

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

Phospholipase D2 promotes disease progression
of renal cell carcinoma
through the induction of angiogenin

(淡明型腎細胞癌の進展におけるホスホリパーゼ D2 の生物学的意義の検討)

2 0 1 8

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

神鳥 周也

目次

I. 序論	p.2
II. 目的	p.9
III. 対象と方法	p.10
IV. 結果	p.19
1. 淡明型腎細胞癌におけるホスホリパーゼ D の発現と臨床病理学的因子の検討	
2. 腎癌細胞の増殖・浸潤におけるホスホリパーゼ D の生物学的意義の検討	
3. 淡明型腎細胞癌の転移および予後におけるホスホリパーゼ D2 発現の意義	
4. 腎癌細胞におけるホスホリパーゼ D2 を介した腫瘍浸潤メカニズムの検討	
V. 考察	p.24
VI. 総括	p.30
VII. 謝辞	p.31
VIII. 引用文献	p.32
IX. 略語	p.42
X. 図表	p.45

I. 序論

1. 腎癌の組織型と分子生物学的特徴

腎癌は近年、国内外を問わず増加傾向にあり、成人における悪性腫瘍の約 3%を占めている^(1,2)。腎癌の主な組織型として淡明型腎細胞癌 (clear cell renal cell carcinoma: ccRCC)、乳頭状腎細胞癌、嫌色素性腎細胞癌があり、このうち ccRCC は約 80%を占める最も発生頻度の高い組織型である^(1,3)。ccRCC の発生母地は近位尿細管上皮細胞とされ、腫瘍細胞内は脂質およびグリコーゲンに富み、組織学的には淡明な細胞質を有することが特徴である。

ccRCC における重要な分子生物学的特徴として遺伝子変異、欠失および DNA メチル化による von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子の機能異常が挙げられ、約 90%の症例で認められている⁽³⁾。この VHL 遺伝子がコードする VHL タンパクは低酸素誘導因子である hypoxia inducible factor (HIF) タンパクの分解を行い、正常細胞における HIF タンパク量を制御している。しかしながら、ccRCC では VHL 遺伝子の機能異常が生じており、HIF タンパクが細胞核内に異常蓄積される。HIF により転写調節される遺伝子は 100 個以上あり、血管新生、細胞内 pH 調節、グルコース代謝、細胞の分化・接着・遊走、アポトーシスなど様々な生理機能を調整する⁽⁴⁾。ccRCC では腫瘍組織における血管新生が豊富であるが、HIF の標的遺伝子である vascular endothelial growth factor (VEGF)、

platelet-derived growth factor (PDGF) などが血管内皮細胞やペリサイトの増殖を促進し、血管の新生・成熟・維持に重要な役割を果たしている。また、HIF は 2 種類が存在し、HIF1 α と HIF2 α があるが特に HIF2 α が ccRCC の発症に多く関連しているとされている^(5, 6)。

2. 腎癌診療の現状

腎癌では限局癌（Ⅰ～Ⅲ期）の症例に対しては腎部分切除術や根治的腎摘除術といった外科的切除が標準的治療とされる。一方、診断時には約 4 分の 1 の症例が局所進行癌もしくは転移癌（Ⅳ期）であり、診断時に転移がない症例でも約 20~40%ではのちに遠隔転移が生じる⁽⁷⁾。このような根治切除不能もしくは転移再発例に対しては、分子標的治療薬やがん免疫療法などの薬物療法を中心とした治療を行う。

腎癌の薬物療法として、1980 年代にサイトカイン療法（インターフェロン α 、インターロイキン 2）が開始されたが、その奏効率は 15%前後であり、全生存期間の中央値は 18 か月程度であった⁽¹⁾。その後、ccRCC の分子生物学的特徴に基づく治療薬の開発が進み、2000 年代には血管新生阻害剤（ソラフェニブ、スニチニブ、アキシチニブ、パゾパニブ）や mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害剤（エベロリムス、テムシロリムス）など多くの分子標的治療薬が臨床応用された。一次治療として使用される血管新生阻害剤であるスニチニブやパゾパニブの奏効率は約 40%、全生存期間の中央値は 25 か

月前後であり、サイトカイン療法時代と比較して飛躍的に治療成績が向上した⁽¹⁾。これらの血管新生阻害剤は VHL-HIF シグナルの下流に存在する vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) や platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) などを治療標的としており、ccRCC の分子生物学的特徴に基づく治療戦略の有用性を証明したとも言える。近年、新たながん免疫療法の開発が進み、抗 programmed cell death 1 (PD-1) 抗体であるニボルマブや抗 cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) 抗体であるイピリムマブが臨床試験において有効性が認められ^(8, 9)、本邦においても保険収載された。このように、多くの治療薬が開発されてきたが完全寛解に至る症例は未だ 10%未満であり^(1, 8, 9)、根治可能な症例は非常にまれである。したがって、ccRCC の分子生物学的特徴に基づいた新規治療法の開発による治療成績の更なる向上が強く望まれている。

3. ホスホリパーゼ D の生理機能

ホスホリパーゼ D (phospholipase d: PLD) は、細胞膜主要構成リン脂質であるホスファチジルコリン (phosphatidylcholine: PC) を加水分解して、ホスファチジン酸 (phosphatidic acid: PA) とコリンを産生するリン脂質代謝酵素である。このような加水分解活性を有する哺乳類 PLD として、PLD1 と PLD2 の 2 つのアイソザイムが同定されている^(10, 11)。哺乳類 PLD アイソザイムの構造は、N 末端領域に脂質結合ドメインである phox homology (PX) ドメインと pleckstrin homology (PH) ドメインを有し、C 末端

側には生物種を超えて広く保存されている相同性の高い領域Ⅰ~Ⅳが存在する。領域ⅡおよびⅣには HxKxxxxD の配列からなる HKD モチーフが存在し、これらが協調して触媒活性を担う。PLD1、PLD2 の活性化には細胞膜微量構成リン脂質であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: PI(4,5)P₂) との結合が必要であるが、領域Ⅱと領域Ⅲの間には PI(4,5)P₂ が特異的に結合する領域が存在する。PLD1 の中央部にはループ状の三次元構造をとる Loop 領域があり、この領域は定常状態の PLD1 の活性を抑制する機能があるとされる。一方で、PLD2 にはこのような Loop 領域は存在しない。

哺乳類 PLD1 および PLD2 は幅広い細胞や組織で発現していることが知られている^(12, 13)。ヒト組織において、PLD1 は心臓、脳、脾、子宮及び小腸での発現が高く、PLD2 は脳、胎盤、肺、胸腺、前立腺及び子宮での発現が高いとされる^(11, 14)。一方、腎は PLD1、PLD2 ともに発現が低い組織である。

哺乳類 PLD アイソザイムはホルモンや神経伝達物質、細胞増殖因子など様々なアゴニストにより細胞が刺激されると活性化され、細胞膜や細胞内小器官膜において PA を産生する⁽¹⁵⁾。PLD1 は主にゴルジ体や小胞体、リソソーム、エンドソーム、分泌小胞などの細胞内小器官に局在し、その一部はアゴニスト刺激依存的に細胞膜に移行する⁽¹⁵⁾。PLD2 は PLD1 とは異なり、主に細胞膜に局在する⁽¹⁵⁾。活性化された PLD は脂質性シグナル伝達分子である PA を産生し、小胞輸送、エキソサイトーシス、オートファジー、

細胞内代謝などの多彩な細胞機能を制御することが知られている⁽¹⁴⁾。

4. がんにおけるホスホリパーゼ D

ヒト腫瘍組織において PLD1 および PLD2 の発現や活性が亢進していることは、乳癌、胃癌や大腸癌などの複数のがんで明らかにされている^(16,17)。特に大腸癌では、PLD2 を高発現している患者では腫瘍径が大きく、生存率が低いことが示されている⁽¹⁷⁾。がん細胞において PLD は脂質性シグナル伝達を制御し、がんの増殖、生存、浸潤や転移に重要な役割を果たしていることが報告されている^(16, 18-23)。乳癌では PLD2 による extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化を促進し、核内における Elk1、c-fos、Fra1 の活性化により増殖を促進することが示されている⁽¹⁸⁾。また、グリオーマでは PLD2 が protein kinase B (AKT) のリン酸化によりオートファジーを促進し、がんの生存に寄与する⁽¹⁹⁾。さらに乳癌では、PLD1 が ERK や AKT の活性化により matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) と matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) の発現を制御し、がんの浸潤を促進する⁽²²⁾。また、大腸癌では PLD1 及び PLD2 が Wnt/ β -catenin 経路の活性化により足場非依存性の増殖や浸潤を促進することが報告されている⁽²³⁾。

一方、がん微小環境における PLD の役割についても報告がなされている⁽²⁴⁾。腫瘍内に存在する宿主由来血管は腫瘍細胞に酸素や栄養素を供給し、腫瘍の増大に極めて重要な役割を果たす。血管内皮細胞において PLD1 は VEGF シグナルの下流で機能し、AKT

や p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) の活性化を促進することで VEGF による腫瘍血管形成に重要な役割を果たす。また、がんの血行性転移において血管内で癌細胞は血小板と結合しており、この結合は血管内で循環するがん細胞の生存および転移組織への滲出に必要であることが示されている。がん細胞と血小板の結合には血小板膜上の $\alpha_{IIb}\beta_3$ インテグリンの活性化が必要であり、PLD1 がこのインテグリンの活性化を促進し、がんの血行性転移に重要な役割を果たしている。

5. 淡明型腎細胞癌の分子生物学的特徴とホスホリパーゼ D

ccRCC では acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) に代表される脂質合成関連タンパクの活性が高く、脂質合成が亢進していることが特徴である⁽²⁵⁾。細胞質内の脂質は主に中性脂肪やエステル型コレステロールであり、これら脂質がリン脂質一重層で覆われた構造である脂肪滴を形成して貯蔵されている⁽²⁶⁾。ccRCC の腫瘍組織では脂肪染色 (Oil Red-O 染色) により細胞内に多数の脂肪滴を確認することができる⁽²⁵⁾。興味深いことに、PLD により産生された PA は脂肪滴の形成を促進し⁽²⁷⁻²⁹⁾、さらに ccRCC では PLD2 の発現および活性が亢進していることが報告されている⁽³⁰⁾。また、ccRCC の発生や進展に VHL-HIF シグナルが重要な役割を果たしているが、HIF2 α の翻訳には PLD により産生される PA が必要であることが報告されている^(31,32)。PLD はがん細胞では増殖や浸潤を、がん微小環境では腫瘍血管形成や遠隔転移を促進することでがんの進展に寄

与するが、ccRCCにおけるPLDの生物学的意義については未だ不明である。

II. 目的

我々はPLDの発現亢進により産生されるPAが脂質性シグナル伝達分子としてccRCCの進展に関与するという仮説をもとに、ccRCCの進展におけるPLDの生物学的意義を明らかにし、治療標的としての可能性を検証することを目的として本研究を行った。

III. 対象と方法

患者背景と使用検体

筑波大学附属病院臨床研究倫理審査委員会の承認を受け（承認番号 H25-072）、2006~2015 年までに ccRCC と診断され、筑波大学附属病院にて根治的腎摘除術または腎部分切除術を施行した 67 例を対象とした。

全対象患者の原発巣におけるホルマリン固定パラフィン包埋（formalin-fixed paraffin-embedded ; FFPE）組織を使用した。このうち 52 例は原発巣における癌部と非癌部の凍結組織が利用可能であり、RNA の抽出を行った。転移巣に対して外科的切除もしくは生検が実施された 16 例では転移巣における FFPE 組織を使用した。

がんの進展度は国際対がん連合（Union for International Cancer Control ; UICC）の TNM 臨床病期分類に基づき決定した⁽³³⁾。また、病理学的悪性度は Fuhrman 4 段階分類を用いて評価した⁽³⁴⁾。

免疫組織化学染色

FFPE 組織を 4 μm に薄切して検体スライドを作製した。スライドのパラフィン除去および再水和を行った。抗原賦活化処理はクエン酸バッファーを緩衝液として使用し、マイクロウェーブ法にて実施した。内因性ペルオキシダーゼ活性を除去するために 3%過

酸化水素含有メタノール溶液に 25 分間浸漬した。一次抗体反応は 4℃、一晩で行った。

二次抗体として Histofine Simple Stain MAX PO® (Nichirei Bioscience 社)を使用し、ジアミノベンジジンをを用いて発色した。ccRCC 患者における PLD1 および PLD2 のタンパク発現を評価するために、腫瘍細胞の細胞膜のみならず細胞質まで染色された場合は高発現症例とし、それ以外を低発現症例と定義した。

以下に使用した一次抗体と希釈濃度を示す。

	希釈濃度	提供元	商品コード
anti-PLD1	1:50	Santa Cruz Biotechnology	sc-25512
anti-PLD2	1:50	Cell Signaling Technology	#138591S
anti-Ki-67	1:200	Dako	M7240

細胞培養

293T (ヒト胎児腎) 細胞株は理化学研究所バイオリソースセンターよりご提供いただいた。SKRC52、SKRC59 (ヒト腎癌) 細胞株は Memorial Sloan Kettering Cancer Center の JG Old 博士より分与していただいた。293T 細胞株は 10%ウシ胎児血清 (FBS) 含有ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM)、SKRC52、SKRC59 細胞株は 10% FBS 含有 RPMI1640 培地を使用し、37℃、5%CO₂ の条件下で培養を行った。

Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)及びPCRアレイ

ccRCC 組織の癌部と非癌部、細胞株からの RNA 抽出には Trizol Reagent (Life Technologies 社)を使用した。抽出した RNA から High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems 社)を用いて逆転写により cDNA を作製した。Real time PCR は、Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems 社)を使用し、7500 Fast Real-Time PCR machine (Applied Biosystems 社)で行った。Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) を内在性コントロール遺伝子として使用した。使用したプライマーの一覧を以下に示す。

Human PLD1	Sense	5'-CAGTGGTTGAGGGAAATCGT-3'
	Antisense	5'-TGGGATGTAGACGCATCAAA-3'
Human PLD2	Sense	5'-CCGTCTCGGAGCTCATCTAC-3'
	Antisense	5'-TGCTCCAAGAATCACACTGC-3'
Human ANG	Sense	5'-TGGGCGTTTTGTTGTTGGTC-3'
	Antisense	5'-GTGGTTTGGCATCATAGTGCTG-3'
Human COL8A1	Sense	5'-AAAGCCAGGTTTCCTTGGTG-3'
	Antisense	5'-GAAGCTGGGCAAAAAGGTGT-3'
Human HPRT	Sense	5'-GACTTTGCTTTCCTTGGTC-3'
	Antisense	5'-AGTCAAGGGCATATCCTAC-3'

RT² Profiler human angiogenesis and Extracellular Matrix and Adhesion Molecules PCR Arrays (SA Biosciences 社)を使用し、血管新生および細胞浸潤に関連する 168 遺伝子について PCR アレイによる発現解析を行った。

ウェスタンブロット

腎癌細胞株におけるタンパク発現を解析するため、過去の報告に従ってウェスタンブロットティングを行った⁽³⁵⁾。以下に使用した一次抗体及び二次抗体とその希釈濃度を示す。標識抗体を検出する化学発光試薬として ImmunoStar Zeta (Wako 社)を使用し、Fujifilm LAS-4000 imager (Fujifilm 社)にて検出した。また、内在性コントロールとして β -actin を使用した。

		希釈濃度	提供元	商品コード
一次抗体	anti-PLD1	1:200	Santa Cruz Biotechnology	sc-25512
	anti-PLD2	1:200	筑波大学金保研究室	-
	anti-AKT	1:200	Santa Cruz Biotechnology	sc-81434
	anti-p-AKT	1:200	Santa Cruz Biotechnology	sc-7985-R
	anti-ERK	1:200	Cell Signaling Technology	#4695
	anti-p-ERK	1:200	Cell Signaling Technology	#4370
二次抗体	anti-rabbit IgG	1:10000	GE Healthcare	NA934
	anti-mouse IgG	1:10000	GE Healthcare	NA931

siRNAによるPLD1及びPLD2遺伝発現抑制

siRNAはDharmacon 社のON-TARGETplus human PLD1 SMART pool siRNA (L-009413-00-0005)、ON-TARGETplus human PLD2 SMART pool siRNA (L-005064-00-0005)、ON-TARGETplus non-targeting pool siRNA (D-001810-10-05)を使用した。Lipofectamine RNAiMax Reagent (Invitrogen社)を製品プロトコールに準じて使用し、腎癌細胞株に対して各siRNA 25 nMをトランスフェクションした。

PLD2 shRNA プラスミドの作製

shRNA 配列には、過去の報告^(36, 37)で使用実績のあるオリゴヌクレオチド配列を使用した。pLKO.1-puro vector をベースに PLD2 の遺伝子発現が抑制される pLKO-shPLD2 vector を作製した。使用したオリゴヌクレオチド配列を以下に示す。

shPLD2#1	5'-CCGGGCCAAGTACAA GACTCCCATACTCGAGTATGGGAGTCTTGTACTTGGCTTTTT-3' 5'-AATTAAAAAGCCAAGTACAAG ACTCCCATACTCGAGTATGGGAGTCTTGTACTTGGC-3'
shPLD2#2	5'-CCGGTGACCTGCACTACCGAC TGACCTCGAGGTCAGTCGGTAGTGCAGGTCATTTTT-3' 5'-AATTAAAAATGACCTGCACTACCGACT GACCTCGAGGTCAGTCGGTAGTGCAGGTCA-3'
shScramble	5'-CCGGGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCTCGAGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTTTTT-3' 5'-AATTAAAAAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCTCGAGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGC-3'

レンチウイルス上清の作製と感染実験

導入試薬としてLipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen社)を使用し、293T細胞に対してpLKO-shControlもしくはpLKO-shPLD2、pMDLg/pRRE、pRSV-Rev、pMD2.Gをトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後にshControlおよびshPLD2レンチウイルス粒子を含む培養上清を回収した。この上清をSKRC52、SKRC59細胞株に添加のうえ培養することによりレンチウイルス感染を行った。ウイルス感染24時間後、puromycin 1.5 µg/mlによる薬剤選択を行うことでshControl株とshPLD2株を樹立した。PLD2の遺伝子発現抑制効果はウエスタンブロットで確認した。

細胞増殖アッセイ

生細胞数の計測には Cell Counting Kit-8 (Dojindo 社) を使用した。96 ウェルマイクロプレート（各ウェルへ細胞懸濁液（細胞濃度 1×10^4 cells/mL）を 100 μ L ずつ入れて培養し、24、48、72、120 時間後に各ウェルへ Cell Counting Kit-8 溶液を 10 μ L ずつ加え、1 時間後にマイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。

細胞浸潤アッセイ

Corning 社のマトリゲルインベーションチャンバー（24 ウェル）を使用し、細胞浸潤能の評価を行った。FBS 非含有 RPMI 培地を用いて、腎癌細胞株 5×10^5 cells/mL を含む細胞懸濁液を調整した。各インベーションチャンバーへは細胞懸濁液 500 μ L を播種し、各ウェルは 10% FBS 含有 RPMI1640 培地 750 μ L で満たした。さらに、化学誘引物質として EGF 3 nM を使用した。37°C、5%CO₂ の条件下で 22 時間の培養を行った。その後、メンブレン上の非浸潤細胞を除去し、メンブレン下面の浸潤細胞を Diff-Quik 液 (Sysmex 社) により染色した。浸潤細胞数は無作為に選んだ各メンブレンの 5 視野について光学顕微鏡下倍率 200 倍で計測した。

PLD 阻害剤

Tocris Bioscience 社 より N-[2-[4-(2,3-Dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)-1-

piperidinyl]ethyl]-5-fluoro-1*H*-indole-2-carboxamide hydrochloride (FIPI) 及び N-[2-[1-(3-Fluorophenyl)-4-oxo-1,3,8-triazaspiro[4.5]dec-8-yl]ethyl]-2-naphthalenecarboxamide (NFOT)を購入した。FIPI は PLD1+PLD2 阻害剤、NFOT は PLD2 選択的阻害剤である。過去の報告^(27, 38)と同様に、細胞増殖アッセイ及び細胞浸潤アッセイでは PLD 阻害剤の添加濃度を両剤とも 5 μ M とした。

Angiogenin (ANG) 中和抗体

R&D Systems 社よりヒト ANG に対する中和抗体 (AB-265-NA) を購入した。コントロールとしてヤギ IgG を使用した。各濃度における腎癌細胞株 SKRC52 に対する浸潤抑制効果を検討し、中和抗体の使用濃度は 0.2 ng/mL とした。

ANG リコンビナントタンパク

R&D Systems 社よりヒト ANG リコンビナントタンパク (AB-265-AN-050) を購入した。製品プロトコールに従って、0.1%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin ; BSA) を用いて 10 μ g/mL に希釈して−20℃で保管した。過去の報告⁽³⁹⁾に基づき、使用濃度は 0.5 μ g/mL とした。コントロールは 0.1% BSA とした。

PA の調整

Avanti Polar Lipids 社より 1,2,-dioleoyl phosphatidic acid (DOPA, 840875P) を購入した。過去の報告⁽⁴⁰⁾に基づき、パウダー状の DOPA を 0.5% BSA/PBS で溶解して濃度を 1 mM として -20°C で保管した。この DOPA 溶解液を液体窒素による凍結・融解を 10 回繰り返し、Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids 社) で粒子径の均一なリポソームを作製した。このリポソーム化 DOPA 300 nM を培養細胞へ添加して 4 時間静置した。

ヌードマウス異種移植

雌の 6~8 週齢 Balb/c ヌードマウスを Charles River Laboratories 社から購入した。皮下移植モデルでは、右側腹部の皮下へ細胞数 5×10^6 個を移植した。移植後は週 1 回ごとに腫瘍径の測定を行った。移植 10 週の時点で屠殺し、皮下腫瘍を取り出した。また、腎被膜下移植モデルは過去の報告に準じて行った⁽⁴¹⁾。マウスの左肋骨下縁を切開し、左腎を取り出して細胞数 1×10^6 個を腎被膜下へ移植した。移植 12 週の時点で屠殺し、腎腫瘍を取り出した。腫瘍の存在は hematoxylin and eosin (HE) 染色で確認した。

統計解析

データは平均値 \pm 標準偏差で示した。統計解析ソフトは JMP 10 software (SAS Institute 社)を使用した。2 群間の比較には Student's t-test、Fisher's exact test、Wilcoxon rank sum

test を用いた。生存期間解析は Kaplan-Meier 法を用い、Log-rank 法にて 2 群間の差を
定した。予後因子の同定には Cox's proportional hazard regression model を用いた。P<0.05
を統計学的有意差ありと判定した。

IV. 結果

1. 淡明型腎細胞癌におけるホスホリパーゼ D の発現と臨床病理学的因子の検討

ccRCC 52 症例における癌部と非癌部の凍結組織を用いて発現解析を行った。非癌部と比較して癌部では PLD1、PLD2 とともに mRNA の発現が有意に亢進していた (図 1)。

さらに、ccRCC 67 症例の原発巣における PLD1 及び PLD2 のタンパク発現を免疫化学染色により評価を行った。腫瘍組織では主に腫瘍細胞の細胞質が強く染色され、腎組織では尿細管上皮細胞が不均一に染色された (図 2、3)。腫瘍細胞における染色強度から高発現と低発現に分類し、PLD タンパクの発現と臨床病理学的因子との関連を解析した。PLD1 高発現症例では低発現症例に比べ、有意に進行癌 (clinical stage 3-4) や高悪性度腫瘍 (Grade 3-4) が多く認められた。(表 1)。また、PLD2 高発現症例でも同様に、有意に進行癌や高悪性度腫瘍が多く認められた (表 2)。以上の結果から、PLD の発現亢進が ccRCC の進展に関与していることが示唆された。

2. 腎癌細胞の増殖・浸潤におけるホスホリパーゼDの生物学的意義の検討

VHL 変異を有する腎癌細胞株である SKRC52、SKRC59 に対して siRNA による PLD1 または PLD2 の遺伝子発現抑制を行い、PLD アイソザイム特異的にタンパク発現が抑制されることを確認した (図 4)。この siRNA を用いて PLD の遺伝子発現抑

制が細胞増殖に及ぼす影響を検討した（図 5）。PLD2 の遺伝子発現抑制により細胞増殖は有意に抑制された。一方で、PLD1 の遺伝子発現抑制では有意な細胞増殖抑制効果は認められなかった。また、PLD の遺伝子発現抑制が細胞浸潤に及ぼす影響を検討した（図 6）。PLD1 および PLD2 の遺伝子発現抑制により細胞浸潤は抑制されたが、特に PLD2 の遺伝子発現抑制による細胞浸潤抑制効果が高く認められた。さらに、PLD 阻害剤が腎癌細胞株の増殖と浸潤に与える影響を検討した。FIPI は PLD1+PLD2 阻害剤であり、NFOT は PLD2 特異的な阻害剤である。両剤ともコントロール群に比較して細胞増殖および浸潤を有意に抑制した（図 7、8）。特に PLD2 特異的な阻害剤である NFOT は FIPI より効果的に細胞浸潤を抑制した。これらは、腎癌細胞では主に PLD2 が細胞増殖や浸潤を促進することを支持する結果であった。

次に、PLD2 が *in vivo* における腫瘍増殖や浸潤へ及ぼす影響を検討した。shRNA ベクターを用いて PLD2 遺伝子発現抑制株（SKRC52/shPLD2#1、#2）を樹立し、PLD2 特異的にタンパク発現が抑制されていることを確認した（図 9）。乳癌やグリオーマにおける報告^(18, 19, 22)と同様に、樹立した PLD2 遺伝子発現抑制株では AKT 及び ERK のリン酸化が抑制されていた（図 10）。皮下移植モデルではコントロール株と比較して PLD2 遺伝子発現抑制株では腫瘍増殖が抑制され（図 11）、皮下腫瘍における Ki-67 の発現が有意に低下していた（図 12）。また、腎被膜下移植（正所性）モデルではコントロール株が腎実質への浸潤性増殖を示すのに対して、PLD2 遺伝子発現抑制株では圧排性増

殖を認めた（図 1 3）。以上の結果から、in vivo においても PLD2 が腎癌の腫瘍増殖や浸潤を促進することが示された。

3. 淡明型腎細胞癌の転移および予後におけるホスホリパーゼ D2 発現の意義

ccRCC 患者の原発巣における PLD2 発現と予後との関連を明らかにするために、Kaplan-Meier 法による生存期間の解析を行った。PLD2 高発現症例では低発現症例に比べ、有意に生命予後が不良であった（ $P=0.002$, 図 1 4）。さらに、臨床病期、病理学的悪性度、脈管侵襲、PLD2 発現の 4 因子と生存期間との関連を検討するため、Cox 比例ハザードモデルに基づく単変量解析、多変量解析を行った（表 3）。これらの解析の結果、PLD2 高発現は ccRCC 症例における独立した予後不良因子であることが明らかになった。これまでの結果から、PLD2 が腎癌細胞の浸潤を促進することが明らかとなったため、ccRCC 患者の原発巣における脈管侵襲での腫瘍細胞の PLD2 発現を検討した。評価可能であった 10 例中 8 例で原発巣と比較して脈管侵襲における腫瘍細胞の PLD2 発現は亢進していた（図 1 5）。さらに、転移巣では原発巣と比較して有意に PLD2 発現が亢進していた（ $P<0.01$, 図 1 6、1 7）。一方、PLD1 は原発巣に比べ転移巣で有意な発現の亢進を認めなかった（図 1 8）。以上の結果から、PLD2 が ccRCC の浸潤や転移を促進し、予後に影響を及ぼすことが示唆された。

4. 腎癌細胞におけるホスホリパーゼ D2 を介した浸潤メカニズムの検討

PLD2 を介した ccRCC の浸潤・転移メカニズムを明らかにするために、PCR アレイによる遺伝子発現解析を行い、SKRC52/コントロール株と PLD2 遺伝子発現抑制株における遺伝子発現を比較した。血管新生や腫瘍浸潤に関連する 168 遺伝子のうち、2 配列の PLD2 遺伝子発現抑制 (shPLD2#1、#2) により共通して 1.5 倍以上の発現変化を認めた 12 遺伝子を同定した (表 4)。この 12 遺伝子の中で、PLD2 が正に制御する *angiogenin* (ANG) 及び *collagen type VIII alpha-1 chain* (COL8A1) に着目した。

SKRC59/PLD2 遺伝子発現抑制株においても ANG の mRNA 発現が抑制されることを確認した (図 19)。さらに、ccRCC 患者の原発巣において、癌部では非癌部に比べて ANG の mRNA 発現が亢進していた (図 20)。また同様に、SKRC59/PLD2 遺伝子発現抑制株においても COL8A1 の mRNA 発現が抑制され (図 21)、ccRCC の癌部で COL8A1 の mRNA 発現が亢進していた (図 22)。

次に、ANG タンパクが腎癌細胞の浸潤に及ぼす影響を検討した。中和抗体による ANG のタンパク阻害により SKRC52、SKRC59 はともに有意に細胞浸潤が抑制された (図 23)。一方、ANG のリコンビナントタンパクの添加によりこれらの PLD2 遺伝子発現抑制株では細胞浸潤が有意に促進した (図 24)。さらに、腎癌細胞において PLD2 により産生された PA が ANG の発現を促進するかを検討した。PLD2 遺伝子発現抑制により ANG の発現は低下するが、PA を添加したことにより再びその発現が亢進した (図 25)。

また、siRNA による PLD1 または PLD2 の遺伝子発現抑制を行い、腎癌細胞における ANG の mRNA 発現変化を検討した（図 2 6）。いずれの PLD アイソザイムにおいても ANG は発現が抑制されたが、特に PLD2 による発現抑制効果は高く認められた。

以上の結果から、ccRCC では PLD2 により産生された PA が ANG を制御し、細胞浸潤を促進することが示唆された。

V. 考察

大腸癌や胃癌において PLD2 の発現が亢進し^(16,17)、さらに大腸癌では PLD2 高発現症例の生命予後が不良であることが示されている⁽¹⁷⁾。過去の報告⁽³⁰⁾と同様に ccRCC の原発巣では PLD2 の発現が亢進し、本研究ではさらに患者の生命予後と関連することを明らかにした。また、原発巣と比較して脈管侵襲や転移巣では PLD2 の発現が高く、ccRCC の進展に重要な役割を果たしていることが示唆される。このように、がんにおいて PLD2 の発現が亢進し、がんの進展に関与することが明らかにされているが、その発現制御メカニズムは未だ不明な点が多い。ユーイング肉腫では EWS-Fli1 融合遺伝子が高頻度に認められるが、この融合遺伝子が PLD2 の転写を促進することが示されている⁽⁴²⁾。また、グリオーマでは miR-203 により PLD2 の発現が抑制されることが報告されている⁽⁴³⁾。大腸癌では β -catenin が転写因子である T-cell transcription factor (TCF) と複合体を形成し、PLD2 の転写を促進する⁽²³⁾。一方、CXXC finger protein 4 (CXXC4) のホモ欠失による Wnt/ β -catenin 経路の活性化が ccRCC の進展を促進することが示されており⁽⁴⁴⁾、ccRCC では Wnt/ β -catenin 経路の活性化により PLD2 の発現が亢進し、ccRCC の進展に寄与している可能性が示唆される。しかしながら、未だ ccRCC における PLD2 の発現制御メカニズムは明らかにされていない。

一方、本研究では ccRCC の高悪性度腫瘍では PLD2 のタンパク発現が亢進していることを示したが、高悪性度腫瘍では腫瘍組織における脂肪滴が減少することが知られており⁽²⁵⁾、PLD が脂肪滴の形成を促進するという報告⁽²⁷⁻²⁹⁾と矛盾する結果となった。

ACAT はコレステロールエステルの合成を触媒する酵素であるが、ccRCC の高悪性度腫瘍では ACAT-1 のタンパク発現や ACAT 活性が高いことが示されている⁽⁴⁵⁾。また、fatty acid synthase (FAS) はマロニル CoA とアセチル CoA から脂肪酸を合成する酵素であるが、ccRCC における進行がんや高悪性度腫瘍では FAS タンパクの発現が高く、高発現症例では予後が不良であることを示している⁽⁴⁶⁾。このように ccRCC における脂質合成関連タンパクの発現と細胞内脂質量は必ずしも相関しないことが報告されている。しかしながら、Patel らは腎癌細胞では脂肪酸が不足する状況下において脂肪滴を利用することで細胞周期の停止を防ぎ、増殖を維持することを報告しており⁽⁴⁷⁾、ccRCC の高悪性度腫瘍では PLD2 の発現が高いにも関わらず、がんの進展のため脂質の消費が亢進するため細胞内の脂肪滴が減少すると推察される。

本研究では PLD2 遺伝子発現抑制や PLD2 阻害剤が *in vitro* における腎癌細胞の増殖や浸潤を抑制すること、マウス異種移植モデルにおいて PLD2 遺伝子発現抑制が腫瘍増殖や浸潤を抑制することを明らかにした。過去の報告では、PLD が産生する PA は多様なシグナル経路の活性化により AKT や ERK のリン酸化を促進し、がんの増殖、浸潤や転移を促進することが示されている^(14,18-23)。ccRCC における網羅的遺伝子解析

によると 28~76%の症例で遺伝子変異、欠失や増幅により phosphoinositide 3-kinase

(PI3K) /AKT/mTOR 経路は活性化し^(48, 49)、他癌腫と比較すると AKT のリン酸化は亢進している⁽⁵⁰⁾。実際にこの経路を標的として、すでに ccRCC に対して mTOR 阻害剤は臨床応用されている⁽¹⁾。本研究においても、PLD2 が腎癌細胞における AKT のリン酸化を制御していると考えられ (図 10)、PLD2 により産生される PA が PI3K/AKT/mTOR 経路を活性化し、細胞増殖を促進することにより ccRCC の進展に寄与している可能性が示唆される。

さらに本研究では、PLD2 の標的遺伝子の同定のため PCR アレイによる遺伝子発現解析を行い (表 4)、血管新生や腫瘍浸潤に関連する遺伝子の中で *ANG* に着目した。*ANG* は大腸癌細胞株 HT-29 の培養上清から単離された血管新生因子であり、腓リボヌクレアーゼファミリーに属する 14kDa のタンパクである⁽⁵¹⁾。*ANG* は多機能を有する分泌タンパクであり、血管新生を介して複数のがんの増殖、浸潤、転移において重要な役割を果たしていることが知られている⁽⁵²⁻⁵⁵⁾。しかしながら、*ANG* と結合する受容体は血管内皮細胞に存在する 170kDa の膜貫通型タンパクとされ、長らくその詳細は不明であった。⁽⁵⁶⁾ 2018 年に Wang らが腓癌において *ANG* が epidermal growth factor receptor (EGFR) のリガンドであることを初めて明らかとした⁽⁵⁷⁾。この報告の中で、*ANG* により腓癌細胞における EGFR シグナルの活性化を促進し、腓癌の発生や浸潤に重要な役割を果たすことや EGFR 阻害剤であるエルロチニブの薬剤感受性に影響を及

ぼすことが示されている。一方、ccRCC では腫瘍組織における ANG のタンパク発現は高く⁽⁵⁸⁾、ccRCC 患者における血清中 ANG 濃度が健常者と比べ高いことが示されている^(59,60)。しかしながら、ccRCC における ANG の制御メカニズムや潜在的な役割については未だ解明されていなかった。本研究では、ccRCC において PLD2 が産生する PA が ANG の発現制御を介して、がんの浸潤を促進することを初めて明らかにした。

また、PCR アレイによる遺伝子発現解析の結果から（表 4）、PLD2 により正に発現が制御される遺伝子として *COL8A1* が同定された（図 2 1）。Ⅷ型コラーゲンは非線維性コラーゲンに分類され、COL8A1 は 2 本の異なる α 鎖のうち 1 つである。Zhao らは肝癌細胞に対して siRNA による COL8A1 の遺伝子発現抑制を行い、細胞増殖と浸潤が抑制されることを示している⁽⁶¹⁾。さらに、ccRCC 患者の腫瘍組織において COL8A1 の発現は亢進していることから（図 2 2）、COL8A1 は ccRCC の進展に関与していることが推察される。しかしながら、ccRCC の The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースを用いた細胞接着及び細胞外マトリックス・リモデリングに関連する遺伝子と患者の生命予後との検討において、COL8A1 高発現症例では低発現症例に比べ有意に予後良好であることが示されている⁽⁶²⁾。

PLD2 のみならず PLD1 においても、がんの浸潤を促進することが複数のがんで報告されている^(14,22,63)。本研究においても ccRCC の PLD1 高発現症例では進行癌が有意に多く（表 1）、PLD1 の遺伝子発現抑制により腎癌細胞の浸潤が抑制されることが明ら

かとなった (図 6)。また、PLD1 の遺伝子発現抑制により ANG の発現が抑制された (図 2 6)。したがって、ccRCC において PLD1 も同様にがんの進展に重要な役割を果たしていることが示唆される。本研究で使用した腎癌細胞株の脂質代謝における各 PLD アイソザイムに対する依存度が影響を及ぼしている可能性を考慮する必要があるが、PLD1 の遺伝子発現抑制と比較して PLD2 の遺伝子発現抑制は細胞増殖や浸潤を抑制する効果は高く認められた (図 5、図 6)。さらに、ccRCC 患者の原発巣と転移巣における PLD1 のタンパク発現を比較したが、転移巣における有意な発現亢進は認められなかった (図 1 8)。これらの結果を考慮すると、2 つの PLD アイソザイムのうち PLD2 が ccRCC の転移に重要な役割を果たしていることが示唆される。

腎癌の有転移症例に対して現在使用されている分子標的治療の中で、血管新生阻害剤は HIF の下流遺伝子である VEGF や PDGF などのレセプターを標的としている。血管新生阻害剤の投与により腫瘍縮小効果は期待できるが、完全寛解に至る症例はごくわずかである。本研究では、PLD2 が腎癌細胞において癌の進展に関連するシグナルを促進し、さらに ccRCC 患者において脈管侵襲や転移巣では PLD2 の発現が亢進していることを明らかにした。したがって、PLD2 は腎癌の有転移症例に対する治療標的となる可能性が示唆される。近年、ウイルス感染、神経疾患、がんなどの様々な疾患において PLD の各アイソザイムが関与し、PLD を標的とする低分子阻害剤の開発が着実に進んでいる⁽⁶⁴⁾。本研究で使用した PLD 阻害剤である FIPI は PLD1 の IC₅₀ が 1nM、

PLD2 の IC_{50} が 44nM であり、アイソザイム選択制は引く。また、30 分子以上に対するオフターゲット効果を認めるとされる⁽⁶⁴⁾。このように、PLD 阻害剤におけるオフターゲット効果やアイソザイム選択性などの課題が残されているが、将来的には腎癌の有転移症例に対する新しい PLD2 選択的阻害剤が登場することを期待したい。

VI. 総括

本研究では、ccRCCにおいてPLD2発現の亢進は腫瘍増殖や浸潤を促進し、患者の生命予後が不良であることを示した。さらに新しい知見として、PLD2-PA-ANGシグナルを介して癌の浸潤を促進することを明らかにした。本研究の成果から、PLD2-PA-ANGシグナルが腎癌の有転移症例に対する新規治療標的となることが示唆された。

VII. 謝辞

本研究は、西山博之教授（筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 腎泌尿器外科学）のご指導のもと行ったものであり、深く感謝いたします。

本研究計画及びその遂行に際し、多くのご指導、ご助言をいただいた小島崇宏講師（筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 腎泌尿器外科学）及び中村英二郎准教授（京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンターDSK プロジェクト）、ホスホリパーゼ D の解析に際し幾多のサポート頂きました金保安則教授及び船越裕司助教（筑波大学大学院人間総合科学研究科 生命システム医学専攻 生理化学研究室）に感謝いたします。

さらに、温かく見守っていただきました筑波大学腎泌尿器外科スタッフ各位、大学院生の皆様に深甚なる感謝の意を表します。

VIII. 参考文献

1. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S et al. Renal cell carcinoma. Nat Rev Dis Primers 2017; 3: 17009.
2. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. Eur Urol 2015; 67:519-30.
3. Linehan WN, Pinto PA, Bratslavsky G et al. Hereditary kidney cancer: unique opportunity for disease-based therapy. Cancer. 2009; 115: 2252-61.
4. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. Blood. 2005; 105: 659-69.
5. Kim W, Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insight into oxygen sensing and cancer. Curr Opin Genet Dev. 2003; 13: 55-60.
6. Baba M, Honq SB, Shama N et al. Folliculin encoded by the BHD gene interacts with a binding protein, FNIP1, and AMPK, and is involved in AMPK and mTOR signaling. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103: 15552-7.
7. Cho E, Adami HO, Lindblad P. Epidemiology of renal cell cancer. Hematol Oncol Clin North Am 2011; 25: 651-65.
8. Motzer RJ, Escudier B, Mc Dermott DF et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced

- Renal-Cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2015; 373: 1803-13.
9. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018; 378: 1277-1290.
 10. Hammond SM, Altshuller YM, Sung TC et al. Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J Biol Chem* 1995; 270: 29640-43.
 11. Lopez I, Arnold RS, Lambeth JD. Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2). ADP-ribosylation factor regulates hPLD2. *J Biol Chem* 1998 273: 12846-52.
 12. Katayama K, Kodaki T, Nagamachi Y et al. Cloning, differential regulation and tissue distribution of alternatively spliced isoforms of ADP-ribosylation-factor-dependent phospholipase D from rat liver. *Biochem J*. 1998; 329: 647-652.
 13. Colley WC, Altshuller YM, Sue-Ling CK et al. Cloning and expression analysis of murine phospholipase D1. *Biochem J*. 1997; 326: 745-753.
 14. Bruntz RC, Lindsley CW, Brown HA. Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Rev* 2014; 66: 1033-79.
 15. McDermott M, Wakelam MJ, Morris AJ. Phospholipase D. *Biochem Cell Biol*. 2004; 82: 225-253.

16. Su W, Chen Q, Frohman MA. Targeting phospholipase D with small-molecule inhibitors as a potential therapeutic approach for cancer metastasis. *Future Oncol* 2009; 5: 1477-86.
17. Saito M, Iwadata M, Higashimoto M, Ono K, Takebayashi Y, Takenoshita S. Expression of phospholipase D2 in human colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 2007; 18: 1329-34.
18. Zhang F, Wang Z, Lu M et al. Temporal production of the signaling lipid phosphatidic acid by phospholipase D2 determines the output of extracellular signal-regulated kinase signaling in cancer cells. *Mol Cell Biol* 2014; 34: 84-95.
19. Bruntz RC, Taylor HE, Lindsley CW, Brown HA. Phospholipase D2 mediates survival signaling through direct regulation of Akt in glioblastoma cells. *J Biol Chem* 2014; 289: 600–16.
20. O'Reilly MC, Scott SA, Brown KA et al. Development of dual PLD1/2 and PLD2 selective inhibitors from a common 1,3,8-triazaspiro[4.5]decane core: discovery of MI298 and MI299 that decrease invasive migration in U87-MG glioblastoma cells. *J Med Chem* 2013; 56: 2695-9.
21. Henkels KM, Boivin GP, Dudley ES, Berberich SJ, Gomez-Cambronero J. Phospholipase D (PLD) drives cell invasion, tumor growth and metastasis in a human breast cancer xenograph model. *Oncogene* 2013; 32: 5551-62.
22. Kang DW, Park MH, Lee YJ, Kim HS, Lindsley CW, Alex Brown H, Min do S.

- Autoregulation of phospholipase D activity is coupled to selective induction of phospholipase D1 expression to promote invasion of breast cancer cells. *Int J Cancer* 2011; 128: 805-16.
23. Kang DW, Min do S. Positive feedback regulation between phospholipase D and Wnt signaling promotes Wnt-driven anchorage-independent growth of colorectal cancer cells. *PLoS One*. 2010; 5: e12109.
24. Chen Q, Hongu T, Sato T et al. Key roles for the lipid signaling enzyme phospholipase d1 in the tumor microenvironment during tumor angiogenesis and metastasis. *Sci Signal* 2012; 5: ra79.
25. Wettersten HI, Hakimi AA, Morin D et al. Grade-Dependent Metabolic Reprogramming in Kidney Cancer Revealed by Combined Proteomics and Metabolomics Analysis. *Cancer Res* 2015; 75: 2541-52.
26. Walther TC, Farese RV. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem* 2012; 81: 687-714.
27. Marchesan D, Rutberg M, Andersson L et al. A phospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related protein, and vimentin in a cell-free system. *J Biol Chem* 2003; 278: 27293-300.
28. Nakamura N, Banno Y, Tamiya-Koizumi K. Arf1-dependent PLD1 is localized to oleic acid-

- induced lipid droplets in NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 117-23.
29. Andersson L, Boström P, Ericson J et al. PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation. *J Cell Sci* 2006; 119: 2246-57.
30. Zhao Y, Ehara H, Akao Y et al. Increased activity and intranuclear expression of phospholipase D2 in human renal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 140-3.
31. Toschi A, Edelstein J, Rockwell P et al. HIF alpha expression in VHL-deficient renal cells is dependent on phospholipase D. *Oncogene*. 2008; 27: 2746-53.
32. Bouquerel P, Gstalder C, Müller D et al. Essential role for SphK1/S1P signaling to regulate hypoxia-inducible factor 2 α expression and activity in cancer. *Oncogenesis*. 2016; 5: e209.
33. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch. *TNM Classification of Malignant Tumors*, 7th edn. Wiley-Blackwell, 2009.
34. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982; 6: 655-63.
35. Watanabe H, Hongu T, Yamazaki M, Kanaho Y. Phospholipase D2 activation by p38 MAP kinase is involved in neurite outgrowth. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 413: 288-93.
36. Sun Y, Fanq Y, Yoon MS et al. Phospholipase D1 is an effector of Rheb in the mTOR pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 8286-91.

37. Tabatabaian F, Dougherty K, Di Fulvio M, Gomez-Cambronero J. Mammalian target of rapamycin (mTOR) and S6 kinase downregulate phospholipase D2 basal expression and function. *J Biol Chem* 2010; 285: 18991-9001.
38. Lavieri RR, Scott SA, Selvy PE et al. Design, synthesis and biological evaluation of halogenated N- (2-(4-Oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-8-yl)ethyl)benzamides: discovery of an isoform-selective small molecule phospholipase D2 (PLD2) inhibitor. *J Med Chem* 2010; 53: 6706-19.
39. Saikia M, Jobava R, Parisien M et al. Angiogenin-cleaved tRNA halves interact with cytochrome c, protecting cells from apoptosis during osmotic stress. *Mol Cell Biol* 2014; 34: 2450-63.
40. Hatton N, Lintz E, Mahankali M, Henkels KM, Gomez-Cambronero J. Phosphatidic acid increases epidermal growth factor receptor expression by stabilizing mRNA decay and by inhibiting lysosomal and proteasomal degradation of the internalized receptor. *Mol Cell Biol* 2015; 35: 3131-44.
41. Yang H, Minamishima YA, Yan Q et al. pVHL acts as an adaptor to promote the inhibitory phosphorylation of the NF-kappaB agonist Card9 by CK2. *Mol Cell* 2007; 28: 15–27.

42. Nozawa S, Ohno T, Banno Y et al. Inhibition of platelet-derived growth factor-induced cell growth signaling by a short interfering RNA for EWS-Fli-1 via down-regulation of phospholipase D2 in Ewing sarcoma cells. *J Biol Chem.* 2005; 280: 27544-51.
43. Chen Z, Li D, Chen Q et al. MicroRNA-203 inhibits the proliferation and invasion of U251 glioblastoma cells by directly targeting PLD2. *Mol Med Rep.* 2014; 9: 503-8.
44. Kojima T, Shimazui T, Hinotsu S et al. Decreased expression of CXXC4 promotes a malignant phenotype in renal cell carcinoma by activating Wnt signaling. *Oncogene.* 2009; 28: 297-305.
45. Matsumoto K, Fujiwara Y, Nagai R et al. Expression of two isozymes of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 and -2 in clear cell type renal cell carcinoma. *Int J Urol.* 2008; 15: 166-70.
46. Horiguchi A, Asano T, Asano T et al. Fatty acid synthase over expression is an indicator of tumor aggressiveness and poor prognosis in renal cell carcinoma. *J Urol.* 2008; 180: 1137-40.
47. Patel D, Salloum D, Saqcena M et al. A Late G1 Lipid Checkpoint That Is Dysregulated in Clear Cell Renal Carcinoma Cells. *J Biol Chem.* 2017; 292: 936-944.
48. Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet.* 2013; 45: 860-7.

49. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*. 2013; 499: 43-9.
50. Zhang Y, Kwok-Shing Ng P, Kucherlapati M et al. A Pan-Cancer Proteogenomic Atlas of PIK3/AKT/mTOR Pathway Alterations. *Cancer Cell*. 2017; 31: 820-832.
51. Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR et al. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 1985; 24: 5480–6.
52. Peng Y, Li L, Huang M, Duan C, Zhang L, Chen J. Angiogenin interacts with ribonuclease inhibitor regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in bladder cancer cells. *Cell Signal* 2014; 26: 2782-92.
53. Shu J, Huang M, Tian Q, Shui Q, Zhou Y, Chen J. Downregulation of angiogenin inhibits the growth and induces apoptosis in human bladder cancer cells through regulating AKT/mTOR signaling pathway. *J Mol Histol* 2015; 46: 157-71.
54. Xu L, Liao WL, Lu QJ et al. ANG promotes proliferation and invasion of the cell of lung squamous carcinoma by directly up-regulating HMGA2. *J Cancer* 2016; 7: 862-71.
55. Dutta S, Bandyopadhyay C, Bottero V et al. Angiogenin interacts with the plasminogen activation system at the cell surface of breast cancer cells to regulate plasmin formation and cell migration. *Mol Oncol* 2014; 8: 483-507.

56. Sheng J and Xu Z. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective.
Acta Biochim Sin (Shanghai). 2016; 48: 399-410.
57. Wang YN, Lee HH, Chou CK et al. Angiogenin/Ribonuclease 5 Is an EGFR Ligand and a
Serum Biomarker for Erlotinib Sensitivity in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell*. 2018; 33:
752-769.
58. Yoshioka N, Wang L, Kishimoto K, Tsuji T, Hu GF. A therapeutic target for prostate cancer
based on angiogenin-stimulated angiogenesis and cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad
Sci USA* 2006; 103: 14519-24.
59. Wechsel HW, Bichler KH, Feil G, Loeser W, Lahme S, Petri E. Renal cell carcinoma:
relevance of angiogenetic factors. *Anticancer Res* 1999; 19: 1537-40.
60. Lukesová S, Kopecký O, Vroblová V et al. Determination of angiogenic factors in serum by
protein array in patients with renal cell carcinoma. *Folia Biol (Praha)* 2008; 54: 134-40.
61. Zhao Y, Jia L, Mao X et al. siRNA-targeted COL8A1 inhibits proliferation, reduces invasion
and enhances sensitivity to D-limonene treatment in hepatocarcinoma cells. *IUBMB Life*.
2009; 61: 74-9.
62. Boquslawska J, Kedzierska H, Poplawski P et al. Expression of gene s involved in cellular
adhesion and extracellular matrix remodeling correlates with poor survival of patients with
renal cancer. *J Urol*. 2016; 195: 1892-902.

63. Tang W, Liang R, Duan Y Shi Q, Liu X, Liao Y. PLD1 overexpression promotes invasion and migration and function as a risk factor for Chinese glioma patients. *Oncotarget*. 2017; 8: 57039-49.
64. Brown HA, Thomas PG, Lindsley CW. Targeting phospholipase D in cancer, infection and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16:351-67.

IX. 略語

ACAT acyl-CoA:cholesterol acyltransferase

ACTB actin beta

AKT protein kinase B

ANG angiogenin

BSA bovine serum albumin

ccRCC clear cell renal cell carcinoma

CTLA-4 cytotoxic T-lymphocyte antigen 4

COL8A1 collagen type VIII, alpha-1 chain

CXXC4 CXXC finger protein 4

DOPA 1,2,-dioleoyl phosphatidic acid

EGF epidermal growth factor

EGFR epidermal growth factor receptor

ERK extracellular signal-regulated kinase

FAS fatty acid synthase

FFPE formalin-fixed paraffin-embedded

FIFI N-[2-[4-(2,3-Dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)-1-piperidinyl]ethy]-5-fluoro-1*H*-indole-2-carboxamide hydrochloride

HIF hypoxia-inducible factor

HPRT hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

NFOT N-[2-[1-(3-Fluorophenyl)-4-oxo-1,3,8-triazaspiro[4.5]dec-8-yl]ethyl]-2naphthalenecarboxamide

mTOR mammalian target of rapamycin

MMP-2 matrix metalloproteinase 2

MMP-9 matrix metalloproteinase 9

PA phosphatidic acid

PDGF platelet derived growth factor

PDGFR platelet derived growth factor receptor

PD-1 programmed cell death 1

PLD1 phospholipase D1

PLD2 phospholipase D2

PH pleckstrin homology

PI3K phosphoinositide 3-kinase

PI(4,5)P2 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PX plox homology

p38MAPK p38 mitogen-activated protein kinase

VHL von Hippel-Lindau tumor suppressor gene

VEGF vascular endothelial growth factor

TCF T-cell transcription factor

TCGA The Cancer Genome Atlas

UICC Union for International Cancer Control

IX. 図表

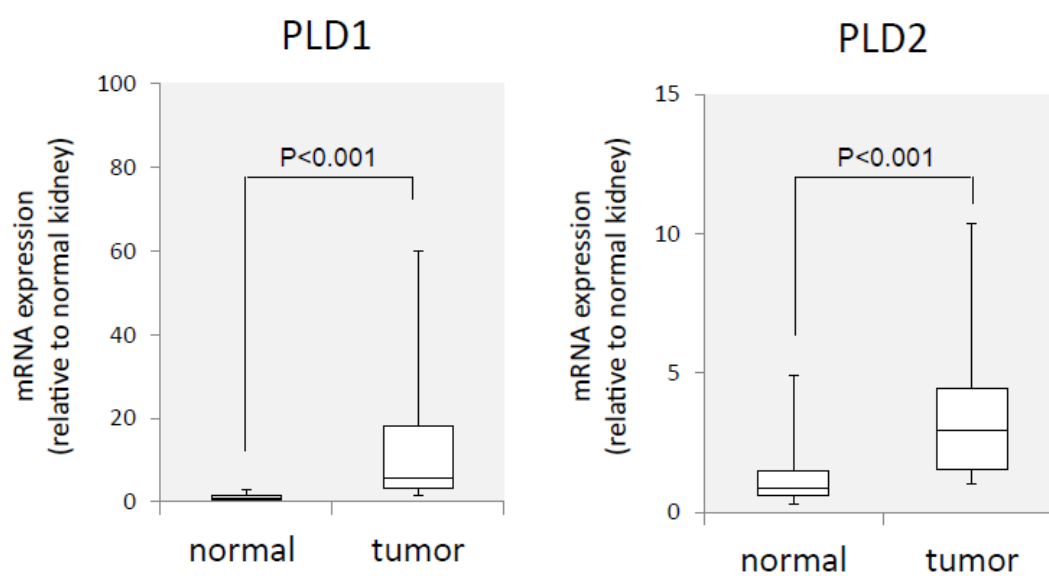
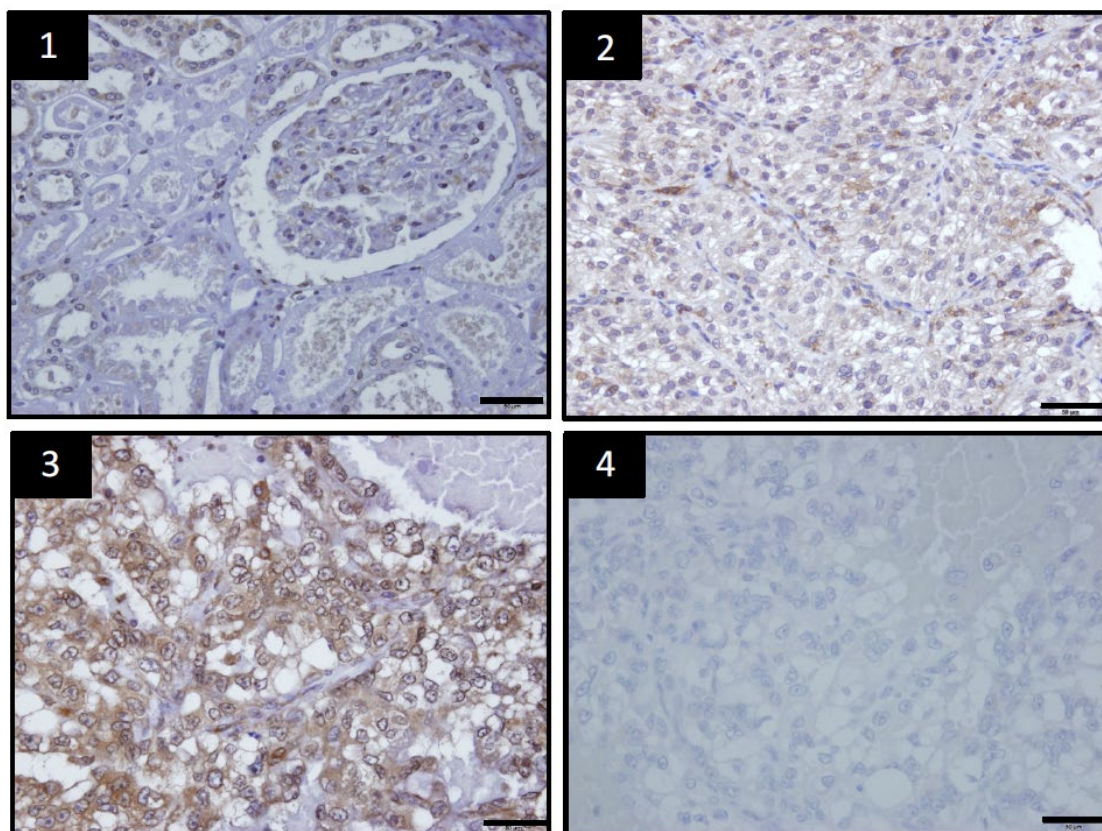


図1 ccRCC の原発巣における PLD1 及び PLD2 の mRNA 発現

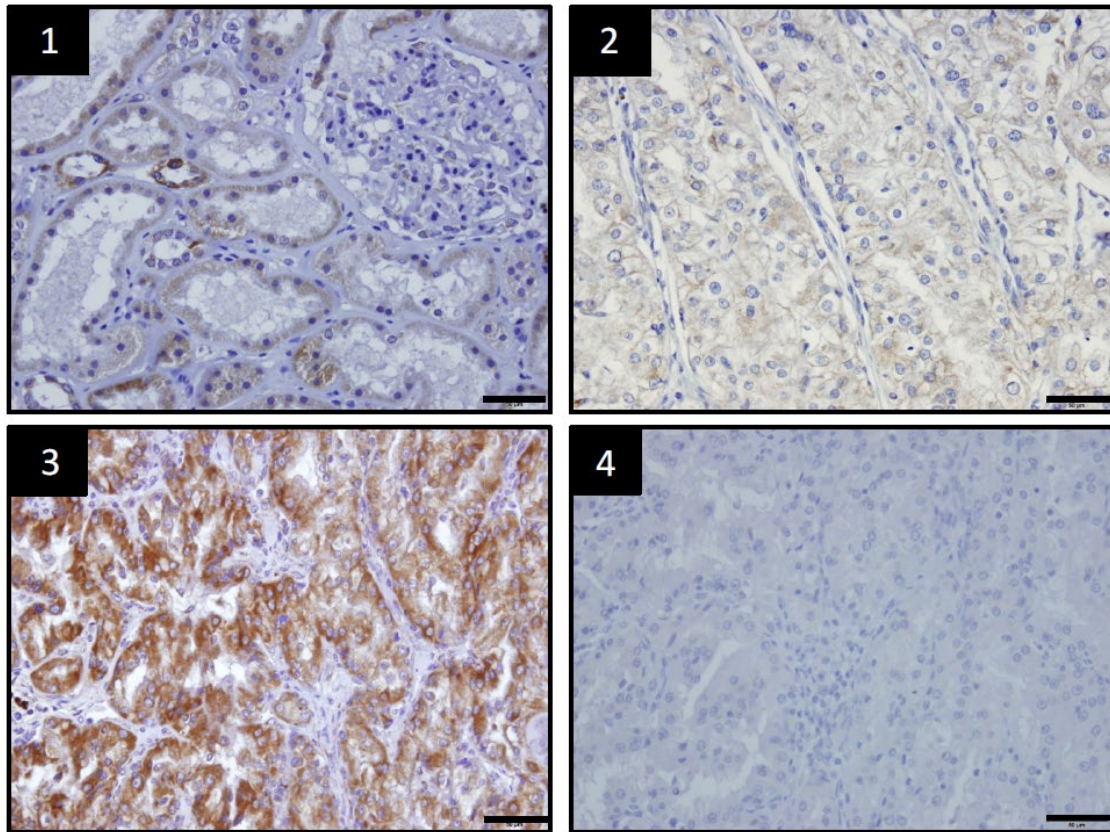


Scale bars, 50 μ m

図2 ccRCC の原発巣における PLD1 のタンパク発現

(1) 正常腎 (2) 原発巣 (低発現)

(3) 原発巣 (高発現) (4) ネガティブコントロール



Scale bars, 50 μm

図3 ccRCC の原発巣における PLD2 のタンパク発現

(1) 正常腎 (2) 原発巣 (低発現)

(3) 原発巣 (高発現) (4) ネガティブコントロール

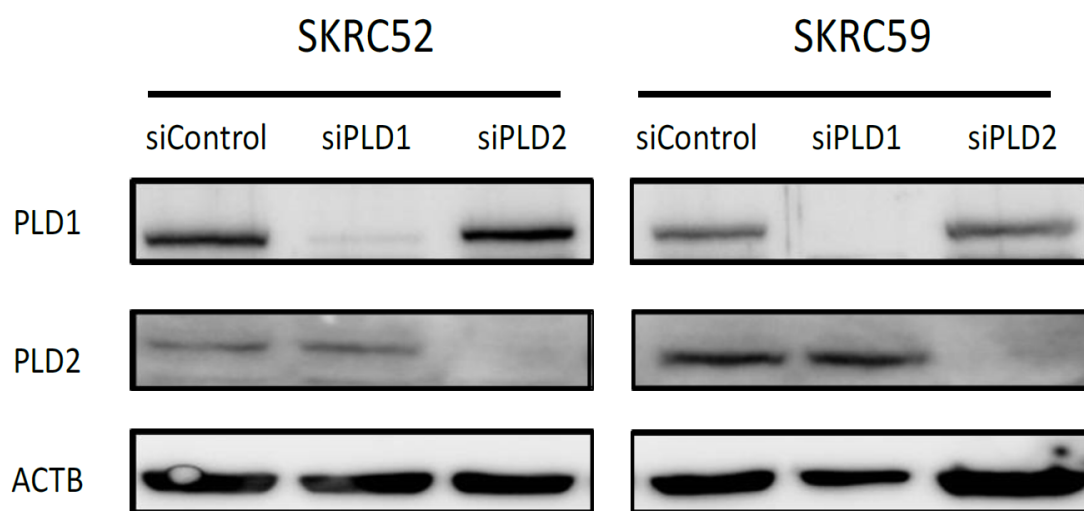


図4 腎癌細胞株における siRNA による PLD タンパクの発現抑制効果

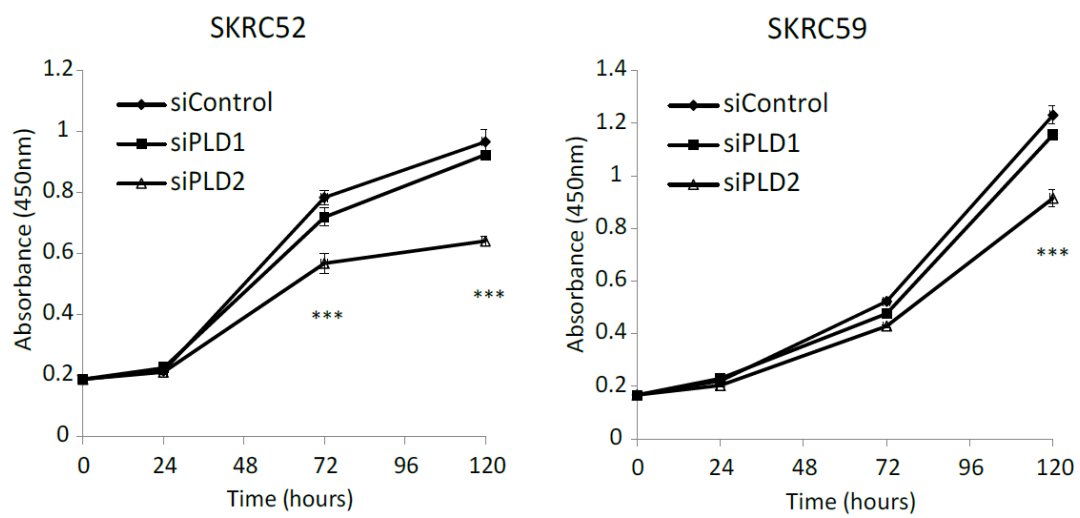


図5 腎癌細胞株における PLD 遺伝子発現抑制による細胞増殖への影響

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

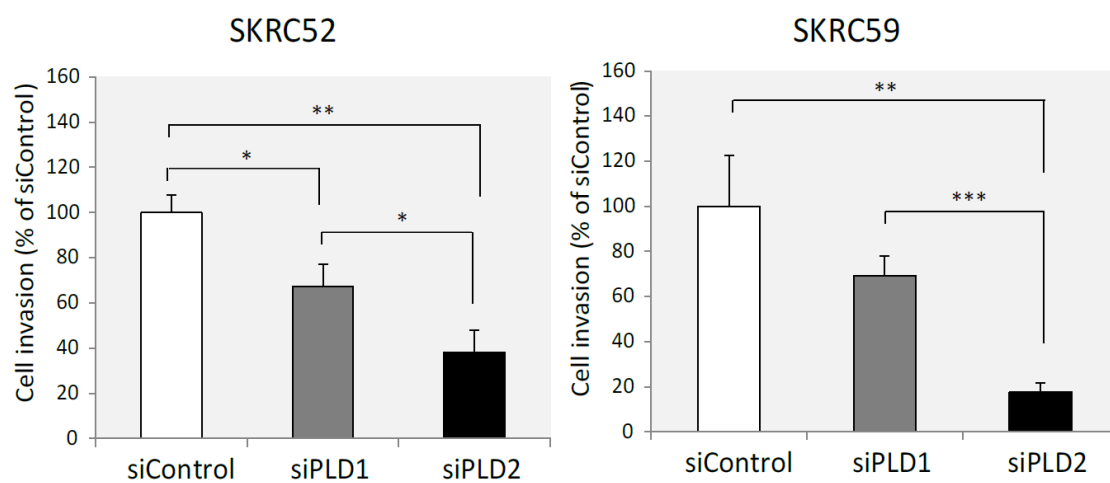


図6 腎癌細胞株における PLD 遺伝子発現抑制による細胞浸潤への影響

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

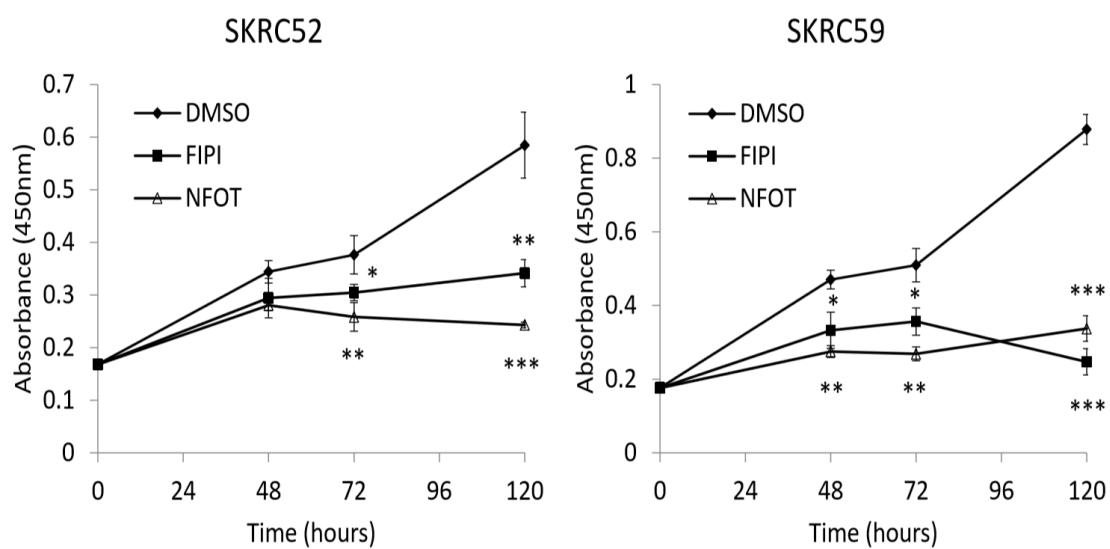


図7 PLD 阻害剤の添加による腎癌細胞株の細胞増殖への影響

(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

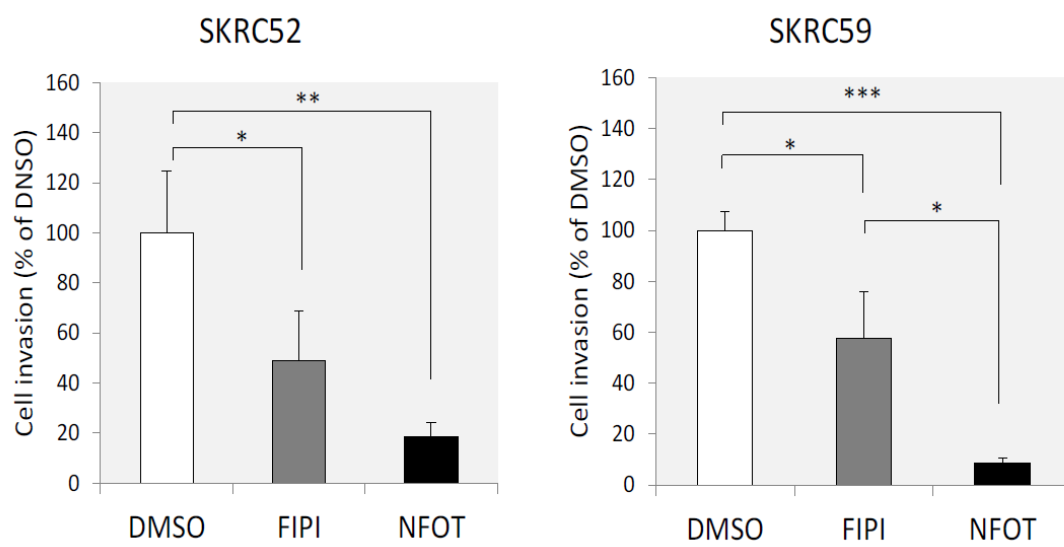


図8 PLD 阻害剤の添加による腎癌細胞株の細胞浸潤への影響

(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

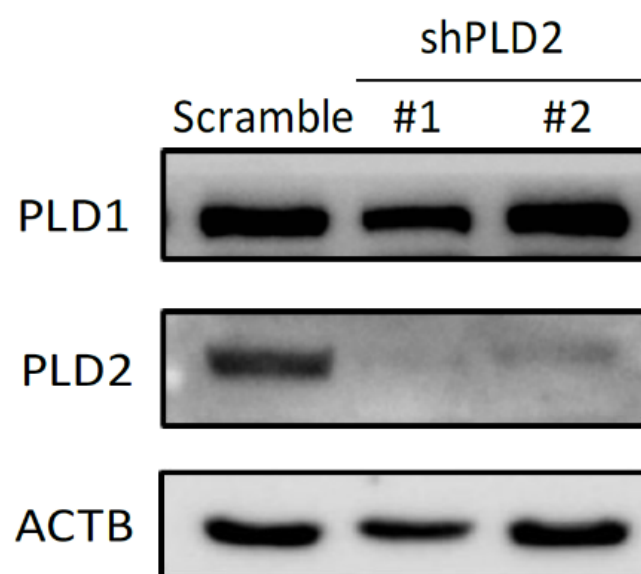


図 9 SKRC52/PLD2 発現抑制株の PLD タンパク発現

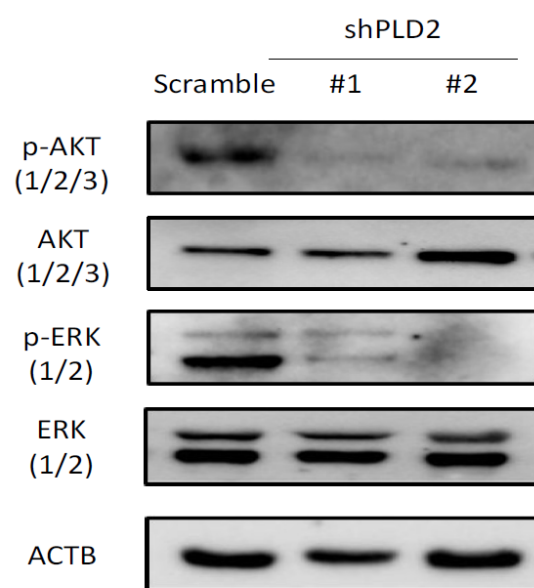
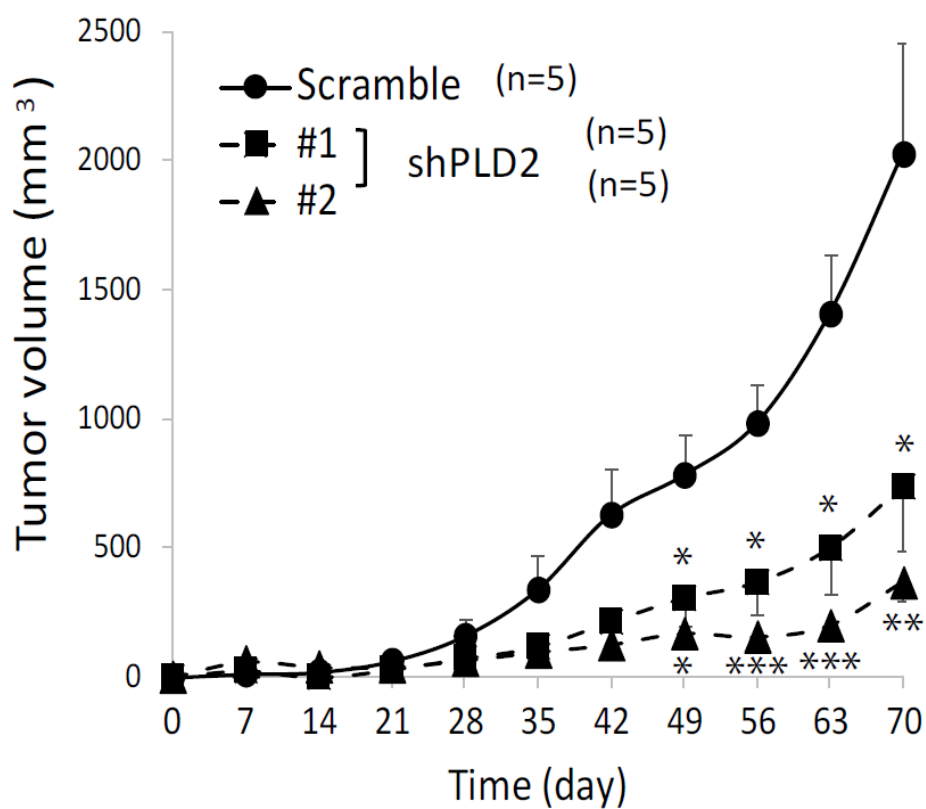


図 1 0 SKRC52/PLD2 発現抑制株における AKT 及び ERK への影響



The error bars represent the SE

図 1 1 SKRC52/PLD2 発現抑制株の皮下移植モデルにおける腫瘍増殖の評価

(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

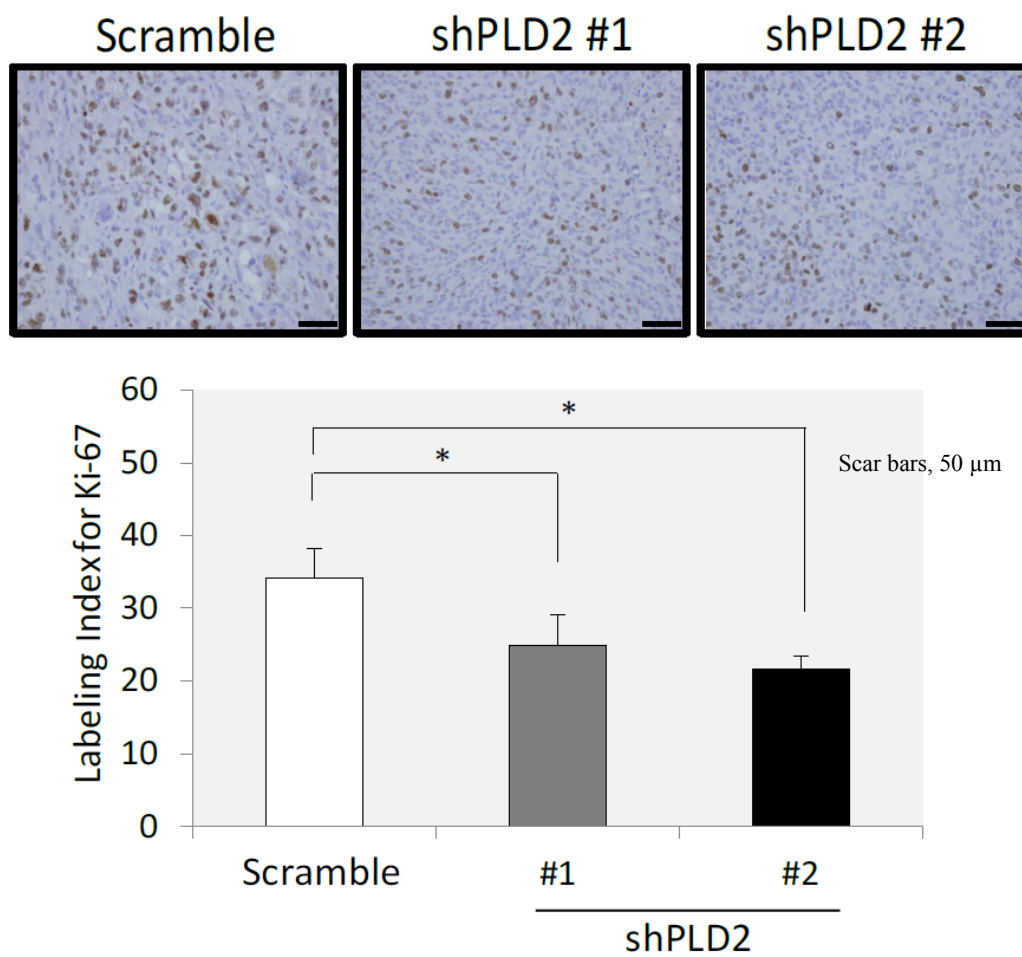
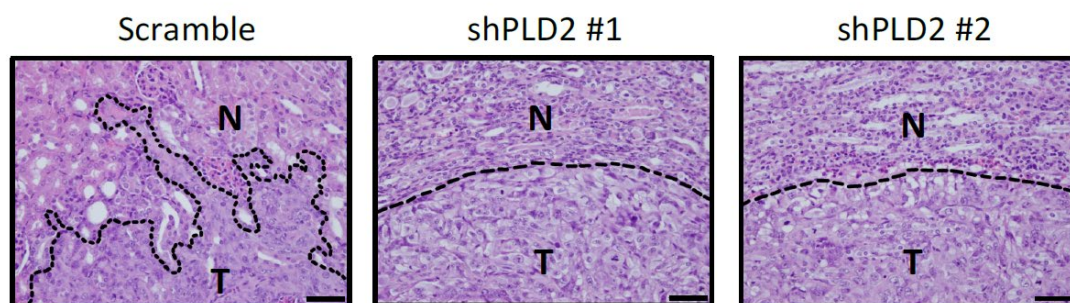


図 1 2 皮下腫瘍（SKRC52/PLD2 発現抑制株）における Ki-67 発現

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)



T : tumor

N : normal kidney

Scale bars, 50 μ m

図 1 3 正所性モデルにおける SKRC52/PLD2 発現抑制株の腫瘍浸潤の評価

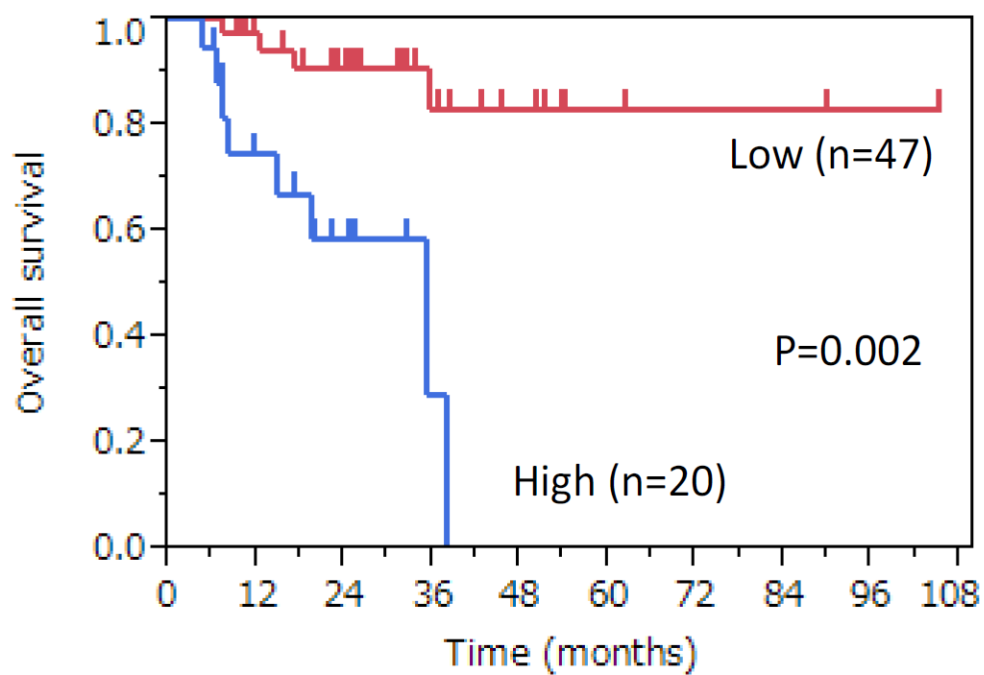


図 1 4 ccRCC の原発巣における PLD2 のタンパク発現と全生存期間

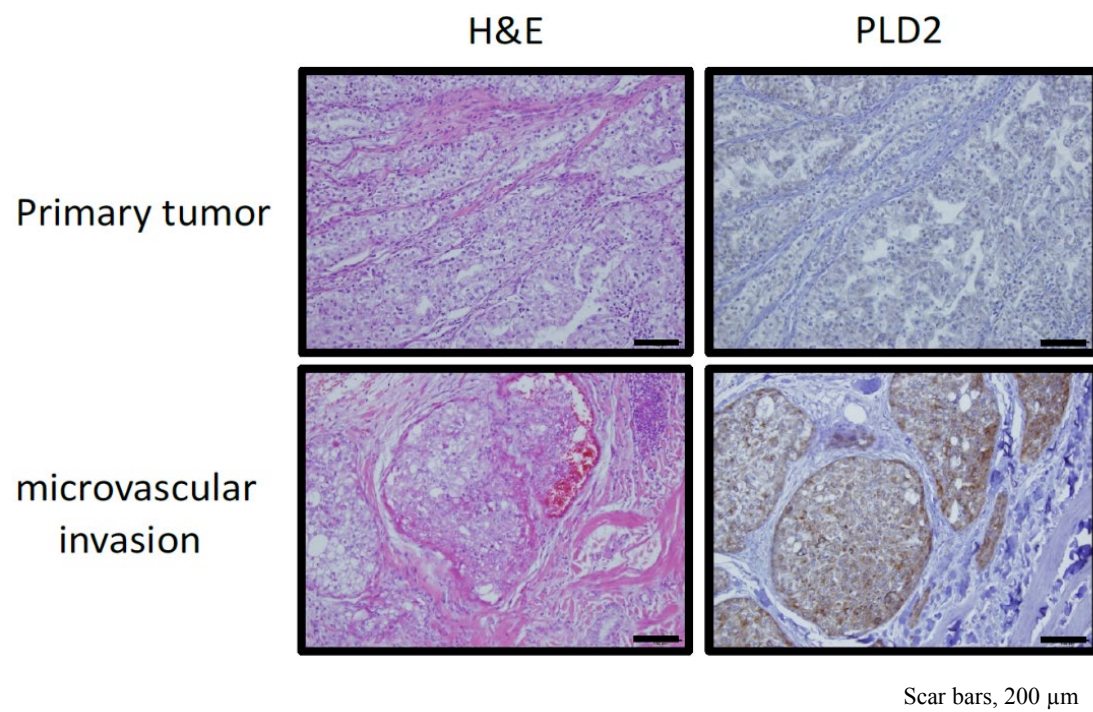


図 1 5 ccRCC の原発巣の脈管侵襲における PLD2 のタンパク発現 (代表例)

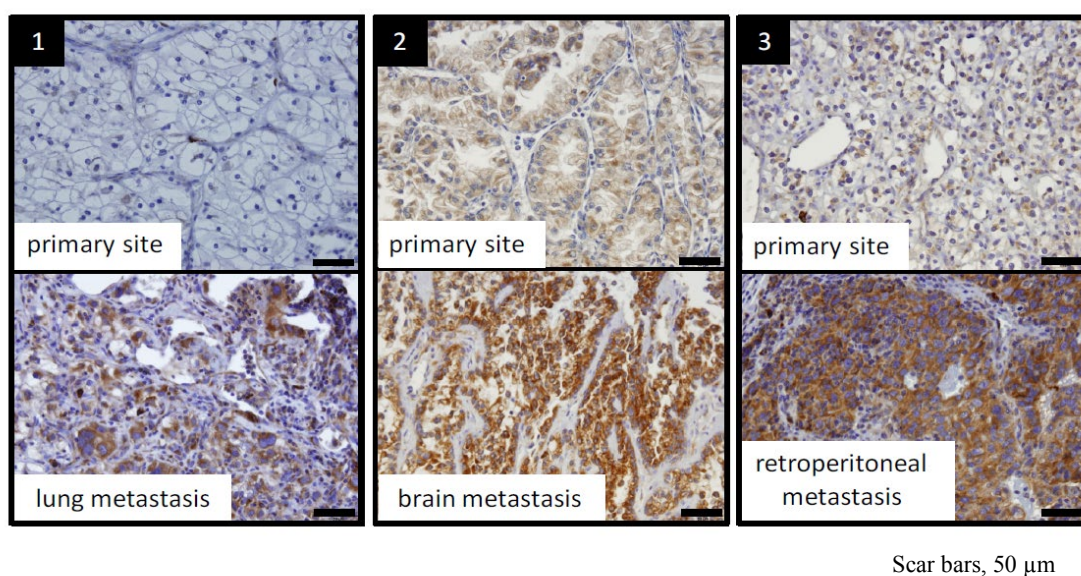


図 1 6 ccRCC における原発巣と転移巣の PLD2 のタンパク発現

(代表例)

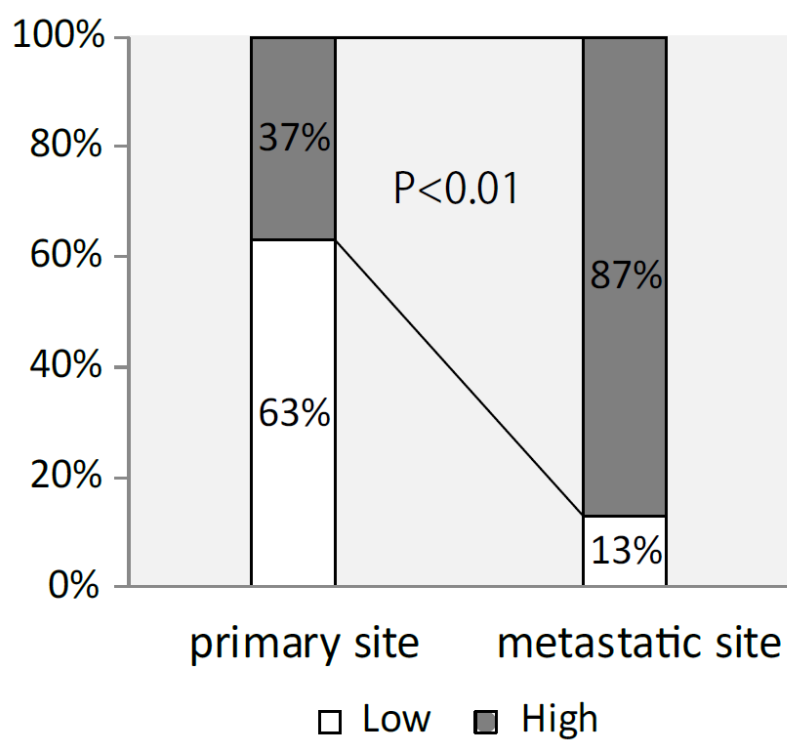


図 1 7 ccRCC における原発巣と転移巣での PLD2 発現の比較

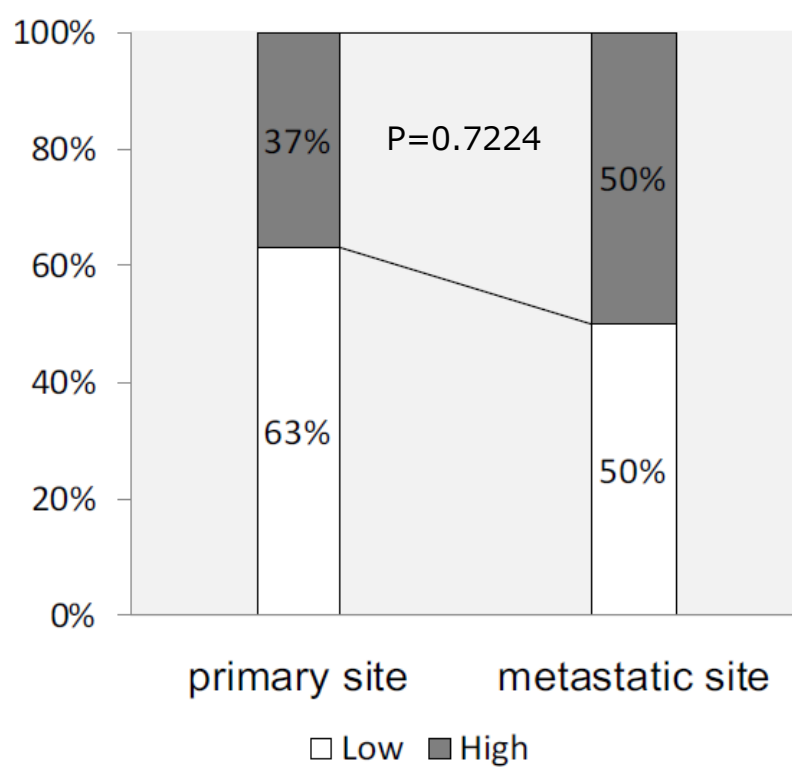


図 1 8 ccRCC における原発巣と転移巣での PLD1 発現の比較

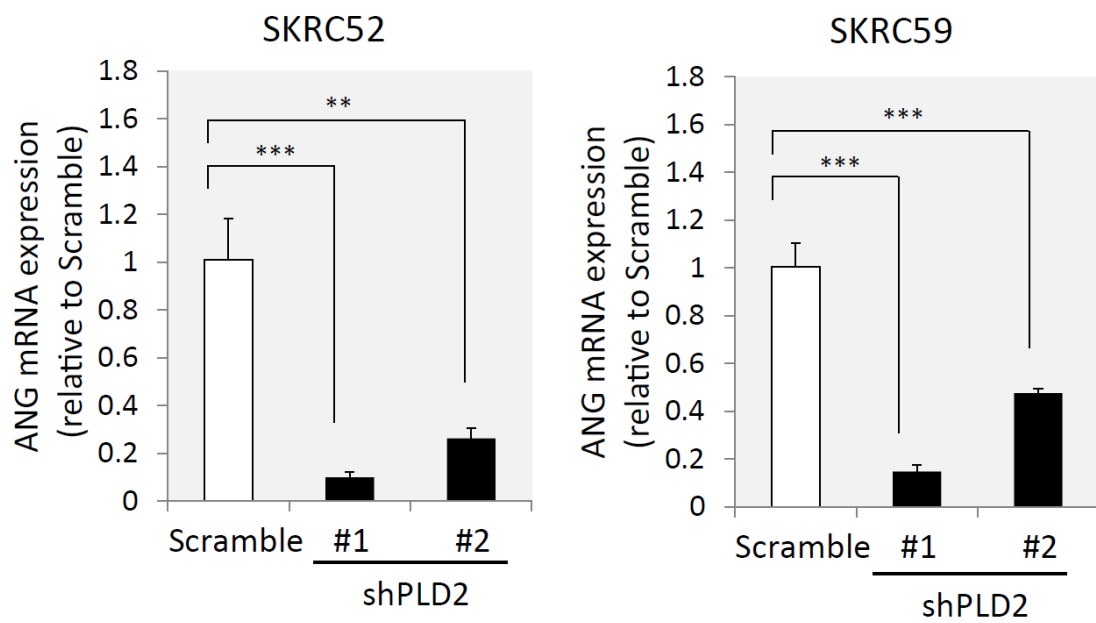


図 1 9 PLD2 発現抑制株における ANG の mRNA 発現

(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

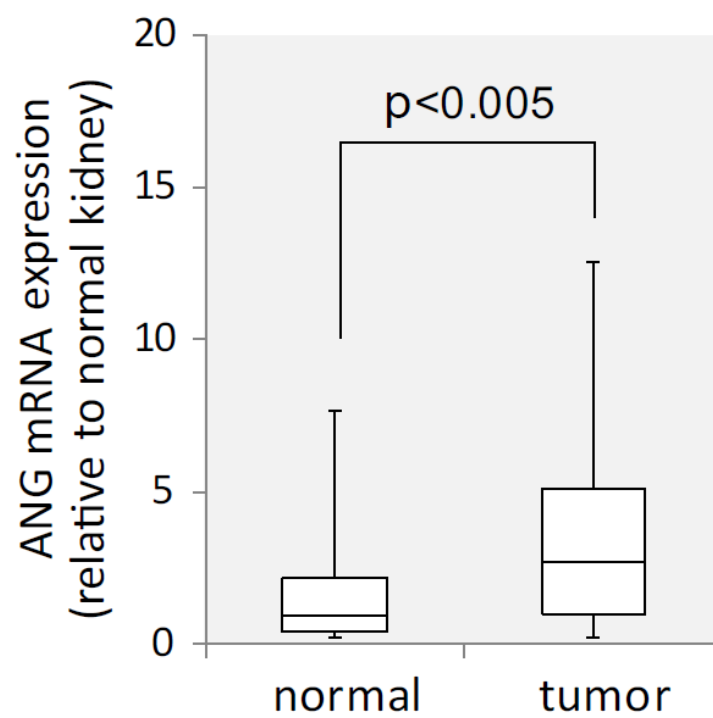


図 2 0 ccRCC の原発巣における ANG の mRNA 発現

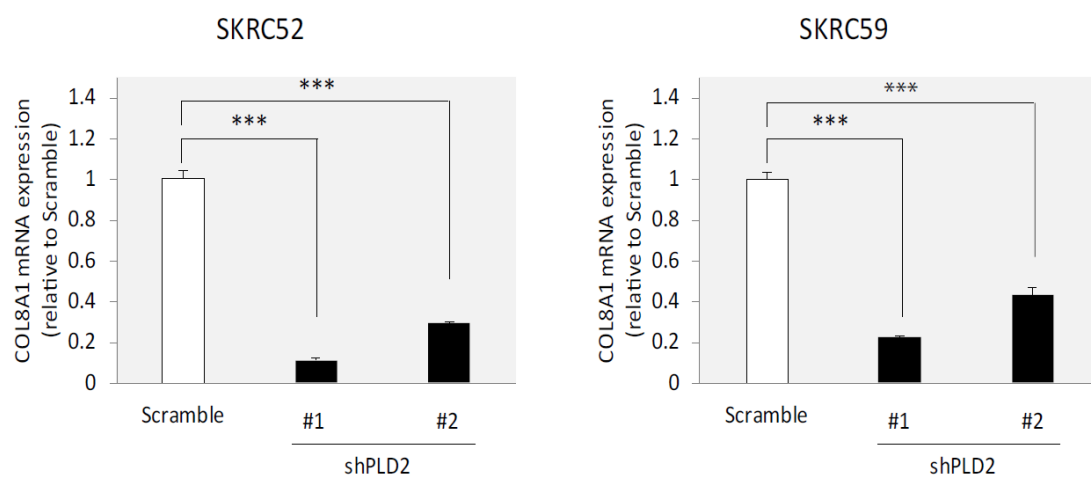


図 2 1 PLD2 発現抑制株における COL8A1 の mRNA 発現

(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

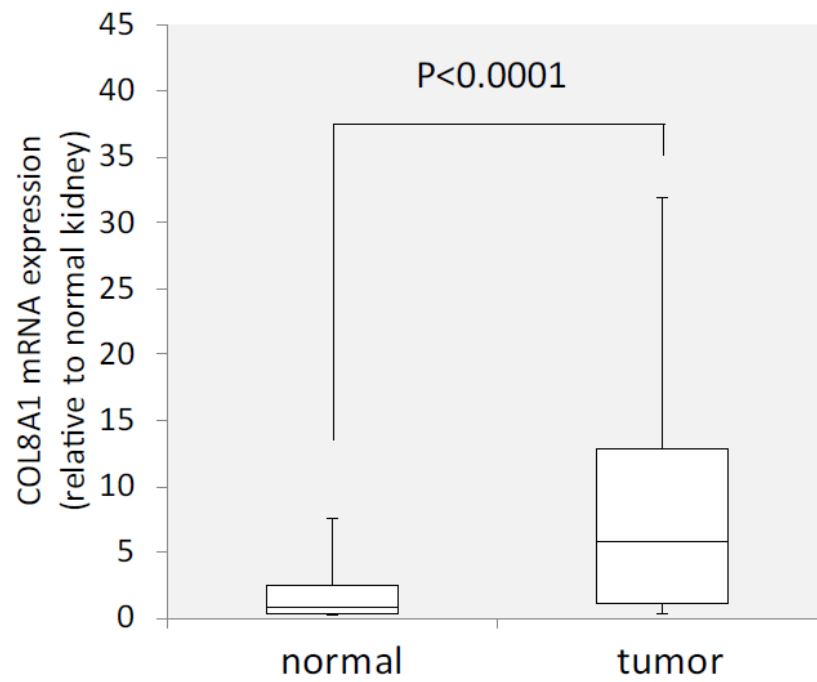


図 2 2 ccRCC の原発巣における COL8A1 の mRNA 発現

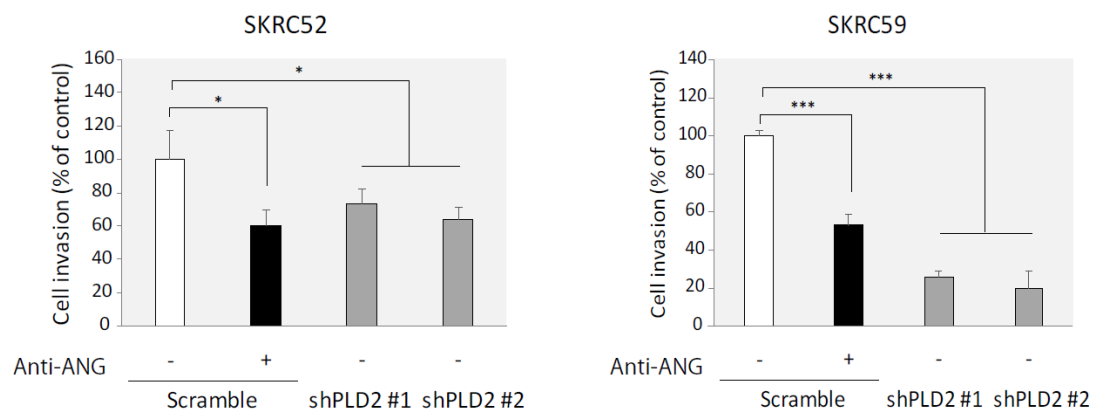


図 2 3 腎癌細胞株における ANG 中和抗体による細胞浸潤への影響

(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

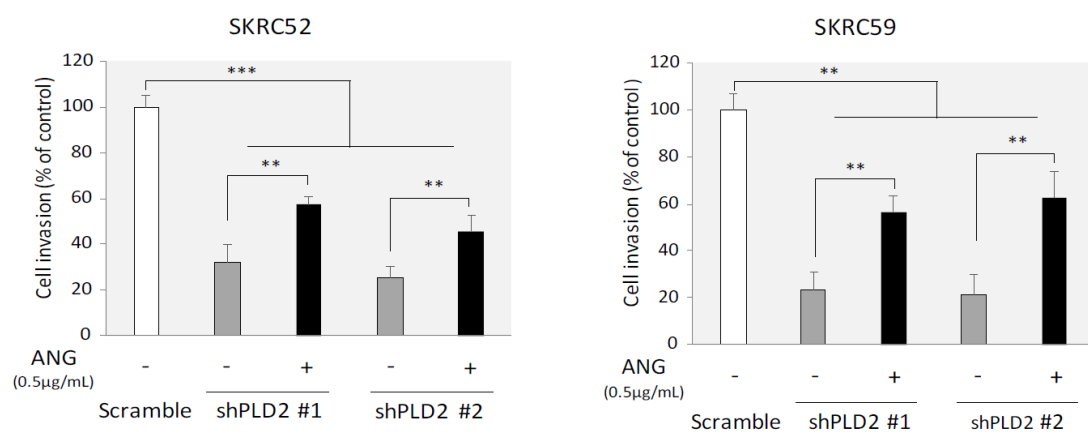


図 2 4 腎癌細胞株への ANG リコンビナント添加による細胞浸潤への影響

(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

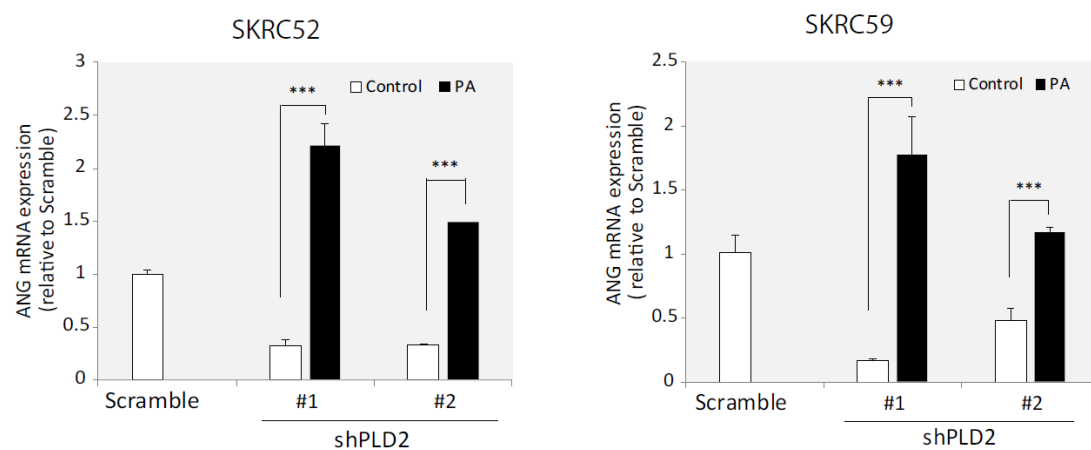


図 2 5 PA 添加による腎癌細胞株における ANG の mRNA 発現へ及ぼす影響

(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

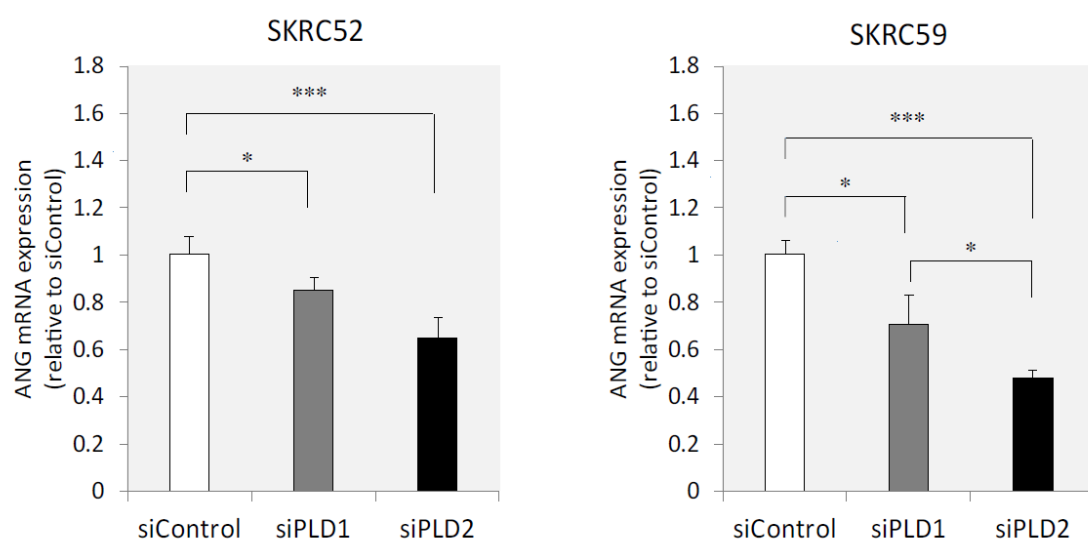


図 2 6 PLD 発現抑制による腎癌細胞株における ANG mRNA 発現への影響

(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

表 1 PLD1 タンパク発現と臨床病理学的因子

	High PLD1 (n = 18) n (%)	Low PLD1 (n = 49) n (%)	P-value
Age: mean ± SD	67.4 ± 12.4	66.0 ± 10.8	.5474
Clinical stage			
1-2	4 (22.2)	29 (59.2)	.0121*
3-4	14 (77.8)	20 (40.8)	
Pathological stage			
T1-2	4 (22.2)	32 (65.3)	.0023*
T3-4	14 (77.8)	17 (34.7)	
Grade			
G1-2	3 (16.7)	35 (71.4)	.0001*
G3-4	15 (83.3)	14 (28.6)	

*Statistically significant difference ($P < .05$).

表 2 PLD2 タンパク発現と臨床病理学的因子

	High PLD2 (n = 20) n (%)	Low PLD2 (n = 47) n (%)	P-value
Age: mean ± SD	68.7 ± 11.0	65.4 ± 11.2	.3511
Clinical stage			
1-2	4 (20.0)	29 (61.7)	.0029*
3-4	16 (80.0)	18 (38.3)	
Pathological stage			
T1-2	6 (30.0)	30 (63.8)	.0159*
T3-4	14 (70.0)	17 (36.2)	
Grade			
G1-2	7 (35.0)	31 (66.0)	.0304*
G3-4	13 (65.0)	16 (34.0)	

*Statistically significant difference ($P < .05$).

表 3 ccRCC の予後因子における単変量および多変量解析

	Cox proportional hazard model (univariate)			Cox proportional hazard model (multivariate)		
	HR	95% CI of HR	P	HR	95% CI of HR	P
Clinical stage (1-2 vs 3-4)	17.6	3.38-323	.0001*	2.97	0.10-91.1	.4889
Grade (1-2 vs 3-4)	17.8	3.45-326	<.0001*	8.99	1.18-202	.0318*
Microvascular invasion	9.38	2.46-61.2	.0006*	1.37	0.07-8.52	.7840
PLD2 (low vs high)	11.4	2.39-30.7	.0007*	4.33	1.25-18.5	.0204*

*Statistically significant difference ($P < .05$).

表 4 SKRC52・PLD2 発現抑制株における mRNA の発現変化

Unigene	Symbol	Description	Fold change	
			shPLD2 #1	shPLD2 #2
Genes downregulated				
Hs.283749	ANG	Angiogenin	0.15	0.28
Hs.654548	COL8A1	Collagen type VIII alpha 1 chain	0.31	0.22
Genes upregulated				
Hs.410037	CTGF	Connective tissue growth factor	12.37	2.51
Hs.164021	CXCL6	C-X-C motif chemokine ligand 6	18.30	4.05
Hs.76753	ENG	Endoglin	2.22	2.28
Hs.164226	THBS1	Thrombospondin 1	3.70	2.30
Hs.375957	ITGB2	Integrin subunit beta 2	9.25	2.00
Hs.536663	ITGB5	Integrin subunit beta 5	7.44	2.37
Hs.521869	ANOS1	Anosmin 1	6.92	2.43
Hs.83169	MMP1	Matrix metalloproteinase 1	142.01	43.22
Hs.297413	MMP9	Matrix metalloproteinase 9	4.93	3.04
Hs.111779	SPARC	Secreted protein acidic and cysteine rich	2.12	3.43