

令和 4 年 4 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07687

研究課題名(和文) ミトコンドリアDNAの動態制御による新規癌治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of Novel Cancer Therapy Strategies by Regulating Mitochondrial DNA Dynamics

研究代表者

田中 晃司 (Tanaka, Koji)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70621019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌の細胞株において、mtDNAコピー数を人工的に減少させる細胞株および膜電位を薬物的に低下させる実験を行い、mtDNAコピー数減少が膜電位の減少を介して、ミトコンドリアと核DNAでの相互作用が生じ、DNMT発現上昇を介し、EMT関連遺伝子の発現を誘導することを確認した。また、マウス皮下腫瘍モデルにて、DNMT阻害剤はEMTを抑制し、化学療法の抵抗性を改善し、治療効果が高まることを証明した。これらの結果から、mtDNAおよびDNMTは治療抵抗性を持つ食道癌細胞の治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮-間葉転換(EMT)は種々の癌腫において、転移や治療抵抗性に関連することが報告されている。しかしながら、EMTの誘導メカニズムおよびその制御法に関しては、未解明の部分がある。本研究成果は、これまで未解明であったEMT誘導の新しい機序を解明することに加え、EMTを抑制するためにmtDNAおよびDNMTが実際に治療標的として有望であることを示すことができた。本研究成果は癌腫を超えた応用が期待され、治療抵抗性を示す癌の治療成績向上に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Experiments were performed in esophageal squamous cell carcinoma cell lines in which mtDNA copy number was artificially reduced and membrane potential was pharmacologically decreased, and it was confirmed that mtDNA copy number reduction, via reduction of membrane potential, causes interaction at mitochondria and nuclear DNA and induces EMT-related gene expression via increased DNMT expression. We also demonstrated that DNMT inhibitors suppress EMT, improve chemotherapy resistance, and enhance therapeutic efficacy in a mouse subcutaneous tumor model. These results suggest that mtDNA and DNMT may be potential therapeutic targets for treatment-resistant esophageal cancer cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：ミトコンドリア 食道癌 メチル化

1. 研究開始当初の背景

消化器癌のなかで最も悪性度の高い癌の一つである食道癌の治療成績は、集学的治療の進歩により向上しつつある。しかしながら、化学療法・放射線療法に治療抵抗性を示す症例がいまだ多く存在しており、それらの治療成績は極めて不良である。さらなる治療成績向上のためには治療抵抗性のメカニズム解明が喫緊の課題である。癌細胞は、「EMT」を介して治療抵抗性や転移能を獲得していることが示唆されており (Mani SA *et al. Cell.* 2008) EMT の制御は治療抵抗性克服の重要な要素である。近年、様々なオルガネラに対する選択的なオートファジーの存在が明らかになってきた。我々は「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 (若手研究(B),17K16550)」にて、mtDNA コピー数と化学療法の関連性を検討してきた。In vitro では、食道癌細胞株に CDDP を暴露すると mtDNA コピー数が約 20%減少することを確認した。また、臨床検体の化学療法前後の食道癌の mtDNA コピー数を検討したところ、化学療法後に約 60%の mtDNA コピー数減少を認めた。すなわち、**化学療法後に残存する癌細胞の mtDNA コピー数は減少していることが分かった。**

2. 研究の目的

本研究は以下の項目を明らかにすることを目的とした。

- mtDNA コピー数変化および膜電位低下による EMT 誘導の検証
- mtDNA と核遺伝子の相互作用による EMT 誘導メカニズムの検討

3. 研究の方法

mtDNA コピー数減少および膜電位低下による EMT 誘導に関する検討：

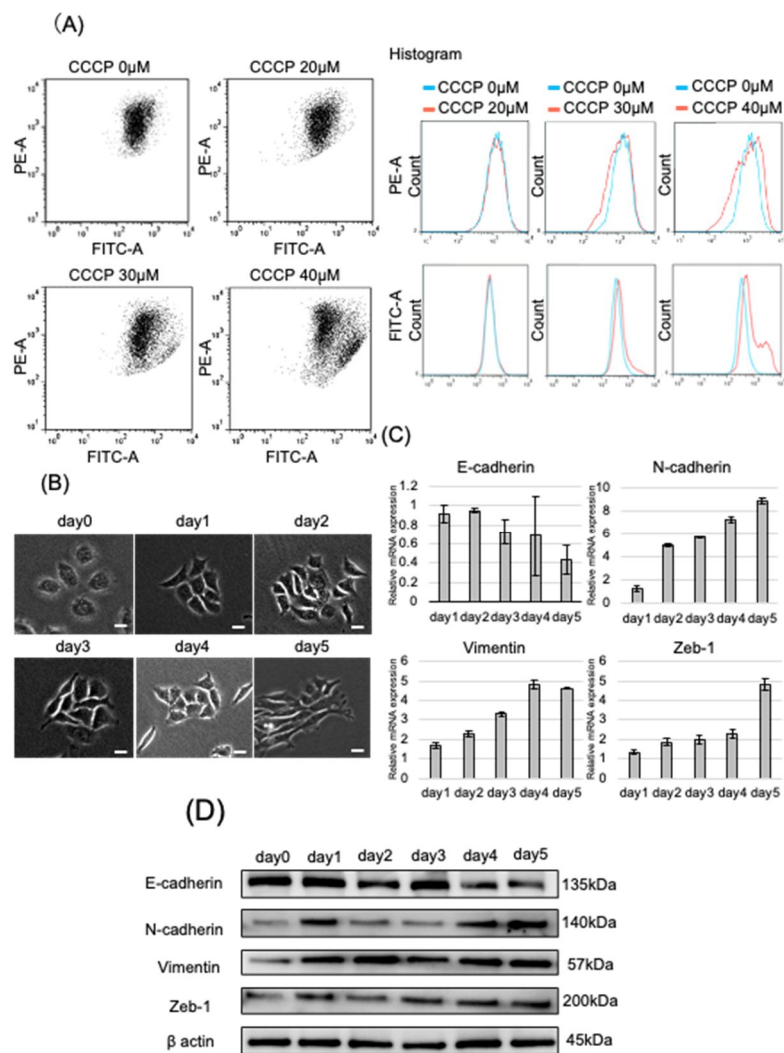
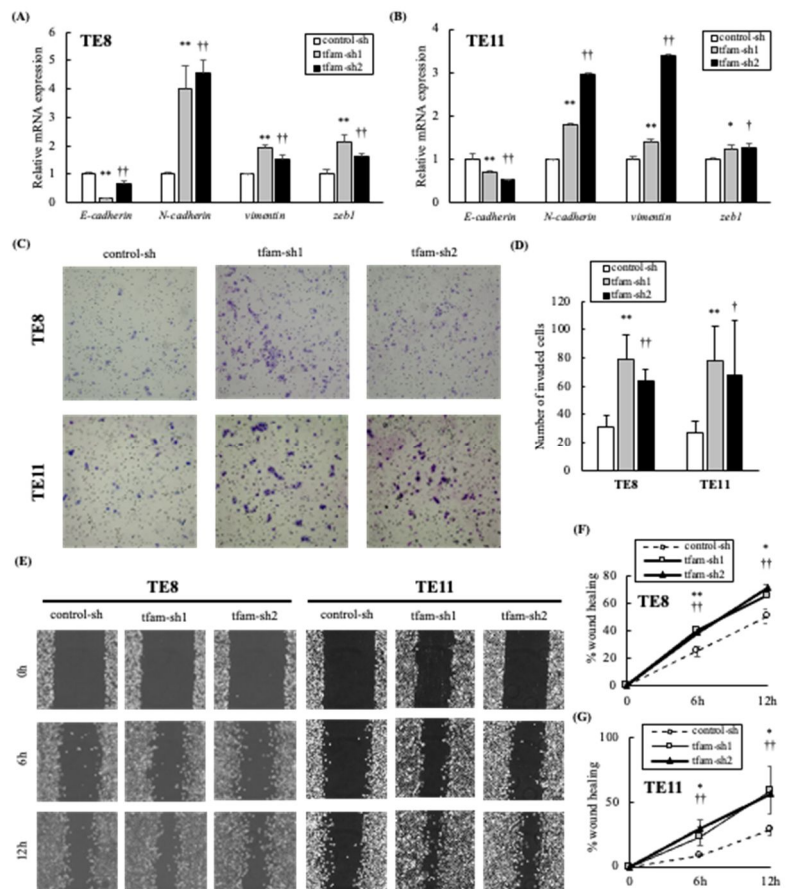
- 樹立した mtDNA コピー数低下細胞株 (shTFAM による) を用い、EMT 関連遺伝子の発現の確認 (qPCR, ウェスタンブロット)、遊走能・浸潤能解析 (wound healing assay, invasion assay)、治療抵抗性の検証 (apoptosis assay, viability assay) を行う。
- mtDNA と核遺伝子の相互作用による EMT 誘導メカニズムの検討
- mDNA と核遺伝子の相互作用として Retrograde signaling に着目し、ミトコンドリアの膜電位変化の挙動を検討する。
- mtDNA による核 DNA メチル化の検討を行う
- In vivo モデルにおける DNMT 阻害薬の治療効果に関する検討
皮下腫瘍マウスモデルにおいて、治療抵抗性を示す、樹立した耐性株に対する化学療法の治療効果を検討する。

4. 研究成果

mtDNA コピー数減少および膜電位低下による EMT 誘導に関する検討：

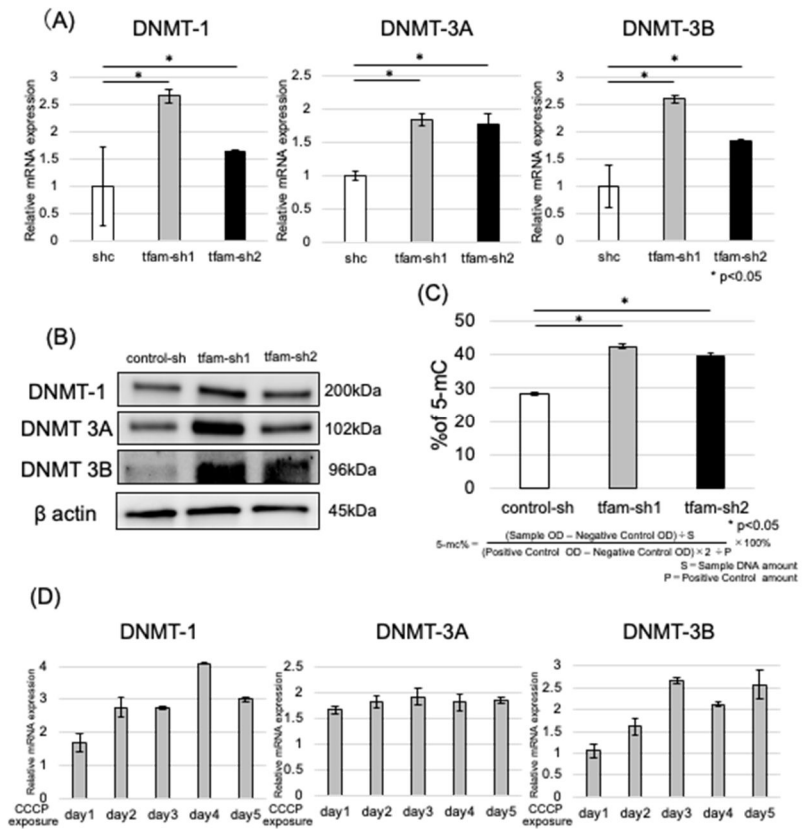
食道癌細胞株において TFAM ノックダウンによりミトコンドリア DNA コピー数を減少させると E-cadherin の発現減少および N-cadherin, Vimentin, ZEB1 の発現上昇を認めた (A) (B)。また、浸潤能を評価すると、ミトコンドリア DNA コピー数を減少させた細胞株 (sh-TFAM) では浸潤能の増加を認めた (C) (D)。遊走能を評価すると、ミトコンドリア DNA コピー数を減少させた細胞株 (sh-TFAM) では遊走能が上昇することが確認できた (E) (F) (G)。

次に、CCCP を用いて強制的にミトコンドリア膜電位を低下させることができた(A)。この条件下で、形態的に CCCP により食道癌細胞株は紡錘形に変形した細胞の割合が増加した(B)。CCCP 投与後に経時的にて E-cadherin および N-cadherin の発現を PCR および WB で評価したところ、E-cadherin の減少および N-Cadherin, Vimentin, ZEB1 が上昇していくことが確認できた(C)(D)。

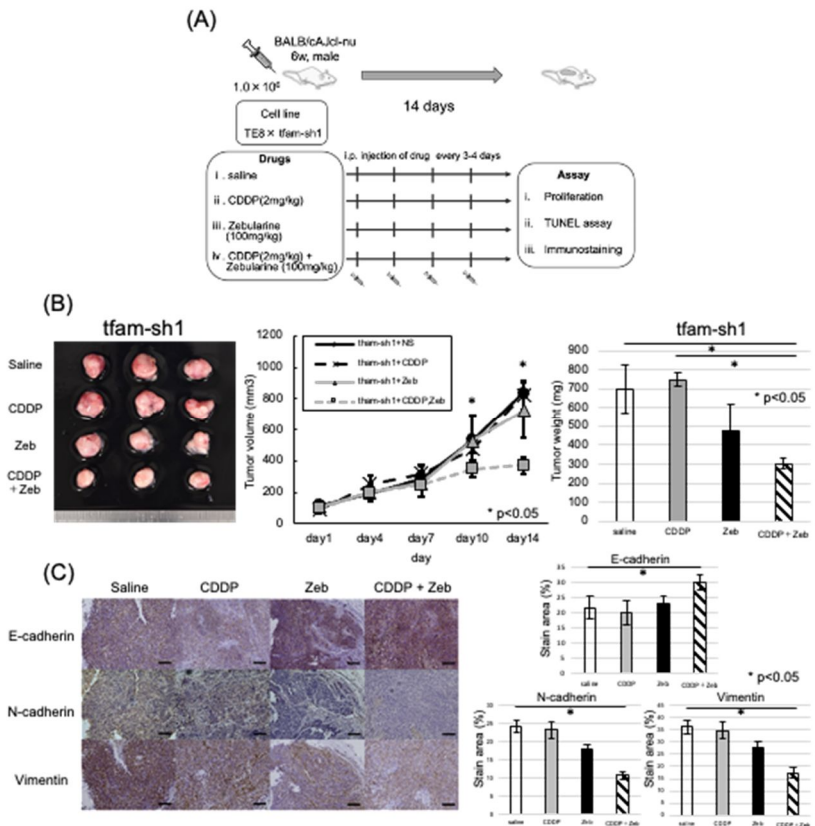


mtDNA と核遺伝子の相互作用による EMT 誘導メカニズムの検討

ミトコンドリア DNA コピー数を減少させた際の DNMT の発現を確認した。DNA のメチル化状態に関して確認を行ったところ、DNMT1, 3A, 3B とともに sh-TFAM 細胞株にて発現上昇していることを PCR および WB にて確認できた (A)(B)。つぎに実際に DNA におけるメチル化率を測定すると、sh-TFAM 細胞株にてメチル化の頻度が上昇していることが確認された (C)。次に、CCCP を用いて強制的にミトコンドリア膜電位を減少させると、DNMT の発現が上昇することが確認できた (D)



次に、sh-TFAM にてミトコンドリア DNA コピー数が減少し、治療抵抗性を示す食道癌細胞株を用いてマウス皮下腫瘍モデルを作成し、CCDP (化学療法) と zebularine (DNMT 阻害剤) の併用効果を検討した (A)。その結果、CCDP および zebularine の併用により著明な腫瘍縮小効果を認めた (B)。また、採取した腫瘍の免疫染色を行うと、zebularine により N-cadherin の発現は低下し、E-cadherin の発現は上昇しており、EMT が抑制され、上皮様の性質を獲得していることが示唆された (C)。



まとめ

これらの結果から、

mtDNA および DNMT は治療抵抗性を持つ食道癌細胞の治療標的となる可能性が示唆された。本研究成果は、これまで未解明であった EMT 誘導の新しい機序を解明することに加え、EMT を抑制するために mtDNA および DNMT が実際に治療標的として有望であることを示すことができた。本研究成果は癌腫を超えた応用が期待され、治療抵抗性を示す癌の治療

成績向上に貢献するものと期待している。今後はミトコンドリア DNA コピー数制御薬の開発に着手する計画である。

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 久保祐人、田中晃司、山下公太郎、西塔拓郎、牧野知紀、山本和義、高橋剛、黒川幸典、中島清一、江口英利、土岐祐一郎
2. 発表標題 食道癌細胞におけるミトコンドリア膜電位と上皮-間葉転換の関連
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中晃司、久保祐人、山下公太郎、牧野知紀、西塔拓郎、山本和義、高橋剛、黒川幸典、中島清一、江口英利、土岐祐一郎
2. 発表標題 食道扁平上皮癌におけるmtDNAコピー数変化に着目した上皮間葉転換誘導機構の解明
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久保祐人、田中晃司、山下公太郎、西塔拓郎、牧野知紀、山本和義、高橋剛、黒川幸典、中島清一、江口英利、土岐祐一郎
2. 発表標題 Association between mitochondrial membrane potential and epithelial-mesenchymal transition in Esophageal Cancer Cells
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
研究分担者	山田 萌 (Yamada Moyuru) (00781717)	大阪大学・医学部附属病院・医員 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	黒川 幸典 (Kurokawa Yukinori) (10470197)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	山崎 誠 (Makoto Yamasaki) (50444518)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	高橋 剛 (Takahashi Tsuyoshi) (50452389)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	
研究分担者	牧野 知紀 (Makino Tomoki) (80528620)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	松浦 記大 (Matsuura Norihiro) (90804477)	大阪大学・医学系研究科・招へい教員 (14401)	

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