

令和 2 年 7 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08670

研究課題名(和文) 結節性硬化症遺伝子変異が惹起する代謝変動とエピゲノム制御異常の解明

研究課題名(英文) Metabolic changes and epigenetic abnormalities caused by tuberous sclerosis complex (TSC) gene mutation

研究代表者

小林 敏之 (Kobayashi, Toshiyuki)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40260070

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)：我々は結節性硬化症(TSC)の新規治療標的経路を明らかにする目的で、TSCモデル動物から樹立した培養細胞を活用し、TSC(Tsc1、Tsc2)遺伝子欠損によって惹起される、代謝やエピゲノム修飾制御の異常の観点から研究を進めた。Tsc2欠損ES細胞では、特定のヒストンタンパクの修飾の低下が認められ、その脱修飾に関わる酵素の発現低下が認められた。一方、TSC遺伝子欠損腎腫瘍細胞株を分岐鎖アミノ酸代謝に関わる酵素(Bcat1)の阻害薬で処理したところ、増殖が抑制された。これらの酵素に関わる経路は新たな治療標的の候補であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結節性硬化症(TSC)は腫瘍を発生する遺伝性の難病である。これまでの治療法は一定の効果をもたらしているものの、完全な腫瘍の抑制が達成されないことなど、新規の治療法の開発が望まれている。本研究で見出された酵素に関わる経路に介入することにより、新たな治療法の開発が進むことが期待される。本研究においては、これまでに知られていない、新たな反応経路同士の関わり方も明らかになった。これらの新たな知見は、他の様々な生命現象・疾患の理解に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：To identify novel therapeutic target pathways for tuberous sclerosis complex (TSC), an inherited and intractable disease, we analyzed metabolic changes and epigenetic abnormalities caused by causative TSC gene (Tsc1 or Tsc2) mutation. In Tsc2 gene-deficient ES cells, certain histone modifications tended to be reduced. The expression of genes encoding enzymes catalyze histone demethylation were also downregulated. In TSC gene-deficient renal tumor cell lines, treatment with an inhibitor of a branched-chain amino acid amino transferase (Bcat1) suppressed cell growth. Although the mechanisms of those phenomena have not been fully elucidated, pathways related to those epigenetic and metabolic enzymes may be novel therapeutic targets for TSC treatment.

研究分野：実験病理学

キーワード：結節性硬化症 遺伝性難病 エピゲノム 代謝 分岐鎖アミノ酸 ES細胞 腫瘍細胞 動物モデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

指定難病である結節性硬化症(TSC、指定難病 158)は、常染色体優性遺伝形式をとる遺伝病であり、腎血管筋脂肪腫(AML)、上衣下巨細胞性星細胞腫(SEGA)、肺リンパ脈管筋腫症(LAM)等の全身に発生する種々の腫瘍性病変と、てんかん、自閉症、精神遅滞等の多様な精神神経症状の合併を特徴とする。*TSC1*あるいは*TSC2*遺伝子、いずれかの生殖細胞系列変異をヘテロ変異性に保持することにより発症する。両遺伝子は腫瘍抑制遺伝子としての特徴を示し、腫瘍においては病変発生の根本要因として、野生型アレルに変異(セカンドヒット)が検出される。一方、精神神経疾患の発生にはセカンドヒットを伴わないハプロ不全が関与することなどから、原因遺伝子変異が各器官・組織特異的に影響を示し、異なる分子機序によって各種の症状を惹起していると推察される。

*TSC1*と*TSC2*タンパクは結合して機能を発揮し、mTORC1 キナーゼの活性を負に制御している。2ヒットによる*TSC1/TSC2*複合体の機能喪失がmTORC1 関連経路の異常亢進を惹起し、腫瘍性病変の発生が進行するのである。これらの事実が解明された現在、ラパマイシン系 mTORC1 阻害薬による腫瘍性病変の治療が行われており、一定の効果が得られている。しかしながら、腫瘍細胞の完全な根絶は達成されず、効果を持続させるためには、治療薬の服用継続が必須であることが判明している。また、高容量の投与による副作用(間質性肺炎、感染症、重篤な口内炎等)の問題も払拭されておらず、mTORC1 阻害薬との併用により効果を増強させる新規薬剤等、新たな治療オプションの開発が望まれている。さらに、精神神経症状の治療法の開発も遅れているのが現状であり、mTORC1 非関連経路を含めた病態発生機構のさらなる解明と新規治療標的の同定が期待されている。

我々はこれらの課題に動物モデルを用いた取組みを進めてきた。これまで *Tsc2* 変異(Eker)ラット、自ら樹立した *Tsc1*、*Tsc2* ノックアウト(KO)マウス、またそれらから樹立した各種培養細胞株を用いた研究を進めてきた。

2. 研究の目的

我々は近年、Eker ラットを用いて ES 細胞を樹立し、その奇形腫形成実験において、*Tsc2* ホモ欠損 ES 細胞特異的な組織異常を見出し、その発生機構が *Tsc2* の 2 ヒットによる腫瘍発生に関わるものと想定して研究を進めてきた。その異常の発生にはエピゲノム修飾の異常が関連することを想定し、予備的にヒストン修飾の分析を開始していた。本研究により、本格的に TSC 遺伝子欠損によるエピゲノム修飾異常の解明を展開することとした。一方、近年、エピゲノム制御に関わる酵素群が、特定の代謝産物によって制御されていることが、様々な研究からわかってきている。とりわけ、 α ケトグルタル酸(α KG)が種々の酵素の促進因子として働くことが解明されている。さらにオンコメタボライトと呼ばれる、それらの促進因子に拮抗して阻害する物質の存在も次々と明らかにされてきている。我々は、*Tsc1* 遺伝子欠損腎腫瘍細胞株において、分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素(Bcat1)の発現が、mTORC1 依存的に亢進している予備的な結果を得ていた。Bcat1 は分岐鎖アミノ酸と共に、 α KG 産生に関わる酵素である。mTORC1 は代謝制御の中心的な役割を果たしており、TSC 遺伝子欠損により、様々な代謝変動が生じることが示唆されていたものの、Bcat1 と TSC の関連は全く明らかにされておらず、その異常が代謝のみならず、エピゲノムの異常を引き起こしている可能性までも調べたいと考えるに至った。本研究においてその取組を進めることとした。これらのエピゲノム異常、代謝異常の研究から得られる知見を元に、TSC の治療に有効な分子標的候補を明らかにし、TSC の医療に資することを旨とするものである。

3. 研究の方法

研究代表者らが樹立した *Tsc2* ホモ変異ラット ES 細胞株、*Tsc1*、*Tsc2* KO マウス由来の各細胞株(*Tsc1* 欠損=CACL1-111 細胞、*Tsc2* 欠損=MKOC1-277 細胞)を用いて研究を行った。ウェスタンブロットや定量 PCR を用いた発現分析を行った。遺伝子発現の抑制効果を調べるために、shRNA 発現系を導入した安定発現細胞株の樹立を活用した。細胞増殖は XTT アッセイにより分析した。培養細胞の代謝産物の変動は質量分析計を用いて分析した。また、ノックアウトマウス由来の組織、奇形腫由来の組織を用いた免疫組織染色を行った。*In vivo* における薬剤の腫瘍抑制効果は、ヌードマウス皮下への培養細胞株移植の実験系により調べた。

4. 研究成果

(1) *Tsc2* 欠損によって生ずるエピゲノム修飾異常

ES 細胞を用いた解析により、*Tsc2* 欠損ホモ変異体において H3K4me3 が低下していることが示唆された。ラパマイシン処理により、H3K4me3 量が回復する傾向があり、mTORC1 経路が H3K4me3 量の制御に関わっている可能性が示唆された。一方で、MKOC1-277、CACL1-111 細胞株においては、H3K4me3 の変動に一定の傾向は見出されず、細胞種や腫瘍発生の段階等で異なる影響が生じ

ていることが予想される。遺伝子発現の分析を行ったところ、*Tsc2*ホモ欠損ES細胞においては、H3K4 脱メチル化に関わる *Jarid1* 酵素群の遺伝子、とりわけ *Jarid1a* や *Jarid1c* 遺伝子の mRNA 量の低下が観察された。これらの結果は、TSC 遺伝子欠損→mTORC1 活性亢進による H4K4me3 低下→フィードバックによる脱メチル化酵素の発現低下、という機構が存在する可能性を示すものである。細胞の分化誘導計系の構築が遅れたことから、奇形腫での組織染色を用いた分化組織特異的な H3K4me の状態を調べたが、現段階では詳細は不明である。分化段階でのエピゲノム修飾異常の動態変化の解明は、今後継続すべき重要な課題である。

(2) 分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 (BCAT1)

CACL1-111 細胞のみならず、MKOC1-277 細胞において、培養下にラパマイシン処理することにより、*Bcat1* の発現が抑制されることがわかった (図 1)。mTORC1 の下流で *Bcat1* の発現が制御される新規経路の存在が明らかとなった。また、免疫組織染色により、*Tsc1*、*Tsc2* KO マウスの腎腫瘍組織においても *Bcat1* の発現が亢進している様子が観察された。両培養細胞において、shRNA を用いて *Bcat1* 遺伝子を発現抑制することにより、細胞増殖が促進される傾向が認められた。これらのことから、*Bcat1* は腫瘍増殖に拮抗する何らかの機構の一部として発現が高まっている可能性が考えられた。しかしながら、*Bcat1* 阻害薬として知られるガバペンチンを培養細胞に作用させたところ、とりわけ MKOC1-277 細胞において強い増殖抑制作用が確認された。また、両細胞株で共にラパマイシンとの増殖抑制併用効果が確認された。MKOC1-277 細胞をガバペンチンで処理した場合、分岐鎖アミノ酸や α ケトグルタル酸量が低下する傾向が認められたが、ポリアミン産生経路など、他の顕著な変動を示す経路が検出された。これらの結果から、ガバペンチンの作用が *Bcat1* 以外の標的にも及んでいる可能性が残る。いずれの作用によるものか、またエピゲノム修飾との関連は未だ不明であるものの、ガバペンチンが TSC の腫瘍に対する新たな治療薬の候補となった。ヌードマウスを用いた MKOC1-277 細胞の造腫瘍アッセイにおいて、ガバペンチン単独の増殖抑制効果は明確には認められなかった。しかしながら、今後 *in vivo* においてラパマイシンとの併用効果が実証されれば、ラパマイシンの投与量の減量による副作用の軽減などに繋がることを期待される。

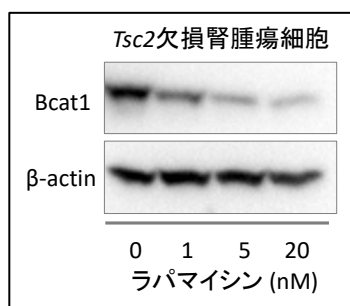


図 1: MKOC1-277 細胞におけるラパマイシンによる *Bcat1* 発現抑制

細胞を異なる濃度のラパマイシンにより 72 時間処理し、*Bcat1* と β アクチンのウェスタンブロットを行った。

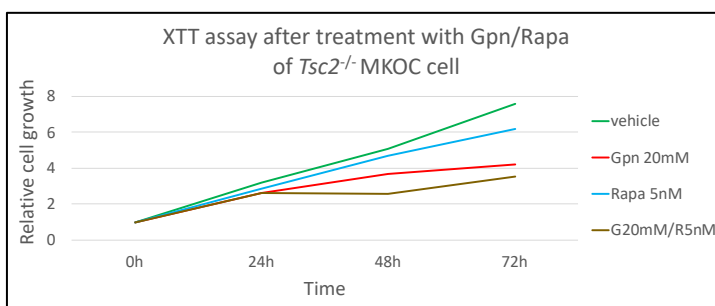


図 2: MKOC1-277 細胞の細胞増殖曲線

培養下にガバペンチン (20 mM; Gpn)、ラパマイシン (5 nM;) 処理、またはその併用を行い、細胞増殖の様子を XTT アッセイにより調べた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inoue T, Kokubo T, Daino K, Yanagihara H, Watanabe F, Tsuruoka C, Amasaki Y, Morioka T, Homma-Takeda S, Kobayashi T, Hino O, Shimada Y, Kakinuma S	4. 巻 111
2. 論文標題 Interstitial chromosome deletion of the tuberous sclerosis complex 2 locus is a signature for radiation-associated renal tumors in Eker rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 840-848
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14307.	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8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 小林敏之、樋野興夫
2. 発表標題 ハマルチンによるアミノ酸アミノ基転移酵素の制御
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi T
2. 発表標題 Exploring downstream pathways of Erc/Msln as therapeutic targets of TSC
3. 学会等名 International Tuberous Sclerosis Complex Research Conference 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiko Nishikawa, Toshiyuki Kobayashi, Yoshinobu Sugitani, Doan Nguyen Minh Thien, Takayuki Kitano, Okio Hino
2. 発表標題 Aberrant histone methylation and altered gene expression in Tsc2-deficient Eker rat ES cells
3. 学会等名 International Tuberous Sclerosis Complex Research Conference 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川桂子、小林敏之、杉谷喜信、Nguyen Minh Thien Doan、北野隆之、樋野興夫
2. 発表標題 Tsc2欠損EkerラットES細胞にみられるヒストンのメチル化異常及び遺伝子発現異常
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi T, Hino O
2. 発表標題 Exploring TSC protein complex/mTORC1-regulated genes in tumor cell lines derived from the Tsc1 knockout mouse
3. 学会等名 2017 International Research Conference on TSC and LAM (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林敏之、樋野興夫
2. 発表標題 Hamartinによる代謝関連遺伝子発現制御
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Doan Nguyen Minh Thien, Toshiyuki Kobayashi, Keiko Nishikawa, Yoshinobu Sugitani, Takayuki Kitano, Masashi Mizuguchi, Okio Hino
2. 発表標題 Gene expression profile in the liver of Tsc2 heterozygous mutant (Tsc2+/-) mice: Implications of heterozygosity on lipid metabolism
3. 学会等名 2019 International Tuberous Sclerosis Complex Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko NISHIKAWA, Tetsuya TAKAGAKI, Moe YASHIMA, Takumi SUZUKI, Toshiyuki KOBAYASHI
2. 発表標題 Bcat1阻害剤はTsc2欠損マウス腫瘍細胞の増殖を効果的に抑える
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
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
研究分担者	高 ひかり (Taka Hikari) (60338374)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (32620)	
研究分担者	三浦 芳樹 (Miura Yoshiki) (90279240)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (32620)	
研究協力者	樋野 興夫 (Hino Okio)		
研究協力者	西川 桂子 (Nishikawa Keiko)		