスが、野生型マウスに比べ有意に軽減されており、E-cadherinの発現は保たれていた。さらに、HCaRGは近位尿細管だけでなく、遠位尿細管の障害も抑制されていた。以上より、近位尿細管におけるHCaRGは、直接近位尿細管上皮細胞の保護・修復を促進するだけでなく、遠位尿細管の障害を軽減し、遠位尿細管による近位尿細管修復機構の維持に寄与することで、尿細管の恒常性を保ち、腎障害や癌の進展を抑制していると考えられた。

1. 緒言

日本における高血圧症、糖尿病、高脂血症患者を合わせると、延べ9000万人以上と言われ、これらの生活習慣病は心血管系臓器障害や腎臓障害を引き起こすことが知られている。特に、進行性腎臓障害は、未だ有効な治療法が確立されていないアンメット・メディカル・ニーズ疾患である。また、生活習慣病の患者は、2～4倍も腎癌のリスクが高く、腎癌の危険因子であることが報告されている。

Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG/COMMD5) は、Montreal大学のTremblay教授らにより2000年に初めて報告された新規遺伝子で、腎臓の尿細管に強く発現しており、細胞の増殖・分化・移動などに関与している¹⁾。近位尿細管特異的HCaRG高発現遺伝子改変マウスを用いて行われた腎虚血再還流モデルの実験では、HCaRGはp21の発現誘導を介して、障害を受け脱分化した尿

細管上皮細胞の間葉上皮移行を促し、尿細管の修復を促進し、腎障害後の生存率を2.5倍も改善した²⁾。そこで、HCaRGの間葉上皮移行促進作用に着目し、癌細胞と正常細胞でHCaRGの発現を比べたところ、癌細胞でHCaRGの発現が低下していることが分かった。次に、腎癌患者の病理標本を用いてHCaRGの発現を解析したところ、腎癌だけでなく、腫瘍径が大きく予後不良であった患者の正常尿細管でもHCaRGの発現が低下しており、正常尿細管のHCaRGレベルが高いほど5年生存率が良いことが分かった³⁾。また、HCaRGを腎癌細胞に高発現させると、癌細胞の分化が促され、細胞周期が抑制され、細胞死が誘導された。このHCaRG高発現癌細胞を野生型マウスの皮下に移植したところ、腫瘍増大や腫瘍血管新生が抑制された。メカニズム的には、正常尿細管上皮細胞から分泌されたHCaRGが、腎癌細胞のErbB受容体の発現を抑制し、腫瘍細胞の生

1) 日本大学医学部

2) 日本大学生物資源科学部

松田裕之: hiroyuki.mazda.jpn@gmail.com

存・増殖の主要伝達経路であるMAPKやPI3K/AKTシグナルの活性化を抑制していることが明らかになった。

これらの知見から、生活習慣病患者の腎臓は、慢性的なストレスに曝されており、常に尿細管の保護と修復のためHCaRGの発現が亢進しているのではないかと考えた。そして、過度な障害による尿細管上皮細胞の脱落でHCaRGの発現が失われた場合に、尿細管上皮バリアー機構が失われ慢性腎臓病に進展し、障害細胞の癌細胞化が起こるのではないかとこの仮説を立てた。

2. 概要

HCaRGの持つ腎保護作用や発癌抑制作用を明らかにするために、HCaRGによる尿細管上皮細胞の間葉上皮移行やオートファジーの制御メカニズムの解明を目的とした。また、残腎機能を評価するバイオマーカーや、腎癌における予後予測因子としてのHCaRGの可能性を検証しようと考えた。そして、新規の分解耐性膜透過性HCaRGタンパクの利用を含め、HCaRGをターゲットとした腎臓病や腎癌の新たな診断・治療法を開発する目的で、以下の実験を計画した。

血液及び尿中HCaRGレベルと腎機能、腎癌の進展や予後との関係

これまでの研究で、正常尿細管から分泌されたHCaRGが癌の進展を抑制している可能性が示唆されたので、モデル動物やヒトの血液中や尿中のHCaRGをELISAキットを用いて測定し、腎臓組織内のHCaRG発現レベルや腎機能、病理組織像との相関を解析し、HCaRGが残腎機能や癌のリスクを評価するためのバイオマーカーとして有用であるのかを明らかにしようと試みた。

分泌型HCaRGタンパクが腎癌の進展を抑制

近位尿細管特異的HCaRG高発現マウスを用いて、マウスの腎皮膜下に癌細胞を移植し、近位尿細管上皮細胞から分泌された内因性HCaRGが、腎癌の進展を抑制するかどうかを検証した。また、HCaRGによるSphere形成の抑制が癌幹細胞の減少を引き起こし、発癌や再発のリスクが低下するのかを明らかにしようと試みた。

HCaRGが腎尿細管上皮バリアー機構を維持し、急性腎障害を抑制

虚血や薬剤曝露にさらされた尿細管では、ミトコンドリア機能不全が引き起こされ、酸化ストレスが上昇し、尿細管上皮細胞が障害を受ける。そこで、HCaRGを高発現させた細胞や、ノックダウンした細胞に、抗癌剤であるシスプラチンの投与や、過酸化水素曝露による酸化ストレス負荷を行い、尿細管上皮細胞間の構造変化やオートファジーを介したHCaRGの腎保護効果を検討した。

分解耐性膜透過性HCaRGタンパク質の合成

細胞内タンパク質安定化タグ (Stabilon) や、細胞膜透過性タグ [11R (アルギニン)] を用いることで、細胞内で安定的に発現可能なタンパク質を合成することが出来る。そこで、Stabilonや11Rを結合させた分解耐性膜透過性ヒトHCaRGタンパクの合成を行い、合成HCaRGタンパクが、尿細管上皮細胞や癌細胞内に取り込まれ、安定的に発現し、内因性HCaRGと同様に間葉上皮移行の促進やオートファジーの制御、癌細胞の増殖抑制作用などを示すのかどうかを検証し、HCaRGタンパクを用いた治療の可能性を探索する計画を予定した。

3. 方法及び結果

血液及び尿中HCaRGレベルと腎機能、腎癌の進展や予後との関係

これまでの研究では、腎細胞癌の摘出手術を受けた患者の病理標本でHCaRGの発現を比較すると、正常尿細管でHCaRGの発現が高い患者群では、HCaRGの発現が低下している患者群よりも手術時の腫瘍径が小さく予後も良好であった (図1, 2)³⁾。また、尿細管上皮細胞株の培養液中でHCaRGタンパク分泌されていることが確認され、正常尿細管から分泌されたHCaRGが、癌の進展を抑制している可能性が示唆された。今回、薬剤性腎障害モデルや糖尿病性腎症モデルのマウスの血液や尿検体を用いてHCaRGを測定し、HCaRGと残腎機能の関係を明らかにしようと試みた。薬剤性急性腎障害モデルとして、抗がん剤であるシスプラチンをHCaRG高発現遺伝子改変マウスに腹腔内投与 (20 mg/kg) し、腎障害の程度を確認した。シスプラチン投与5日後の血清クレアチニンは、HCaRG高発現マウスで $0.70 \pm 0.34SD$ mg/dl、野生型マウスで $2.73 \pm 0.96SD$ mg/dlと有意 ($P < 0.01$) な低下が見られた。組織学的にも尿細管障害は、野生型マウス (non-Tg mice) に比

べHCaRG高発現マウス (HCaRG-Tg mice) において軽減されていた (図3)。

腎組織中のHCaRG発現は尿細管上皮細胞の脱落とともに低下していた。現在、これらのマウスの血液・尿サンプルを回収し、市販のELISAキットを用いたHCaRGタンパクの測定を検討している。次に、ストレプトゾシンを用いてI型糖尿病マウスを作製

した。糖尿病性腎症の発症を確認するため、ストレプトゾシン投与6ヶ月後に血清クレアチニン及び、尿中タンパク、微量アルブミンの測定を行ったところ、血糖値の上昇は継続していたが、腎機能の悪化や尿中タンパクの上昇は認めなかった。現在、ストレプトゾシンを投与し、糖尿病発症後12ヶ月経過したマウスでの評価を行っている。

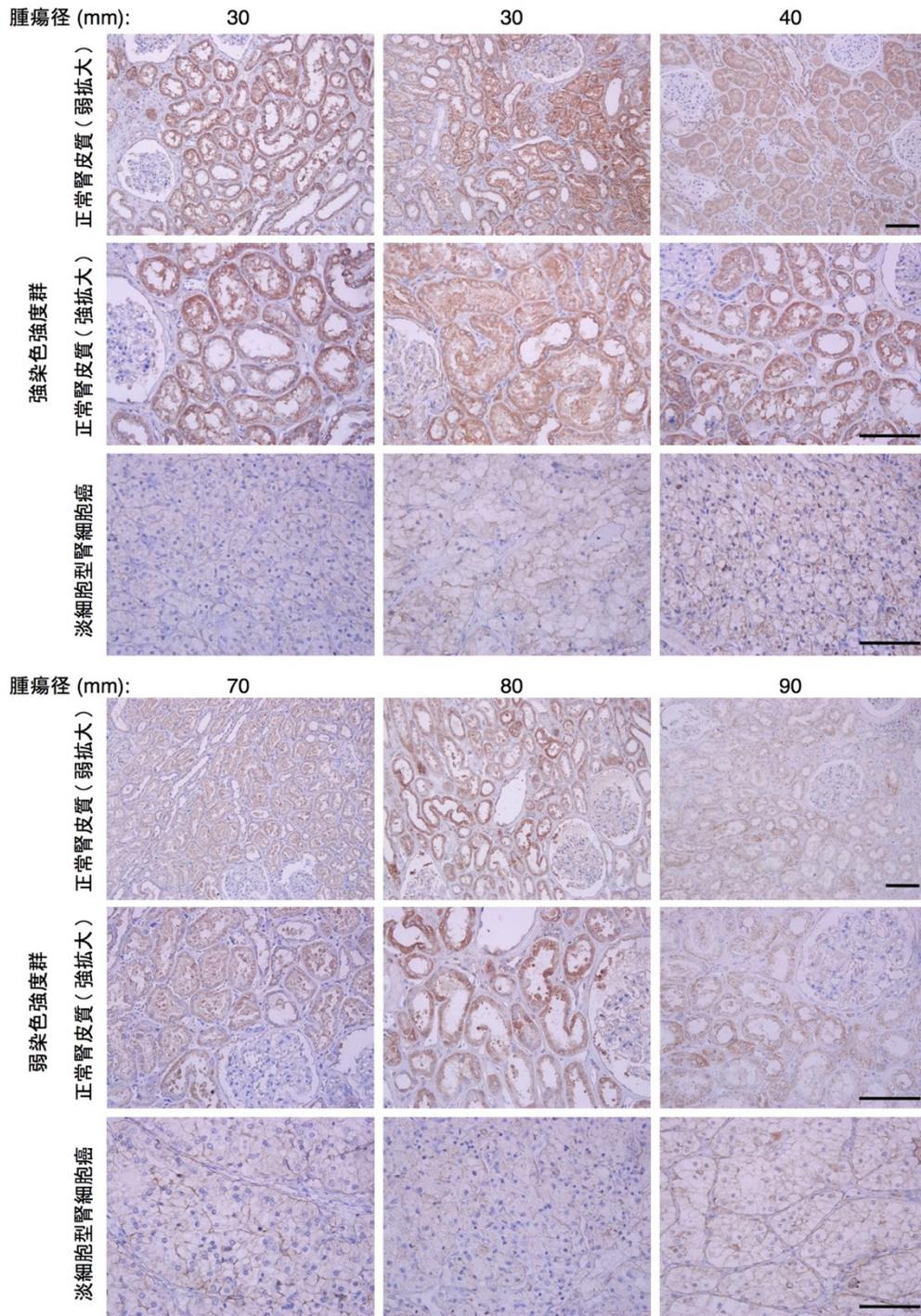


図1 淡明細胞型腎細胞癌患者の腎細胞癌と正常腎皮質におけるHCaRG免疫組織染色像³⁾。Scare bar = 0.1 mm。

また、残腎機能を評価するためのバイオマーカー、及び腎細胞癌の予後予測因子や、術後の腎細胞癌の再発リスクを評価するバイオマーカーとしての有用性を検討するために、日本大学医学部附属板橋病院と研究協力施設において、腎機能障害の患者

及び、腎癌にて手術を受けた患者約130名の同意を得、血液・尿検体をこれまでに確保した（臨床研究RK-170912-4）。今後、これらのヒト検体においてもHCaRGタンパクの測定を行い、臨床上有用なバイオマーカーとして可能性を検証する予定である。

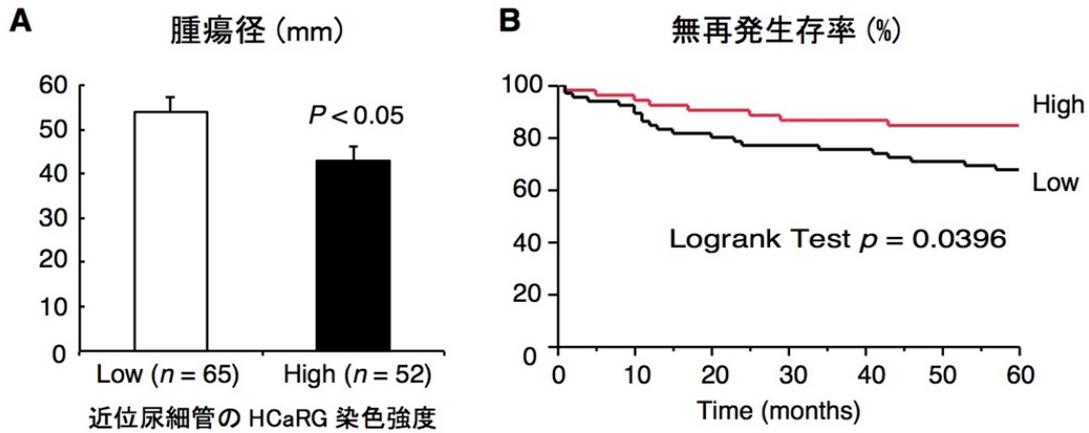


図2 近位尿細管におけるHCaRG高発現群では、腫瘍径は小さく、予後も改善³⁾。
A) 正常近位尿細管におけるHCaRG高発現群 (High) では低発現群 (Low) に比べ、腫瘍径は有意に小さかった。B) HCaRG高発現群 (High) では低発現群 (Low) に比べ、5年無再発生存率は有意に改善していた。

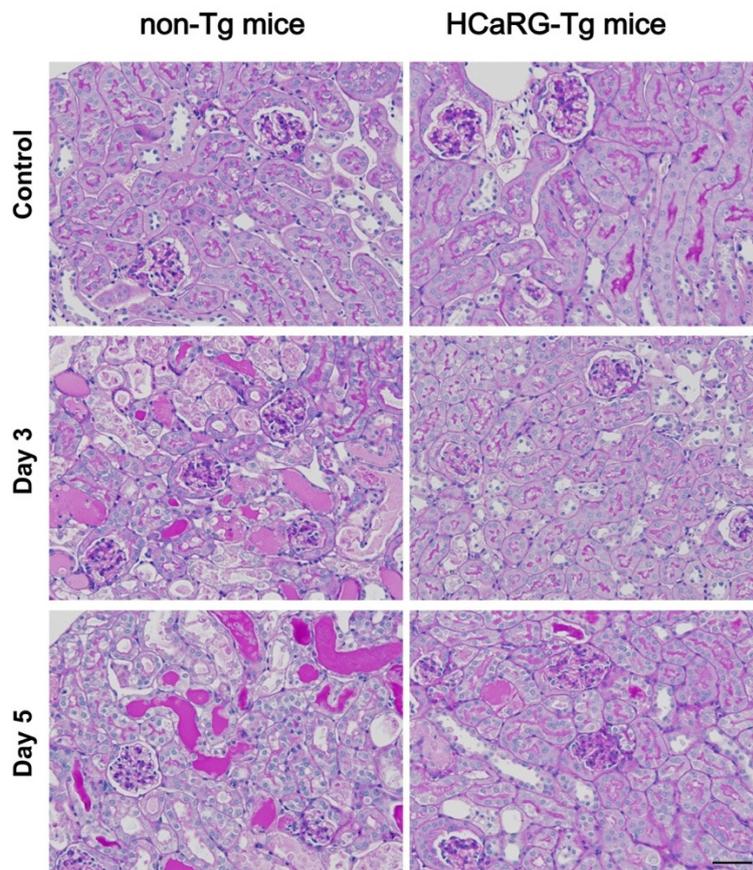


図3 HCaRG高発現遺伝子改変マウスを用いたシスプラチン腎症モデルの腎臓のPAS。(Periodic acid-Schiff) 染色像。
Scare bar = 0.1 mm.

分泌型HCaRGタンパクが腎癌の進展を抑制

これまでの研究で、HCaRGを遺伝子導入した癌細胞を野生型マウスの皮下に同種移植すると、腫瘍の増大や腫瘍血管新生が抑制されることが明らかになっている³⁾。この研究の中で、正常尿細管上皮細胞から分泌されたHCaRGタンパクが、癌細胞のEGFRを含むErbB受容体ファミリーの発現を抑制している可能性を示した。今回、内因性HCaRGが、細胞骨格の構成因子であるアクチンとRab5に結合し、EGFRの細胞内輸送及びリサイクリングをコントロールしていることを報告した⁴⁾。次に、分泌型HCaRGが癌の発生・維持や、再発・治療抵抗性に関係しているとされる癌幹細胞にも作用し、癌抑制効果を示しているのかを検討した。癌細胞株にHCaRGを遺伝子導入し、腎癌の癌幹細胞表面マーカーであるCD133の陽性細胞数の変化を測定したが、同定することが出来なかった。そこで、腎癌幹細胞の評価を、Sphere formation assayとAldehyde Dehydrogenase (ALDH) activity assayの組み合わせを用いて行った。HCaRG導入癌細胞や、分泌型HCaRGタンパクを多く含む培養液中で培養した癌細胞では、コントロール細胞に比べSphere形成が抑制され、HCaRGノックダウン癌細胞では、コントロール細胞に比べSphere形成が促進した(図4)。

さらに、HCaRG導入癌細胞では、ALDH activityが低下していた。以上の結果から、内因性HCaRG及び、尿細管上皮細胞から分泌されたHCaRGは、培養細胞実験において腎癌幹細胞を減少させる効果があることが明らかになった(論文投稿準備中)。今後、腎細胞癌で手術を受けた患者の病理標本を用いて、正常尿細管におけるHCaRG発現と癌幹細胞の関係を免疫染色法にて検証する予定である。

生体内における分泌型HCaRGの癌抑制効果を検討するために、HCaRG高発現遺伝子改変マウスの腎皮膜下にマウス癌細胞株であるRenca細胞を移植した。腫瘍形成を確認するために、先行実験として野生型マウスの腎皮膜下に異なる細胞数のRenca細胞を移植したが、Renca細胞は生着しなかった。これは、使用するHCaRG高発現遺伝子改変マウスとRenca細胞のマウスの系統が異なることが原因ではないかと考えた。今後、分解耐性膜透過性HCaRGを合成した後に、Renca細胞を同系統のマウスの皮下に移植したモデルを作製し、合成HCaRGタンパ

クを投与する実験を計画している。

HCaRGは腎尿細管上皮バリアー機構を維持し、急性腎障害を抑制

これまでの研究において、HCaRGが障害により脱分化した尿細管上皮細胞の間葉上皮移行を促進することや²⁾、低栄養下ではオートファジーを誘導し、細胞の生存率を改善させることを見出している。今回、培養尿細管上皮細胞に薬剤暴露を行い、HCaRGの細胞保護メカニズムを検討した。HCaRGは、シスプラチン暴露下の尿細管上皮細胞において速やかにp21の発現を増強し、p21の発現増強後にE-cadherinの発現ピークが観察された(図5)。

この遺伝子発現の経過中、p21の転写因子の一つであるFoxOタンパクのリン酸化が抑制され、FoxOのトータルタンパク量が増加していた。HCaRGを抑制したところ、核内FoxOのリン酸化亢進により、FoxOが分解され、p21の低下によりE-cadherinの発現が抑制されていることが分かった。HCaRGをノックダウンした尿細管上皮細胞のタイトジャンクション機能を、電気抵抗指数を用いて測定すると、電気抵抗は低下していた。これらの知見から、HCaRGは、E-cadherinの発現を亢進させ、細胞間接着構造を増強し、尿細管上皮バリアー機構を強化することにより、腎障害を予防しているのではないかと考えられた。HCaRG高発現遺伝子改変マウスを使った実験では、シスプラチン投与後の腎機能・組織障害がHCaRG高発現マウスで有意に軽減されているのに加え、E-cadherinの発現は、特にHCaRG高発現マウスの遠位尿細管で保たれていた(図6)。

各尿細管セグメントの遺伝子発現を解析したところ、HCaRG高発現遺伝子改変マウスでは遠位尿細管が障害されていなかった。野生型マウスでは、 α Klothoなどの遠位尿細管由来の腎保護因子が低下していたが、HCaRG高発現マウスでは保たれていた。以上より、近位尿細管におけるHCaRGは、直接近位尿細管上皮細胞の保護・修復を促進するだけでなく、パラクリン機構により遠位尿細管の障害を軽減し、尿細管相互作用による恒常性維持に寄与し、腎障害の進展を抑制していると考えられた。今後、近位尿細管特異的HCaRGノックアウトマウスを作製し、近位尿細管由来のHCaRGに遠位尿細管保護作用があるのかどうかを検討する計画である。

また、HCaRGを遺伝子導入した尿細管上皮細胞

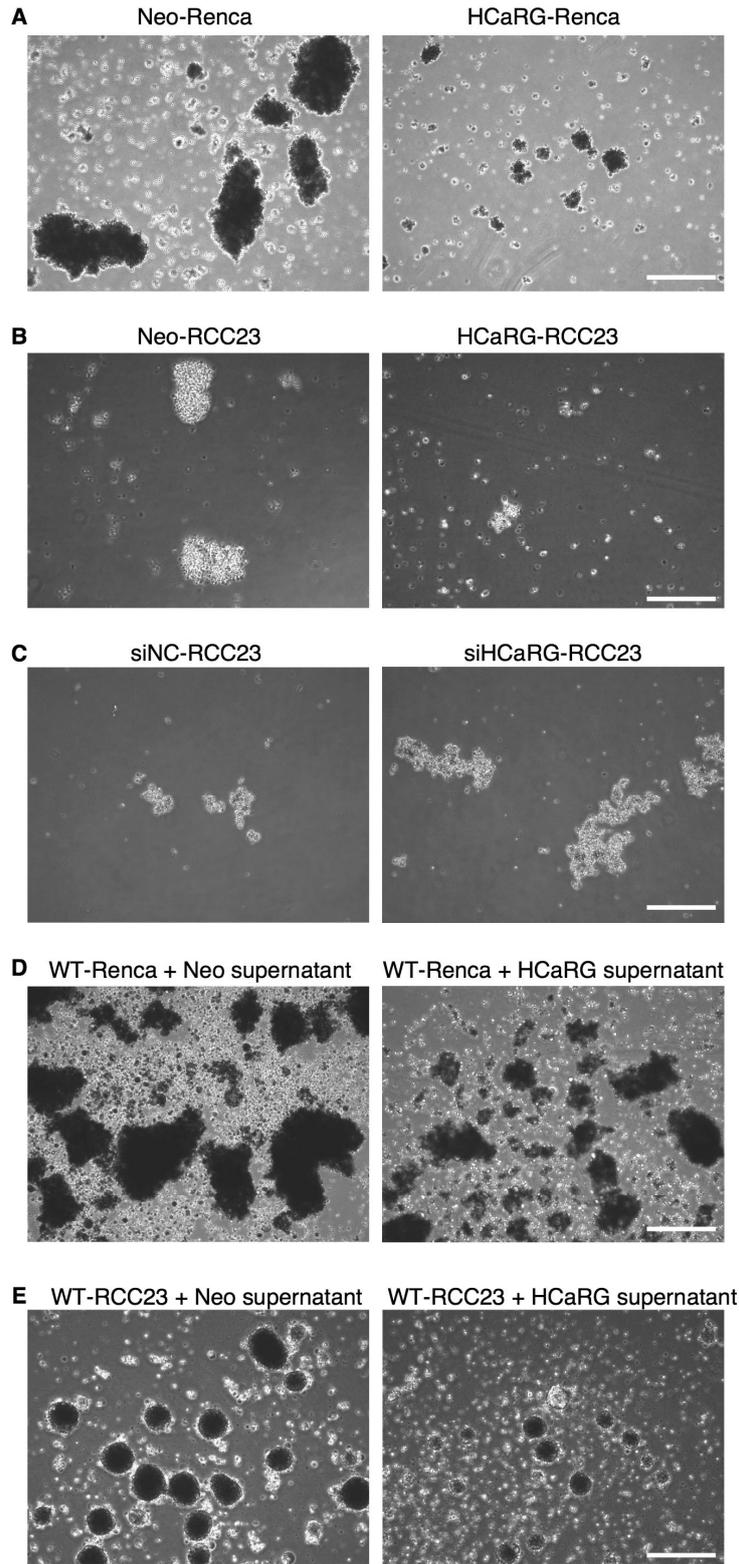


図4 HCaRGは癌細胞の Sphere 形成を抑制した。

A) HCaRG 高発現 Renca 細胞 (HCaRG-Renca) では、コントロール細胞 (Neo-Renca) に比べて Sphere 形成が抑制されていた。B) HCaRG 高発現 RCC23 細胞 (HCaRG-RCC23) でも、コントロール細胞 (Neo-Renca) に比べて Sphere 形成が抑制されていた。C) HCaRG のノックダウンを行った siHCaRG-RCC23 細胞ではコントロール細胞 (siNC-RCC23) に比べて、sphere 形成が増加していた。D) HCaRG 含有培養液中 (HCaRG supernatant) で培養された野生型 (WT) -Renca 細胞では、コントロールの培養液中 (Neo supernatant) で培養された細胞に比べて、sphere の数は少なかった。E) HCaRG 含有培養液中で培養された WT-RCC23 細胞でも、コントロールの培養液中で培養された細胞に比べて、sphere の数は少なかった。

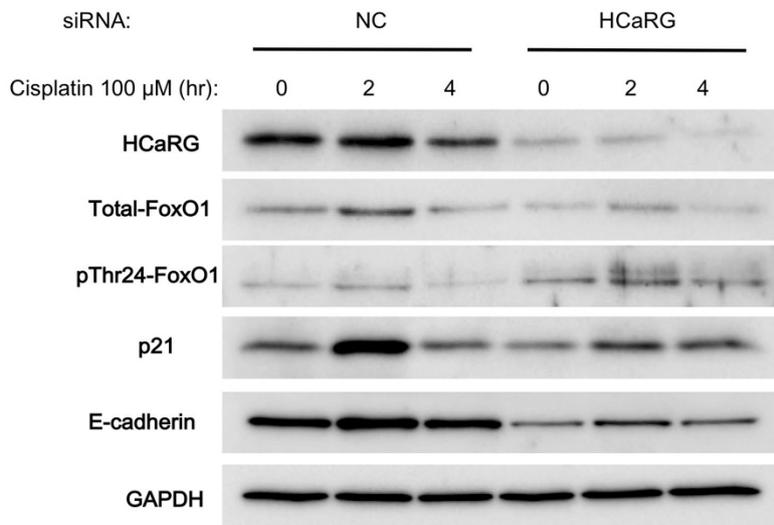


図5 尿細管上皮細胞 (HK-2) にシスプラチン処理を行った際のWestern blot像。NC細胞 (non-target controlを導入) とHCaRG細胞 (HCaRG標的siRNAを導入) を用いて経時的なタンパク発現の変化を比較した。

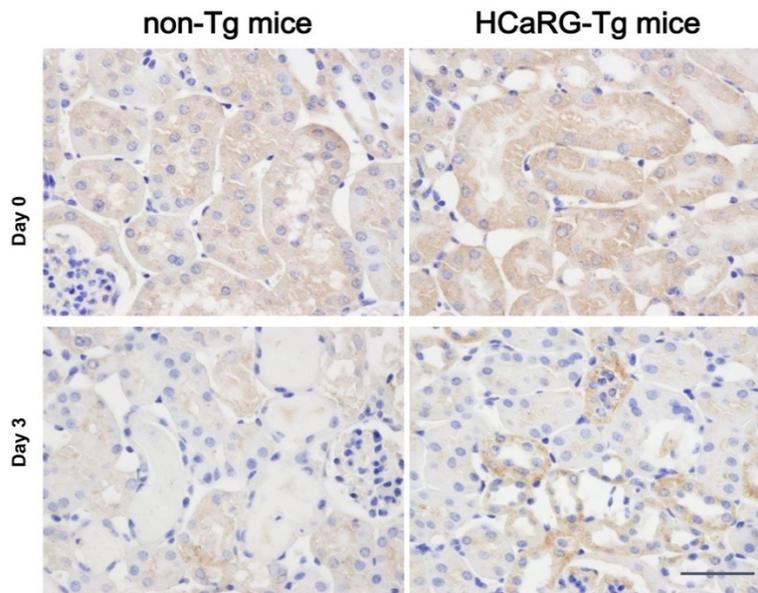


図6 HCaRG高発現遺伝子改変マウスを用いたシスプラチン腎症モデルの腎臓のE-cadherin免疫染色像。Scale bar = 0.1 mm。

に、過酸化水素処理を行い、細胞死やオートファジーに与える影響について検討した。コントロール細胞では曝露12時間後までオートファジーが遅延し、細胞死が増加していたが、HCaRGは速やかに過剰なオートファジーを抑制し、ATP産生などミトコンドリア機能を保護し、細胞生存率を改善していた。このことから、HCaRGは過剰なオートファジーを介した細胞死を抑制し、尿細管上皮細胞を保護し

ている可能性を考えた。今後、前述の遺伝子改変マウスやノックアウトマウスを用いて、HCaRGのオートファジー制御メカニズムを探索する予定である。**分解耐性膜透過性HCaRGタンパク質の合成**

HCaRGは、アクチンやRab5と相互作用があることを報告したが⁴⁾、HCaRGの相互因子や受容体の存在など、まだ明らかになっていない点が多くある。今回、HCaRGの関わる新たな伝達経路を明らかに

する目的で、HCaRGの相互因子の探索を行った。ヒトHCaRG-Flagタグ及びFlagタグ-ヒトHCaRG合成タンパク発現プラスミドを作製し、ヒト胎児腎臓由来のHEK-293細胞に遺伝子導入を行った。この遺伝子導入された細胞のタンパク質を用いて免疫沈降と質量分析を行ったところ、HCaRGの結合タンパクの候補として、新たに23のタンパク質が同定された(論文投稿準備中)。これらの候補タンパク質の中には、HCaRG以外のCOMMDファミリーや、細胞内輸送に関わるタンパク複合体、遺伝子制御に関わる核内分子などが含まれており、今後、細胞内でのHCaRGとの結合や、相互作用を検討していく計画である。さらに、現在3種類の細胞透過性ヒトHCaRGタンパク発現プラスミドを合成しており、プラスミド合成後に細胞透過性ヒトHCaRGタンパクを精製し、合成タンパク質の生理活性を確認する予定である。

4. 考察

近年、日本の人工透析患者は32万人を超え、医療費の増加は社会的問題になっている。現在、AKI to CKD progressionという考えが提唱され、末期腎不全患者を減らすために、いかに慢性腎臓病(CKD)への進行を食い止めるかということに注目が集まっている。しかしながら、可逆的と考えられていた急性腎障害(AKI)から、慢性腎臓病に進展するメカニズムについては未だ不明な点が多い。

今回我々は、近位尿細管におけるHCaRGがE-cadherinの発現を亢進させ、細胞間接着構造を増強し、尿細管上皮バリアー機構を強化することにより、近位尿細管の障害を軽減することを見出した。

また、近位尿細管の障害を軽減することで、遠位尿細管が保護され、尿細管相互作用による恒常性維持機構により急性腎障害の進展が抑制されている可能性が示唆された。そして、尿細管上皮細胞の細胞死の抑制にはHCaRGを介したオートファジーの制御が関与していると考えられた。このようなHCaRGによる尿細管の恒常性維持が、腎障害や腎癌の進展を予防しているのではないかと考えられ、今後新たな治療法の開発へと応用を目指して本研究を推進していく予定である。

謝辞

本研究の共同研究者は日本大学医学部 内科学講座総合診療学分野の池田迅先生、小笠原茉衣子先生、日本大学医学部 泌尿器科学系泌尿器科学分野の高橋悟教授、山口健哉先生、八戸学院大学健康医療学部 人間健康学科の遠藤守人教授、佐々木研究所附属 杏雲堂病院の相馬正義先生である。また本研究は、日本大学学術研究助成金[総合研究](No. 総18-013)を受けて行われた。

文献

- 1) Solban, N. *et al.* HCaRG, a novel calcium-regulated gene coding for a nuclear protein, is potentially involved in the regulation of cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **275**, 32234-32243, doi:10.1074/jbc.M001352200 (2000).
- 2) Matsuda, H., Lavoie, J. L., Gaboury, L., Hamet, P. & Tremblay, J. HCaRG accelerates tubular repair after ischemic kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 2077-2089, doi:10.1681/ASN.2010121265 (2011).
- 3) Matsuda, H. *et al.* HCaRG/COMMD5 inhibits ErbB receptor-driven renal cell carcinoma. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.18012 (2017).
- 4) Campion, C. G. *et al.* COMMD5/HCaRG Hooks Endosomes on Cytoskeleton and Coordinates EGFR Trafficking. *Cell Rep* **24**, 670-684 e677, doi:10.1016/j.celrep.2018.06.056 (2018).