

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18618

研究課題名（和文）腎癌の治療標的となりうる新規癌特異分子PRELID2の機能解析

研究課題名（英文）Identification and characterization of PRELID2 as a novel molecular target gene for renal cell carcinoma therapy

研究代表者

加藤 廉平（Renpei, Kato）

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：60748234

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）：これまでの研究によって、腎癌細胞株Caki-1のPRELID2発現抑制を行いミトコンドリア呼吸能を解析した結果、コントロールと比較して予備呼吸能が低下することが示された。PRELID2と細胞の増殖能の関連が示されていることから、PRELID2が治療標的としての可能性を有すると考え、PRELID2の結合分子の探索を試みた。我々が樹立したHEK293PRELID2安定発現細胞を用いてPRELID2の結合タンパク質のショットガンプロテオミクスによる解析を行い、分子Xを同定した。PRELID2と分子Xの結合に関しては、ウエスタンブロッティングによってPRELID2と結合していることも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PRELID2に関する分子機能はこれまでほとんど解明されておらず、共同研究者の片桐教授が腎癌における癌特異分子であることを初めて発見した。その後、我々はPRELID2のミトコンドリア機能との関連を証明し、PRELID2に結合するミトコンドリア関連分子を同定している。本研究と現在進めている基盤Cの研究を通じて、世界に先駆けて癌化と関連するPRELID2の生理機能を報告し、腎癌の新しい治療標的分子を捉えられる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）： We evaluated a critical role in renal carcinogenesis for PRELID2 which is exclusively up-regulated in clear cell RCC (ccRCC) cases. Introduction of PRELID2 into HEK293 cells significantly enhanced cell growth, whereas knockdown of PRELID2 expression drastically suppressed growth of ccRCC cells. Notably, depletion of PRELID2 led to enhance ROS production. Moreover, downregulation of spare respiratory capacity was observed in PRELID2-depleted cells by extracellular flux analysis. We further demonstrated that exogenous HA-PRELID2 interacted with endogenous mitochondrial molecular X.

These findings suggest that PRELID2 might play a crucial role in mitochondrial ROS regulation for renal carcinogenesis, and be promising therapeutic target for ccRCC therapy.

研究分野：腎癌

キーワード：腎癌 PRELID2 ミトコンドリア ROS

1. 研究開始当初の背景

腎癌全体の約 20%を占める局所進行または遠隔転移を有する進行性腎癌の 5 年生存率は 10%と不良である。進行性腎癌に対する薬物療法としては、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬が用いられるが、これらの治療効果は限定的で、重篤な有害事象をみとめることから、癌特異的な細胞増殖シグナルを阻害することのできる新しい治療標的を同定することが求められている。

我々は、共同研究者である片桐豊雅教授(徳島大学先端酵素研究所ゲノム制御学分野)が行った腎癌における網羅的遺伝子発現解析を通じて、新規の癌特異分子として同定された PRELID2 に着目した。PRELID2 を含む PRELI ファミリータンパク質は種を超えて保存されていることから、正常細胞の機能維持においても必須の分子と考えられる。PRELI ファミリータンパク質の機能として、ミトコンドリアの膜間腔におけるリン脂質輸送と生合成を介してミトコンドリアの恒常性を維持していることが知られている。しかし、PRELI family の中で PRELID2 のみが生体における機能がほとんど解明されておらず、なぜ PRELID2 が腎癌で高発現しているのか、その意義は不明である。

2. 研究の目的

PRELID2 がミトコンドリア機能にどのような影響を及ぼしているかを明らかにすることと、PRELID2 による活性酸素の産生を制御するメカニズムの解明が本研究の目的である。

そのために、本研究では次のことを明らかにする。

- ・腎癌細胞株を用いて PRELID2 発現がミトコンドリア機能へ及ぼす影響を解明する。
- ・PRELID2 の結合分子を探索し、その中でミトコンドリアに局在し活性酸素の制御との関与が報告されている分子を同定する。
- ・PRELID2 の結合分子の発現と腎癌細胞の増殖や活性酸素の制御との関連を解析し、これらの複合体が腎癌の癌化に重要な役割を果たしていることを証明する。

3. 研究の方法

本研究では PRELID2 とミトコンドリア機能との関連を証明し、PRELID2 の活性酸素の制御に関連する結合分子を同定した。

下記の方法で研究を進めた。

(1) PRELID2 とミトコンドリア機能との関連解析：共同研究施設である徳島大学先端酵素研究所の施設内にある細胞外フラックスアナライザー XFe24(Agilent Technologies 社)を使用し、腎癌細胞株における PRELID2 発現とミトコンドリア呼吸鎖機能への影響を解析する。

(2) PRELID2 の活性酸素の制御に関連する結合分子の同定：我々が樹立した PRELID2 安定発現細胞株とコントロールの細胞を用いて PRELID2 との共免疫沈降を行い、結合してきた分子をショットガンプロテオミクスによる解析を行う。その中から既存の文献報告で、ミトコンドリアに局在し活性酸素の制御に関連することが明らかとなっている分子を特定する。この手法で特定した分子と PRELID2 との結合を共免疫沈降とウエスタンブロッティングによって評価する。

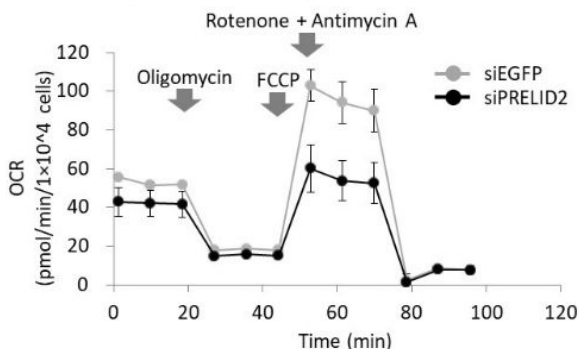
4. 研究成果

(1) PRELID2 とミトコンドリア機能との関連解析：

PRELID2 発現とミトコンドリア呼吸鎖機能との関連を検討するため、細胞外フラックスアナライザー XFe24(Agilent Technologies 社)を用いた解析を行った。腎癌細胞株 Caki-1 を reverse transfection 法で siRNA を用いて PRELID2 発現抑制を行い(コントロール: siEGFP) 解析を行った。解析の結果、PRELID2 発現抑制によってコントロールと比較して基礎呼吸と予備呼吸能が、それぞれ有意に低下することが示された(右図)。また、グルコース飢餓条件にするとコントロールにおいても予備呼吸能が有意に低下し、グルコース飢餓かつ PRELID2 発現抑制した Caki-1 の予備呼吸能が非常に乏しくなることが示された。これらのミトコンドリア呼吸

Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test :

Cells: Caki1, Analyses at 48hr after RNAi transfection



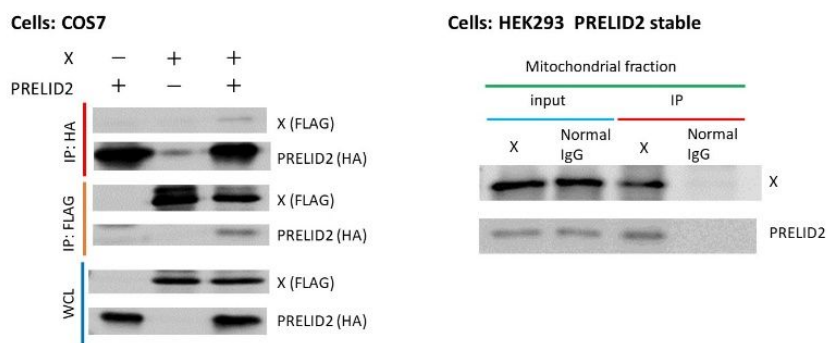
PRELID2発現抑制によるミトコンドリア予備呼吸能の低下を認めた

鎖能との関連が、先行研究の PRELID2 の細胞増殖能や活性酸素の制御と関連することが示唆されると考えている。

(2) PRELID2 の活性酸素の制御に関連する結合分子の同定：

我々が樹立した HEK293PRELID2 安定発現細胞 (HA タグ付き) と HEK293 mock 細胞のセルライセートを用いて PRELID2 (HA 抗体) による共免疫沈降を行った。結合してきたタンパクのショットガンプロテオミクスによる解析を行い、結合分子を探索した。候補分子として既存の文献報告でミトコンドリアにおける細胞内局在をし、活性酸素の制御に関連することが明らかとなっている分子を抽出した結果、分子 X を同定した。PRELID2 と分子 X の結合に関しては、HEK293PRELID2 安定発現細胞 (HA タグ付き) と HEK293 mock 細胞のセルライセートを用いて分子 X の抗体による共免疫沈降を行い、ウエスタンブロッティングによって PRELID2 と結合していることも確認した。

この結果より、腎癌の癌化の過程において PRELID2 と分子 X によって活性酸素の制御が関わっていることが示唆される。



当初は4年の経過であったが、これまでの研究結果から、腎癌の癌化の過程における PRELID2 による酸化ストレス制御の働きが重要であることが示唆され、基盤 C に本研究の最終年度前年度応募し採択され新規研究に取り組んでいくこととなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 加藤 廉平
2. 発表標題 Critical involvement of PRELID2 in regulating mitochondrial ROS production for renal carcinogenesis
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Renpei Kato
2. 発表標題 Mitochondrial protein of relevant evolutionary and lymphoid interest domain containing 2 (PRELID2), a novel molecule in carcinogenesis of renal cell carcinoma
3. 学会等名 the American Urological Association's 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Renpei Kato
2. 発表標題 Mitochondrial PRELID2, a novel molecule in carcinogenesis of renal cell carcinoma
3. 学会等名 12th Triennial Meeting German-Japanese Confederation of Urology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	片桐 豊雅 (Katagiri Toyomasa)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	吉丸 哲郎 (Yoshimaru Tetsuro)		
研究協力者	松下 洋輔 (Matsushita Yosuke)		

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