

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07214

研究課題名（和文）IDH賦活化による癌悪性化抑制法開発のための基盤研究

研究課題名（英文）Development of anti-cancer strategy using IDH gene activation

研究代表者

神吉 けい太 (Kanki, Keita)

岡山理科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：10516876

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：癌細胞の脱分化による悪性化を防ぐため、細胞分化に重要と考えられるTCA回路酵素のひとつであるイソクエン酸脱水素酵素（IDH）の賦活化による癌進展抑制手法を検討した。本研究では、TGFシグナルやソニックヘッジホッグシグナル、HDAC活性化などの脱分化シグナルにより、IDH発現が遺伝子レベルで抑制されることを明らかにするとともに、IDH強制発現が癌細胞の悪性化要因の一つである低酸素応答の抑制に有効であることが示された。また3種類のIDHサブタイプにより癌抑制効果に違いがみられ、癌細胞における多様な働きが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では癌細胞の脱分化において発現低下するTCA回路代謝酵素の一つであるイソクエン酸脱水素酵素（IDH）に着目し、その発現賦活化により癌細胞悪性化を抑制する機構を明らかにすることを目的とした。IDHについては腫瘍学分野では癌促進作用のある変異型IDHについての研究が広く進められているが、それに比べ野生型IDHの癌細胞における働きについてはあまり知られていない。本研究で野生型IDHの低酸素応答抑制作用や、サブタイプによる違いを明らかにしたことは、IDH変異の報告のない癌種において共有される貴重な情報となる。

研究成果の概要（英文）：Anti-cancer strategy using isocitrate dehydrogenase (IDH) activation was investigated in hepatocellular carcinoma (HCC) cells. IDH expression in HCC cells paralleled with a differentiation status, being downregulated during dedifferentiation induced by TGF- signaling, Sonic hedgehog signaling and HDAC activation. Restoration of IDH expression was shown to play a role for inhibiting hypoxic response, a major cellular signaling for cancer progression, in HCC cells. Comparative study of three IDH-subtypes revealed that diverse function of these molecules in cancer cells

研究分野：腫瘍生物学

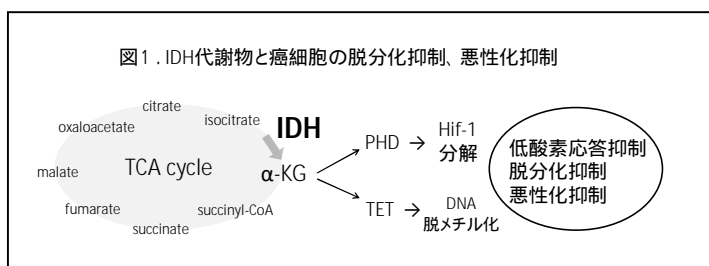
キーワード：肝細胞癌 IDH 脱分化 癌悪性化 低酸素応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌患者の予後改善のためには、抗腫瘍効果のみならず血管新生、浸潤、転移など悪性を抑止する技術が必要である。腫瘍内では低酸素環境が刺激となり、癌細胞のミトコンドリア機能が低下している。これにより癌細胞にとって有害な活性酸素種 ROS が減るとともに、幹細胞性 (stemness) の獲得や、癌悪性化の特徴の一つである上皮間葉系移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) と呼ばれる脱分化現象が引き起こされる。その結果、上皮系の癌細胞がより運動性の高い転移しやすい悪性形質を獲得する。したがって、癌細胞の脱分化を抑制する技術は浸潤・転移の抑制につながり、患者の予後改善に大きく寄与する。

研究代表者はこれまでの研究で、上皮系から脱分化し間葉系の性質を獲得した未分化型肝癌細胞において、ミトコンドリア TCA 回路酵素であるイソクエン酸脱水素酵素 (IDH) が顕著に発現低下していることを確認している。IDH の発現は他の TCA 回路酵素と比べ、低酸素環境における細胞分化に強く影響を与えと考えられる。その理由として、IDH の代謝産物である  $\alpha$  ケトグルタル酸 ( $\alpha$ -KG) が、細胞の低酸素応答シグナルやエピゲノム制御に関わる酵素の活性化に必要であることがあげられる。具体的には、 $\alpha$ -KG 存在下で低酸素応答因子 (Hif-1) の分解が促進され低酸素刺激による悪性化が抑制される、 $\alpha$ -KG 存在下で DNA 脱メチル化酵素 (TET) が活性化し、悪性化が抑制される、という2点である (図1)。したがって、癌悪性化の過程では、IDH の発現低下が癌細胞の脱分化促進に寄与している可能性が考えられる。しかし、これまでに IDH 発現低下が癌細胞の脱分化にどのような影響を与えるか、またどのような細胞内シグナルが IDH 発現低下に関わっているかは不明である。



### 2. 研究の目的

以上のような背景から、IDH は癌悪性化制御のための重要な標的分子と考えられる。そこで、以下の3つの課題について研究を進め、IDH 分子が癌悪性化抑制のための標的分子となりうるかについて検証した。

課題 肝癌細胞の脱分化における IDH サブタイプの発現変化

課題 IDH の発現低下はどのようなメカニズムで引き起こされるか？

課題 IDH の発現回復により脱分化抑制、悪性化抑制は可能か？

これらの課題を検証することで、IDH の発現を回復するような IDH 発現賦活化技術を確立し、新しい癌悪性化抑制技術に発展させることが期待できる。

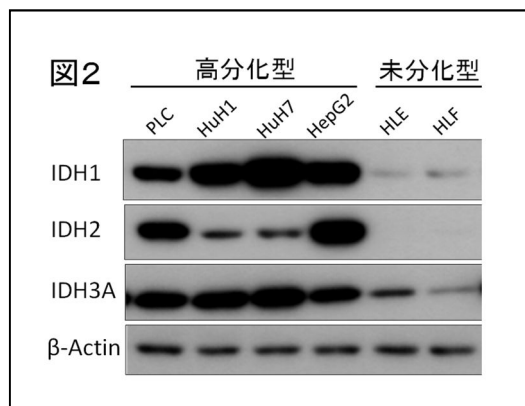
### 3. 研究の方法

課題 について、分化度の異なる複数の肝癌細胞株における IDH 遺伝子の発現レベルを比較し、分化度との相関を調べた。また、分化型株に対し脱分化誘導刺激を加えることで IDH 遺伝子の発現レベルがどのように変化するかについて検討した。課題 について、脱分化機構とかかわりの深い細胞内シグナルやエピジェネティック制御因子について、阻害剤を用いた実験をおこない、IDH 分子の発現回復および癌悪性形質や幹細胞性の減弱につながるかを検討した。課題

について未分化型株に対し IDH サブタイプ強制発現ユニットの安定導入を実施し、樹立した強制発現株について形質を比較するとともに、マウス腫瘍造成実験をおこなった。

### 4. 研究成果

課題 について、分化型肝癌細胞 (HepG2, HuH1, HuH7) に対し未分化型肝癌細胞 (HLE, HLF) では IDH1, IDH2, IDH3A の顕著な発現低下が認められた。また脱分化モデルとして TGF- $\beta$  誘導上皮間葉系移行 (EMT) における IDH の発現変化について調べた結果、EMT 誘導とともに各 IDH サブタイプの発現低下が認められた (図2)。これらの研究成果は第25回肝細胞研究会 (2018年7月 東京)、第77回日本癌学会学術総会 (2018年9月 大阪) で発表した。未分化型肝癌細胞および、TGF- $\beta$  により上皮間葉移行を起こした肝癌細胞においては、ヘッジホッグ (HH) シグナル経路の活性化を認めた。HH シグナル経路は細胞増殖、細胞運動性、細胞死抵抗性などの癌悪性形質を促進することが知られることか



ら IDH 発現制御に関わる機構のひとつと示唆された。

課題 について、HH シグナル阻害剤 (GANT-61) を用いた研究を行い、HH シグナル阻害が未分化型肝癌細胞において間葉系マーカー減少、上皮系マーカー上昇、IDH サブタイプ発現上昇、細胞増殖抑制、細胞運動性抑制に働くことを見出した。この研究成果は第 77 回日本癌学会学術総会 (2018 年 9 月 大阪)、第 26 回肝細胞研究会 (2019 年 5 月 横浜) で発表され、学術論文として International Journal of Molecular Sciences 誌に掲載された (Harada K et al., IJMS, 21, E3126, 2020)。また分化誘導剤として知られるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤が未分化細胞に IDH を強く発現誘導させることを見出した。これらの結果から IDH の発現制御に、HDAC によるエピジェネティックな転写制御が関与していることが示唆された。肝癌細胞における脱分化に関わる HDAC 分子に着目した研究を進め、その中で class II に属する HDAC9 が脱分化と幹細胞性に関わりが深いことを明らかにした。HDAC9 の阻害により足場非依存成長などの悪性形質の減弱効果が認められ、この成果は第 80 回日本癌学会学術総会 (2021 年 9 月 横浜) で発表され、学術論文として Cancers 誌に掲載された (Kanki K et al., Cancers, 12, 2734-2746, 2020)。

課題 について、未分化型株 HLF に対し IDH サブタイプ強制発現ユニットの安定導入を実施し、3 種類 (IDH1, IDH2, IDH3 $\alpha + \beta + \gamma$ ) の強制発現株を樹立できた。これらの細胞株を用い、代謝物である  $\alpha$  ケトグルタル酸 ( $\alpha$ KG) の細胞内濃度と低酸素応答シグナルを調べた結果、IDH1 強制発現株において顕著な低酸素応答抑制が認められた。この効果により VEGF や解糖系などの低酸素応答遺伝子の発現低下が起きており、低酸素による癌悪性を抑制する可能性が示唆された。一方、マウス腫瘍造成実験においては対照群において有意な腫瘍形成が認められず、この原因としては強制発現株樹立に用いた HLF 細胞は腫瘍造成能が低い可能性が文献的に示唆された。本実験では引き続き移植されたグラフト内の血管新生を血管内皮マーカーである CD31 を用いて解析することで、低酸素応答抑制効果を *in vivo* で示していく予定である。また予期していなかった結果として、IDH1 強制発現株においてのみ移植 3 か月後に腫瘍の生着を認めた。文献的に検索したところ、IDH1 による還元的カルボキシル化により腫瘍成長が促進される可能性が示唆された。この知見から IDH 賦活化による癌抑制効果においては、標的とする IDH サブタイプの選定が重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Keita Kanki, Ryota Watanabe, Le Nguyen Thai, Chun-Hao Zhao, Kyoko Naito	4. 巻 12
2. 論文標題 HDAC9 Is Preferentially Expressed in Dedifferentiated Hepatocellular Carcinoma Cells and Is Involved in an Anchorage-Independent Growth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2734-2746
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12102734	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Harada K, Ohashi R, Naito K, Kanki K	4. 巻 21
2. 論文標題 Hedgehog Signal Inhibitor GANT61 Inhibits the Malignant Behavior of Undifferentiated Hepatocellular Carcinoma Cells by Targeting Non-Canonical GLI Signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 E3126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21093126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 植村仁、神吉けい太
2. 発表標題 イソクエン酸脱水素酵素が肝細胞癌上皮間葉系移行に与える影響
3. 学会等名 第25回肝細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神吉けい太
2. 発表標題 イソクエン酸脱水素酵素発現がTGF 誘導肝癌細胞上皮間葉移行における細胞分化状態に与える影響
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神吉けい太、原田健資
2. 発表標題 肝癌細胞におけるヘッジホッグ経路阻害剤GANT-61の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第26回肝細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神吉けい太
2. 発表標題 未分化肝癌細胞におけるヘッジホッグ阻害剤GANT61の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神吉けい太
2. 発表標題 HDAC9 is preferentially expressed in dedifferentiated hepatocellular carcinoma cells and is involved in an anchorage-independent growth
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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