

令和元年5月29日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14993

研究課題名(和文) iPS細胞誘導をモデルとした発がんにおける解糖系代謝活性化メカニズムの研究

研究課題名(英文) Uncovering the mechanisms of glycolytic activation in tumorigenesis using iPS derivation as a model system

研究代表者

曽根 正光 (Sone, Masamitsu)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：90599771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞と多能性幹細胞はいずれも増殖能力が旺盛で、それを支える重要な分子基盤が解糖系エネルギー代謝経路である。これまで、がん化およびiPS細胞誘導において、低酸素誘導因子(HIF)と呼ばれる転写因子が、解糖系の活性化を主導すると考えられてきた。しかし、がん化において、解糖系回路を活性化する、HIFに依らない分子機構については十分に検証されていない。本研究ではiPS細胞誘導をモデルとして、がん細胞が解糖系代謝を活性化する、HIFに依存しないメカニズムを明らかにすることを試みたが、解明には至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、iPS細胞誘導系をモデルとし、代謝システムのスイッチに焦点を絞って新しい発がんのメカニズムを解明する点にある。がん化は、細胞の代謝だけではなく、細胞周期、シグナル伝達、細胞形態や細胞接着などあらゆる変化を伴う、多面的な現象である。そのため、従来の研究では、がん化に伴う代謝システムの遷移の直接的要因を、間接的な要因と区別して研究することが困難であった。本研究では、解糖系代謝の活性化に重要なHIF遺伝子を欠損した細胞を用いることによって、好氣的解糖の獲得に主導的な役割を果たす新たな代謝調節経路を同定することが期待され、新たな抗がん剤に繋がる大きな社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：Glycolytic energy metabolism is an essential molecular basis supporting vigorous proliferation of cancer and pluripotent stem cells. Previous reports show that Hypoxia inducible factors (HIF) play instructive roles in activating glycolytic pathways. However, our understanding of HIF-independent mechanisms that provoke glycolysis in tumorigenesis is yet sufficient. We tried to approach molecular mechanisms that activate glycolytic metabolism in cancer formation by using iPS-cell derivation as a model system.

研究分野：分子生物学

キーワード：発がん iPS細胞 解糖系代謝 HIF

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞は低酸素環境下では、酸化的リン酸化ではなく、解糖系代謝によって ATP を生産する。しかし、1924 年に Warburg によりがん細胞は通常の酸素濃度下においても解糖系エネルギー代謝を好んで利用することが報告され、それは好氣的解糖と呼ばれるがん細胞の特徴として広く認識されている。また、解糖系の活性化は、iPS 細胞などの多能性幹細胞でも顕著で、高い自己複製能を支える重要な基盤となっている。これまで、がん化および iPS 細胞誘導において、低酸素誘導因子 (HIF) と呼ばれる転写因子が、解糖系の活性化を主導すると考えられてきた。実際、がん細胞株において HIF を活性化する突然変異が多数報告されており、また、HIF をノックダウンするとヒト iPS 細胞の誘導が阻害される。しかしながら、HIF を活性化する突然変異のないがん細胞株でも解糖系は亢進しており、通常の酸素濃度下では HIF タンパク質は恒常的に分解されていることから、HIF だけでは好氣的解糖は説明できないと考えられる。

(2) 申請者らは、これまでマウスの iPS 細胞誘導過程において Zic3 と Esrrb という転写因子が、解糖系に関わる遺伝子群の近傍に直接結合し、発現上昇させることで、HIF 非依存的に解糖系代謝を亢進することを見出した(Sone et al., 2017, *Cell Metab*)。こうした経緯から、がん化においても解糖系回路を活性化する、HIF に依らない分子機構が存在するのではないかと考えた (図 1)。そして、そのような代謝の可塑性が、がん細胞を抗がん剤による死滅から回避させ、がんの完治を困難にしている可能性がある。従って、がん細胞が解糖系を亢進する分子機構の全容を明らかにすることが、がんに対する有効な治療法の確立に重要であると考えた。

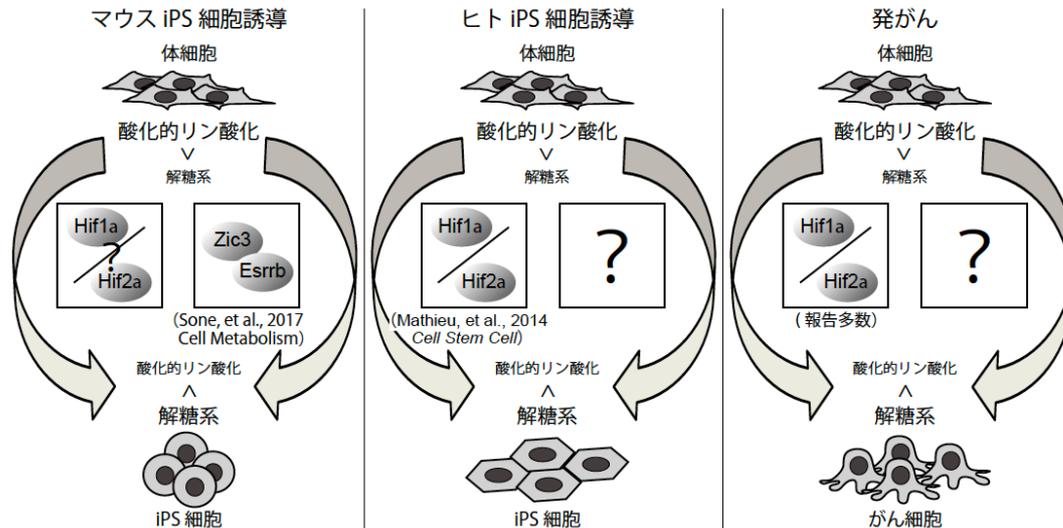


図 1 : iPS 細胞誘導および発がんにおける解糖系代謝の活性化。HIF に依らない経路も存在しうる。

2. 研究の目的

発がんをモデル化する上で次のような問題が存在する。第一に、単離されたヒトのがん細胞をモデルとした場合、多くはかなり進行したがんの状態に近く、発がんのメカニズムに迫ることが困難である。第二に、遺伝子を改変し発がんを誘導するモデル動物では、誘導後、一般的に発がんまで数カ月の長期間を要する。第三に、モデル動物ではがんマーカーの発現や薬剤に対する感受性など、がん細胞の振る舞いが必ずしもヒトとは一致しない。本研究では、発がんと同様に、酸化的リン酸化から解糖系へエネルギー代謝がスイッチし、およそ 1

カ月の早さで完了する iPS 細胞誘導をモデルとして、がん細胞が解糖系代謝を活性化するメカニズムを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

当該研究期間において、Dox により iPS 細胞誘導可能な既存のヒト繊維芽細胞株 (hiF-T 細胞, Cacchiarelli et al., 2015, *Cell*) に遺伝子改変を行い、*HIF1α*、*HIF2α*両遺伝子のコンディショナルノックアウト細胞株の作製を試みた。これは、以下の実験に使用することを目的とする。得られた細胞にゲノム編集技術を用いてゲノムワイドな変異を導入した細胞のプールを作製する。これらの細胞に *HIF* 遺伝子の欠損を誘導した後、iPS 細胞誘導を行い、*HIF* 遺伝子の欠損を補完できる変異群を同定する (図 2)。同定した変異群が解糖系やその他の細胞代謝に与える影響をメタボローム解析によって明らかにする。変異により増殖能やがん形成能など細胞の性質がどのように変化するか in vitro/in vivo 実験によって調べる。また、実際のがんで見られる変異との関連性をがんのゲノムデータベースを用いて解析する。

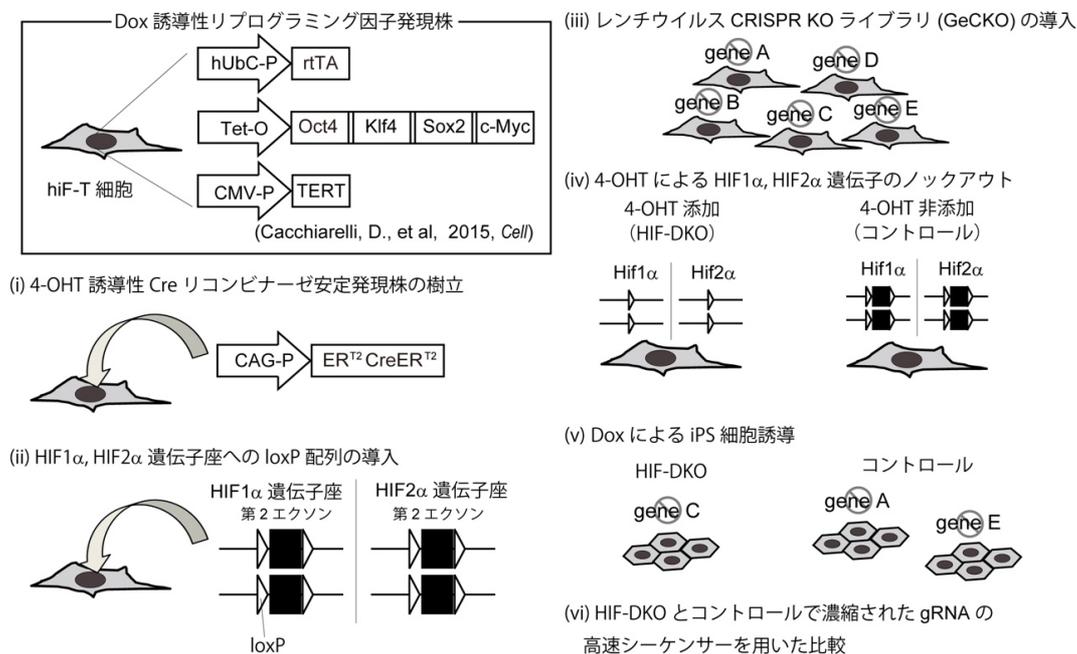


図 2 : iPS 細胞誘導を利用した解糖系代謝を活性化する変異の同定方法。hUbC-P : ヒトユビキチン C プロモーター、rtTA : リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子、Tet-O : テトラサイクリン応答性オペレーター、CMV-P : サイトメガロウイルスプロモーター、CAG-P : CAG プロモーター。

4. 研究成果

(1) hiF-T 細胞を用いた iPS 細胞誘導条件の確立

まず、米国 BROAD Institute より譲渡された hiF-T 細胞を用いて、我々の手で iPS 細胞誘導が再現できるかどうかを確認した。その結果、誘導の際の MEF feeder 細胞の播種密度が誘導効率に影響を与えることを見出し、至適条件を確立した (図 3)。

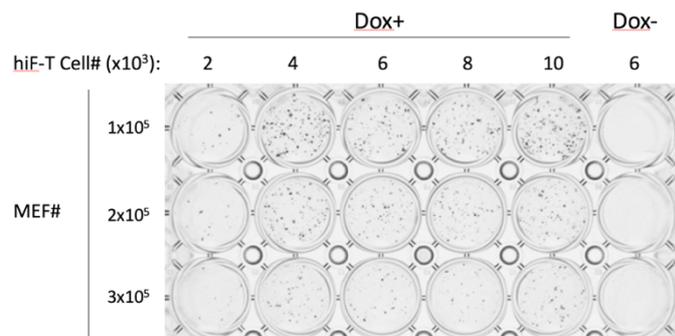


図 3: hiF-T 細胞の iPS 細胞誘導における MEF feeder の至適条件の検討。iPS 細胞のコロニーが黒く染色されている。

(2) 4-OHT 誘導性 Cre リコンビナーゼ安定発現 hiF-T 株樹立の試み

次に、4-OHT 誘導性 Cre リコンビナーゼを安定的に発現する hiF-T 細胞株の樹立を試みた。導入方法としては、顕著な導入効率（約 40%）を示したエレクトロポレーション法を用い、*piggyBac* トランスポゾンシステムによって、hiF-T 細胞のゲノムに挿入するスキームをとった。しかしながら、遺伝子導入後、薬剤選択したところ、生存する細胞が存在したものの、いずれも細胞老化をきたし、それ以降の用途に用いることが困難であった。そこで、線維芽細胞は細胞密度の低い状態では急速に老化することがあるため、薬剤選択に伴う細胞の孤立化により hiF-T 細胞が老化した可能性を考慮し、MEF feeder 上で Cre 安定発現株の単離を試みた。また、Dox の添加によって細胞増殖を促進することのできるリプログラミング因子を強制的に発現する事のできる hiF-T 細胞の性質を活かし、Dox 存在下でも Cre 安定発現株の単離を試みた。しかしながら、いずれの方法においても増殖能力の低下を防ぐことができず、Cre 安定発現株を樹立することはできなかった。

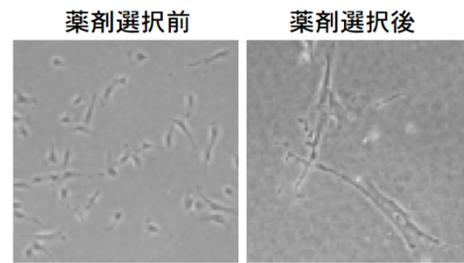


図 4 : hiF-T 細胞を薬剤選択すると細胞老化を起こす。

(3) lentiCRISPR システムを用いた *HIF1* および *HIF2* 遺伝子機能阻害の試み

上記の結果から、hiF-T 細胞は hTERT 遺伝子の過剰発現により不死化しているものの、薬剤選択により細胞老化が誘発され、クローニングが非常に困難であることが分かった。そこで、図 2 の研究計画を見直してクローニング過程(i), (ii)を省略し、よりシンプルな方法を取ることを考えた。つまり、レンチウイルスを介した CRISPR/Cas9 システムによって *HIF1A* 遺伝子を単純にノックアウトし、それを(iii)のスクリーニング系の出発材料にしようと考えた。hiF-T 細胞において *HIF1A* 遺伝子は効率よくノックアウトされた (図 5)。そこで、*HIF1A* 遺伝子を標的とした sgRNA を導入し、CRISPR/Cas9 システムによって機能阻害を行い、標的を持たない陰性コントロール (scramble) に比べ、iPS 細胞誘導を抑制するかどうかを調べた (図 6)。その結果、驚いたことに scramble を導入した場合であっても iPS 細胞誘導は阻害されてしまい、lentiCRISPR システム自体が hiF-T 細胞を用いた iPS 細胞誘導に適さないことが明らかとなった。

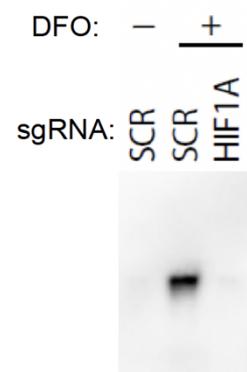


図 5 : hiF-T において、DFO 依存的な HIF1A タンパク質の発現が CRISPR/Cas9 系により抑制される。

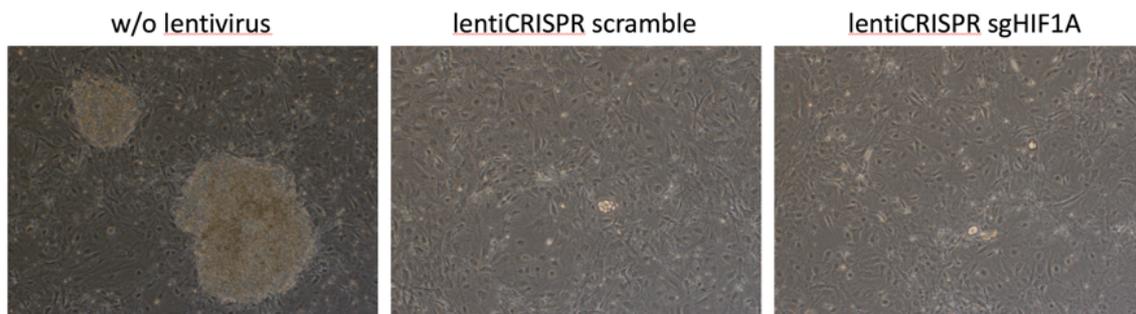


図 6 : lentiCRISPR システム自体が hiF-T における iPS 細胞誘導を阻害する。

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〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。