

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23877

研究課題名(和文) 上皮間葉転換(EMT)に伴うOXPHOS活性亢進機序の解明

研究課題名(英文) The mechanism of enhanced OXPHOS after the EMT

研究代表者

半田 悠 (Handa, Haruka)

北海道大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：00844721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉転換(EMT)は、正常細胞では個体発生や傷の修復過程で起こる現象であるが、腫瘍細胞においては、治療抵抗性に通ずる様々な細胞内変化を引き起こし悪性度進展に関わる現象として知られている。本研究はまず、正常細胞EMTにおいてミトコンドリアの酸化的リン酸化レベルが亢進することを明らかにし、さらにその分子メカニズムとしてミトコンドリア外膜タンパク質の一種が関与していることを示唆するデータを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
癌の悪性度進展に上皮間葉転換が深くかかわることが知られている。本研究では、正常細胞における上皮間葉転換を利用し、ミトコンドリア内代謝における変化を見出し、さらにその分子メカニズムを明らかにする手がかりとしてミトコンドリア外膜タンパク質を同定した。今後、この分子の癌細胞EMTにおける意義を明らかにすることで、国民病といわれる癌に新たな治療法を提案しよう。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is well-known to be involved in cancer malignant progression that confers tumour cells resistance against various types of cancer treatments.

This study showed that the OXPHOS level was changed after normal EMT. A certain protein whose expression level was changed after EMT might be involved in the enhancement of OXPHOS.

研究分野：分子生物学

キーワード：上皮間葉転換 ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition:EMT)は、上皮細胞が一時的に間葉系細胞へと転換する現象であり、生理学的には個体発生の初期段階や傷の修復過程で見られるように秩序ある組織形成の一端を担う。EMTは時空間的に正しく制御される必要があるが、癌細胞ではこの制御機構が破綻しており、結果として薬剤や放射線抵抗性、転移再発能さらには免疫逃避能を獲得することが報告されている。癌的 EMT によって獲得されるこれらの形質が互いに連関しうる機構は、未だ明らかではない。癌細胞の EMT では、上皮及び間葉という二項関係だけではなく、部分的 EMT が見られる。また、形態学的に間葉系へと転換する EMT とは異なり、脱分化を経て間葉系細胞となる EMT も存在する。このような細胞が本来の記憶を「保ち続ける」、もしくは、「忘れる」メカニズムの多くは解明されていない。癌細胞が、本来正常細胞の持つ「制御された」プログラムを生存のために利用する例は多く知られており、癌的 EMT もその一つと考えられる。正常 EMT が細胞に付与する機能やその制御機構を深く理解することで、それが破綻した結果としての癌的 EMT を解析し得ると考えられる。正常 EMT においては、TGF や WNT による古典的な誘導メカニズムや新規シグナル経路による誘導機構が知られている。また、E-カドヘリンの抑制やアクチン線維などの細胞骨格制御が、EMT の特徴である「運動能」の獲得に寄与する。癌細胞は、ワールブルグ効果やグルタミンオリシスといった特有の代謝活動を行っており、近年では代謝経路を標的とした癌治療開発が行われている。癌細胞が EMT を起こす場合には、正常 EMT で見られた OXPHOS の亢進が見られないことを見出しているが、これが癌細胞による自発的かつ積極的な代謝リプログラムなのか、他因子による受動的で消極的な結果であるかは不明である。本研究の対象である mitoNEET は、二量体を形成するミトコンドリア外膜タンパク質で、鉄-硫黄中心を持ち OXPHOS 活性に関与するとされているが、詳細な機序は明らかではない。最近、mitoNEET がミトコンドリア間に存在しミトコンドリアの動態制御の一端を担うことや、mitoNEET が Parkin/PINK1 と協調し膵臓細胞の mitophagy に関与することが報告されている。しかしながら、EMT のようにダイナミックに細胞動態が変化する状況で、mitoNEET の発現制御機構や OXPHOS 活性の制御機構が明らかにされた例は無い。

## 2. 研究の目的

正常細胞 EMT における代謝フラックスを解析した例は存在するものの、エネルギー産生機構である OXPHOS 活性を解析した例は無い。本研究では **新たに見出した (i)正常細胞 EMT では OXPHOS 活性が亢進すること、(ii)正常細胞 EMT で mMT が減少することを基盤とし** EMT における OXPHOS 制御の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。また、EMT によって獲得された間葉系形質と、線維芽細胞のように *bona fide* (生来的) な間葉系形質とでは、OXPHOS 活性に違いがあることを見出している。このように、形態学的に類似であっても本質的には異なる分化状態にあることを示唆した例は少なく、代謝と分化制御に関する知識を深めることにつながる。mitoNEET は、ミトコンドリアの機能である OXPHOS とミトコンドリアの動態変化の両方に関わることが既存の報告から強く示唆され、このように機能と形態を統御するようなミトコンドリアタンパク質は他に知られていない(引用文献)。申請者は、mitoNEET が EMT シグナルによる遺伝子発現制御を受けることを見出しており、ミトコンドリアの機能や動態が EMT で制御されるメカニズム解明に有力な知見をもたらす。また、膵臓癌において mitoNEET の発現低下と生存率に負の相関があることから(悪性度が高い膵臓癌細胞株で mitoNEET 発現が低下することを確認している)、間葉形質を示す悪性癌において mitoNEET の発現低下が癌細胞の生存・増殖に寄与していると考えられ、mitoNEET による OXPHOS 活性制御を明らかにすることは、膵臓癌に代表される難治性癌の治療に貢献する可能性がある。

## 3. 研究の方法

### (1) EMT 誘導における遺伝子変化

TGF 刺激により上皮間葉転換を誘導できる正常マウス乳腺上皮細胞 NMuMG を用いた。EMT 誘導前後における mitoNEET のタンパク質量および mRNA 量を SDS-PAGE と qPCR 法を用いて測定した。また、公共 Database を用いて EMT 前後における遺伝子発現を確認した(引用文献)。同様に、ヒト腫瘍細胞で EMT 誘導が可能な肺腺癌上皮細胞 A549 や、上皮形質を持つ乳癌細胞 MCF7、間葉系形質を持つ乳癌細胞 MDA-MB-231 細胞を用いて mitoNEET のタンパク質量および mRNA 量を測定した。

### (2) 細胞株の樹立

mitoNEET 強制発現細胞を樹立するため、トランスポゾンベクターシステムを用いて NMuMG 細胞、A549 細胞へ mitoNEET 遺伝子をそれぞれ導入した(引用文献)。また、mitoNEET は Fe-S クラスターを保持するための特徴的なアミノ酸配列を持つが、その機

能活性部位を変異させた,変異型 mitoNEET 発現細胞も樹立した。mitoNEET 局在を確認するために, mitoNEET に HA タグを融合させた発現ベクターを構築し, その融合遺伝子を発現した細胞を樹立した。

- (3) O2K による OXPHOS 測定  
樹立した mitoNEET 強制発現細胞を用い, EMT 誘導前後において, O2K(OROBOROS 社) を使用して酸化的リン酸化(OXPHOS)を測定した。O2K では基質の量や酵素の阻害薬などを適切に組み合わせ測定を行った。
- (4) ミトコンドリア抽出と Blue-Native PAGE  
OXPHOS に関与する分子複合体として, ミトコンドリア呼吸鎖複合体(電子伝達系)が知られている。本研究では, EMT 誘導前後における構造変化を調べる目的で, ミトコンドリアを粗精製し, Blue-Native PAGE で展開することにより, 呼吸鎖複合体の複合度合いを評価した。
- (5) EMT 誘導による細胞機能の評価  
NMuMG, A549 mitoNEET 強制発現細胞を用いて, EMT 誘導前後の二次元運動能および浸潤能を Transwell Assay や Nikon A1R イメージングシステムを用いて解析した。また, 生細胞イメージングの際にミトコンドリアを染色することで, 運動時におけるミトコンドリア動態を測定した。

#### 4. 研究成果

上記(1)から(5)の方法にのっとり, 研究を進めた。EMT 前後に mitoNEET の発現が転写およびタンパク質レベルで変化することを確認し, さらに OXPHOS 活性が上昇することを見出した。ミトコンドリア形態と mitoNEET の関連については, 免疫染色による簡易的な評価を行ったが, ミトコンドリア形態評価に関する方法論の確立に時間を要し, 期間内に評価を確定することはできなかった。現在, mitoNEET のミトコンドリア機能及び形態に関して論文をまとめている。本研究結果は, 上皮間葉転換における mitoNEET 発現変動が, ミトコンドリア形態及び機能に影響を与えることを強く示唆している。

#### <引用文献>

Furihata T, Takada S, Kakutani N, Maekawa S, Tsuda M, Matsumoto J, Mizushima W, Fukushima A, Yokota T, Enzan N, Matsushima S, Handa H, Fumoto Y, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Tanaka S, Tsutsui H, Sabe H, Kinugawa S. Cardiac-specific loss of mitoNEET expression is linked with age-related heart failure., *Commun. Biol.*, 29;4(1):138, 2021.

Meyer-Schaller N, Cardner M, Diepenbruck M, Saxena M, Tiede S, Lüönd F, Ivanek R, Beerenwinkel N, Christofori G. A Hierarchical Regulatory Landscape during the Multiple Stages of EMT., *Dev Cell.*, 25;48(4), 2019, 539-553.

Onodera Y, Nam JM, Horikawa M, Shirato H, Sabe H. Arf6-driven cell invasion is intrinsically linked to TRAK1-mediated mitochondrial anterograde trafficking to avoid oxidative catastrophe., *Nat Commun.*, 11;9(1), 2018, 2682.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furihata T, Takada S, Kakutani N, Maekawa S, Tsuda M, Matsumoto J, Mizushima W, Fukushima A, Yokota T, Enzan N, Matsushima S, Handa H, Fumoto Y, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Tanaka S, Tsutsui H, Sabe H, Kinugawa S	4. 巻 4
2. 論文標題 Cardiac-specific loss of mitoNEET expression is linked with age-related heart failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01675-4	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
---------	---------