

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07235

研究課題名(和文) 遺伝的背景に依存して癌の進行を抑制する代謝機能を支える分子基盤

研究課題名(英文) Exploring a molecular mechanism governing the metabolism to repress cancer progression depending on genetic backgrounds

研究代表者

山本 一男 (YAMAMOTO, Kazuo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：70255123

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)：細胞の「大きさ」を調節する遺伝子として同定されたLargenは、低レベルながらほとんどの細胞で発現しているが、過剰発現させるとミトコンドリアを増やし、ATP産生を上げることで細胞サイズを調節している。ミトコンドリアの活性と癌との関連を調べるために、原因となる遺伝子変異が異なる2種類の白血病モデルマウスにLargenを過剰発現させたところ、延命効果に差が見られることが分かった。これら変異を持つ細胞では代謝活動やタンパク質合成に差が見られ、Largenの過剰発現による影響にも違いがあった。メタボローム解析の結果、Largenの過剰発現により特定の代謝経路が活発化していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記の研究成果から、白血病という病気が、最終的にT細胞の無秩序な増殖を理由とする病態であっても、その先駆けとなる遺伝子の変異が異なると、細胞内における代謝に対して異なる影響を及ぼし、異なる経緯で増殖に至っていることが分かる。従って、Largen過剰発現に感受性の高い代謝経路を特定し、それぞれの遺伝子変異による白血病モデルにおける代謝にどう関わっているかを明らかにすることで、これまでとは全く異なる観点からの治療薬・治療法の開発につながると期待される。さらに他の発癌モデルにも研究を適用することで、より一般的な疾病の克服に発展させることも考えられる。

研究成果の概要(英文)：A gene called Largen is ubiquitously expressed in most types of cells with low level, but increases cell size by modulating cellular mitochondrial content and ATP production upon over expression. To elucidate the relationships between mitochondrial activity and cancer onset/development, we investigated the effect of Largen-over expression in two different mouse models for leukemia caused by the distinct genetic disorders. The over expression of Largen extended the life span in one model mouse system, but had no effect on another one. The investigator found that the metabolic profiles and the rate of protein synthesis were altered in the cells derived from individual mouse models. The effect of Largen-over expression was also different in these models. A metabolome analysis revealed that particular metabolic pathways were activated by Largen-over expression.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞サイズ ミトコンドリア がん 代謝 タンパク質合成

## 1. 研究開始当初の背景

我々の身体は 30 兆を越える細胞から構成される。その形態は多様であるが、「大きさ」に着目してみると、分化した細胞集団は一定のサイズ分布を示すことが多い。一方で、細胞を取り巻く環境や刺激に応答して細胞は大きくなり、また元に戻る例も多数知られている。このような観点から近年、mTOR や Hippo などの情報伝達経路が細胞サイズの調節にも関与することが明らかになってきた (Gonzalez S & Rallis C, *Front. Cell Dev. Biol.* **5**:Article 61, 2017; Yu FX *et al.*, *Cell* **163**:811-828, 2015)。しかしながら細胞サイズを恒常的に維持する機構とその破綻がもたらす影響に関する積極的な考察は進んでいない。

本研究代表者は、この問題へのアプローチとして独自の遺伝子スクリーニングを実施し、多数の細胞サイズ調節候補遺伝子を同定した。そのうちのひとつで、過剰発現により実際に細胞を大きくすることから「Largen」と名付けた遺伝子が、ミトコンドリアの量と質を高めることにより細胞を大きくすることを示した (Yamamoto K *et al.*, *Mol. Cell* **53**:904-915, 2014)。

ミトコンドリアは、細胞のエネルギー産生工場として生命活動に必須である ATP や、生体における数々の重要な化学反応の基質や補酵素となる中間代謝産物を供給する。一方で、過剰な活動状況下においては活性酸素などの有害な物質を排出する。このためミトコンドリアの活性は、癌と深い関わりがあることが古くから指摘されている。以上に鑑み、Largen の過剰発現によってもたらされるミトコンドリアの質・量における活性化が癌に与える影響を調べる研究に着手した。

## 2. 研究の目的

癌抑制遺伝子である *Pten* や *p53* を T 細胞特異的に欠損させたマウスでは、ともに胸腺においてリンパ腫を形成して早期に死亡するが、Largen を過剰発現させると、*Pten* 欠損マウスではリンパ腫の縮小が見られる一方、*p53* 欠損マウスではそのような傾向が見出されなかった。この結果は、Largen の過剰発現で増強されるミトコンドリアの活性は、白血病発症の先駆けとなる遺伝的変異の背景が異なると影響が変わるということを示している。この差を生じる分子メカニズムを解明する目的で、上記白血病モデルマウスにおけるミトコンドリアの機能とタンパク質合成能等を徹底的に比較・検討し、それらがいかにして発症メカニズムの異なる癌の進展に影響を与えるのかを調べる。

## 3. 研究の方法

*Pten<sup>fl/fl</sup>* Lck-Cre マウスと *Pten<sup>fl/fl</sup>* Lck-Cre Largen-Tg マウス、および *p53<sup>fl/fl</sup>* Lck-Cre マウスと *p53<sup>fl/fl</sup>* Lck-Cre Largen-Tg マウスの 4 種類の遺伝的背景を持つマウスを安定に維持・供給し、遺伝子型ごとに生後 60 日、90 日、120 日、150 日目に解剖して胸腺・脾臓・リンパ節、および末梢血等を採取し、以下の解析を加える；

### (1) 細胞外フラックス測定によるエネルギー代謝プロファイリング

細胞の極近傍に化学センサーを配置し、局所的な酸素分圧と pH の変化を精密測定することにより好気呼吸と解糖系の効率をプロファイリングする。

### (2) メタボロミクス・リポドミクスによる代謝回路の解析

解糖系や呼吸鎖における中間産物の量を網羅的に調べて比較することにより、上記(1)の実験で調べた代謝経路の回転とバランスを解析し、各遺伝子型マウスに特徴的なパターン

が存在するかどうかを調べる。

### (3) SUnSET (Surface sensing of translation) 法によるタンパク質合成効率の評価

細胞レベルでのグローバルなタンパク質合成効率を調べるために SUnSET 法を行う。即ち、細胞をピューロマイシンに短時間暴露して伸長中のポリペプチドに取り込ませた後、抗ピューロマイシン抗体による全タンパク質のウェスタンブロットの定量化を行うことでタンパク質合成効率を測定する。

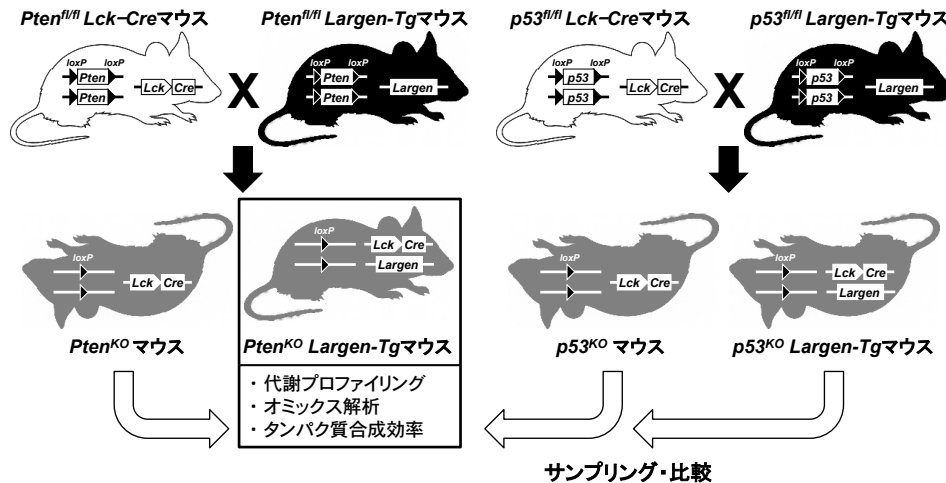


図1 研究の方法

#### 4. 研究成果

上記4種類の遺伝的背景を持つマウスを準備し、各遺伝子型のマウス群ごとについていくつかの個体を解剖し、胸腺・脾臓・リンパ節などを摘出した。生後60日では特に大きな差異は見られなかったが、生後90日では *Pten<sup>fl/fl</sup> Lck-Cre* マウスに比べて *Pten<sup>fl/fl</sup> Lck-Cre Largen-Tg* マウスの胸腺のサイズが縮小していた。 *p53* 変異を背景を持つマウスではこのような差は見られなかった。この組織から T 細胞を回収し SUnSET (Surface sensing of translation) 法による解析を行ったところ、Largen の強制発現によるタンパク質合成効率の変化が観察された。これらの差異が、異なる遺伝的背景を持つ白血病の発症と進行における Largen の作用の違いを説明することにつながることを期待される。さらにこの現象を細胞レベルで理解することを図るために、単離 T 細胞を用いた細胞外フラックス測定を行ったところ、これら遺伝的背景の異なる細胞では代謝プロフィールが異なることが分かった。

この違いを分子レベルで明らかにするために、メタボローム解析を行った。Largen を過剰発現する細胞と親株のコントロール細胞、およびそれらについてラパマイシンを作用させた4群について、中心エネルギー代謝に含まれる代謝産物を定量比較した。多くの物質で様々な変動が観察されたが、特定の代謝経路において特徴的な傾向を見出すことができた。その傾向は、別に行ったトランスクリプトーム解析において、Largen の過剰発現によって発現変動が見られた酵素の増減と相関するものであった。これら代謝経路とそれに関わる酵素群の変動から *Pten* 欠損と *p53* 欠損に由来するリンパ腫の動向の違いを説明できるものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Muta Kumiko, Nakazawa Yuka, Obata Yoko, Inoue Hiro, Torigoe Kenta, Nakazawa Masayuki, Abe Katsushige, Furusu Akira, Miyazaki Masanobu, Yamamoto Kazuo, Koji Takehiko, Nishino Tomoya	4. 巻 -
2. 論文標題 An inhibitor of Kruppel-like factor 5 suppresses peritoneal fibrosis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peritoneal Dialysis International: Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0896860820981322	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Haraguchi Masafumi, Miura Satoshi, Yamamoto Kazuo, Nakao Yasuhiko, Ichikawa Tatsuki, Kanda Yasuko, Sasaki Ryu, Fukushima Masanori, Akazawa Yuko, Miyaaki Hisamitsu, Nakao Kazuhiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Geranylgeranylacetone decreases the production of hepatitis B virus related antigen by comprehensive downregulation of mRNA transcription activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15394	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Torigoe Kenta, Obata Yoko, Torigoe Miki, Oka Satoru, Yamamoto Kazuo, Koji Takehiko, Ueda Hiroshi, Mukae Hiroshi, Nishino Tomoya	4. 巻 24
2. 論文標題 Hexapeptide derived from prothymosin alpha attenuates cisplatin-induced acute kidney injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 411~419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-019-01843-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Khan Khaleque N, Yamamoto Kazuo, Fujishita Akira, Muto Hideki, Koshiba Akemi, Kuroboshi Haruo, Saito Shigeru, Teramukai Satoshi, Nakashima Masahiro, Kitawaki Jo	4. 巻 104
2. 論文標題 Differential Levels of Regulatory T Cells and T-Helper-17 Cells in Women With Early and Advanced Endometriosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 4715~4729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jc.2019-00350	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 Khan Khaleque N, Yamamoto Kazuo, Fujishita Akira, Koshiba Akemi, Kuroboshi Haruo, Sakabayashi Satomi, Teramukai Satoshi, Nakashima Masahiro, Kitawaki Jo	4. 巻 38
2. 論文標題 Association between FOXP3+ regulatory T-cells and occurrence of peritoneal lesions in women with ovarian endometrioma and dermoid cysts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reproductive BioMedicine Online	6. 最初と最後の頁 857 ~ 869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rbmo.2019.01.011	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 Shimamura Mika, Yamamoto Kazuo, Kurashige Tomomi, Nagayama Yuji	4. 巻 370
2. 論文標題 Intracellular redox status controls spherogenicity, an in vitro cancer stem cell marker, in thyroid cancer cell lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 699 ~ 707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2018.07.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------