

令和元年6月18日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17758

研究課題名(和文) がん悪性化におけるミトコンドリア逆行性制御の解明

研究課題名(英文) Exploring the mitochondrial retrograde control in malignant progression

研究代表者

笠原 敦子 (KASAHARA, Atsuko)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：00447244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：悪性度の高い脳腫瘍である膠芽腫(グリオブラストーマ)では、放射線・化学療法に対して耐性を持ち、転移や再発の直接の原因となる、がん幹細胞様集団が見出されている。本研究では、このがん幹細胞様集団特異的なミトコンドリアの形態や細胞内局在を見出した。この特異的なミトコンドリア動態が、細胞表面のグリコカリックス発現を制御し、細胞障害性Tリンパ球によるグリオブラストーマ幹細胞様集団の細胞認識・傷害に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでがん細胞では、エネルギー代謝制御におけるミトコンドリアの役割が注目・研究されてきた。本研究では、ミトコンドリアの形態や細胞内局在が、がん細胞の悪性形質を制御し、がん免疫療法の効率に関わることを初めて明らかにした。本研究の成果は、悪性がん細胞特異的なミトコンドリア動態が、治療標的となりうる可能性を示唆し、新規のがん治療研究への布石となったと考えている。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma (GBM) is a very aggressive and destructive brain tumour. Numerous studies have identified a tumour cell population in GBM that can initiate glioma development, as glioma stem-like cells. We observed the specific mitochondrial shape, and intracellular localisation in glioma stem-like cells, that regulates sialylated glycan expressions at the plasma membrane, which directly influences the physiological contact, and killing efficiency of cytotoxic T lymphocyte to the glioma stem-like cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア動態 カルシウム制御

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

#### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは絶えず融合・分裂を繰り返すことで、その品質管理、細胞内局在、サイズ、運動性を細かく調節しており、複雑なミトコンドリアの形態は、内膜融合因子 OPA1、外膜融合因子 MFN1, MFN2 と、分裂因子 DRP1 が協調して融合・分裂を制御することにより、調節、維持されている (Kasahara and Scorrano, Trends Cell Biol 2014)。これまで、がん細胞におけるミトコンドリアは、糖、アミノ酸、脂質などの代謝制御機能を中心に研究が進められてきたが、近年、その多面的な機能と深く結びつくミトコンドリアの形態や細胞内での局在についても着目されはじめている。例えば、高転移性乳がん細胞は、低転移性細胞に比べて分裂因子 DRP1 の発現上昇を伴ってミトコンドリアの形態は断片化しており (Oncogene 2013)、前立腺がんでは、分裂因子 DRP1 が、がん遺伝子として知られる Ras・MAPK 経路の下流標的としてがん悪性化に関与していることが報告された (Mol Cell 2015)。また、グリオーマ細胞の腫瘍形成能を有した細胞は、そうでない細胞に比べて、ミトコンドリアは断片化しており、ミトコンドリアの分裂を誘導するリン酸化型 DRP1 の発現が上昇していること、それは Cyclin-dependent kinase 5 が制御していることが報告された (Nat Neurosci 2015)。このように、様々ながん種の悪性細胞で、特異的なミトコンドリアの形態が見出されており、ミトコンドリアの動態が、いかにがん細胞の悪性進展に関与しているかがわかってきている。一方で、このような特異的なミトコンドリア動態が、いかにしてがん細胞の悪性形質の獲得や維持に関与しているかはよくわかっていない。

#### 2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、心筋分化過程において、Notch1 シグナルを介した「ミトコンドリア逆行性制御」を示した (Kasahara et al, Science 2013)。これは、ミトコンドリア融合因子 MFN2, OPA1 の発現低下によるミトコンドリアの断片化、さらにミトコンドリアの細胞内局在の変化は、細胞内カルシウム制御に大きく影響を与え、Notch1 シグナルを活性化し、心筋分化を制御する、「ミトコンドリア逆行性制御」である。本研究では、形態や局在の変化したミトコンドリアが、どのような「ミトコンドリア逆行性制御」を介して、がん細胞の悪性進展に関与しているかを明らかにするために、1) グリオーマの幹細胞様集団の特異的な形態のミトコンドリアは、どのような悪性形質の獲得や維持に関与しているのか、2) 分子標的薬耐性肺がん細胞の特異的な形態のミトコンドリアは、どのように薬剤耐性に関与しているのかについて明らかにすることを目指した。

#### 3. 研究の方法

1) 研究代表者がジュネーブ大学在籍時に開始したプロジェクトであり、ジュネーブ大学の共同研究者から提供されたグリオーマ細胞 GL261 (マウス)、U251 (ヒト)を用いて、グリオーマ幹細胞様集団を濃縮するために、sphere 形成培養を数ヶ月行い、幹細胞マーカーの発現確認をし、グリオーマ幹細胞様集団を単離した。この細胞集団と、血清を含む培地で接着培養したグリオーマ分化細胞のミトコンドリアの動態を共焦点顕微鏡、電子顕微鏡を用いて観察した。また、ジュネーブ大学在籍時の研究室において、細胞障害性 T リンパ球によるグリオーマ細胞の殺傷効率は、グリオーマ幹細胞様集団の方が分化した細胞より高いことがわかっており、ミトコンドリア融合もしくは分裂因子の発現を低下させたグリオーマ細胞を用意し、ミトコンドリア動態が幹細胞性の形質に関与するか、細胞障害性 T リンパ球によるグリオーマ細胞の殺傷効率を変化させるかを検証した。2) 研究代表者が現在所属する金沢大学がん進展制御研究所の後藤典子教授グループによって単離された分子標的薬 gefitinib 耐性肺腺がん細胞を用いて、gefitinib 感受性肺腺がん細胞と比較し、ミトコンドリアの形態を共焦点顕微鏡で、微細構造を電子顕微鏡で観察し、ミトコンドリアの機能を細胞外フラックスアナライザーで測定した。

#### 4. 研究成果

1) グリオーマ幹細胞様集団の細胞のミトコンドリアは、報告されているように分化した細胞に比べて断片化しており、さらに、小胞体との距離も離れており、カルシウムや脂質のやりとりに重要な、ミトコンドリアと小胞体が 15nm 未満の間隔で限りなく近づいている“contact sites”の数も減少していた。そのため、幹細胞様集団のミトコンドリア内カルシウムレベルは分化した細胞に比べ低下していた。ミトコンドリアマトリクスに局在する UV レーザーにより発色する GFP と、常にミトコンドリアマトリクス内で RFP を発色するコンストラクトを用いてミトコンドリアの融合活性を観察したところ、グリオーマ幹細胞様集団は断片化したミトコンドリアの形態を示しているにも関わらず、分化したグリオーマ細胞の長いミトコンドリアよりも、より活発に融合していた。これまでに、グリオブラストーマ細胞の細胞表面を原子間力顕微鏡で観察すると、悪性度の異なる細胞で細胞表面の構造が異なることが報告されていた (J Immunol 2010)。そこで、細胞表面糖タンパク質の発現を蛍光プローブにより検出したところ、幹細胞様集団では分化した細胞に比べて低下していた。この細胞表面のグリコカリックスの違いが細胞障害性 T リンパ球によるグリオーマ細胞の細胞認識、殺傷効率に直接関わっていた。興味深いことに、この細胞表面糖タンパク質の発現は、ミトコンドリア融合・分裂因子の発現や、ミトコンドリアと小胞体を強制的に近づけるコンストラクトによって変化する。つまり、ミトコンドリアの形態や細胞内局在がグリコカリックス構造に関与し、細胞障害性 T リンパ球によるグリオーマ細胞の殺傷効率を制御しているということである。本研究では、グリオーマ細胞におけるグリコカリックスを介した「ミトコンドリア逆行性制御」を見出し、悪性がん細胞形質を制御する新しいミトコンドリア動態を報告することができた (EMBO J 2017)。

2) gefitinib 耐性の肺腺がん細胞では、感受性細胞に比べてミトコンドリアが長く、さらに呼吸機能が向上していたため、ATP 合成酵素の特異的阻害剤であるオリゴマイシン、またはミトコンドリアの呼吸鎖酵素複合体のタンパク質発現を低下させることが知られている抗生物質ドキシサイクリン (Cell Rep 2015) を処理し、耐性細胞の Gefitinib への感受性が復帰することを観察した。また、耐性細胞では抗アポトーシス因子である Opa1 の発現上昇が観察されていたため、short hairpin RNA を用いて Opa1 発現を欠損させると耐性細胞の Gefitinib への感受性が復帰することも確認できている。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

Vu HT, Kobayashi M, Hegazy AM, Tadokoro Y, Ueno M, Kasahara A, Takase Y, Nomura N, Peng H, Ito C, Ino Y, Todo T, Nakada M, Hirao A. Autophagy inhibition synergizes with calcium mobilization to achieve efficient therapy of malignant gliomas. *Cancer Sci*. 2018 109: 2497-2508. doi: 10.1111/cas.13695. 査読有

Noguchi M, Kasahara A. Mitochondrial dynamics coordinate cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 500: 59-64. Review. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.094. 査読無

Bassoy EY\*, Kasahara A\*, Chiusolo V, Jacquemin G, Boydell E, Zamorano S, Riccadonna C, Pellegatta S, Hulo N, Dutoit V, Derouazi M, Dietrich PY, Walker PR, Martinvalet D. ER-mitochondria contacts control GSC surface glycan expression and sensitivity to killer lymphocytes. *EMBO J*. 2017 36: 1493-1512. \*Contributed equally to this work, doi: 10.15252/emboj.201695429. 査読有

### 〔学会発表〕(計 4 件)

Kasahara A, Noguchi N., Shibata K., Kohno S., Takahashi C., Gotoh N., Kohno T., Scorrano L., Hirao A. “Mitochondrial dynamics in gefitinib-resistant lung adenocarcinoma cells” Keystone Symposia Conference, Mitochondrial Biology, 22-26 Apr 2018, Kyoto, Japan, Poster presentation

Kasahara A. “Mitochondrial dynamics in tumour malignancies: retrograde control from mitochondria” International workshop on mitochondrial dynamics, 14 Dec 2017, Osaka Japan, Invited talk presentation

Kasahara A., Noguchi M., Kohno S., Takahashi C., Gotoh N., Kohno T., Scorrano L., Hirao A.  
“Mitochondrial dynamics in gefitinib-resistant lung adenocarcinoma cells” EMBO-FEBS Lecture Course “Mitochondria in life, death and disease”, 9-13 Oct 2017, Brindisi, Italy, Poster presentation  
Noguchi M., Kohno S., Takahashi C., Gotoh N., Kohno T., Hirao A., Scorrano L., Kasahara A.  
“Mitochondrial dynamics and functions in lung adenocarcinoma cells” Padua-Mit-Innsbruck “Mitochondrial Conference”, 12-14 September 2017, Padua, Italy, Poster presentation

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 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。