

令和元年6月27日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16550

研究課題名(和文)ミトコンドリア機能異常を標的とした食道癌治療戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of treatment strategy for esophageal cancer targeting mitochondrial dysfunction

研究代表者

田中 晃司 (Tanaka, Koji)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70621019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：術前治療後に根治術を施行した食道扁平上皮癌88例の切除標本においてmtDNAコピー数を測定。mtDNAコピー数低値群で有意に化学療法の病理組織学的効果が乏しかった。ミトコンドリア転写因子A(TFAM)をshRNAでknockdown(KD)し、mtDNAコピー数減少細胞株を樹立した(TE8:約40%、TE11:約60%)。抗がん剤感受性を比較したところ、mtDNAコピー数が減少した細胞では、抗がん剤の感受性が低下していることがわかった。また、同様の結果が皮下腫瘍モデルでも確認された。以上の結果よりmtDNAコピー数減少細胞は、抗がん剤に対する治療抵抗性があることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、化学療法の治療抵抗性にmtDNAコピー数減少が関与することを示唆している。すなわち、何らかの理由で減少しているmtDNAコピー数を増加させることができれば化学療法の効果が改善し、ひいては食道癌の治療成績向上につながると思われる。これまで、mtDNAと化学療法抵抗性に言及した報告はほとんどなく、新たな治療戦略につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We measured mtDNA copy number in resected specimens of esophageal squamous cell carcinoma that underwent radical surgery after preoperative treatment. The histopathological effects of chemotherapy were significantly poor in the mtDNA copy number low group. Mitochondrial transcription factor A (TFAM) was knocked down (KD) with shRNA to establish a mtDNA copy number reduced cell line (TE8: approximately 40%, TE11: approximately 60%). Comparison of anticancer drug sensitivities showed that cells with reduced mtDNA copy number had reduced anticancer drug sensitivity. Similar results were also confirmed in the subcutaneous tumor model. From the above results, it was confirmed that mtDNA copy number-reduced cells are resistant to treatment with anti-cancer agents.

研究分野：消化器外科

キーワード：食道癌 ミトコンドリアDNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年ミトコンドリアをはじめとする様々なオルガネラに対する選択的機構の存在が明らかになってきた。特にミトコンドリアに対するオートファジーはマイトファジーと呼ばれており、機能低下したミトコンドリアを除去することによりミトコンドリアの品質管理に貢献していることが明らかになってきている。しかしながら、癌細胞におけるミトコンドリア機能異常が癌の進行や治療抵抗性に与える影響とそのメカニズムに迫ったものは未だ無いのが現状である。

2. 研究の目的

癌細胞においてミトコンドリアの機能異常があることが観察されているが、ミトコンドリア機能異常が癌の進行や治療抵抗性に及ぼす影響に関しては不明な点が多い。また、ミトコンドリア機能異常の原因として、ミトコンドリア DNA(mtDNA)のコピー数異常や、mtDNA の変異などが考えられるが、臨床検体における mtDNA の状況は未だ明らかではない。本研究では、まず mtDNA のコピー数異常や変異がヒトの臨床検体で認められるかを現状調査を行う。次に、ミトコンドリア機能異常が治療抵抗性に及ぼす影響を検討し、ミトコンドリア機能制御が新規の治療標的になるかを検証することを目的とする。

3. 研究の方法

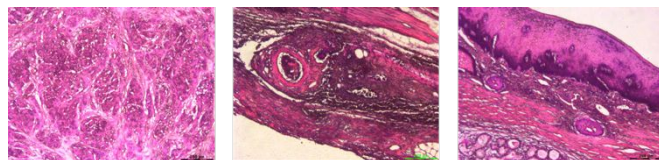
(1) 臨床検体における mtDNA 異常の存在確認および治療による mtDNA コピー数の変化の検証
食道癌臨床検体を用い、mtDNA コピー数や mtDNA 変異の解析を行い、食道癌における mtDNA 異常の現状把握を行う。また、治療前後での mtDNA コピー数変化や mtDNA 変異の有無、これら mtDNA の情報と臨床病理学的因子(腫瘍の進行度や抗癌剤の治療効果や予後など)との相関を検討する。さらに、mtDNA 由来の電子伝達系を構成する分子(COX1, ND1)の免疫染色を行い、mtDNA の情報と相関性を検討する。また、血液中の mtDNA コピー数や変異を解析し、癌診断や感受性予測への利用可能性を模索する。

(2) mtDNA コピー数減少が化学療法感受性に及ぼす影響の検討

In vitro で、mtDNA コピー数を減少させた細胞株を樹立する。エチジウムブロマイド(EtBr)および mtDNA の転写因子である TFAM に対する shRNA を用いて、mtDNA コピー数を段階的に減少させる。mtDNA 量に応じて(100%、60%、30%、0%)ミトコンドリア機能の評価し、mtDNA コピー数とミトコンドリア機能の相関性を確認する。その上で、mtDNA コピー数と抗癌剤感受性を比較検討する。

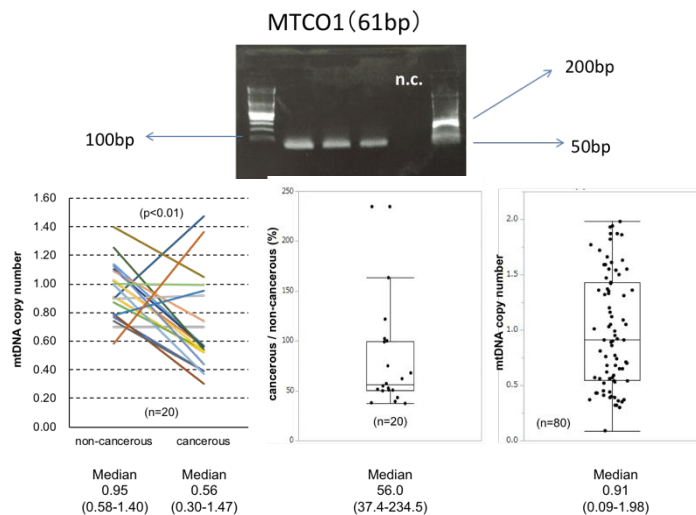
(3) 抗癌剤耐性株の樹立および獲得耐性における mtDNA 変異領域の同定

抗癌剤耐性株を樹立し、mtDNA のコピー数および mtDNA 変異を親株と比較検討する。シーケンスを行い、mtDNA 変異を同定する。



4. 研究成果

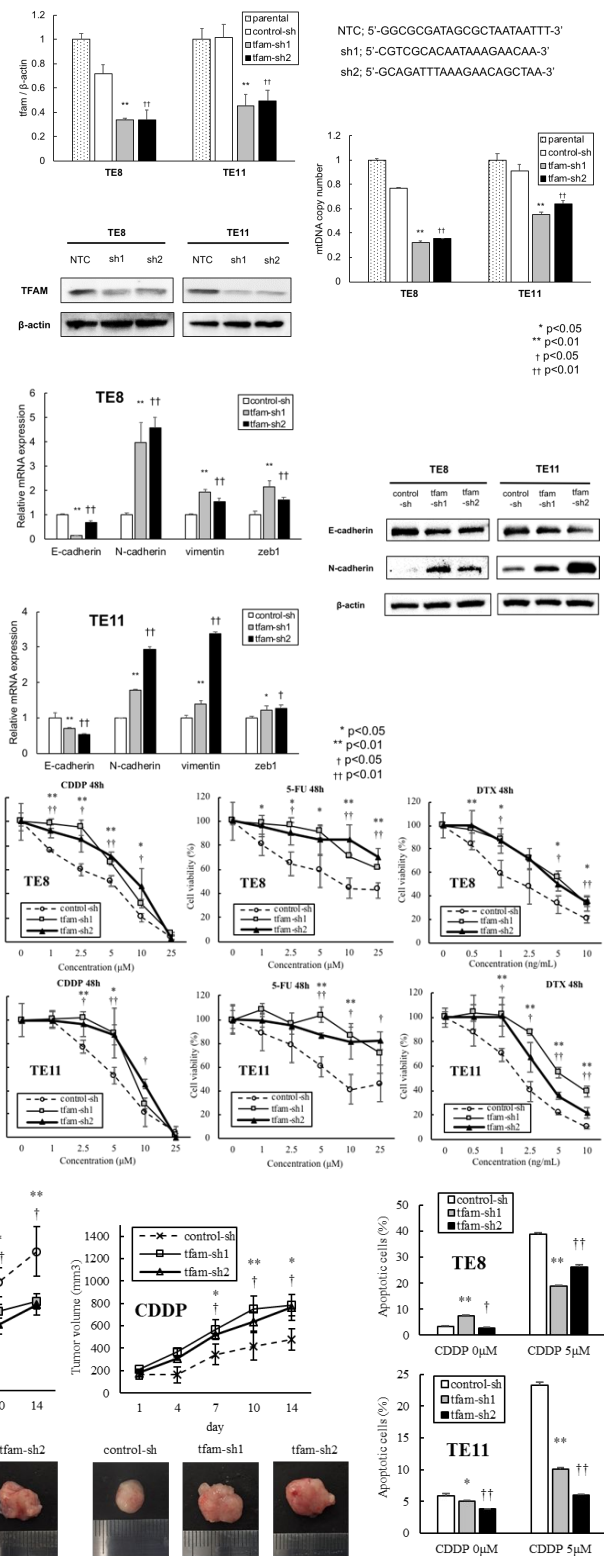
2002 年~2012 年に術前未治療で根治術を施行した食道扁平上皮癌 80 例の切除標本 (FFPE) を用い、Laser microdissection により癌部 DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法で CO1 遺伝子と核 DNA の比より mtDNA コピー数を測定。20 例について非癌部食道粘膜の mtDNA コピー数と比較すると、癌部では 56.0% (37.4-234.5%) と有意に減少していた。癌部 80 例での検討では、mtDNA コピー数低値群で有意に病理学的深達度及び病理学的病期が進行していた。また、低値群で有意に 5 年生存率が不良であり (31.5% vs 68.4%, $p < 0.01$)、mtDNA コピー数は独立予後因子であった。



ミトコンドリア転写因子 A (TFAM) を shRNA で knockdown (KD) し、mtDNA コピー数減少細胞株を樹立した (TE8: 約 40%、TE11: 約 60%)。遺伝子発現について RT-PCR 法および WB を施行すると、TFAM-KD 細胞では E-cadherin の低下、N-cadherin / vimentin / zeb-1 の上昇が見られた。さらに Matrigel-invasion assay、Scratch-wound healing assay を行ったところ、TFAM-KD 細胞は浸潤能、遊走能が有意に亢進していた。一方、癌幹細胞マーカーである CD44 について、mRNA 及び蛋白発現を RT-PCR とフローサイトメトリーで測定した結果、TFAM-KD 細胞で CD44 の mRNA 及び蛋白発現の上昇を認めた。Tumor sphere formation assay を行ったところ、TFAM-KD 細胞で腫瘍形成能が有意に亢進していた。以上の結果より mtDNA コピー数減少細胞は、癌の悪性度と関連する上皮間葉転換、癌幹細胞化をきたしていることが示唆された。

術前治療後に根治術を施行した食道扁平上皮癌 88 例の切除標本 (FFPE) を用い、Laser microdissection により癌部 DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法で C01 遺伝子と核 DNA の比より mtDNA コピー数を測定。mtDNA コピー数低値群で有意に cM 陽性症例が多く、化学療法の病理組織学的効果が乏しかった。また、低値群で有意に 5 年生存率が不良であった。

TE8 および TE11 の親株および shTFAM を導入した細胞株に抗がん剤を暴露し、抗がん剤感受性を比較した。その結果、mtDNA コピー数が減少した細胞では、抗がん剤の感受性が低下していることがわかった。またこれらの細胞を用いて皮下腫瘍モデルを作成し、抗がん剤を暴露したところ、mtDNA コピー数が減少した細胞は、コントロールと比較し、腫瘍サイズが大きく、治療抵抗性を示唆する結果であった。



抗癌剤耐性株を樹立し、mtDNA のコピー数および mtDNA 変異を親株と比較検討するためのサンプル調整が完了した。現在シーケンスに提出し、結果待ちの状態である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Esophageal squamous cell carcinoma with low mitochondrial copy number has mesenchymal and stem-like characteristics, and contributes to poor prognosis.

Masuike Y, Tanaka K, Makino T, Yamasaki M, Miyazaki Y, Takahashi T, Kurokawa Y, Nakajima K, Mori M, Doki Y. (査読あり)

PLoS One. 2018 Feb 15;13(2):e0193159. doi: 10.1371/journal.pone.0193159. eCollection 2018. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Low mitochondrial copy number induces resistance to chemotherapy in esophageal cancer. Yamada.M, Tanaka K., Makino T., Miyazaki Y., Takahashi T., Kurokawa K., Yamasaki M., Mori M., Doki Y. AACR Annual Meeting 2018.11.15, Korea
2. J-1043 ミトコンドリア DNA コピー数と食道癌化学療法耐性との関連性に関する検討、田中晃司、山崎誠、牧野知紀、益池靖典、宮崎安弘、高橋剛、黒川幸典、中島清一、森正樹、土岐祐一郎。2018.9.27、第77回日本癌学会学術総会、大阪
3. Low copy number of mtDNA is associated with cancer stemness in ESCC、Hara.T, Masuike Y., Tanaka K., Makino T., Yamasaki M., Miyazaki Y., Takahashi T., Kurokawa Y., Eguchi H., Nakajima K., Mori M., Doki Y. AACR Annual Meeting 2018.4.18、Chicago

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。