

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09180

研究課題名(和文)腎がん細胞のND1発現低下が細胞内ROSと転移増殖能へ与える影響の検討

研究課題名(英文)The effect of the low ND1 expression in renal cancer cells on the intracellular ROS, tumor metastasis and proliferation

研究代表者

金 伯士 (KIM, Hakushi)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：70609338

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)：腎癌におけるND1発現低下が細胞内ROS量に与える影響と腎癌におけるND1サブユニットの役割を解明する目的で研究を開始したが、siRNAによるND1ノックダウンに難渋したため、一部Sorafenibを用いた実験へ変更した。Sorafenibを加えた786-0でND1発現が低下することを確認した。ウエスタンブロット法では約25%のタンパクレベルでの発現低下を認めた。ROS検出試薬で処理した786-0(sorafenib+)と786-0(sorafenib-)の蛍光強度をArrayScanで測定した結果、786-0(sorafenib+)で細胞内ROSの上昇を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、核ゲノムによってコードされる各増殖因子や免疫チェックポイントを標的とした治療薬が主である腎細胞癌において、ミトコンドリアゲノムによってコードされるND1サブユニットの腎細胞癌における役割に着目した新しい試みである。マルチキナーゼ阻害薬であるSorafenibによってND1サブユニットは遺伝子およびタンパクレベルで発現低下し、また間接的ではあるが、細胞内ROS量の上昇を認めた。SorafenibによるND1サブユニットおよび細胞内ROSへの影響とその機序を紐解くことによって、治療抵抗性の解明や新たな治療薬の開発への今まではない側面からのアプローチとなる。

研究成果の概要(英文)：We started this study to investigate the effect of ND1 downregulation on intracellular ROS levels and the role of ND1 subunit in renal cell carcinoma. However, due to the difficulty in knocking down ND1 using siRNA, we switched to sorafenib-mediated experiments. As a result, we confirmed that sorafenib reduced ND1 gene expression in 786-0. Western blotting showed a decrease in expression at the protein level of about 25%. The fluorescence intensity of 786-0(sorafenib+) and 786-0(sorafenib-) treated with ROS detection reagent was measured by ArrayScan, and the intracellular ROS was increased in 786-0(sorafenib+).

研究分野：腎細胞癌

キーワード：腎細胞癌 ND1 ROS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 転移性腎細胞癌に対する新規治療標的の必要性

腎細胞癌は、根治的切除を行った後でも 20-30%の患者に再発を認め、転移性腎細胞癌へと進展する。転移性腎細胞癌の治療成績は、分子標的治療薬の登場によってサイトカイン時代と比べ向上したが、30-40%と満足のいく結果を得られていない。更なる治療成績向上のためには、腎細胞癌の進展(増殖、転移)に関係する新たな標的分子の探索が必要である。腎細胞癌の進展は、HIF-1の蓄積による各種増殖因子(VEGF, PDGF, FGF 他)の過剰発現が主因で、それらを標的とした薬剤(血管新生阻害薬, mTOR 阻害薬)が多数存在する。しかしながら、活性酸素種(以下 ROS)やアポトーシスなどの腫瘍進展を制御するミトコンドリア分子に着目した薬剤は無い。

### (2) ND1 遺伝子変異と ROS 蓄積、腫瘍進展への影響

ND1 サブユニットは、ミトコンドリア内膜で酸化リン酸化を担う呼吸鎖複合体を構成する膜蛋白サブユニットのひとつである(図 1)。

ND1 サブユニットをエンコードする ND1 遺伝子(ND1)は、956 塩基対から構成される遺伝子である。ND1 変異は、酸化リン酸化反応の停滞を引き起こし、細胞内に ROS が過剰蓄積する。その結果、酸化ストレス

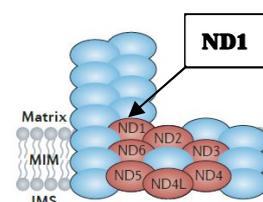


図 1 呼吸鎖複合体

によるミトコンドリア DNA への更なる変異を惹起し、細胞エネルギーの効率的な産生は障害を受け、解糖系を中心とした腫瘍進展に好条件なエネルギー環境が形成される。

### (3) 腎細胞癌組織における ND1 遺伝子変異と臨床的予後の検討

申請者は腎細胞癌術後患者の非再発生存率が、ND1 変異を有する群で有意に不良であることを示した(H Kim et al. Int J Mol Sci. 2016)。特に、腎癌死した症例は、全例(4例)が ND1 にミスセンス変異を有していた。また、リアルタイム PCR (RT-PCR)では、腎癌手術検体 48 例のうち、23 例(47.9%)に ND1 発現低下を認めた。ND1 発現低下、ROS 過剰蓄積および腎細胞癌進展は密接な関係が示唆されるが、その関連に言及した研究報告はなく、本研究の課題となる。

以上の学術的背景から、腎癌細胞株における ND1 発現量と細胞内 ROS 蓄積量の比較を行い、ND1 発現を抑制した細胞株を用いて腫瘍増殖能、転移能を in vivo で検討予定であった。しかしながら、siRNA 法(MT-ND1 siRNA Oligo set; Accession Number: ENST00000361390)で十分な ND1 発現抑制を得られず、研究進捗に遅れが出たため、研究計画を一部変更した。

## 2. 研究の目的

腎細胞癌 ND1 サブユニット発現低下が細胞内 ROS 量に与える影響と腎細胞癌における ND1 サブユニットの役割を解明する。

## 3. 研究の方法

5 種類の腎癌細胞株(786-0, RCC4/vector alone, RCC4/VHL, ACHN, Caki2)を用いて以下の実験を行った。

- (1) サンガーシクエンスによる腎癌細胞株の ND1 変異探索
- (2) RT-PCR法による ND1 発現量の比較検証
- (3) 殺細胞性抗がん剤および分子標的薬を用いた ND1 発現量へ影響を与える薬剤のスクリーニング
- (4) スクリーニング薬剤による ND1 発現量の mRNA およびタンパクレベルでの評価
- (5) 蛍光マーカーによる細胞内 ROS 蓄積の比較検証

蛍光マーカー(carboxy-H<sub>2</sub>DCFCA)で染色。Arrayscanを用いた ROS 検出試薬の蛍光強度比較。

(6) *ND1*発現量とROS蓄積量の比較

4. 研究成果

(1) 5種類の細胞株の*ND1*変異

ACHN, Caki2に1か所、RCC4/vector alone, RCC4/VHLに2か所の共通の*ND1*変異を認めた(表1)。A3480Gはsynonymous変異、T3398CとA3796Gはnon-synonymous変異であり、T3398Cはlikely pathogenic (APOGEE)であった。

cell line	変異サイト	
786-0	None	
ACHN	A3480G	
Caki2	A3480G	
RCC4 vector	T3398C	A3796G
RCC4 vhl	T3398C	A3796G

表1 腎癌細胞株における*ND1*変異

(2) 5種類の細胞株の*ND1*発現量

RT-PCR法で腎癌細胞株間の*ND1*発現量に差を認めた(図2)。*ND1*発現量はACHNで最も高く、Caki2で最も低かった。

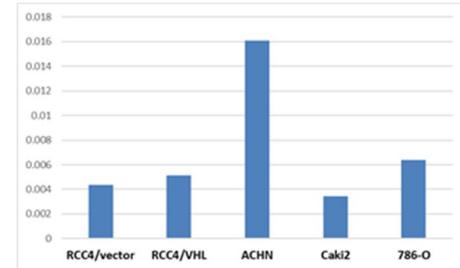


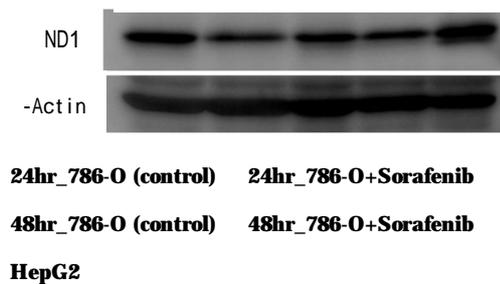
図2 腎癌細胞株における*ND1*発現量

(3) *ND1*発現量へ影響を与える薬剤のスクリーニング

MT-*ND1* siRNA (Human)を用いて、786-0, RCC4/vector alone, RCC4/VHLの*ND1*ノックダウンを試みたが、十分なダウンレギュレーションを得られなかった。そのため、研究計画を一部変更し、抗がん剤および分子標的薬を用いて、上記腎癌細胞株の*ND1*発現量の変化をスクリーニングした結果、786-0においてSorafenibで発現量の低下を認めた。

(4) Sorafenibによる*ND1*発現量の変化

786-0にSorafenib(20 μM)を添加した786-0 (Sorafenib+)では、RT-PCR法で約70%の*ND1*発現量の低下を認め、ウエスタンブロット法で約25%のタンパクレベルの低下を認めた(図3)。



(5) 786-0 (Sorafenib+) 細胞株を用いた細胞内ROS測定

上記の細胞株を用いて細胞内ROSを測定した。ROS検出試薬で処理した786-0 (sorafenib+)と786-0 (sorafenib-)の蛍光強度をArrayScan測定した結果、786-0 (sorafenib+)でROS蛍光強度の上昇を認めた(図4)。

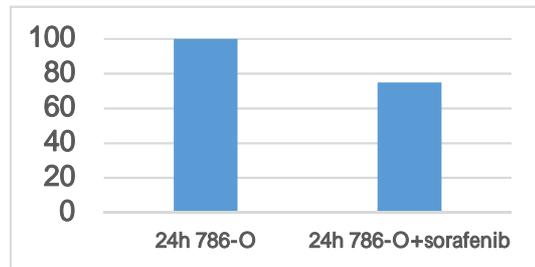
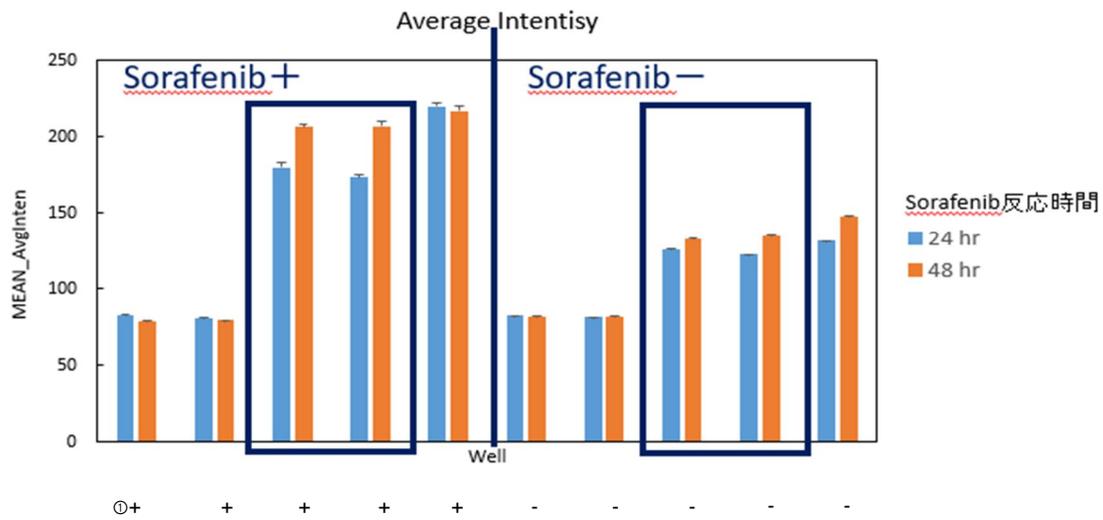


図3 Sorafenibの有無による786-0における*ND1*タンパク発現量の変化



①H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, ROS 試薬- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+, ROS 試薬- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, ROS 試薬+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, ROS 試薬+ ①H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+, ROS 試薬+  
 +:Sorafenib あり, -:Sorafenib なし

図 4 Sorafenib 添加の有無による細胞内 ROS の比較

(6) Sorafenib添加により786 - 0細胞株におけるND1はタンパクレベルでの発現低下を認め  
 た。また、細胞内ROSは増加を示した。ND1発現量の変化と細胞内ROS量の関連が示唆さ  
 れる所見であったが、siRNA法による直接的なND1発現コントロールに難渋したため、間  
 接的な結果となる。shRNAを用いた方法によるND1ノックダウンで本結果を検証する必要  
 がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金 伯士、小見山智義、川上正能、新田正広、長谷川政徳、河村好章、小路 直、井野元智恵、渡橋 靖、梶原 博、中村直哉、小林広幸、宮嶋 哲
2. 発表標題 限局性腎細胞癌におけるミトコンドリアD-loop変異は予後因子として有用か.
3. 学会等名 日本泌尿器科学会
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
研究分担者	小見山 智義  (Komiya Tomoyoshi)  (60439685)	東海大学・医学部・准教授    (32644)	
研究分担者	宮嶋 哲  (Miyajima Akira)  (90245572)	東海大学・医学部・教授    (32644)	

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