

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 28 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16803

研究課題名(和文) ISYNA1による細胞内ミオイノシトール合成制御からの腎細胞癌抑制機序の解明

研究課題名(英文) Regulation of intracellular myo-inositol synthesis by ISYNA1 as a mechanism of renal cell carcinoma suppression

研究代表者

胡口 智之 (Koguchi, Tomoyuki)

福島県立医科大学・医学部・病院助手

研究者番号：40791950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腎癌に対する薬物療法の一つである分子標的療法は、細胞内のAkt活性化を阻害することで治療効果を示します。また、水溶性ビタミンであるミオイノシトールは、Akt活性化を抑制すると報告されています。我々は細胞内ミオイノシトールに影響するISYNA1の発現制御が、新たな治療標的になる可能性を考え、研究を行いました。

まず、複数のヒト腎癌細胞株に薬剤処理を行い、ISYNA1の発現誘導を評価しました。その結果、腎癌細胞ではISYNA1の発現変化がない、または発現低下する結果が得られました。この結果から、腎癌細胞では薬剤処理にて細胞内ミオイノシトール増加が抑制される可能性が考えられました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん抑制遺伝子であるp53は、様々な下流遺伝子を制御すること抗腫瘍制効果を示します。これまで我々は、ISYNA1がp53の下流遺伝子であることを同定し、細胞内ミオイノシトールの制御を行っていることを発見しました。

本研究では、腎癌では薬剤投与による生体ストレス下でISYNA1の発現誘導を認めませんでした。ミオイノシトールはAkt活性化を抑制することから、ISYNA1の発現誘導のない腎癌では細胞内ミオイノシトールの増加抑制が起きていると考えられ、既存の分子標的療法の効果に影響する可能性が考えられました。この結果から、ISYNA1の発現制御が新規治療標的の開発に応用できる可能性が考えられました。

研究成果の概要(英文)：Molecularly targeted therapies for renal cell carcinoma inhibit intracellular Akt activation. Previous studies have reported that the water-soluble vitamin myo-inositol inhibits Akt activation. We investigated the regulation of ISYNA1 expression, which affects intracellular myo-inositol, as a potential new therapeutic target. We evaluated the induction of ISYNA1 expression by drug administration in several human renal cell carcinoma cell lines. The results showed that the expression of ISYNA1 was either unchanged or down-regulated in renal cell carcinoma cell lines. These results indicated that the intracellular myo-inositol up-regulation was inhibited in renal cancer cells even in response to biological stress.

研究分野：腎癌

キーワード：腎癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん抑制遺伝子 p53 は転写因子として、細胞周期の停止やアポトーシスの誘導、血管新生抑制といった機能を持つ遺伝子群の発現制御をすることが知られている。近年、p53 は解糖系の制御やエネルギー代謝、細胞内鉄の調整など細胞内の代謝制御も行っていることが報告されている。一方、腎癌では p53 の発現パターンが予後と関連するという報告があるが、p53 の変異自体は稀である。現在も p53 が腎癌の予後に影響する機序は解明されていない。そこで我々は、p53 が腎癌の予後に関連する機序として、p53 下流遺伝子が影響している可能性に着目し研究を行ってきた。

### 2. 研究の目的

これまでの研究において、新規 p53 下流遺伝子 Inositol 3-phosphate synthase (ISYNA1) を同定し、p53 が細胞内ミオイノシトールを制御することを報告してきた。ミオイノシトールは、腫瘍の生存に影響する Akt の活性化を抑制すると報告されている。また、腎癌の分子標的療法は Akt の活性化阻害を目的にしている。そこで本研究では、p53 - ISYNA1 経路が細胞内ミオイノシトールを介して腎癌に影響する機序の解明を行う。さらに、ISYNA1 の発現をコントロールすることによる新たな治療法の開発に向けた基礎的研究を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 腎癌における ISYNA1 発現コントロールが新規治療法に応用可能かどうか評価するため、まずヒト腎癌細胞株における生体ストレス下での ISYNA1 発現解析を定量的 PCR にて行うこととした。また、複数の細胞株において同様の発現を示すか検討するため、ヒト腎癌細胞株 786-O、OSRC2、TUHR3TKB、TUHR4TKB、ACHN に対してアドリアマイシン投与による生体ストレスを与え、ISYNA1 発現誘導について評価した。また、転移性腎癌より樹立された ACHN に対して同様にアドリアマイシン処理を行い、ISYNA1 発現誘導と Akt および Erk1/2 のリン酸化活性状態の推移についてウェスタンブロットによる解析を試みた。

(2) ISYNA1 発現調整が可能な腎癌細胞株を作成するため、テトラサイクリン刺激応答性 (Tet-on システム) に ISYNA1 発現を行うプラスミドの作成を行うこととした。図 1 の様な ISYNA1 に対して発現調整タンパクであることを示す HA-tag を付与する遺伝子コンストラクトを作成した。作成した遺伝子コンストラクトを Tet-One™ Inducible Expression System (Clontech®) の pTetOne vector 中に存在するマルチクローニングサイトへ挿入し、発現調整プラスミドの作成を試みた。pTetOne vector でコンピテントセルを形質転換し、抗生剤を添加した LB 寒天選択培地に塗末培養した。LB 寒天選択培地で得られたシングルコロニーを採取し、抗生剤を添加した LB 液体培地で培養した。培養にて得られたコンピテントセルからプラスミド抽出を試みた。

(3) ヒト腎癌細胞株 786-O、ACHN に対して ISYNA1 強制発現プラスミドをリポフェクション法による遺伝子導入を行い、一過性遺伝子発現細胞におけるタンパク発現について解析を試みた。

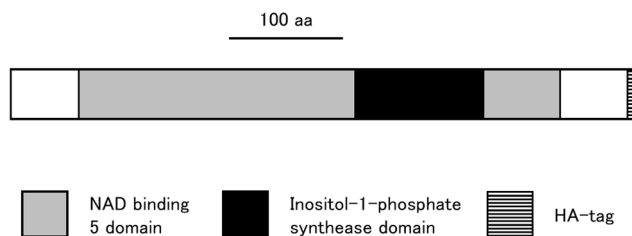


図1: 発現調整用のISYNA1タンパクの構造

### 4. 研究成果

(1) 腎癌細胞における生体ストレス下での ISYNA1 発現解析を行うため、ヒト腎癌細胞株 786-O、OSRC2、TUHR3TKB、TUHR4TKB、ACHN に対してアドリアマイシン処理による細胞傷害時の ISYNA1 mRNA 発現について定量的 PCR 法を用いて評価を行った。その結果、各ヒト腎癌細胞株にアドリアマイシン処理を行うと、生体ストレスの陽性コントロールである p53 下流遺伝子 CDKN1A はどの細胞株においても用量依存的に mRNA の発現上昇を認めた。一方、786-O、OSRC2 ではアドリアマイシンの用量依存的に ISYNA1 mRNA 発現の低下がみられ、TUHR3TKB、TUHR4TKB、ACHN では ISYNA1 mRNA 発現に変化はみられなかった (図 2)。

転移性腎癌から樹立された ACHN について、同様の条件でのタンパク発現についてウェスタンブロットで解析した。その結果、ISYNA1 は投与するアドリアマイシン濃度が

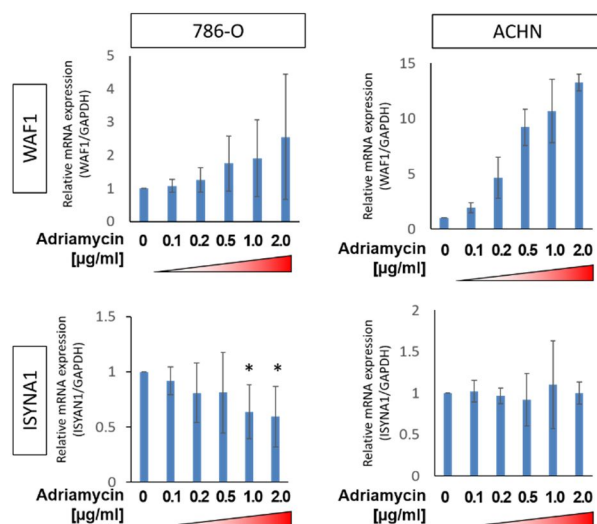


図2: ヒト腎細胞癌株へのアドリアマイシン投与とISYNA1発現変化

高濃度になるにつれタンパク発現が低下することが明らかとなった。また、Erk1/2 のリン酸化活性状態に変化を認めなかったが、Akt のリン酸化活性状態は ISYNA1 発現と逆相関する結果が得られた (図3)。

(2) ISYNA1 発現調整が可能な腎癌細胞株を作成するため、Tet-One™ Inducible Expression System を用いた ISYNA1 発現調整プラスミドの作成を試みた。作成した遺伝子コンストラクトを挿入したプラスミドでコンピテントセルを形質転換し、抗生物質を添加した LB 寒天選択培地に塗末培養して得られたシングルコロニーについて抗生物質を添加した LB 液体培地で培養した。培養にてコンピテントセルは十分得られたことから、市販の抽出キットを用いてプラスミド抽出を行った。抽出したプラスミドの濃度を測定すると、微量しか抽出されていなかった。低コピー数のプラスミドであった可能性も考え、大量 LB 液体培養後にプラスミドの抽出を行ったが、終了の増加は微々たるものであった。プラスミド濃縮目的にゲルから抽出、エタノール沈殿、イソプロパノール沈殿、フェノール・クロロホルム沈殿など各種手技を行うも、細胞実験に十分量のプラスミドは得られなかった。コンピテントセルの遺伝子導入、液体培養条件、プラスミド抽出の影響を考慮し、遺伝子組込後のプラスミド、組込前のプラスミドで条件検討、抽出実験の再検討を行うもプラスミドを十分得ることはできなかつたため、発現調整プラスミドの作成は一度中断することとした。

(3) ヒト腎癌細胞株に対する ISYNA1 遺伝子導入を行うため、定常発現用プラスミドである pCAGGS vector に遺伝子コンストラクトを組み込んだ強制発現プラスミドを利用することとした (Koguchi T et al Int J Oncol. 2016 Jun;48(6):2415-24.)。リポフェクション試薬を用いて、ヒト腎癌細胞株 786-O、ACHN に ISYNA1 強制発現ベクターを遺伝子導入した。ISYNA1 を一過性発現させた細胞株を用いて、ウェスタンブロットによるタンパク発現解析を行った。その結果、どちらの細胞株とも遺伝子導入した HA-tag の発現が確認されたが、786-O と比較し ACHN では強制発現プラスミドと遺伝子コンストラクトを含んでいないプラスミドの遺伝子導入において ISYNA1 の発現に差は認めなかった (図4)。

今回の研究において、腎癌細胞株の ISYNA1 発現と細胞内シグナルの活性状態に関連があることが明らかとなった。この結果から ISYNA1 が治療標的になり得る可能性が考えられ、その後に細胞株の ISYNA1 発現を変化させる発現ベクターの作成に移ったが、実験に使用できる十分量のプラスミドを得ることができなかつたため検証はできなかつた。プラスミドが得られない原因として、低コピー数プラスミドを使用していた可能性が考えられ、今後別な発現調整プラスミドを使用した実験について検討している。また、現在定常発現用プラスミドを用いた安定細胞株の作成に向けた準備を進めている。

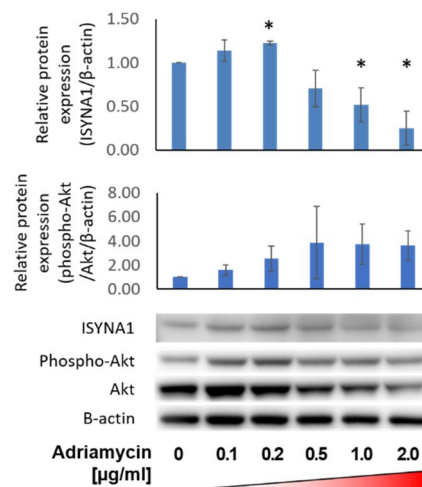


図3: ACHNのISYNA1発現とAkt活性状態

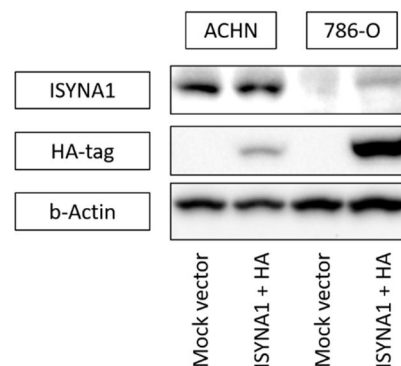


図4: ヒト腎癌細胞株とISYNA1一過性発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----