

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15979

研究課題名（和文）消化器腫瘍における新規マイクロプロテインMKMP78の検討

研究課題名（英文）a novel microprotein MKMP78 in gastrointestinal tumor

研究代表者

神田 真聡（Kanda, Masatoshi）

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：40796348

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では新規マイクロプロテインMKMP78の大腸癌における分子機構を解明することおよび、MKMP78の発現量と患者予後への影響について検討することを目的として行われた。MKMP78は大腸癌細胞株において細胞増殖を制御していることが分かった。免疫染色による細胞内での局在評価ではMKMP78はミトコンドリアに存在するタンパクであることがわかり、さらなる検討でミトコンドリア内に存在するあるタンパクXと結合し、共役して働いていることが示唆され、細胞内代謝を制御することで細胞増殖を制御している可能性が示唆された。また、患者検体では低分化型大腸癌における発現が亢進していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が独自に発見した新規マイクロプロテインMKMP78の生理的・臨床的意義はこれまで明らかにされていなかったが、本研究によりMKMP78が大腸癌の増殖・細胞内代謝を制御し、低分化型大腸癌の増殖に寄与する可能性が示唆された。今後MKMP78をターゲットにした治療法が開発されることにより、低分化型腺癌の新規治療法の開発へとつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the molecular mechanism of the novel microprotein MKMP78 in colon cancer and to examine the expression level of MKMP78 and its impact on patient prognosis. MKMP78 was found to regulate cell proliferation in colon cancer cell lines. Further studies suggested that MKMP78 binds to and functions in concert with a mitochondrial protein X, suggesting that MKMP78 may regulate cell proliferation by regulating intracellular metabolism. This suggests that the protein may regulate cell proliferation by regulating intracellular metabolism. In addition, the expression of the protein was upregulated in patients with poorly differentiated colon cancer.

研究分野：腫瘍学

キーワード：マイクロプロテイン 大腸癌 細胞内代謝 ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は先行研究で Ribosome foot-printing sequencing( Ribo-Seq )を用いて、現在は long-noncoding RNA ( lncRNA ) とされているある遺伝子上に 78 アミノ酸からなる新規マイクロプロテイン ( MKMP78 ) を発見した。MKMP78 は健常状態で腎遠位尿細管、扁平上皮細胞、成熟マクロファージに発現することが分かったが大腸癌・子宮頸癌などの腫瘍細胞でも発現が亢進していることが示唆されたことから、本研究ではまだ分子機能の明らかとなっていない MKMP78 が腫瘍細胞 ( 特に大腸癌 ) で、どのような分子機能もつかについて共役分子や転写制御因子に注目して検討し、腫瘍増殖・浸潤能へ影響に焦点をあてて検討する。

## 2. 研究の目的

本研究では MKMP78 が大腸癌においてどのような分子機構をもち、どのような表現型に影響を与えるか明らかにすることを目的とする。さらに臨床検体を用いた検討により、MKMP78 の発現量と患者予後などへの影響について検討する。

## 3. 研究の方法

### 1. 大腸癌細胞株における MKMP78 の発現と細胞内分布の評価

実験の軸にする細胞株を同定するため、大腸癌細胞株( HT29, Caco-2, HCT-15, COLO205, SW1116, DLD-1, SW480, WiDr, Lovo, BM314 ) における MKMP78 の発現量を RT-qPCR および WB によりスクリーニングし、MKMP78 高発現大腸癌細胞株および非発現細胞株を選定した。また、蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡を用いて MKMP78 の細胞内分布を評価した。

### 2. MKMP78 と結合分子の同定

マイクロプロテインは共役分子の存在が認められることが多いことから、MKMP78 内在性発現細胞とその細胞の MKMP78 KD したもののライセートを MKMP78 カスタム抗体で免疫沈降し、質量分析で結合分子を同定する。この実験に関してはカスタム抗体における免疫沈降の実験系がうまく構築できず最終的にはグは protein interaction screen on peptide matrices ( PRISMA ) と呼ばれる合成ペプチドフラグメントを用いた方法に変更し、さらに逆実験として、同定された結合分子の候補に対する免疫沈降を行い MKMP78 の結合を確認した。

### 3. MKMP78 強制発現およびノックダウンにおける RNA トランスクリプトーム解析

MKMP78 低発現大腸癌株に対して MKMP78 を強制発現したものおよび MKMP78 高発現大腸癌株に対する siRNA によるノックダウン実験を行い、それらのコントロールと共にトランスクリプトームを解析した。細胞増殖活性への影響が予想されたため、細胞増殖アッセイ ( WST-8 ) をおこなった。

### 4. 大腸癌検体における MKMP78 発現と患者予後に関する検討 大腸癌およびその前癌病変 ( 大腸腺腫 ) の内視鏡あるいは外科手術の残余検体を用いて MKMP78 発現を免疫染色で検討した。さらにその発現量と患者臨床情報の相関について検討し、MKMP78 と実際の患者における臨床的予後と大腸癌との関係について検討した。

#### 4. 研究成果

MKMP78 高発現大腸癌株および低発現大腸癌株を同定し、高発現大腸癌株における MKMP78 の細胞内分布を蛍光免疫染色および共焦点顕微鏡により評価したところ、ミトコンドリアに局在があることが分かった。

MKMP78 の共役分子を同定するために免疫沈降-質量分析を行った。しかしながら、MKMP78 のカスタム抗体を用いての免疫沈降の実験系がうまく樹立できず、最終的にカスタム抗体が免疫沈降に適さないと判断した。免疫沈降-質量分析での共役分子の同定が困難であることから、方法を変更し、合成ペプチドフラグメントを利用した、protein interaction screen on peptide matrices (PRISMA) と呼ばれる方法で MKMP78 の共役分子をスクリーニングした。すると、MKMP78 の中間部に複数のミトコンドリア局在タンパクとの結合が示唆された。

それらのなかからタンパク X に注目し、免疫沈降を行ったところ、MKMP78 と内在性結合する可能性が示唆された。タンパク X が細胞代謝に関与する分子であることから、MKMP78 は細胞内代謝を制御している可能性が示唆された。

また、MKMP78 の強制発現およびノックダウン細胞に対する RNA-sequencing の結果からは細胞増殖に影響を与える可能性が示唆されたため、細胞増殖アッセイを WST-8 で行ったところ、MKMP78 は細胞増殖を正に制御することが分かった。

大腸癌患者の臨床検体を用いた MKMP78 の発現解析では、低分化型大腸癌における MKMP78 の発現亢進が示唆された。臨床的予後との相関は今回の検討では明らかとならなかった。

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

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			
ドイツ	Max-DeIbruck-Centrum			