

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18007

研究課題名(和文) ミトコンドリア 小胞体関連タンパクPDZD8を標的とする骨肉腫治療戦略

研究課題名(英文) Targeting of the mitochondria-ER-tethering protein PDZD8 for osteosarcoma treatment

研究代表者

岸 真五 (Kishi, Shingo)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50790341

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)：ミトコンドリアと小胞体を係留し両者の物質移動や代謝に影響を与える mitochondria-associated membrane (MAM)に注目が集まっている。本研究では、MAMの中でもPDZD8についてその機能を検討したところ、PDZD8タンパクは腫瘍特異的に発現している可能性があり、ミトコンドリアの鉄代謝を制御しROS産生を抑制していることが示唆された。PDZD8の抑制は、ROS産生の増加から抗癌剤やF1F0-ATPaseを阻害するプテロスチルベンの抗腫瘍効果を促進した。SunitinibはPDZD8をoff targetとして抑制する可能性が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PDZD8が腫瘍特異的に発現し、その抑制が抗がん剤などの抗腫瘍効果を促進したことは、PDZD8ががん治療における新たな分子標的となることが考えられる。とくに、SunitinibはPDZD8をoff targetとして抑制したことは、今後のPDZD8のシグナル経路の解明の手掛かりとなるとともに、PDZD8を標的とする創薬に繋がる知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria-associated membranes (MAMs) have attracted much attention which tethers mitochondria and endoplasmic reticulum (ER) to influence substance transfer and metabolism between the two. In this study, we examined the function of PDZD8 among MAMs, suggesting that PDZD8 protein is expressed in a tumor-specific manner, regulating mitochondrial iron metabolism and suppressing ROS production. Inhibition of PDZD8 promoted the antitumor effects of anticancer drugs and pterostilbene, which inhibits F1F0-ATPase, from increased ROS production. Sunitinib might suppress PDZD8 as its off target.

研究分野：がん生物学

キーワード：ミトコンドリア繫留分子 PDZD8 骨肉腫 活性酸素 鉄 スニチニブ プテロスチルベン

### 1. 研究開始当初の背景

最近、ミトコンドリアと他のオルガネラとの協調作用が注目され、その制御系として mitochondria-associated membrane (MAM)などのミトコンドリアとオルガネラを係留・連携するタンパク群に焦点が集まっている。小胞体膜とミトコンドリアと接触する領域がミトコンドリアの分裂や飢餓にともなうオートファジーの制御に関与することが報告されている (Arasaki K, Developmental Cell. 2015)。PDZD8 は、はじめウイルス感染関連タンパクとして HSV1 や HIV1 ウイルスの感染を阻害すると報告された (Henning MS, J Virol. 2010、Henning MS, Virology. 2011)。その後、PDZD8 はイーストにおけるミトコンドリア 小胞体係留タンパクのひとつである Mmm1 と相同性を有し、哺乳類においてミトコンドリア 小胞体の係留を行うことが明らかになった (Hirabayashi Y, Science. 2017)。イーストでは Mmm1 はミトコンドリア 小胞体間の脂質輸送に関係するとされるが (Jeong H, Proc Natl Acad Sci USA. 2017) 哺乳類ではカルシウムシオンの移動を制御することが示唆されている (Hirabayashi Y, Science. 2017)。しかし、PDZD8 の機能的な解析は未だ不十分であり、細胞死との関連を示唆する申請者のデータを裏付ける機序も明らかではない。

### 2. 研究の目的

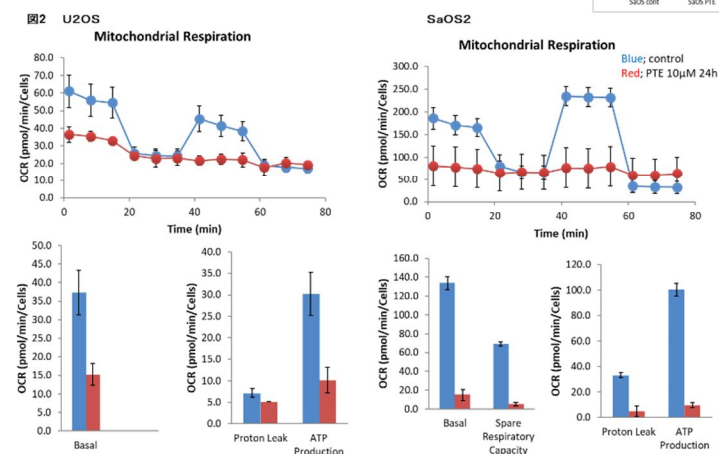
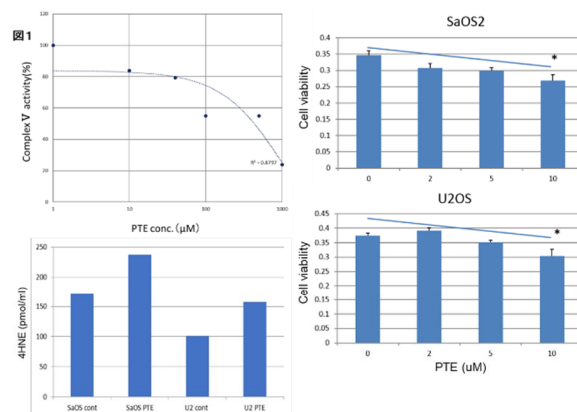
本研究では、PDZD8 の機能を明らかにし、その標的化が骨肉腫の新たな分子標的となることを証明することを目的とする。MAM 研究は近年進展が著しく、とくにパーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患との関連から注目を集め (Gómez-Suaga P, Cell Death Dis. 2018, Area-Gomez E, FASEB J. 2017) MAM 機能障害が疾患の本態とする仮説が提唱されている (Schon EA, Mol Cell Neurosci. 2013)。がんとの関係についてもカルシウム・イオンとアポトーシスの関連から研究がなされているが、(Doghman-Bouguerra M, Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2019) がんにおける PDZD8 の役割を報告したものは PubMed 上認められない。PDZD8 を標的化することにより骨肉腫の治療に応用することが出来れば、若年者に発生し、依然難治で、生存してもその機能的予後を制限する骨肉腫に対する治療に新規な有効なツールとなることが期待される。

### 3. 研究の方法

PDZD8 の機能解析として、(1) PDZD8 のノックダウンによる細胞死誘導機序、(2) PDZD8 の機能制御に関連するシグナルの同定、(3) PDZD8 の骨肉腫における発現と臨床病理学的因子・薬剤耐性との関連を検討する。また、PDZD8 の治療標的化の検討として、(1) PDZD8 阻害の抗腫瘍効果、(2) PDZD8 阻害の正常組織への影響 (3) PDZD8 阻害剤のミトコンドリアへの作用を検討する。

### 4. 研究成果

ヒト骨肉腫細胞株の SaOS2 および U2OS を F1FOATPase 阻害活性を有するプロテロスタチンで処理すると、濃度依存性の増殖抑制が認

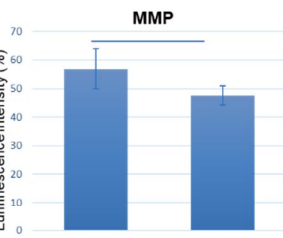
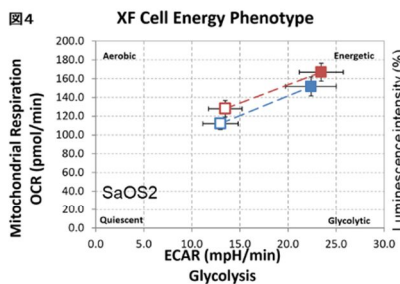
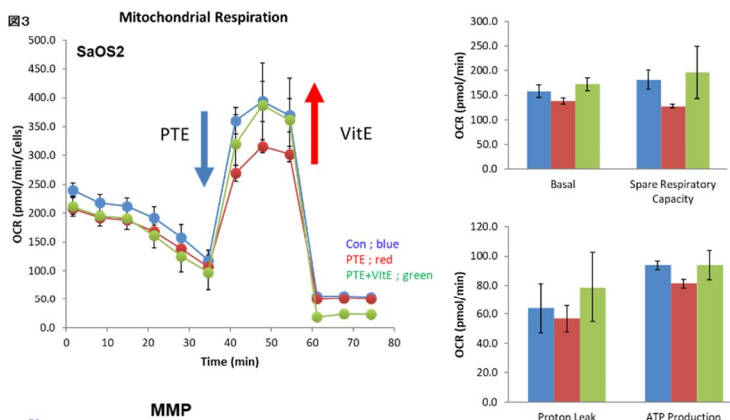


められた (図1)。このとき、プロテロスタチンにより酸化ストレスの増大が見られた。

さらに、プロテロスタチンの酸化リン酸化に対する作用をFlux解析で検討すると、図2のように、プロテロスタチンによりミトコンドリア呼吸は著明に抑制され、ATP産生も著減した。

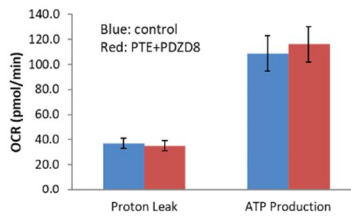
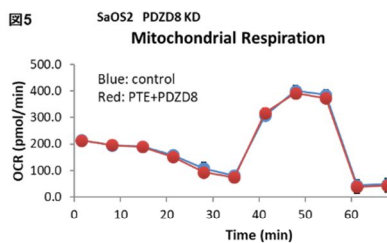
これに対し、βテロステロールとともに抗酸化剤であるビタミンEを処理すると、βテロステロールにより抑制されたミトコンドリア呼吸は回復しATP産生も正常化した。

これらのことから、ミトコンドリア ROS 産生の増加が酸化リン酸化を阻害し、細胞増殖を抑制したと考えられた。



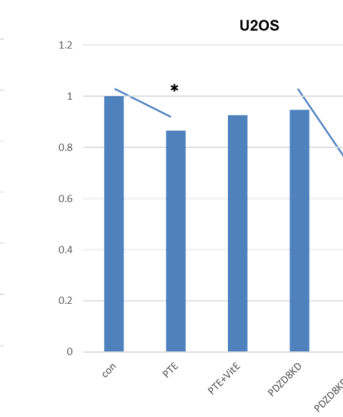
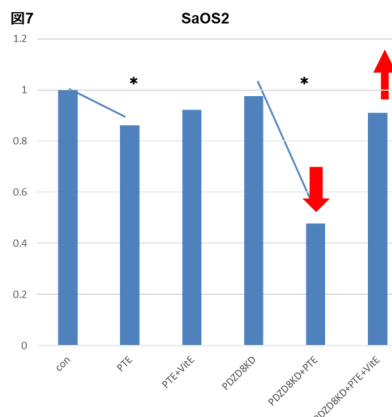
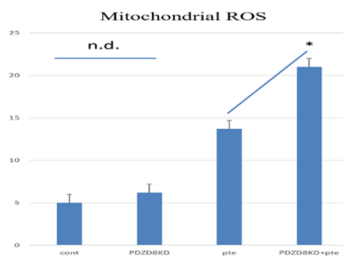
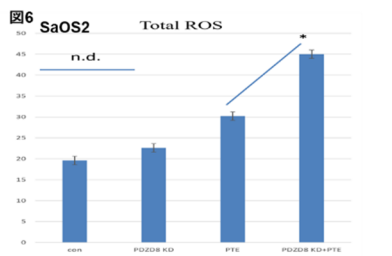
これに対して、MAM タンパクである PDZ8 をノックダウンしても、図 4 のようにミトコンドリア膜電位 (MMP) は保たれており、エネルギー代謝にも変化は認められなかった。

ところが、PDZ8 ノックダウンとβテロステロール処理を併用すると、図 5 のようにβテロステロールによる酸化リン酸化の阻害が打ち消され、ミトコンドリア呼吸や ATP 産生の抑制は認められなくなった。



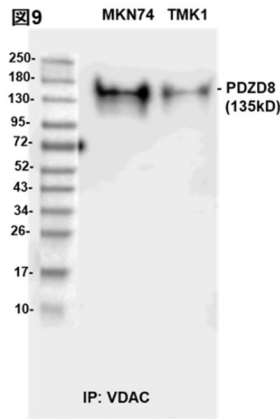
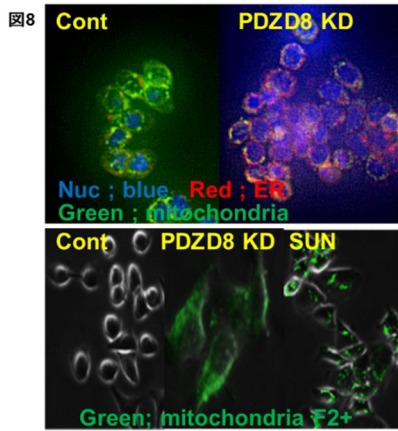
さらに、興味深いことに、βテロステロール単独で誘導された total ROS およびミトコンドリア ROS のいずれもが、PDZ8 ノックダウンとβテロステロール処理を併用により著明に増加した (図 6)。

その結果、PDZ8 ノックダウンとβテロステロール処理を併用することにより、細胞増殖はβテロステロール単独よりも著明に抑制された (図 7)。この併用処理による増殖抑制はビタミン E により消失した。



用を示さないのに対して、βテロステロールの酸化リン酸化抑制作用を阻害することにより、ROS 産生を亢進し、細胞障害をもたらしていると考えられる。

この原因を検討するため、PDZ8 の MAM 作用について検討を行った。図 8 上段のように、PDZ8 をノックダウンすると、ミトコンドリアと小胞体 (ER) の共局在が低下する。このとき、ミトコンドリア Fe<sup>2+</sup>の量が増加することが認められた (図 8 下段)。このことから、PDZ8 ノックダウンによりミトコンドリアと小胞体の繫留が低下し、両者の間の鉄移行に障害をもたらされたと考えられる。PDZ8 はプラットフォーム・タンパクであり、ミトコンドリアと小胞体を係留する領域に種々のタンパクをリクルートし、特定の機能を果たす複合体を形成すると考えられる。そこで、PDZ8 と共沈するタンパク質を免疫沈降で検討した。その結果、カルシウム移動に関与する VDAC が PDZ8 と共沈した (図 9)。VDAC は鉄移動に関与する mitoNEET と結合することが報告さ



れており、PDZD8 が構築する MAM 複合体内に VDAC とともに mitoNEET がインテグレートされ、鉄移動に関与することが考えられる。

ミトコンドリア鉄沈着をマーカーとして同様の变化をもたらす薬剤を検討したところ、スニチニブ (SUN) が抽出された (図 8 下段)。スニチニブ処理により PDZD8 と同様の PTE との相乗効果がミトコンドリア呼吸、ROS 産生、細胞増殖抑制に対して認められることから、スニチニブは off target として PDZD8 を阻害する可能性が示唆された。今後、詳細な検討を行うことで PDZD8 のシグナル経路を解明することが可能になると考えられる。

興味深いことに、胃粘膜と腫瘍性病変を用いて、PDZD8 タンパクの発現レベルを検討したところ、表 1 のように PDZD8 タンパクは胃癌組織のみ発現しており、正常粘膜組織および腺腫では発現は認められなかった。

このことから、PDZD8 は胎児組織や主要組織のような増殖性組織において MAM の役割を果たしている可能性が考えられ、今後の検討が必要である。

表1: 胃粘膜・胃腫瘍におけるPDZD8タンパク発現

Tissue	n	PDZD8 expression				P value <sup>1)</sup>
		Negative	Low	Moderate	High	
Foveolar epithelium	35	35	0	0	0	
Pyloric gland	24	24	0	0	0	
Fundic gland	11	11	0	0	0	
Intestinal metaplasia	12	12	0	0	0	
Adenoma	11	11	0	0	0	
Adenocarcinoma	85	0	8	39	38	<0.0001

表2: 胃癌におけるPDZD8タンパク発現と進行度

Parameter	n	PDZD8 expression			P value <sup>1)</sup>	
		Low	Moderate	High		
pT <sup>3)</sup>	1	10	3	5	2	0.031
	2	25	4	12	9	
	3	44	1	21	22	
	4	6	0	1	5	
pStage <sup>3)</sup>	1	34	7	16	11	0.0106
	2	44	1	22	21	
	3 - 4	7	0	1	6	

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 8件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Hojo Yudai, Kishi Shingo, Mori Shiori, Fujiwara-Tani Rina, Sasaki Takamitsu, Fujii Kiyomu, Nishiguchi Yukiko, Nakashima Chie, Luo Yi, Shinohara Hisashi, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 23
2. 論文標題 Sunitinib and Pterostilbene Combination Treatment Exerts Antitumor Effects in Gastric Cancer via Suppression of PDZD8	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4002 ~ 4002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23074002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ogata Ruiko, Mori Shiori, Kishi Shingo, Sasaki Rika, Iwata Naoya, Ohmori Hitoshi, Sasaki Takamitsu, Nishiguchi Yukiko, Nakashima Chie, Goto Kei, Kawahara Isao, Fujiwara-Tani Rina, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 23
2. 論文標題 Linoleic Acid Upregulates Microrna-494 to Induce Quiescence in Colorectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 225 ~ 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujiwara-Tani Rina, Okamoto Ayaka, Katsuragawa Hiroyuki, Ohmori Hitoshi, Fujii Kiyomu, Mori Shiori, Kishi Shingo, Sasaki Takamitsu, Nakashima Chie, Kawahara Isao, Hojo Yudai, Nishiguchi Yukiko, Mori Takuya, Mizumoto Takeshi, Nagai Kenta, Luo Yi, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 22
2. 論文標題 BRAF Mutation Is Associated with Hyperplastic Polyp-Associated Gastric Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12724 ~ 12724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222312724	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Mori Takuya, Goto Kei, Kawahara Isao, Nukaga Shota, Wakatsuki Yuma, Mori Shiori, Fujiwara-Tani Rina, Kishi Shingo, Sasaki Takamitsu, Ohmori Hitoshi, Kido Akira, Honoki Kanya, Tanaka Yasuhito, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 1
2. 論文標題 Effect of Vitamin B2 and Vitamin E on Cancer-Related Sarcopenia in a Mouse Cachexia Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioMed	6. 最初と最後の頁 50 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomed1010004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mori Shiori, Fujiwara-Tani Rina, Kishi Shingo, Sasaki Takamitsu, Ohmori Hitoshi, Goto Kei, Nakashima Chie, Nishiguchi Yukiko, Kawahara Isao, Luo Yi, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 22
2. 論文標題 Enhancement of Anti-Tumoral Immunity by -Casomorphin-7 Inhibits Cancer Development and Metastasis of Colorectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8232 ~ 8232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22158232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kishi Shingo, Nishiguchi Yukiko, Honoki Kanya, Mori Shiori, Fujiwara-Tani Rina, Sasaki Takamitsu, Fujii Kiyomu, Kawahara Isao, Goto Kei, Nakashima Chie, Kido Akira, Tanaka Yasuhito, Luo Yi, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 22
2. 論文標題 Role of Glycated High Mobility Group Box-1 in Gastric Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5185 ~ 5185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22105185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takuya Mori, Akira Kido, Isao Kawahara, Shota Nuaga, Yoshihiro Miyagawa, Kei Goto, Shiori Mori, Shingo Kishi, Kiyomu Fujii, Rina Fujiwara-Tani, Hiroki Kuniyasu	4. 巻 5
2. 論文標題 Nutritional intervention for cancer sarcopenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Musculoskeletal Medicine	6. 最初と最後の頁 001 ~ 004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17352/amm.000024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Luo Yi, Kishi Shingo, Sasaki Takamitsu, Ohmori Hitoshi, Fujiwara Tani Rina, Mori Shiori, Goto Kei, Nishiguchi Yukiko, Mori Takuya, Kawahara Isao, Kondoh Masuo, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 111
2. 論文標題 Targeting claudin 4 enhances chemosensitivity in breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1840 ~ 1850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mori Shiori, Kishi Shingo, Honoki Kanya, Fujiwara-Tani Rina, Moriguchi Takuma, Sasaki Takamitsu, Fujii Kiyomu, Tsukamoto Shinji, Fujii Hiromasa, Kido Akira, Tanaka Yasuhito, Luo Yi, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 21
2. 論文標題 Anti-Stem Cell Property of Pterostilbene in Gastrointestinal Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9347 ~ 9347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21249347	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sasaki Takamitsu, Mori Shiori, Kishi Shingo, Fujiwara-Tani Rina, Ohmori Hitoshi, Nishiguchi Yukiko, Hojo Yudai, Kawahara Isao, Nakashima Chie, Fujii Kiyomu, Luo Yi, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 21
2. 論文標題 Effect of Proton Pump Inhibitors on Colorectal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3877 ~ 3877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21113877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Owari Takuya, Sasaki Takamitsu, Fujii Kiyomu, Fujiwara-Tani Rina, Kishi Shingo, Mori Shiori, Mori Takuya, Goto Kei, Kawahara Isao, Nakai Yasushi, Miyake Makito, Luo Yi, Tanaka Nobumichi, Kondoh Masuo, Fujimoto Kiyohide, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 21
2. 論文標題 Role of Nuclear Claudin-4 in Renal Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8340 ~ 8340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21218340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miyagawa Yoshihiro, Nukaga Shota, Mori Takuya, Fujiwara-Tani Rina, Fujii Kiyomu, Mori Shiori, Goto Kei, Kishi Shingo, Sasaki Takamitsu, Nakashima Chie, Ohmori Hitoshi, Kawahara Isao, Luo Yi, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 11
2. 論文標題 Evaluation of cancer-derived myocardial impairments using a mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 3712 ~ 3722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kishi S, Honoki K, Mori S, Kuniyasu H, Tanaka Y
2. 発表標題 Dual inhibition of direct metabolic features targets osteosarcoma stem cells.
3. 学会等名 APMSTS - Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society 2021, Okayama, 2021.4.21-23 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kishi S, Honoki K, Mori S, Fujiwara-Tani R, Kido A, Fujii H, Tsukamoto S, Tanaka Y, Kuniyasu H
2. 発表標題 F0-F1 ATPase is a therapeutic target for osteosarcoma without cardiotoxicity.
3. 学会等名 80th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Tokyo (ハイブリッド開催), 2021.9.30-10.2
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸 真五、朴木寛也、森 汐莉、谷 里奈、城戸 顕、藤井宏真、塚本真治、國安弘基、田中康仁
2. 発表標題 Pterostilbeneは細胞特異的mitochondria毒性により抗腫瘍効果を示す
3. 学会等名 第54回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、広島、2021.7.15-16
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸 真五、森 汐莉、朴木寛弥、谷 里奈、大森 育、藤井 澄、佐々木里歌、藤井宏真、塚本真治、田中康仁、國安弘基
2. 発表標題 PterostilbeneはF0-F1ATPase阻害作用をもち骨肉腫細胞特異的にmitochondria毒性をもたらす
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会、東京都（ハイブリッド開催）、2021.4.22-24
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 岸真吾、森汐莉、谷里奈、森拓也、宮川良博、額賀翔太、川原勲、羅奕、朴木寛容、國安弘基
2. 発表標題 PDZD8による小胞体-ミトコンドリアの繫留は骨肉腫細胞においてミトコンドリアの活性を制御する
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北條雄大、岸 真五、森 汐莉、谷 里奈、篠原 尚、國安弘基
2. 発表標題 小胞体 - ミトコンドリア繫留分子PDZD8の抑制は胃癌に細胞死をもたらす
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kishi S, Mori S, Fujiwara-Tani R, Hojo Y, Owar T, Mori T, Nukaga S, Kita M, Sasaki R, Honoki K, Kuniyasu H
2. 発表標題 The creatine kinase is a metabolic vulnerability in Osteosarcoma.
3. 学会等名 79th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Hiroshima
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sasaki R, Kishi S, Mori S, Fujiwara-Tani R, Sasaki T, Luo Y, Kuniyasu H
2. 発表標題 HMGB1 regulates mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells to cancer cells damaged by 5-fluorouracil
3. 学会等名 79th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Hiroshima
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mori S, Fujiwara-Tani R, Kishi S, Kuniyasu H
2. 発表標題 Alteration of 0 cells in in vivo environment
3. 学会等名 79th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Hiroshima
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------