

論文内容の要旨

論文題目

Identification and characterization of the TMEM22 gene for molecular therapy of renal cell carcinoma

腎癌治療に向けた新規分子標的候補遺伝子 TMEM22 の単離およびその機能解析

氏名

土橋 祥子

背景

腎癌は癌全体の約 2% を占めており、日本においても罹患率が増加する傾向にある。腎癌に対しては化学療法や放射線療法の効果が望めず、根治的腎摘除術以外に有効な治療法が存在しないのが現状であった。これまでは、手術のみでは根治が望めない進行性腎癌に対して、インターフェロン α やインターロイキン 2 を用いた免疫療法が実施されてきたが、これらの免疫療法の奏効率は 20% 程度と低く、重篤な副作用も問題となっている。近年、特定の分子をターゲットとした分子標的治療薬の開発が進められ、2008 年には日本においても VEGF、VEGFR を標的とした Sorafenib, Sunitinib の 2 剤が認可され、進行性腎癌の新たな治療薬として適応できるようになった。しかしながら、これらの治療薬においても重篤な副作用の出現の報告や適応患者の制限といった問題があることから、新たな分子標的治療薬の開発は急務である。

当研究室ではこれまでに、腎癌に対する新規分子標的治療薬あるいは診断マーカーの開発を目指し、レーザーマイクロビームマイクロダイセクションと cDNA マイクロアレイ法を用いて、腎癌および正常臓器におけるゲノムワイドな遺伝子発現プロファイルを作製している。本研究では、これらの発現情報解析を通して、腎癌特異的に高頻度に高発現し、治療薬開発に際して副作用を回避する目的で、正常臓器では発現の認められない分子を探索した。その結果、細胞膜蛋白質をコードする Transmembrane protein 22 (TMEM22) に着目し、腎癌の新規治療標的分子としての可能性を検討した。

方法

当研究室においては、レーザーマイクロビームマイクロダイセクションと cDNA マイクロアレ

イ法により正確な腎癌の遺伝子発現プロファイルが構築されている。27,648 cDNA に対する腎癌の発現情報解析データから、

- ① 腎癌臨床検体の 50%以上で発現情報が得られるもの
- ② その発現情報の得られた症例のうち、50%以上の症例で正常腎皮質に比べ腎癌検体において 5 倍以上の発現亢進が見られるもの
- ③ 生命維持に重要な臓器（心臓・肺・肝臓・腎臓）では発現を認めないもの

を選択した。以上の条件を満たす遺伝子について、マイクロアレイ解析の再現性を確認するために、半定量的 RT-PCR ならびにノザンプロット法により腎癌臨床検体、正常組織および腎癌細胞株における発現状況を調べた。

標的候補のひとつとして着目した TMEM22 の細胞内局在を確認するために、TMEM22 特異的ポリクローナル抗体を作製した。配列特異性の高い N 末端部分の組換え蛋白質を大腸菌発現系にて調製し、それを抗原としてウサギに免疫しポリクローナル抗体を精製した。この抗体を用いて免疫細胞染色を行い、細胞内における TMEM22 の局在を確認した。

TMEM22 の細胞増殖への関与を調べるために、TMEM22 特異的な siRNA オリゴヌクレオチドを用いて発現抑制実験を行った。腎癌細胞株 Caki-1 および Caki-2 に siRNA を導入し、48 時間後に RNA を抽出後、半定量的 RT-PCR により mRNA の発現状況を確認した。また、siRNA 導入後 72 時間で細胞可溶化液を抽出し、TMEM22 特異的ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット法にて蛋白質レベルでの発現抑制を調べた。さらに MTT アッセイならびにコロニー形成実験を行い、細胞増殖への影響を調べた。

TMEM22 の機能解析の手がかりを得るために、免疫沈降法と質量分析により結合蛋白質の同定を試みた。TMEM22 に Flag タグを付加した発現ベクターを HEK293 細胞に強制発現させ、Flag タグ抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物を SDS-PAGE 後、銀染色法にてゲルを染色し、Mock ベクターを発現させたコントロールに対し TMEM22 導入細胞において認められるバンドを切り出し、得られた蛋白質を質量分析により同定した。

結果および考察

腎癌において高発現を認めた TMEM22 について、半定量的 RT-PCR ならびにノザンプロット法により腎癌臨床検体、腎癌細胞株、正常 16 臓器における発現状況を調べた。半定量的 RT-PCR による解析で、当遺伝子は腎癌臨床検体 10 例中 7 例にて発現亢進を認める一方、正常腎皮質における発現は認められなかった。ヒトの正常臓器におけるノザンプロット解析の結果、正常 16 臓器すべてにおいて TMEM22 の発現が認められないことが確認された。さらに、13 種類の腎癌細胞株の mRNA を用いたノザンプロット解析では、腎癌細胞 13 株中の 11 株にて発現を認め、約 2.0 kb に 2 本のバンドが確認された。NCBI データベースでは、TMEM22 遺伝子は染色体 3q22.3 に局在し、そのゲノム構造は 2 つのエクソンから構成され、2 つのスプライシングバリエント (V1 と V2) が存在することが報告されていた。このことより、分子量を考慮するとノザンプロット解析によって得られた約 2.0 kb の 2 本のバンドはそれぞれ V1 と V2 であると推察された。

TMEM22 の細胞内局在を調べるために、TMEM22 特異的ポリクローナル抗体を作製し、免疫細胞染色を行った。TMEM22 に HA タグを付加した発現ベクターを COS7 細胞に導入し、HA タグ抗体および TMEM22 特異的ポリクローナル抗体を用いて免疫細胞染色を行ったところ、両抗

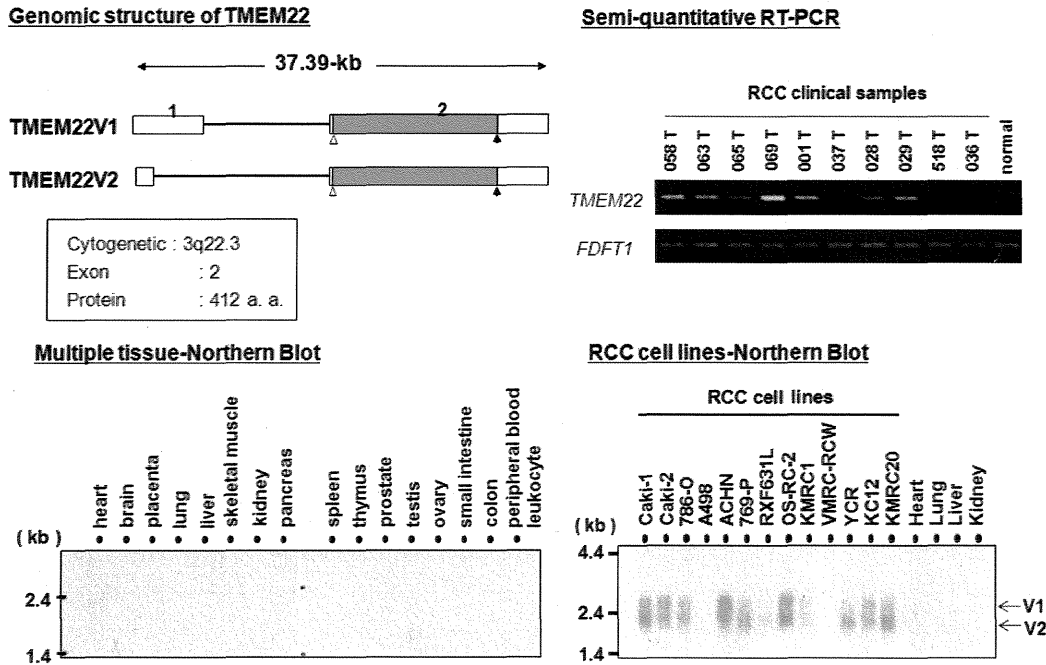


Fig1. Expression of *TMEM22* in RCC and normal tissues

体ともに細胞膜上に染色を示し、*TMEM22* が細胞膜蛋白質であることが示唆された。さらに *TMEM22* のアミノ末端(N)ならびにカルボキシル末端(C)が細胞内・外のどちらに存在するかを調べた。N 末端に HA タグ、C 末端に Flag タグを付加した *TMEM22* 発現ベクターを COS7 細胞に導入後、免疫細胞染色を行ったところ Triton-X100 処理による細胞膜透過性条件下にて、N 末端および C 末端に付加したタグのシグナルが検出された。一方、Triton-X100 未処理の細胞膜非透過性条件下では全く検出されなかった。以上のことから、*TMEM22* の N 末端および C 末端は共に細胞内に局在すると推察された。

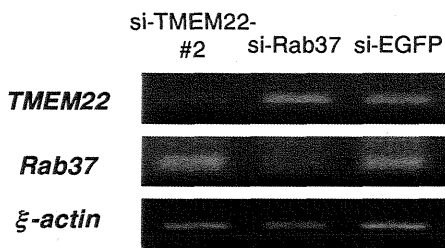
次に *TMEM22* の発現阻害実験を行い、細胞増殖に対する影響を調べた。腎癌細胞株 Caki-1 に *TMEM22* 特異的な siRNA オリゴヌクレオチドを導入し、48 時間後に mRNA の発現抑制を確認した。siRNA 導入 72 時間後には蛋白質レベルでも発現の抑制が確認された。siRNA の導入から 6 日後に MTT アッセイを実施したところ、*TMEM22* の siRNA を導入した細胞ではコントロールに比べ細胞増殖が抑制されていることが確認された。コロニー形成実験でも同様に、細胞増殖抑制効果が示された。別の腎癌細胞株 Caki-2 を用いて同様の実験を行ったところ、Caki-1 と同様に *TMEM22* を発現阻害した際に細胞増殖の抑制が確認された。これらの結果より、*TMEM22* は細胞の増殖に重要な役割を持つことがわかった。

TMEM22 の結合蛋白質の同定を試みた。免疫沈降により得られた結合候補蛋白質を質量分析により解析したところ、Ras 関連蛋白質ファミリーのひとつである Rab37 が同定された。*TMEM22* と Rab37 の結合を調べるために、*TMEM22* に HA タグを、Rab37 に Flag タグを付加した発現ベクターを構築し、両者を COS7 細胞に同時に強制発現させ、それぞれのタグ抗体にて免疫沈降を行った。その結果、HA 抗体での免疫沈降産物に対する Flag 抗体を用いたウェスタンブロットでは Rab37 のバンドが確認された。一方、*TMEM22* に Flag タグ、Rab37 に HA タグを付加した発現ベクターを導入し、HA 抗体で免疫沈降した後の Flag 抗体を用いたウェスタンブロットでは

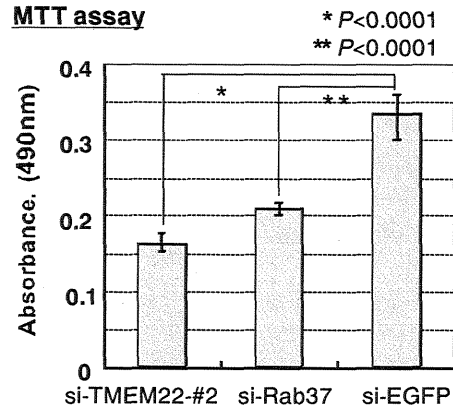
TMEM22 のバンドが検出され、両者の結合が確認された。また、Rab37 を強制発現した際のウェスタンブロットにおいてバンドが 2 本検出されたため、リン酸化の翻訳後修飾を受けていることを考え、ホスファターゼアッセイを行った。その結果、ホスファターゼ処理により高分子量のバンドが消失し、Rab37 はリン酸化修飾を受けていると推察され、TMEM22 はリン酸化 Rab37 と非リン酸化 Rab37 の両方とも結合すると考えられた。さらに両者を同時に発現させた際の細胞内局在を調べたところ、TMEM22 と Rab37 は細胞膜上で共局在を示し、両者の複合体が膜直下で機能していると推察された。

次に siRNA を用いて Rab37 の発現抑制を行い、同様に細胞増殖に対する影響を調べたところ、Rab37 を発現阻害した細胞において増殖の低下が確認された。また Rab37 を発現阻害した際には、TMEM22 の発現を抑制した際と同様に、細胞内に気泡が観察された。以上のことから TMEM22 と Rab37 の複合体が細胞増殖に重要な役割を担うものと推察された。

Semi-quantitative RT-PCR



MTT assay



Morphological change

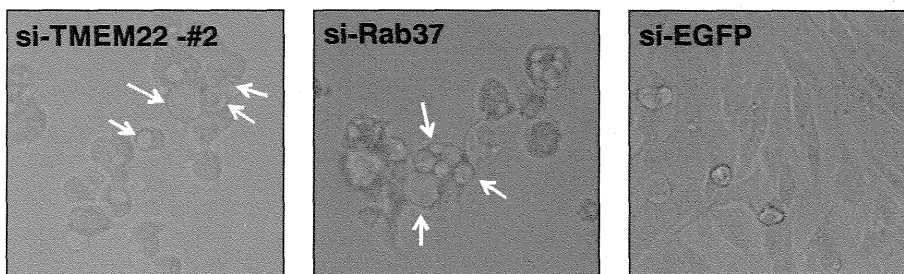


Fig. 2. Effect of TMEM22 and RAB37 on proliferation of RCC cells

結語

cDNA マイクロアレイによる網羅的腎癌遺伝子発現情報解析を通じて、新規の治療標的分子 Transmembrane protein 22 (TMEM22) を同定した。TMEM22 は腎癌において高頻度に発現亢進を示す一方、正常腎皮質をはじめ、ほとんどの正常組織において発現が認められなかった。免疫細胞染色により、TMEM22 は細胞膜蛋白質であることが明らかとなった。RNA 干渉法 (siRNA) による発現阻害実験より、TMEM22 が腎癌細胞の増殖に重要な分子であることがわかった。さらに結合蛋白質として Rab37 を同定し、両者が細胞膜直下にて結合することを確認した。両者の発現をそれぞれ siRNA により阻害したところ、細胞増殖の抑制および類似した細胞形態の変化が観察された。本研究の結果から、TMEM22 は腎癌に対する新規治療標的分子として有望であると考えられる。