

HOTAIR による腎癌悪性化メカニズムの探索と治療への応用

[1] 組織

代表者：方山 博路
(東北大学大学院医学系研究科)
対応者：菅野 新一郎
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 15 万

[2] 研究経過

代表者である方山は、腎癌の基礎研究を行い、long non-coding RNA である HOTAIR が、IGFBP2 (Insulin Growth Factor Binding Protein 2) を介して腎癌悪性化に関与することを証明した。

本共同研究では、IGFBP2 がどのような機序で腎癌悪性化に関わるのかを解明し、腎癌の新たな治療標的や、早期診断につながるバイオマーカーの探索を目的とする。

以下、研究活動状況の概要を記す。

先行論文のデータをもとに、HOTAIR 過剰発現で誘導される蛋白質として、IGFBP2 および CPVL に着目し、IGFBP2-Flag、CPVL-Flag 細胞樹立免疫沈降法を用いた実験 (Figure 1)、およびプロテオーム解析を行い、電気泳動で得られたバンドを切り出しして IGFBP2 および CPVL に結合する蛋白質の解析を日本プロテオミクス社に依頼して質量分析を行った。

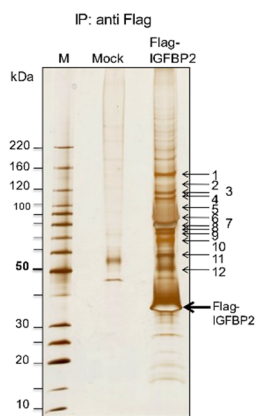


Figure 1 : IGFBP2 過剰発現細胞を用いた、免疫沈降反応実験の結果

研究打ち合わせの開催状況

2020/4/21 共同研究に関する打ち合わせ
先行する HOTAIR-IGFBP2 に関する腎癌基礎研究の論文をもとに、研究する方向について discussion
2020/5 より実験を開始する方針であったが、covid-19 による安全レベルの引き上げにともない中断
2020/6/8 HOTAIR 過剰発現で誘導される蛋白質として、IGFBP2 および CPVL に着目する。
2020/8/4 IGFBP2-Flag、CPVL-Flag 細胞樹立
2020/9/11 免疫沈降法を用いた実験
2020/9/23 プロテオーム解析 電気泳動で得られたバンドを切り出しして IGFBP2 および CPVL に結合する蛋白質の解析を日本プロテオミクス社に依頼して質量分析
2020/9/28 discussion
IGFBP2 はエクソソーム内にも分泌されていることが報告されており、エクソソーム内の IGFBP2 を検出できた場合、早期診断マーカーとなる可能性
2020/11/9 discussion
エクソソーム解析の方法について、他の研究に関する review と今後の解析方法に関して
2020/12/4 discussion
質量分析の結果をうけて、さらなる追加実験の方向性について IGFBP2 の抗体を、代表者が所属していた宮城県立がんセンター幹細胞教室から試料提供依頼
2021/1/29 discussion
IGFBP2 の C 端の結合について解析する
2021/5/28
CMF1 の過剰発現株の作成について
2021/5/25
IGFBP2 が exosome 内で detect できるか discussion
2021/8/10
細胞老化について、IGFBP2, HOTAIR の関連が報告されており、そのテーマで基礎研究を行うべきか、方向性について協議
2021/9/13
Cellline の選定、細胞老化ストレスのモデルについて確認

[3] 成果

(3-1) 研究成果

質量分析の結果から、特定の蛋白質 CMF1 (Cancer Malignancy Factor1)、IGFBP2 と特異的に結合していた。

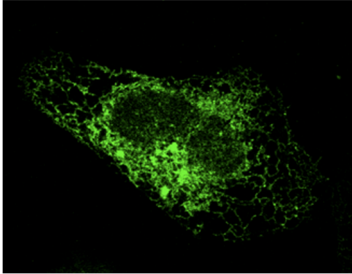


Figure 2.GFP-IGFBP2 が分泌蛋白特有な分布を示す

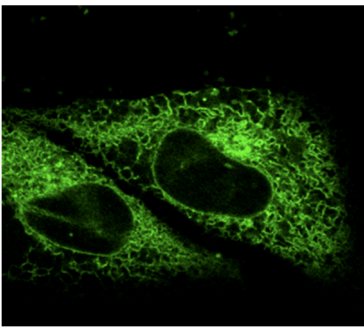


Figure 3.GFP-CMF1 も IGFBP2 と同様な分布

Fig2 および Fig3 で示す通り、GFP による蛍光顕微鏡による観察では、IGFBP2 と CMF1 はともに分泌蛋白特有な分布を示すことから、IGFBP2 は CMF1 と結合し、腎癌悪性化機序に関与するという仮説に矛盾しない結果となった。

HOTAIR-IGFBP2 の経路の先行研究では、HOTAIR を過剰発現させると、増殖能は変化ないが、遊走能が亢進することが示されていた。CMF1 も他の癌種において、同様な傾向をしめしており、IGFBP2 と CMF1 が相互作用を示すことが証明できれば、新たな腎癌の悪性化機序を証明することになる。

IGFBP2 および CMF1 を当院で生検または手術で摘出した組織で確認するべく、東北大学病院倫理委員会に申請し、承認を得た。(受付番号 2020-1-1177, ヒトを対象とした医学系の研究申請:IGFBP2 プロテオーム解析による腎癌新規バイオマーカーの探索)

(3-2) 波及効果と発展性など

IGFBP2 はエクソソーム内にも分泌されていることが報告されており、エクソソーム内の IGFBP2 を検出できた場合、早期診断マーカーとなる可能性もある。

今後は IGFBP2 と CMF1 の結合部位や、結合した場合の作用機序に関する研究を行い、新たな治療対象となるか調査する。並行して、エクソソーム解析により、腎癌患者における IGFBP2 のエクソソーム内発現が、予後に関与するのではないかという仮説を証明すべく、エクソソームの研究を行う。

臨床検体で IGFBP2 および CMF1 の発現を採血、尿中、組織から検出し、予後や病期との相関を調査する。

また、IGFBP2 および HOTAIR は細胞老化に関連する報告があり、その相関について老化処理を行った細胞を用いて調査を行う予定である。

[3] 成果資料

現時点では、まだ成果はありません。