

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06969

研究課題名（和文）転写制御因子SUZ12によるレドックス制御を介した足場非依存性増殖機構の解析

研究課題名（英文）SUZ12 suppresses anoikis by alleviating oxidative stress in cancer cells

研究代表者

石川 文博 (Ishikawa, Fumihito)

昭和大学・大学共同利用機関等の部局等・准教授

研究者番号：60515667

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）：本課題は、転写制御因子SUZ12によるレドックス制御を介したがん細胞のアノイクス（適切な接着環境の喪失によるアポトーシス）逃避機構について明らかにすることを目的として解析を行った。解析結果から、がん細胞中でSUZ12は接着喪失に伴うミトコンドリアからの活性酸素種の増加を抑制し、活性酸素によるアノイクスの誘導を抑制していることが明らかとなった。この結果と一致して、SUZ12は、ミトコンドリアに依存した内因性アポトーシス経路を抑制することで、がん細胞をアノイクスから保護している可能性が示唆された。さらに詳細なメカニズムを調べるため、SUZ12に依存して発現変化する遺伝子群を網羅的に同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の成果から、接着喪失にともなうミトコンドリアでの活性酸素種の上昇はアノイクスを促進し、がん細胞ではSUZ12によって抑制的に制御されていることが明らかになった。一方で、SUZ12の発現によって活性酸素種の産生と消去に関わる既知の酵素の遺伝子の発現レベルはいずれも影響を受けなかった。これらの結果は、SUZ12による新規のレドックス制御機構の存在を示唆しており、レドックス生物学をさらに発展させるものである。また、細胞レベルの予備的な結果ではあるが、抗酸化剤の過剰な摂取はSUZ12と同様の効果を示すことが予想され、がんの進展に促進的に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To accomplish metastasis, cancer cells need to acquire the ability of anchorage-independent growth, which is achieved by escaping from detachment-induced apoptosis (anoikis).

In this study, we examined the role of SUZ12, a polycomb-group protein, in redox regulation during anoikis. First, we found that SUZ12 knockdown increased reactive oxygen species (ROS) in both cytosol and mitochondria under detached conditions, whose effects was prominent in mitochondria. Moreover, anoikis induced by SUZ12 knockdown was inhibited by antioxidant treatment, overexpression of NRF-2 (which plays a role in protection against oxidative stress), or concomitant overexpression of ROS-scavenging enzymes in mitochondria. In accordance with these results, anoikis was completely blocked in caspase-9 knockout cells that are deficient in intrinsic apoptotic pathway via mitochondria. Together, these results suggest that SUZ12 inhibits anoikis by alleviating mitochondrial oxidative stress in cancer cells.

研究分野：腫瘍細胞生物学

キーワード：足場非依存性増殖 がん転移 レドックス ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

足場非依存性増殖は、がん転移の成立に必須な代表的形質と考えられ、適切な細胞外マトリックスからの接着喪失に伴うアポトーシス（アノキス）からの回避で達成される。しかしながら、アノキスの回避機構については、一般的な抗アポトーシスシグナルの増強で説明されることが多く、接着喪失時に特異的にアポトーシス抑制に至るメカニズムに関する報告はなされていない。このような状況の下、転移過程で生じる活性酸素種（ROS）が酸化ストレスとして働き、転移の障壁となっていることを示す報告がなされた。このことは、接着喪失により生じる ROS によって、がん細胞にアノキスが誘導されている可能性を示しているが、その詳細な分子メカニズムはいまだ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

我々が、高転移性乳がん細胞 MDA-MB-231 の足場非依存性増殖に関わる遺伝子として同定したポリコム群タンパク質 SUZ12 が、細胞内の ROS を制御することでアノキスの抑制に関わっていることを示すとともに、そのメカニズムを詳細に明らかにすることを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) 接着喪失に伴う細胞内レドックス変化の解析

細胞内の酸化還元状態をモニターできる蛍光タンパク質 (RoGFP, Grx1-RoGFP) に各細胞内小器官への標的配列を付加した発現系を MDA-MB-231 細胞へ導入し、フローサイトメーターで蛍光強度を測定することで各コンパートメントでの酸化還元状態を時空間的に解析した。さらに、これらの細胞に shRNA を導入することで SUZ12 をノックダウン (KD) し、SUZ12 の接着喪失に伴う還元状態の変化への影響を調べた。

(2) 細胞内 ROS のアノキスへの関与とアポトーシス経路の解析

SUZ12KD 細胞に、抗酸化剤を処理もしくはカタラーゼ (MTS-CAT) やスーパーオキシドジismスターゼ (SOD) などの ROS 除去酵素などをミトコンドリアへ過剰発現させ、アネキシン V と 7-アミノアクチノマイシン D (7-AAD) の染色性についてフローサイトメーターを用いて調べた。アネキシン V 陽性、7-AAD 陰性細胞をアポトーシス細胞とした。さらにアノキス経路を明らかにするため、アポトーシスの内因性経路と外因性経路に特異的に関わるカスパーゼ 9 と 8 をそれぞれノックアウト (KO) することで検討を行った。

(3) SUZ12 による酸化ストレス克服機構の解析

SUZ12KD 細胞から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法によって ROS 産生に関わるミトコンドリア関連遺伝子や NADPH オキシダーゼ、ROS の除去や NADPH 産生系に関わる遺伝子の発現を解析した。さらに、SUZ12 によって制御される遺伝子の候補を網羅的に得るために、RNA シークエンスを行った。

4. 研究成果

(1) 接着喪失に伴う細胞内レドックス変化の解析

細胞質およびミトコンドリアに局在化させた RoGFP 導入細胞を浮遊状態 (Sus) にしたところ、コントロール細胞 (NT) では接着状態 (Adh) と比べていずれも酸化還元状態に有意な変化は見られなかった。一方で、SUZ12KD 細胞では接着状態ではコントロールの細胞とほぼ変化が見られないものの、接着状態では有意に酸化状態に傾いていた。特に、この変化はミトコンドリアで顕著であった (図 1)。

さらに、この結果を確認するため、細胞内の抗酸化物質であるグルタチオンの酸化状態を Grx1-roGFP 導入細胞で SUZ12 を KD することで検討した。細胞質では接着喪失により酸化型グルタチオンの顕著な増加が認められ、SUZKD で若干の増加を認めた。一方で、ミトコンドリアの酸化型グルタチオンは、SUZ12KD 細胞を接着喪失

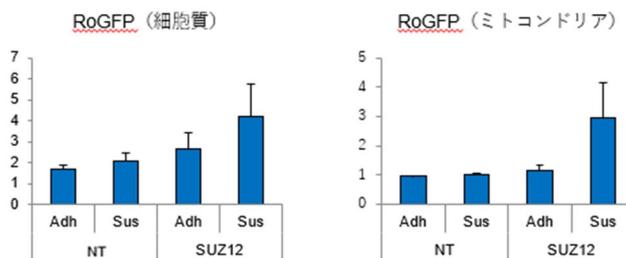


図 1 接着喪失に伴う細胞内 ROS の変化に対する SUZ12 の影響

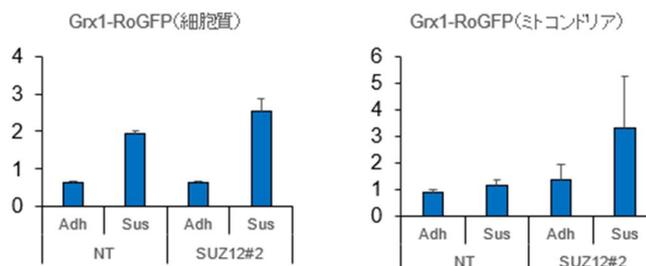


図 2 接着喪失に伴うグルタチオンの酸化状態の変化への SUZ12 の影響

失させたときのみ顕著な上昇を認めた(図2)。

これらの結果は、MDA-MB-231 細胞では接着喪失による ROS の上昇が SUZ12 によって抑制されており、その中心的な細胞内局在がミトコンドリアであることを示していた。

(2) 細胞内 ROS のアノキスへの関与

SUZ12 により抑制されている ROS がアノキスへ関与するかどうかを調べるため、まず抗酸化剤を処理することで検討を行った。その結果、NAC (N-アセチルシステイン)、Trlx (Trolox; ビタミン E の水溶性誘導体)、MT (MitoTEMPO; ミトコンドリアでのスーパーオキシドスカベンジャー) を処理した際に、有意にアノキスが抑制された(図3)。

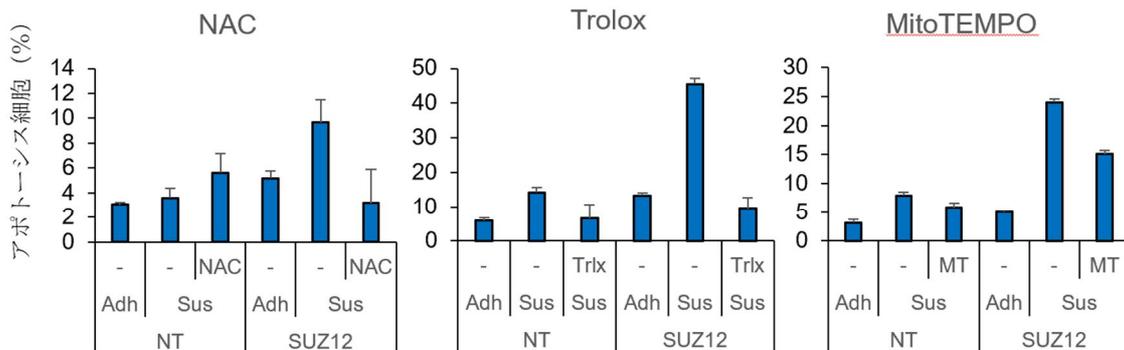


図3 抗酸化剤のアノキスへの影響

この結果と一致して、ミトコンドリアに SOD とカタラーゼを過剰発現させた細胞では、アノキスは顕著に抑制された。さらに、ROS のアノキスへの関与を確認するため、酸化ストレス応答を担う転写因子 NRF2 を過剰発現させて検討を行い同様の結果が得られた(図4)。

以上の結果から、

SUZ12 は、接着喪失で生じる酸化ストレスを緩和することでアノキスを抑制している可能性が考えられた。次に、この酸化ストレスがどのような経路を介してアノキスを起こすのかを調べるため、アポトーシスの内因性経路と外因性経路の主要なカパーゼである 9 と 8 をそれぞれ KO して調べたところ、前者の KO (sgCaspase9) により完全にアノキスが抑制された。内因性経路はミトコンドリアを起点するアポトーシス経路であり、この結果は SUZ12 によって抑制される ROS がミトコンドリア由来である可能性を支持していた。

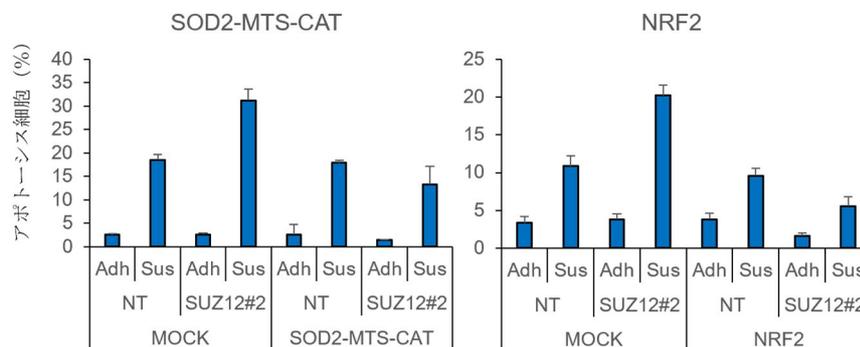


図4 抗酸化酵素および酸化ストレス応答転写因子のアノキスへの影響

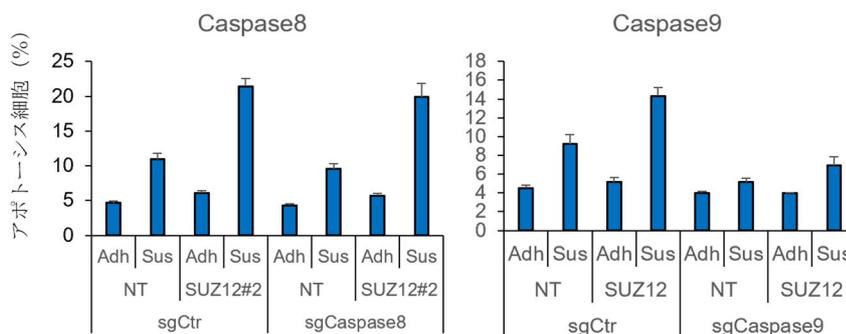


図5 アノキスに関わるアポトーシス経路の同定

(3) SUZ12 による酸化ストレス克服機構の解析

SUZ12 は核内で遺伝子発現を制御する転写制御因子であることから、アノキスを誘導する細胞内レドックス変化の原因を探るため、これまでに知られる ROS 産生系および消去系ならび NADPH 産生系の発現レベルの変化についてリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討を行った。しかしながら、いずれも SUZ12 の KD によって影響を受けなかった。この結果から SUZ12 による新規のレドックス制御機構が示唆されたことから、RNA シークエンスによって網羅的に接着喪失下で SUZ12 の発現によって影響を受ける遺伝子群の同定を試みた。その結果、66 の遺伝子が有意に同定された(図6)。

同定された遺伝子群には、ミトコンドリアや細胞死に関連した遺伝子が含まれていることが明らかになった。また、そのほとんどは、これまでSUZ12の標的遺伝子として知られていない新規のものであった。

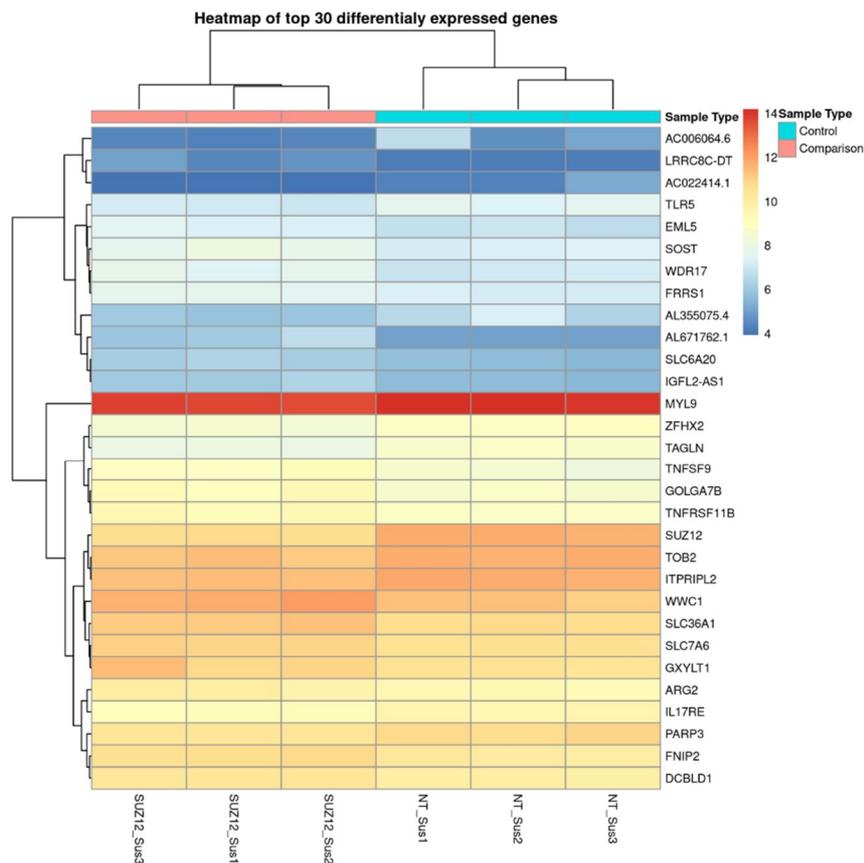


図6 SUZ12により接着喪失下で発現に影響を受ける遺伝子群（上位30）

以上の結果から、SUZ12は接着喪失により生じるミトコンドリアでのROSレベルの上昇を未知の標的遺伝子を制御することで抑制し、内因性アポトーシス経路の発動を抑制することでアノキスを抑制していることが示唆された（図7）。今後は、同定された遺伝子について、接着喪失にともなうミトコンドリアでのROSレベルの上昇ならびにアノキスへの関与を詳細に調べることにより、がん転移を抑制するための新たな分子標的の提示につなげていきたい。

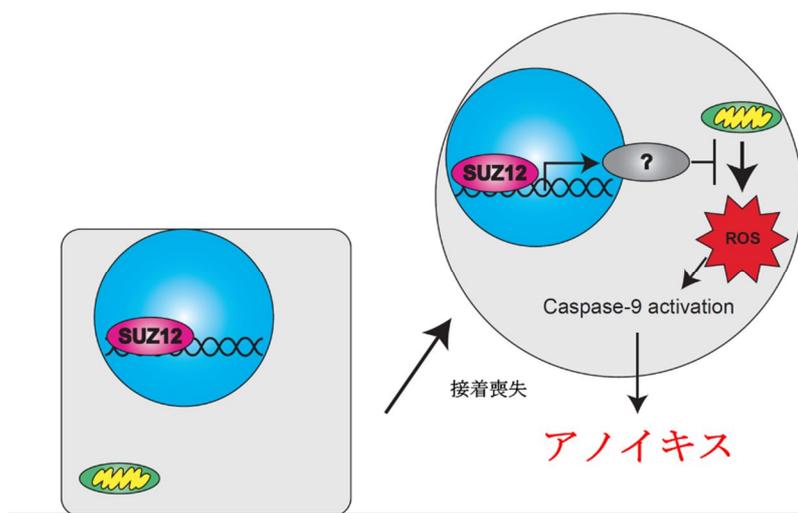


図7 SUZ12によるROS制御を介したアノキス制御モデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ishikawa F, Mori K, Shibamura M
2. 発表標題 Polycomb-group protein SUZ12 suppresses anoikis by alleviating oxidative stress in cancer cells
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（札幌）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川文博、森一憲、柴沼質子
2. 発表標題 ポリコム群タンパク質SUZ12は酸化ストレスを緩和することでアノイクスを抑制する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fumihito Ishikawa, Kazunori Mori and Motoko Shibamura
2. 発表標題 Polycomb group protein SUZ12 suppresses anoikis by alleviating oxidative stress in cancer cells
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	森 一憲 (Mori Kazunori) (60349040)	昭和大学・薬学部・准教授 (32622)	

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
---------	---------