

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：19K07455

研究課題名（和文）肺腺癌細胞においてミトコンドリアに局在するOCIAD2の機能的意義の検証

研究課題名（英文）Functional analysis of OCIAD2 localized at mitochondria in lung adenocarcinoma

研究代表者

柴綾（Shib, Aya）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50708427

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：OCIAD2は浸潤性肺腺癌において過剰発現する腫瘍特異性の非常に高い遺伝子である。患者予後とも負に相関し、肺腺癌の悪性化に何らかの機能を持つことが示唆されていた。本研究を通してOCIAD2は複数の肺腺癌細胞においてミトコンドリアの形態の維持に重要であることが明らかになった。さらにミトコンドリアの膜電位を安定化させることでアポトーシスを抑制している可能性が示唆され、多くのミトコンドリア局在タンパク質と結合していることも示された。特にVDAC1との相互作用は興味深く、今後はOCIAD2機能の分子機序をより詳細に解析したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OCIAD2は浸潤性肺腺癌で高発現するミトコンドリア局在タンパク質であるが、その詳細な機能と分子メカニズムは明らかではなかった。本課題では、肺腺癌細胞でのOCIAD2の発現抑制が細胞増殖を抑制しミトコンドリア依存性アポトーシスを引き起こすことを見出し、その機能に重要と考えられる新たな結合タンパク質も同定した。今後は、OCIAD2が結合相手の1つであるVDAC1とどのように作用するかを解析し、この結合を阻害して腫瘍進展を抑制する治療戦略を開発したい。これにより、OCIAD2-VDAC1複合体またはOCIAD2-その他の結合相手を標的とした抗腫瘍薬が肺腺癌の有望な治療法となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：OCIAD2 is a gene that is overexpressed in invasive lung adenocarcinoma and exhibits very high tumor specificity because it is not expressed in normal lung tissue. The high-expression group has significantly poorer prognosis compared to the low-expression group, suggesting that OCIAD2 may have some function in the malignancy of lung adenocarcinoma. In this study, we focused on the function of OCIAD2 in mitochondria and analyzed the effects of OCIAD2 expression inhibition on proliferation and apoptosis using lung adenocarcinoma cells in vitro. OCIAD2 is suggested to inhibit apoptosis by stabilizing the mitochondrial membrane potential in multiple lung adenocarcinoma cells, and it was revealed to interact with numerous mitochondrial localization proteins. The interaction with VDAC1 is particularly intriguing, and further analysis of the molecular mechanisms of OCIAD2 function will be conducted in the future.

研究分野：分子病理学

キーワード：肺腺癌 アポトーシス ミトコンドリア OCIAD2

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

初期肺腺癌は形態学的に浸潤の有無や大きさに基づき、上皮内癌、初期浸潤癌に分類される。上皮内癌は術後5年生存率が100%であるのに対し、初期浸潤癌へと進行すると約75%となり死亡例を含む悪性度の高い癌となる。研究課題の核心をなす学術的な問いは、『どのような分子異常がこの患者予後の差を生み出しているのか』ということであり、申請者はこれまで上皮内癌と初期浸潤癌の間で有意に発現が異なる遺伝子群を網羅的に探索してきた。SFN や IGBP1 など複数の遺伝子発現異常を見出し肺腺癌の初期悪性化を促すことを示してきたが、その中でも最も機能がわかっていないものとして OCIAD2 (Ovarian Cancer Immunoreactive Antigen Domain Containing 2) が挙げられる。OCIAD2 は当研究室で上皮内癌に比べて初期浸潤癌で有意に発現が高い遺伝子として見出され、正常肺では発現がないため非常に腫瘍特異性の高い遺伝子である (Cancer Sci, 2007)。高発現群は低発現群に比べて予後不良で、肺腺癌において何らかの機能を持つことが示唆される (Pathol Int, 2018)。しかし、OCIAD2 はこれまでにミトコンドリアへの局在やアルツハイマーの進行などとの関連が散在的に示されているものの、腫瘍における系統立った機能解析はなされていない。

他方、ミトコンドリアは常に融合・分裂を繰り返す動的な細胞小器官である。近年このミトコンドリアダイナミクスの分子機序が明らかになりつつあり、この障害ががん発生と関連していることが示されている (FASEB J, 2012)。ミトコンドリアは分裂によって断片化すると、より多くの活性酸素種を産生し細胞増殖を促進するが、がん細胞ではこれと一致して、分裂の制御因子である DRP1 (dynamin-related protein 1) が活性化されミトコンドリア分裂が増加している。このミトコンドリアネットワークの断片化は、小胞体から放出された Ca^{++} のミトコンドリア内への伝播を抑制し (Moll Cell, 2004) Ca^{++} を介するアポトーシスが起こりにくくなるというがん細胞に有利な形質をもたらしている。

2. 研究の目的

申請者の予備実験において、OCIAD2 を発現抑制すると細胞種によっては細胞数の低下、アポトーシス誘導、細胞当たりのミトコンドリア数の減少が引き起こされることが示されており、OCIAD2 がミトコンドリアの分裂を何らかの方法で促進しているのではないかと予想した。そこで本課題では、ミトコンドリアに局在する OCIAD2 に着目し、浸潤性肺腺癌における OCIAD2 機能とそのメカニズムを、特にミトコンドリアダイナミクスとアポトーシスとの関与に絞って明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肺腺癌細胞およびヒト肺腺癌組織における OCIAD2 の発現と局在解析

上皮内癌由来の PL16T 細胞 (EGFR 野生型、KRAS 野生型)、進行肺腺癌由来の A549 細胞 (EGFR 野生型、KRAS 変異型)、HCC827 細胞 (EGFR 変異型、KRAS 野生型) 等、悪性度やドライバー変異など背景の異なる複数の肺腺癌細胞を試料として用いる。発現量は real-time RT-PCR 法、Western blot 法、局在は Mt マーカー Tom20 との蛍光免疫染色法で解析する。また、超遠心による細胞分画法を利用して Mt 分画タンパク質を単離し、Western blot 法にて OCIAD2 の局在を解析する。また、ヒト肺腺癌組織 (正常肺と腫瘍組織のペア) 20 症例を用い、OCIAD2 の発現を解析する。

(2) 肺腺癌細胞における OCIAD2 の機能解析

OCIAD2 特異的 siRNA を3種類用い、上記肺腺癌細胞に導入する。ノックダウン48時間後、肺腺癌細胞への影響を、細胞増殖能 (Cell count 法、WST-8 法)、アポトーシス (Caspase-3/7 活性測定法、Annexin V 発現測定法) の観点から解析する。また、ミトコンドリアに由来するアポトーシス誘導経路はチトクローム c 放出を発端とするため、OCIAD2 ノックダウン後のチトクローム c を定量し、放出量を比較検討する。

上記1の結果と統合し、OCIAD2 発現量とその機能に相関があるか検証することで、OCIAD2 機能が最も発揮されやすい背景を見出す。

(3) OCIAD2 のミトコンドリア形態への影響

OCIAD2 ノックダウン後のミトコンドリア形態を解析するために、OCIAD2 ノックダウン後の細胞を用いて電子顕微鏡用標本を作製し、ミトコンドリアのクリステ、内膜、外膜の構造を電子顕微鏡にて詳細に観察する。1細胞当たりのミトコンドリア数、1ミトコンドリア当たりのクリステ数を数値化し、ミトコンドリア形態への影響を検証する。

(4) OCIAD2 機能の分子機序の解明

OCIAD2 を発現抑制した細胞を用いて RNA-sequencing を行い、OCIAD2 機能の分子機序を明

らかにする。OCIAD2 とミトコンドリア分裂やアポトーシスとの関係が示された場合は、その分子機序を明らかにするために、HA タグを付加した OCIAD2 を強制発現させた肺腺癌細胞のミトコンドリア分画タンパク質を用いて pull-down assay を行い、OCIAD2 結合タンパク質を収集し、LC-MS/MS 解析しタンパク質の同定を行う。

4. 研究成果

(1) 肺腺癌細胞およびヒト肺腺癌組織における OCIAD2 の発現と局在解析

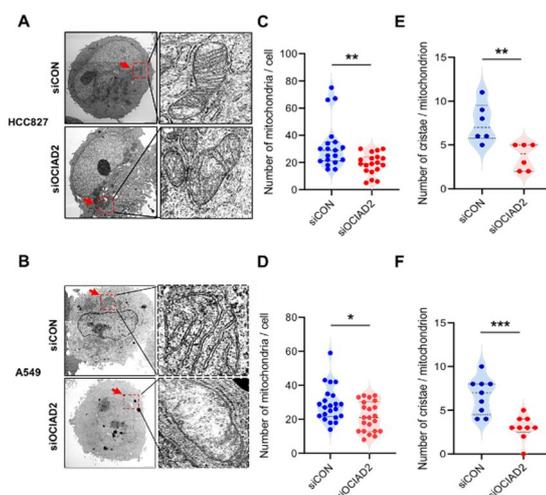
不死化気管支上皮細胞 PL16B、不死化上皮内癌細胞 PL16T、肺腺癌細胞 A549、HCC827、PC9 を用いて OCIAD2 の RT-qPCR およびウェスタンブロッティングを行い、OCIAD2 の発現は mRNA レベル、タンパク質レベルの両者において PL16B よりも肺腺癌細胞で発現が高いことを確認した。さらに、正常肺と腫瘍組織が対になったヒト肺腺癌組織 12 症例を用いて OCIAD2 のウェスタンブロッティングを行うと、OCIAD2 発現は明らかに腫瘍組織で高く、正常組織では発現が見られなかった。このことから OCIAD2 は非常に高い腫瘍特異性を持つことがわかる。さらに、肺腺癌細胞 HCC827、A549 を用いて OCIAD2、および Mt マーカーである Tom20 の二重蛍光免疫染色を行うと、両者が共局在することも明らかになった。さらに、細胞分画法によりタンパク質を細胞質分画とミトコンドリア分画に分けてウェスタンブロッティングを行うと、OCIAD2 はミトコンドリア分画のみに検出され、OCIAD2 はミトコンドリアに局在していることが示された。

(2) 肺腺癌細胞における OCIAD2 の機能解析

OCIAD2 の肺腺癌における機能を明らかにするために、OCIAD2 特異的 siRNA (siOCIAD2) を用いて遺伝子の発現抑制を行い、肺腺癌に及ぼす影響を解析した。最初に肺腺癌細胞 4 株 (HCC827、A549、PC9、PL16T) を用いて siOCIAD2 導入後の細胞数を計測したところ、コントロールと比較して有意に細胞数が減少していた。一方で、siOCIAD2 導入後に caspase-3, 9 および PARP の開裂をウェスタンブロッティングにて検出すると、OCIAD2 発現抑制により Caspase-3, 9, PARP の開裂が見られた。れさらに、annexin V assay でも同様に OCIAD2 発現抑制によってアポトーシス細胞が有意に増加し、OCIAD2 発現抑制によりアポトーシスが誘導されていることも明らかになった。同時にミトコンドリア膜電位の低下も起こっており、ミトコンドリアの活性が低下していると考えられた。さらにチトクローム c の細胞内局在の変化も見られ、これらのことから OCIAD2 はなんらかの機序によりミトコンドリアの安定性の維持に寄与し、アポトーシスを抑制していることが示唆された。

(3) OCIAD2 のミトコンドリア形態への影響

OCIAD2 がミトコンドリアの安定性に寄与している可能性が示唆されたため、OCIAD2 を発現抑制した肺腺癌細胞 A549、HCC827 を電子顕微鏡で観察した。ミトコンドリアの形態はコントロールと明らかに異なっており、クリステの損傷や swelling が見られた。細胞を 1 つずつ観察し、1 細胞辺りのミトコンドリア数、および 1 ミトコンドリア辺りのクリステ数を計測すると、OCIAD2 を発現抑制した細胞では有意にミトコンドリア数、クリステ数が減少していた (右図)。前述の結果と同様に、OCIAD2 は正常なミトコンドリア形態の維持に寄与していることが示唆される結果と言える。



(4) OCIAD2 機能の分子機序の解明

HCC827、PC9、A549 の 3 種の肺腺癌細胞で OCIAD2 を発現抑制し、RNA-sequence 解析を行った。コントロールと比較して発現が 2 倍以上変化している遺伝子群を選別し、3 株で共通して変化していた遺伝子は 137 遺伝子同定された。それらの遺伝子は pro-apoptotic initiator (BIM や PUMA 等) pathway に有意に enrich することがわかり、OCIAD2 がアポトーシスを抑制するメカニズムの一端が示唆された。

一方、OCIAD2 タンパク質が何らかの因子に結合してその機能を果たしている可能性を考え、pull-down assay と LC-MS/MS 解析を行い OCIAD2 結合タンパク質を網羅的に同定した。その結果、1000 を超える結合因子が選別されたが、その多くがミトコンドリア関連分子であった。そのうち、ミトコンドリア外膜に存在する VDAC1 との結合は内因性タンパク質でも確認され、OCIAD2 が VDAC1 に何らかの作用を及ぼしアポトーシス抑制に寄与している可能性が考えられた。今後この分子メカニズムを詳細に解析する計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hong Jeongmin, Shiba Ishii Aya, Kim Yunjung, Noguchi Masayuki, Sakamoto Noriaki	4. 巻 112
2. 論文標題 Ovarian carcinoma immunoreactive antigen domain 2 controls mitochondrial apoptosis in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 5114 ~ 5126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15160	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 -

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

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