

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2021
課題番号：17K09431
研究課題名(和文)細胞サイズ調節遺伝子によるワールブルグ効果の破綻を利用した肝細胞癌抑制の研究

研究課題名(英文)The inhibition of hepatocellular carcinoma growth through Warburg effect disruption using cell-size regulating gene

研究代表者
三馬 聡 (Miuma, Satoshi)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：30437892
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)：肝細胞癌は依然として治療困難な疾患であり、新たな治療法の開発が求められている。今回我々は、細胞サイズ調節遺伝子(Largen)に注目し、新規治療の開発を目指して研究を行った。最初に細胞サイズが大きくなる遺伝子を持つマウスを作成し、これらで肝細胞癌が抑制されるか解析したところ、肝細胞癌の進展は明らかに抑制された。さらに組織中の代謝物質の解析により、これらの抑制が、細胞サイズ変化に伴う癌細胞代謝の劇的な変化により誘導されることが明らかとなった。同様の結果は、細胞を用いた研究でも得られている。今後、細胞サイズ調節遺伝子(Largen)をターゲットとして新たながん代謝阻害薬の開発が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：細胞のサイズは細胞にとって非常に適切に調整されており、これらは癌細胞においても同様である。癌細胞を少し大きくすることにより、癌細胞代謝、癌周囲環境は劇的に変化し、癌細胞は生存することができなくなる。本研究ではこれらを確認した。

社会的意義：癌代謝は新たな創薬のターゲットになると考えられる。さらに研究を継続し、将来的には癌代謝を標的とする新たな治療法を開発する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma (HCC) is still refractory, and the development of new therapy is required. In this study, we examined the suppressive effect of genes that increase cell size (Largen) on HCC for developing new therapies.

First, we created transgenic mice having Largen and examined whether the HCC development was suppressed or not in these mice. HCC development was suppressed significantly compared to normal mouse. Next, metabolome analysis was performed to elucidate the mechanism, which revealed that the suppression was caused by dramatic changes of metabolism in tumor tissue induced by Largen expression. Similar results were obtained in in vitro experiments using HCC cell lines. Our results suggest that Largen might be very useful to suppress the development of HCC. In the future, the development of novel tumor metabolism inhibitors targeting Largen is expected.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：肝細胞癌 ワールブルグ効果 Largen遺伝子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進展した肝細胞癌に対する治療は依然困難であり、新たな治療法開発が切望される。今回我々は、共同研究者の山本らが新規に同定した細胞径を増大させる遺伝子“**Largen**”による革新的な抗癌治療の可能性に着目した。**Largen**はその名の通り細胞径を増大させるが、同時に細胞内エネルギー産生を好気性代謝にシフトさせる。癌細胞では嫌気性解糖系代謝によるエネルギー産生が生存、増殖に必須であり(ワールブルグ効果)、**Largen**発現はこれらエネルギー代謝の破綻を介し、抗腫瘍効果をもたらす可能性が考えられる。実際、白血病モデルマウスへの**Largen**強制発現により、リンパ腫縮小効果をもたらされることを我々は確認している。本研究では、**Largen**の肝細胞癌への抗腫瘍効果、その機序を明らかにしたい。そしてその成果を肝細胞癌に対する新規治療開発につなげたい。

2. 研究の目的

Largen発現の肝細胞癌への抗腫瘍効果、及びその作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

以下(1)-(4)について研究を行った。

(1) **Largen**発現が肝癌細胞株に与える影響の解析

肝癌細胞株に**Largen**の一過性強制発現を行い、**Largen**発現による細胞径変化、ミトコンドリア活性、ATP産生能について評価した。さらに**Largen**定常強制発現株を作製し、**Largen**発現による細胞増殖能変化について解析した。

(2) DEN誘導発癌マウスモデルにおける解析

Floxed Largen transgenic mouseと**Alb-Cre transgenic mouse**により、肝臓特異的**Largen**発現マウスを作製した。生後14日目の**Wild**マウス(**Largen**(-)/**Alb-Cre**(+))と**Largen**(+)マウス(**Largen**(+)/**Alb-Cre**(+))にDEN腹腔内投与による肝発癌を誘導し、12ヶ月後にsacrificeし、肝腫瘍数、腫瘍径を計測した。

(3) メタボローム解析による癌部代謝シフトの解析

上記2.で得られた、非腫瘍部・肝腫瘍部組織を用いて、メタボローム解析(CE-MS)を行い、組織内代謝産物を測定した。さらに**MetaboAnalyst ver5.0**により、PCA解析、**metabolite set enrichment analysis (MESA)**により**Largen**(+)マウス癌部の代謝シフトの有無、関連するpathwayを解析した。

(4) Exome Seqによる肝癌 somatic mutationの解析

上記2.で得られた非腫瘍部・肝腫瘍部組織よりDNAを抽出し、**Exome Sequence**を行った。得られたデータより**germline mutation**を除き、さらに腫瘍部遺伝子変異から非腫瘍部にみられる遺伝子変異を除くことにより、**Cancer-related somatic mutation**を抽出した。また癌遺伝子、癌抑制遺伝子の有無に着いても評価を行った。

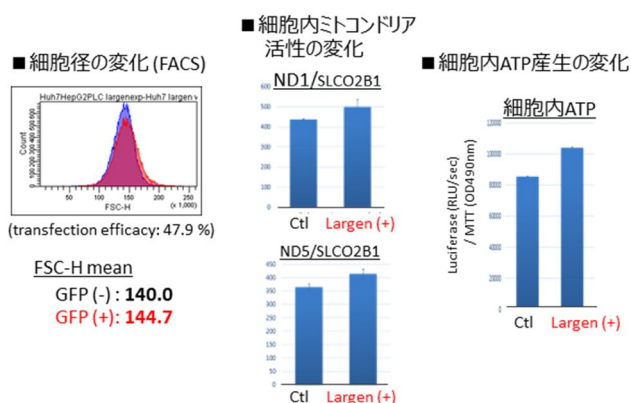
4. 研究成果

(1) **Largen**発現が肝癌細胞株に与える影響の解析

Huh7肝癌細胞株に**Largen**を一過性発現させFACSにて細胞径を解析したところ、**Largen**発現による細胞径増大が確認された(図1.)。さらに**ND1/SLCO2B1**、**ND5/SLCO2B1**を評価したところ、**Largen**発現**Huh7**においていずれも増加しており、ミトコンドリア活性上昇を誘導することが示された。また細胞内ATPのluciferase assayによる解析では、**Largen**発現により細胞内ATP上昇が認められた。これらの知見は**Largen**発現が肝癌細胞株内でも作用し、ミトコンドリア活性上昇を誘導することを示唆する。

続いて、**HepG2**肝癌細胞株にlinear vectorを用いて**Largen**遺伝子を導入し、**GFP**発現によりクローニングを行い、**Largen**定常発現株を作製した。これら定常**Largen**発現株の細胞増殖能について評価を行ったところ、**Largen**発現は細胞増殖能が低下しており、**Largen**発現による細胞増殖抑制効果が認められた。

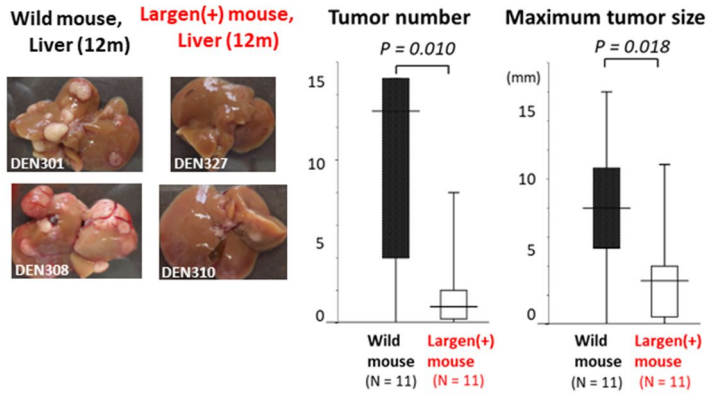
図1. **Largen**発現による肝癌細胞株の変化



(2) DEN誘導発癌マウスモデルにおける解析

Wildマウスと**Largen**(+)マウスにおいてDEN投与12ヶ月後の肝腫瘍形成について比較を行った。図2.に示すように、**Largen**(+)マウスにおいては、肝腫瘍個数、最大腫瘍径に統計学的にも有意差が認められた。

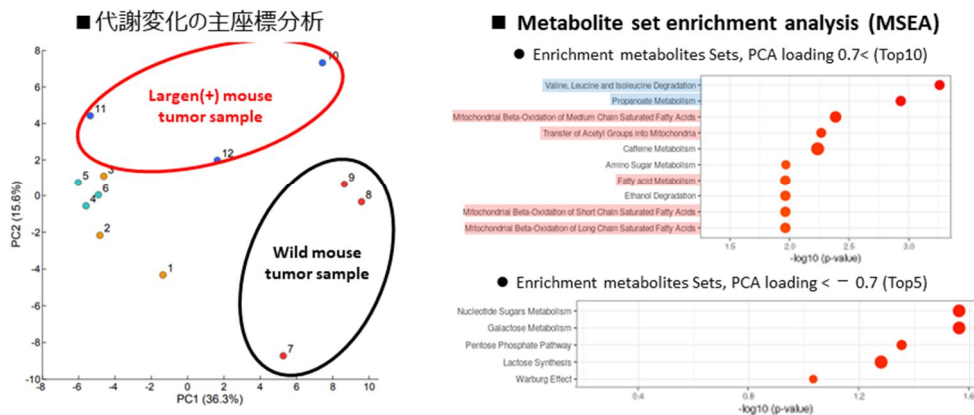
図2. Largen発現がDEN誘導発癌に与える影響



(3) メタボローム解析による癌部代謝シフトの解析

メタボローム解析により **Largen(+)**マウス癌部の代謝シフトについて評価したところ、**Largen(+)**マウスの代謝産物は大きく異なっており、図 3.に示すように **PCA** にて大きな変化が認められた。また **ATP, ADP, AMP** の濃度上昇等も確認された。さらに詳細に解析を行うため、主成分負荷量を計算し、**0.7**<、あるいは< **-0.7** の負荷量を示す代謝産物により **enrichment** 解析を行ったところ、**Largen(+)**マウスの癌部においては、**BCAA degradation, Propanoate Metabolism** の pathway、ミトコンドリア 酸化による脂質代謝 pathway などに代謝変化が誘導されていることが明らかとなった。

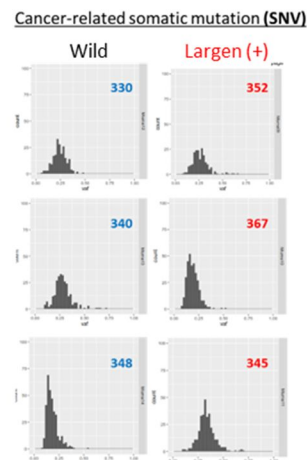
図3. Largen発現マウスの肝癌組織の代謝変化



(4) Exome Seq による肝癌 somatic mutation の解析

Exome sequence により、腫瘍部に発生する **somatic mutation** について、**Wild** マウス、**Largen(+)**マウスで比較を行ったが、**Largen(+)**マウス腫瘍部の **allele frequency** に大きな変化は見られなかった (図 4.)。これらのことは、**Largen** 発現が、**DNA damage**、あるいは **DNA damage response** などには関連しないことを示唆していると考えられた。また特に **Largen** 発現により特徴的な癌遺伝子、癌抑制遺伝子の変異なども誘導されていなかった。

図4. Largen発現有無による somatic mutation 頻度の比較



(5) 総括

(1) - (4)の解析より、**Largen** 発現の肝癌に対する抗腫瘍効果が確認され、またその機序として劇的な代謝シフトにより引き起こされることが見いだされた。今後、さらに詳細な解析が必要であるが、**Largen** 発現をターゲットとして、化合物ライブラリーを用いて創薬スクリーニングを行うことにより、新規癌代謝阻害剤の開発を目指すことも可能である。

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
研究分担者	山本 一男 (Yamamoto Kazuo) (70255123)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授 (17301)	

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