

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18148

研究課題名（和文）細胞内ミオイノシトール代謝を標的とした新規腎癌薬物療法の開発

研究課題名（英文）Regulating intracellular myo-inositol metabolism as a novel candidate for a therapeutic target of renal cancer

研究代表者

胡口 智之（Koguchi, Tomoyuki）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40791950

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）：腎癌細胞株ACHN、786-0へISYNA1強制発現ベクターを遺伝子導入すると細胞増殖が抑制された。細胞培地へのミオイノシトール投与は、786-0細胞の増殖を抑制した。ACHN、786-0細胞へミオイノシトール代謝阻害薬であるバルプロ酸とリチウムを投与すると、バルプロ酸投与群において細胞増殖が亢進した。ACHN、786-0細胞に対して発現ベクターを用いたISYNA1安定発現細胞株を作成した。ACHN、786-0どちらのISYNA1安定発現細胞株も、バルプロ酸投与により細胞増殖抑制効果がキャンセルされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで腎臓ではミオイノシトール代謝により浸透圧調整を行っていることが知られていたが、腎臓におけるミオイノシトール代謝の変化や細胞機能へ与える影響は明らかではなかった。今回我々の研究によって、腎臓では細胞へのミオイノシトールの新規供給が低下している可能性が示唆された。腎臓へミオイノシトール供給する経路を回復させることで細胞の増殖制御ができること、またこの経路の阻害が細胞増殖を亢進させることが明らかになった。これは細胞へミオイノシトールの内的および外的な新規供給どちらに置いてもみられており、腎臓の新規治療に向けた分子標的としての応用や薬物療法の開発につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： The result of colony formation assay using ACHN and 786-0 cells indicated that ISYNA1 overexpression suppressed cell proliferation. We found that 786-0 cells were suppressed cell growth by myo-inositol treatment.

We performed colony formation assay using ACHN and 786-0 cells treated with valproate and lithium as inhibitors of myo-inositol metabolism. As a result, ACHN and 786-0 treated with valproate were enhanced cellular proliferation.

Using expression vector, we established ISYNA1 stable expression cell lines as ACHN and 786-0. Treated with valproate in ACHN and 786-0 stable cell lines canceled the growth suppressive effect by ISYNA1 expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：腎臓 がん代謝 ミオイノシトール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転移性腎癌は予後不良であり、分子標的療法や免疫チェックポイント阻害薬が薬物療法に使用されるが、臨床の間では薬剤抵抗性の出現が大きな問題となっている。これまで我々はがんに対する基礎研究をする中で、p53 - Inositol 3-phosphate synthase (ISYNA1) 経路による細胞内ミオイノシトール制御を明らかにしたほか、当講座で行った腎癌摘出標本のcDNA microarray解析では、ISYNA1発現と腎癌の予後に関連を認めたことから、腎癌において細胞内ミオイノシトール代謝が重要な役割を持つことが推察された。ミオイノシトールは様々な機能を有する水溶性ビタミンであり、正常腎では主要な浸透圧活性物質として細胞外の浸透圧刺激に反応してミオイノシトールトランスポーターを介した細胞内集積により細胞内外の浸透圧バランスを保つ働きが報告されている。しかし、腎癌のミオイノシトール代謝の変化は明らかになっておらず、がん代謝における代謝変化が細胞機能に及ぼす影響は未知であることから、このメカニズムの解明が腎癌に対する新規分子標的の開発に応用できる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腎癌における細胞内ミオイノシトール代謝の解明、腎癌細胞株の細胞内ミオイノシトールの変化と腫瘍増殖や細胞生存に与える影響の検討、転移性腎癌に対する新しい治療標的としての応用と新規薬物療法の開発することである。

3. 研究の方法

腎癌におけるミオイノシトール代謝関連遺伝子の発現と細胞内ミオイノシトール代謝が細胞機能に及ぼす影響の解明について、下記の通り研究を進めた。

研究 : 正常腎組織と腎癌組織におけるミオイノシトール代謝関連遺伝子群の発現について、The Cancer Genome Atlas (TCGA) database の腎癌コホートをを用いて RNA 発現解析を行った。また、代表的な腎癌の組織型である淡明細胞型腎細胞癌、乳頭状腎細胞癌、嫌色素性腎細胞癌について各組織型と正常腎組織との遺伝子発現比についても検討し、組織型によるミオイノシトール代謝関連遺伝子群の発現差異について評価した。

研究 : ミオイノシトール新規供給による細胞機能への影響について評価するため、これまでに作成した ISYNA1 発現ベクターを用いてリポフェクション法による遺伝子導入を行った。ISYNA1 タンパク発現のあるヒト腎癌細胞株 ACHN と、ISYNA1 タンパク発現のないヒト腎癌細胞株 786-0 に対して遺伝子導入を行い、コロニー形成アッセイによる細胞増殖への影響についても評価した。細胞外からのミオイノシトール供給による影響を評価するため、細胞培地へ各濃度のミオイノシトール添加を行い、細胞増殖能を評価した。

研究 : 細胞内ミオイノシトール新規合成によるミオイノシトール代謝の影響を評価するため、ISYNA1 発現ベクターとコントロールベクターをヒト腎癌細胞株 ACHN、786-0 に遺伝子導入し、選択培地による長期培養を行い、安定遺伝子発現細胞株の作成を行った。ミオイノシトール代謝阻害による影響を検討するため、まず親株である ACHN、786-0 に対しミオイノシトール代謝阻害薬であるバルプロ酸、リチウム投与を行い、細胞増殖能を評価した。次に作成した ISYNA1 安定遺伝子発現細胞株へバルプロ酸、リチウム投与を行い、細胞増殖能に及ぼす影響を評価した。

4. 研究成果

研究 : 細胞内へのミオイノシトール供給は、ISYNA1 を介したグルコースからの新規合成経路、high-affinity sodium myo-inositol transporter (SMIT) を介した細胞外からの能動輸送、細胞内で使用したイノシトールリン酸のサルベージ経路が存在している。腎癌におけるミオイノシトール代謝関連遺伝子群の関与について評価するため、まず TCGA database の腎癌コホートをを用いてそれぞれの経路の RNA 発現解析を行ったところ、腎癌では正常腎組織と比較し ISYNA1 および SMIT の発現が低下しており、サルベージ経路の INPP1 などの発現が上昇していることが明らかになった (図1)。

また、腎癌にはいくつかの組織型が存在するが、代表的な腎癌サブタイプである淡明細胞型腎細胞癌および乳頭状腎細胞癌、嫌色素性腎細胞癌毎にこれらの遺伝子発現について検討したところ、いずれの組織型においても細胞へミオイノシトールを新規供給する ISYNA1 や SMIT の発現低下がみられた (図 2)。

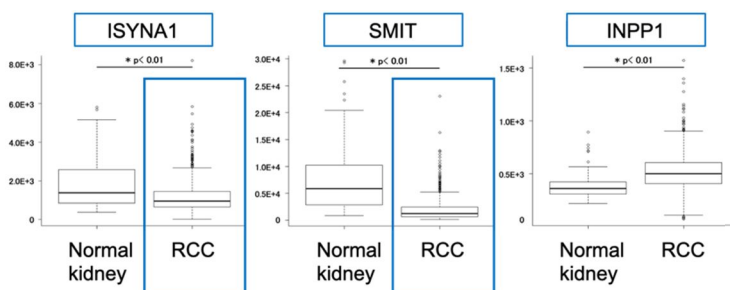


図 1: 正常腎および腎癌におけるミオイノシトール代謝関連遺伝子発現

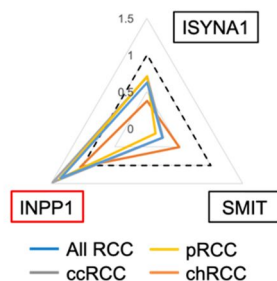


図 2: 組織型とミオイノシトール代謝関連遺伝子

研究 : ミオイノシトール新規供給による細胞機能への影響について評価するため、これまでに我々が作成した ISYNA1 発現ベクターを用いてリポフェクション法による遺伝子導入を行った。作成した発現ベクターには薬剤抵抗性遺伝子も組み込んでおり、G418 を添加した選択培地を用いて遺伝子導入した細胞を選択し、その後の細胞増殖、コロニー形成能を評価したところ、元々の親株に ISYNA1 タンパク発現のある ACHN 細胞、ISYNA1 タンパク発現のない 786-O 細胞ともに ISYNA1 発現ベクター導入群の細胞増殖、コロニー形成が抑制された (図 3)。

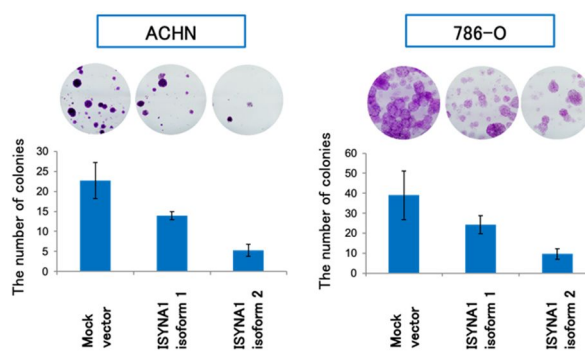


図 3: ヒト腎癌細胞への ISYNA1 遺伝子導入と細胞増殖への影響

ISYNA1 を介したミオイノシトールの内的な細胞内新規供給が細胞増殖抑制効果を持っていたことから、次に SMIT を介したミオイノシトールの外的な細胞外新規供給が及ぼす影響を評価するため、細胞培地へ各濃度のミオイノシトール添加を行った。ミオイノシトールは、グルコースの異性体であり、浸透圧活性を持っていることから、同濃度のグルコース添加による細胞増殖への影響についても評価した。その結果、ACHN 細胞、786-O 細胞ともグルコース添加の有無による細胞増殖への影響はみられなかった (図 4)。

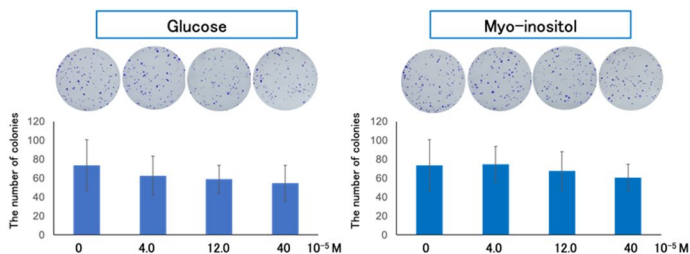


図 4: ACHN 細胞への細胞外ミオイノシトール供給の影響

一方、ミオイノシトール添加群では、ISYNA1 発現のある ACHN 細胞では細胞増殖に差はみられなかったが、ISYNA1 発現のない 786-O 細胞ではミオイノシトールの濃度によらず細胞増殖が抑制された (図 5)。このことから、ミオイノシトールの細胞内への新規供給は内的・外的経路を問わず、腎癌の細胞増殖を制御している可能性が考えられた。

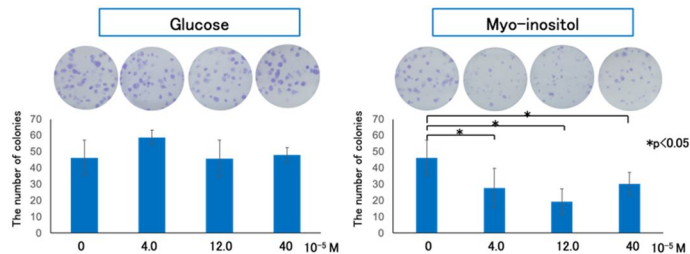


図 5: 786-O 細胞への細胞外ミオイノシトール供給の影響

研究 : ISYNA1 を介した細胞内ミオイノシトール新規合成が細胞機能へ及ぼす影響を評価するため、ISYNA1 発現ベクターとコントロールベクターをそれぞれ ACHN、786-O 細胞へ遺伝子導入し、G418 選択培地による長期培養を行い、安定発現細胞株の作成を行った。遺伝子導入による ISYNA1 発現があるか確認するため、HA タグを組み込んだ発現ベクターを用い

て操作した結果、ACHN、786-0 それぞれの ISYNA1 安定発現が確認された (図 6)。

次に、ミオイノシトール代謝阻害による影響を評価するため、まず親株である ACHN、786-0 ヘミオイノシトール代謝阻害薬であるバルプロ酸、リチウム投与を行いコロニー形成能評価を行ったところ、バルプロ酸投与群ではコロニー形成が多い傾向がみられた。続いて、ISYNA1 安定発現をさせた

ACHN、786-0 に対してバルプロ酸、リチウム投与を行ったところ、バルプロ酸投与群では用量依存的に細胞増殖の亢進がみられた (図 7)。元々、ISYNA1 タンパク発現のあった ACHN で

は、バルプロ酸投与により顕著に細胞増殖の亢進がみられた。このことから、腎癌において ISYNA1 の発現低下は、細胞の増殖制御の破綻に關与している可能性があり、腎癌のがん化能獲得に寄与していると考えられる。そのため、この経路の制御や細胞内へのミオイノシトール新規供給は、今後の腎癌治療における新規治療標的として有用な可能性があると考えられる。

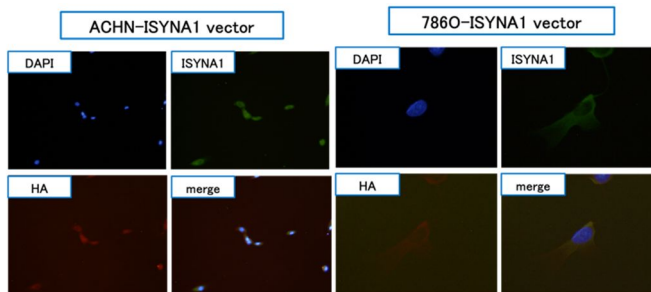


図 6：ヒト腎癌細胞株を用いた ISYNA1 安定発現細胞株の作成

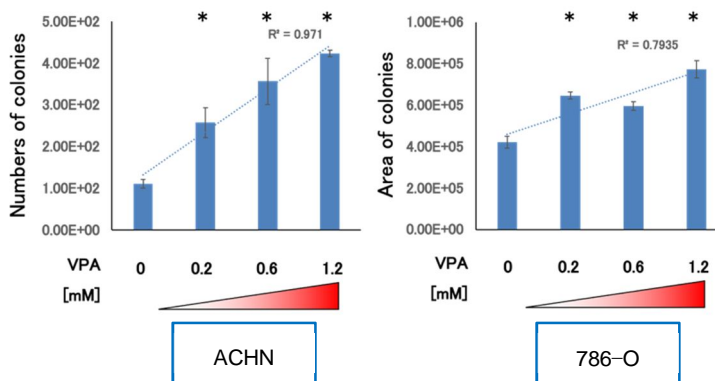


図 7：バルプロ酸による ISYNA1 阻害と増殖能へ及ぼす影響

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 胡口 智之
2. 発表標題 腎癌進行過程におけるISYNA1を介したmyo-inositol代謝経路の意義
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学科総会
4. 発表年 2021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
---------	---------