

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17661

研究課題名(和文) 肺癌におけるプロレニン受容体の発現と生理機能の解明

研究課題名(英文) Prorenin receptor expression and function in lung cancer.

研究代表者

大場 浩史(OHBA, Koji)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：70726710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、肺癌におけるプロレニン受容体(PRR; Prorenin receptor)の発現とその機能を明らかにすることである。PRRの発現を非腫瘍性の肺組織と肺癌組織とで比較すると、両方の組織でPRRの発現が見られ、肺癌組織でその発現量が増加していた。また、肺癌組織の細胞質内に顆粒状の染色像が見られた。肺腺癌組織由来の培養細胞を使用した実験を行い、PRRがオートファジーの制御を介して、腫瘍細胞の増殖や遊走に関与していることが明らかになった。また、肺腺癌細胞において、可溶性PRRの産生が抗腫瘍効果のある薬剤によって促進される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロレニン受容体が肺癌組織で発現が増強されており、オートファジーの制御を介して腫瘍細胞の増殖や遊走に関与している可能性が示唆された。このことから、プロレニン受容体が治療標的の一つとなる可能性が考えられる。また、可溶性プロレニン受容体の産生がカルボプラチンやパクリタキセルといった抗がん剤の作用によって増加していた。化学療法の際に血液中の可溶性プロレニン受容体を測定することで、薬剤治療の効果を判定するマーカーとして応用できる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate the expression and function of the prorenin receptor (PRR; Prorenin receptor) in lung cancer. Comparing PRR expression between non-neoplastic lung tissue and lung cancer tissue, PRR expression was found in both tissues, and its expression was increased in lung cancer tissue. In addition, a granular staining pattern was observed in the cytoplasm of the lung cancer tissue. Experiments using cultured cells derived from lung adenocarcinoma revealed that PRR is an essential element in autophagy regulation and is involved in the proliferation and migration of lung adenocarcinoma cells. It was also shown that soluble PRR generation may be enhanced by anti-tumor agents in lung adenocarcinoma cells.

研究分野：細胞生理学

キーワード：プロレニン受容体 オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロレニン受容体 (PRR : prorenin receptor) は、350 個のアミノ酸からなる一回膜貫通型受容体であり、レニンアンジオテンシン系の新規構成因子として発見された (Nguyen et al. J Clin Invest. 2002)。その後の研究で、膜型受容体にとどまらない多様な機能を有していることが明らかになってきている。

- (1) 酵素的に不活性なプロレニンを活性型のレニンに変換し、アンジオテンシンIIの産生を促進する。
- (2) 膜型受容体としての機能として、レニンあるいはプロレニンがPRRに結合することでMAPKシグナルやAktシグナルが活性化する。
- (3) LPR6のリン酸化に必須の存在であり、Wntシグナルの活性化に関与する (Cruciat et al. Science. 2010.)
- (4) PRRは、細胞内や細胞内小器官のpHに関与するV-ATPaseのサブユニットの一つとして機能する。(Kinouchi K et al. Circ Res. 2010)

PRR と癌との関係については、PRR の多様な機能に着目していくつかの癌で研究が行われている。これまでに PRR の膜型受容体としての機能に着目して、乳癌において PRR が腫瘍細胞の増殖に関与していることを明らかにした。膵臓癌やグリオーマを対象とした研究では、PRR と Wnt シグナルとの関係に着目し、PRR の腫瘍の発生や病態の進行への関与が報告されている (Shibayama et al. Sci Rep. 2015. Kouchi et al. J Neurosurg. 2017)。

しかし、これまで PRR と肺癌の関係について検討がなされておらず、肺癌における PRR の発現、機能、臨床病理学的な意義については不明である。

2. 研究の目的

本研究課題に先行して実施した実験から、PRR が肺癌においてオートファジーの制御に関与していることを示唆する基礎的な結果が得られていた。しかし、オートファジーの制御に関して詳細なメカニズムは不明であり、肺癌組織での PRR の発現や臨床病理学的な因子との関係性も明らかにされていなかった。そこで、本研究の目的を次の通りとした。

- (1) 肺癌におけるPRRの臨床病理学的因子との関係性について明らかにする。
- (2) 肺癌培養細胞を用いて、PRRの機能を解析し発現意義を明らかにする。

3. 研究の方法

研究方法を以下に示す。

- (1) 肺癌組織アレイ標本を用いて、肺癌組織におけるPRRの発現を免疫組織化学的に検証し、細胞増殖マーカーであるKi-67の発現や、オートファジーのマーカーであるLC3、p62の発現との関連を解析した。
- (2) 肺腺癌培養細胞株A549を対象として、siRNAを用いてPRRの発現を抑制し、細胞増殖、遊走能、オートファジーの状態の変化を解析した。
- (3) 研究の過程でみられた可溶性PRRの産生量の変化のメカニズムを解析した。

4. 研究成果

(1) 肺癌組織における PRR の発現

ヒト正常肺組織と肺腺癌組織における PRR の発現を免疫組織化学的に検討した。PRR は膜型受容体であることから、細胞膜が主に染色されると予想したが、細胞質に PRR の染色性が認められ、顆粒状の特徴的な染色像が得られた。腫瘍性、非腫瘍性の組織の両方で PRR の発現が確認されたが、染色強度を比較すると肺腺癌組織 64 症例中 45 例で PRR の発現が増強していた。PRR の発現強度と臨床病理学的因子との相関を解析したところ、年齢・性別・リンパ節転移・Histological grade との相関はみられなかったが、Stage 分類と相関傾向がみられ、Ki-67 の発現と相関がみられた。

他の肺癌組織系でも PRR の染色性を解析したが、肺腺癌と同様に PRR の染色強度の増強する症例があり、細胞質に顆粒状の染色像がみられた。

(2) 肺癌培養細胞を使用した PRR の機能解析

ヒト肺癌組織で PRR の発現が確認することができたので、次に肺腺癌由来の培養細胞株 A549 を用いて PRR の機能解析を実施した。

PRR 特異的な siRNA を用いて PRR の発現を抑制した。WST-8 アッセイで細胞増殖の変化を解析すると、PRR の発現を抑制すると有意に細胞増殖が抑制された。Wound healing アッセイで細胞遊走能の変化を解析したところ、遊走能の低下がみられた。セルブロックを作製して Ki-67 の発現を解析したところ、PRR の発現を抑制すると Ki-67 の陽性率が有意に低下した。

PRR がオートファジーの制御に関係する V-ATPase のサブユニットとして機能していることから、LC3 と p62 の発現状態をウエスタンブロットとセルブロックを作製して免疫組織化学的に解析した。PRR の発現を抑制すると、細胞内に LC3 と p62 の蓄積が観察された。V-ATPase 阻害剤であるバフィロマイシン A1 を作用させると、PRR の発現を抑制した時と同様に LC3 と p62 の細胞内への蓄積を確認することができた。

(3) 可溶性 PRR の産生メカニズムの解析

PRR の発現を抑制した際に、細胞外への可溶性 PRR の放出を ELISA 法で解析したところ、培地中の可溶性 PRR の濃度は減少した。しかし、バフィロマイシン A1 を添加すると、培地中の可溶性 PRR の濃度が上昇した。全長型 PRR の切断には複数のタンパク分解酵素が関与しているが、肺癌組織と A549 細胞におけるタンパク分解酵素の発現を解析すると、site-1 protease と Furin の発現が確認できた。そこで、バフィロマイシン A1 を添加した状態でそれらの阻害剤を添加すると、site-1 protease 阻害剤によって有意に可溶性 PRR が減少した。

バフィロマイシン A1 のようなオートファジー阻害作用、細胞増殖抑制作用のある薬剤で可溶性 PRR の産生が増加することから、抗がん剤の効果を判定するマーカーとして応用性があるのではないかと考えた。A549 細胞にカルボプラチンとパクリタキセルを作用させると、可溶性 PRR のタンパク量が増加した。

以上の結果から、PRR は肺癌細胞のオートファジーの制御を介して、腫瘍細胞の増殖や遊走に関与している可能性が示唆された。また、可溶性 PRR が腫瘍細胞の増殖を抑制する薬剤の効果を判定するマーカーとして応用できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Endo Moe, Ohba Koji, Sato Shigemitsu, Yokota Yurina, Takahashi Kazuhiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Increased soluble (pro)renin receptor protein by autophagy inhibition in cultured cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 483 ~ 497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12776	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 Ohba Koji, Endo Moe, Sato Shigemitsu, Kashio Yokota Yurina, Hirose Takuo, Takahashi Kazuhiro	4. 巻 25
2. 論文標題 (Pro)renin receptor/ATP6AP2 is required for autophagy and regulates proliferation in lung adenocarcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 782 ~ 795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12812	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 Kashio-Yokota Yurina, Sato Shigemitsu, Hirose Takuo, Watanabe Tomoki, Endo Akari, Watanabe Fumihiko, Endo Moe, Ohba Koji, Mori Takefumi, Takahashi Kazuhiro	4. 巻 255
2. 論文標題 Elevated (Pro)renin Receptor Expression by Anti-Cancer Drugs, Carboplatin and Paclitaxel, in Cultured Cancer Cells: Possible Involvement of Apoptosis and Autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 91 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.255.91	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大場浩史
2. 発表標題 The prorenin receptor maintains kidney cancer cell survival through modulation of autophagy
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 横田 柚梨菜
2. 発表標題 Increased expression and secretion of soluble (pro)renin receptor by anti-cancer agents in cultured cancer cells
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 佐藤重光
2. 発表標題 Mechanism of cell proliferation effect by insulin and prorenin receptor in cultured cancer cells
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 遠藤 萌恵
2. 発表標題 Elucidation of production mechanism of soluble PRR in tumor cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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