

令和 5 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08296

研究課題名(和文)オートファジーによる核蛋白を介したエピジェネティックなアミノ酸代謝調整機構の解明

研究課題名(英文)The relationship between autophagy-related nuclear matrix protein and epigenetic regulation of amino acid metabolism

研究代表者

渡辺 純夫 (Watanabe, Sumio)

順天堂大学・医学部・名誉教授

研究者番号：20138225

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)：肝癌細胞株においてオートファジー機能が亢進している細胞ではカテプシン発現が増加し増殖能が高かった。カテプシン発現が低下している細胞では脂肪滴が蓄積する傾向にあった。脂肪化肝細胞にカテプシンを誘導するとリポファジーやミトファジーが誘導され酸化ストレスが軽減した。ヒト化肝細胞ではカテプシン発現抑制によって代謝リプログラミングに関与する蛋白が不溶性核蛋白として蓄積した。以上のことから肝癌細胞において発現が変化するカテプシンは細胞増殖や脂質代謝の制御分子であり癌代謝リプログラミングに大きく寄与すると考えられた。カテプシンをターゲットとした新規検査法や抗癌治療の有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌は治療法の進歩に伴い治療成績は改善しつつあるが、死亡者数は24,839人(2020年)、5年生存率は35.8%であり予後が悪い疾患である。肝癌の悪性化の機序は不明な点が多いが、本研究により肝癌悪性化において重要な代謝リプログラミングにリソソーム内蛋白分解酵素カテプシン発現が関与している可能性が示唆された。カテプシンを標的とした新規腫瘍マーカーや抗癌治療法の開発は、肝癌患者の予後改善に結び付く可能性があり社会的に重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：In the hepatocarcinoma cell line, cells with enhanced autophagy function had increased cathepsin expression and high proliferative ability. Cells with low-cathepsin expression tended to accumulate lipid droplets. Inducing cathepsin in hepatocytes with steatosis induced lipophagy and mitophagy, reducing oxidative stress. In humanized hepatocytes, proteins involved in metabolic reprogramming accumulated as insoluble nuclear proteins by suppressing cathepsin expression. These results suggest that cathepsin is a regulatory molecule of cell proliferation and lipid metabolism and contributes greatly to cancer metabolism reprogramming. The usefulness of new cathepsin-targeted testing methods and anticancer treatments was suggested.

研究分野：肝臓病学

キーワード：オートファジー リソソーム カテプシン 核マトリクス 代謝リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

細胞内代謝変化によって生じた代謝物が細胞の代謝リプログラミングを誘導し、その結果生じた代謝酵素やその関連遺伝子の大規模な発現変化が発癌や癌悪性化に寄与すると考えられている。実際に癌細胞においては、ケトグルタル酸産生酵素の遺伝子変異によって、ケトグルタル酸やセリン、グリシン、トリプトファンなどの合成が亢進し、オートファジー機能と密接に関与する蛋白である p53 や Nrf2 活性化を介して癌細胞の代謝リプログラミング維持に作用する。また **ATP 産生のためにオートファジーによる積極的な蛋白分解が誘導される癌組織と異なる代謝経路が活性化しオートファジー誘導が抑制されている癌腫が存在することからオートファジー機能は代謝リプログラミングの On-Off に密接に関与すると考えられた。**一方、癌細胞ではクロマチン凝集や核腫大、核膜肥厚などの病理学的所見が観察される。この変化は核分裂が盛んであることを意味するだけでなく、核蛋白不溶分画(核マトリクス)の変性を反映している。核マトリクスは核より DNA と可溶性蛋白を除去した際の難溶性残存物として発見された構造体で **DNA 複製・転写などの核内イベントを効率的に制御し行う場である。核マトリクス蛋白の変性、量的変化は細胞増殖や核内シグナル伝達に影響を与え発癌に寄与することが報告されている。**オートファジーは細胞内蛋白や小器官などの分解を主とする機構であるが核蛋白分解にも関与することが報告されており、実際にオートファジー機能抑制によって肝細胞の核マトリクスの発現が変化することを我々は発見した。特に栄養状態のセンシングに関与する mTOR と関連の強い 14-3-3 蛋白がオートファジー機能に関連する核マトリクスとして検出されたことはオートファジーによる核蛋白発現変化が栄養状態、アミノ酸感受性を制御している可能性を示唆している。以上のことから癌細胞における代謝リプログラミングにオートファジー機能を背景とした核蛋白の変化が関与している可能性があると考えられた。また **細胞が脱落した際に核マトリクス蛋白は細胞外に放出されることから、腫瘍化によって発現が増加する核マトリクス蛋白の同定は新規腫瘍マーカーとして有望視され、実際に臨床において膀胱癌診断などで利用され、保険適応となっている。**代謝リプログラミングに関連する核マトリクス蛋白の同定は代謝リプログラミングをターゲットとした新規腫瘍マーカーとして有望である可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、癌細胞における代謝リプログラミングにオートファジー機能異常が関係するという仮説を検証するとともに、代謝リプログラミングに関連する核マトリクス蛋白を同定することを目的としている。この目的を達成するために次の3つの目標を設定した。

- (1) 癌細胞における蛋白・脂質代謝変化とオートファジーとの関連性を解明する。
- (2) PPAR を介したリソソーム・オートファジー制御を試みるとともに脂質代謝・細胞内酸化ストレスへの影響を明らかにする。
- (3) 細胞内リプログラミングに関連する核マトリクス蛋白を同定する。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞における蛋白・脂質代謝変化とオートファジーとの関連性の解明。

GFP-LC3 プラスミドを導入した複数のヒト肝癌細胞株において低栄養環境下でのオートファジー誘導を蛍光顕微鏡観察によって評価した。さらに低栄養環境でオートファジーを誘導した後、Lysotracker-Red にてオートリソソームを染色した。その後、細胞を Lysotracker-Red を含まない富栄養培地にて30分培養しオートリソソームの消失率を評価した。以上の工程によりオートファジー誘導能や蛋白分解能が亢進している肝癌細胞株と低下している細胞株を選別した。オートファジー機能促進群と非促進群における細胞の増殖能を WST-1 Assay にて評価し、カテプシン B とカテプシン L の発現をウエスタンブロット法にて評価した。さらに LipidTOXTM 試薬にて細胞内脂肪滴発現を評価した。

(2) PPAR を介したリソソーム・オートファジー制御を試みるとともに脂質代謝・細胞内酸化ストレスへの影響を明らかにする。

肝癌腫瘍細胞に脂肪酸(パルミチン酸 400 μM)を添加した群と非添加群(コントロール)を作成し、これらの細胞において選択的 PPAR α アゴニスト添加群と非添加群を作成した。細胞障害を WST-1 アッセイにて評価し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内脂肪滴形成(LipidTOXTM 試薬)を評価した。GFP-LC3 プラスミド導入によってオートファジー小体を可視化し脂肪酸負荷後のオートファジー小体数を評価した。Mtpagy Dye と Lyso Dye(Dojindo)を用いて E64d + PepstatinA 添加後のミトコンドリア・オートファジーを観察した。JC-1 試薬を用いて脂肪酸負荷後のミトコンドリア障害を評価した。

(3) 細胞内リプログラミングに関連する核マトリクス蛋白を同定する。

ヒト化肝細胞にリソソーム蛋白分解酵素阻害薬 (E64d + Pepstatin A) を添加した群と非添加群を作成し 6 時間後のそれぞれの群より核蛋白を抽出し、可溶性分画と非可溶性分画に分離した。非可溶性核蛋白の LC-MS 解析を行い、リソソーム・カテプシンを抑制したときに発現が変化する核不溶性蛋白を同定する。これらの蛋白のデータマイニング解析を行い、アミノ酸代謝と関連性の高い蛋白を選別する。

4. 研究成果

(1) 癌細胞における蛋白・脂質代謝変化とオートファジーとの関連性の解明

GFP-LC3 プラスミドを導入した複数のヒト肝癌細胞株 (Huh 1、JHH 5、Huh7、JHH7 細胞株) のオートファジー誘導に関して評価したところ飢餓ストレスによって全ての細胞株においてオートファジーは誘導された。一方、低栄養環境で誘導されたオートリソソームを Lysotracker-Red にて染色した後に、Lysotracker-Red を含まない富栄養培地にて 30 分培養しオートリソソームの分解を評価したところ Huh7 と JHH7 細胞株では Huh 1 と JHH 5 細胞と比較し、オートリソソームの分解が遅延していることが分かった。また Huh 1 と JHH 5 細胞は Huh7 と JHH7 細胞と比較し細胞増殖能が有意に促進していた (図 1)。これらの細胞における蛋白分解酵素カテプシン D とカテプシン L 発現解析では Huh 1 と JHH 5 細胞は Huh7 と JHH7 細胞と比較しカテプシン D とカテプシン L の発現が増加していたのに対し、Huh7 と JHH7 細胞株では逆に抑制されていることが分かった (図 2)。次に富栄養培地にてこれらの細胞を培養した際の脂肪滴形成を LipidTOX™ 試薬を用いて染色し、共焦点顕微鏡にて観察したところ Huh7 と JHH7 細胞株では Huh 1 と JHH 5 細胞と比較し細胞内脂肪滴が多く観察された。以上のことから、リソソーム蛋白分解酵素発現が亢進している肝癌細胞株においては蛋白分解能が亢進しており、また細胞の増殖能が高いことがわかった。一方、リソソーム蛋白分解酵素発現が低下している肝癌細胞株では脂肪滴形成が促進していることがわかった。これらの結果はリソソームが細胞増殖、細胞内蛋白分解や脂質代謝を制御する重要な役割を担っていることを示唆していると考えられた。

図 1 培養3日後の細胞数の変化

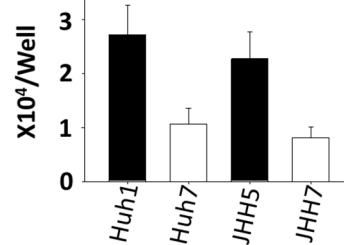
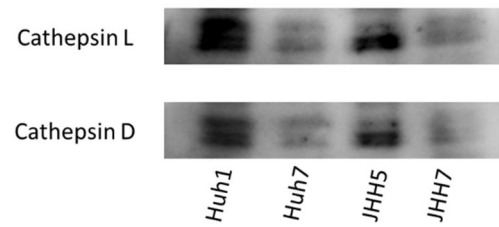
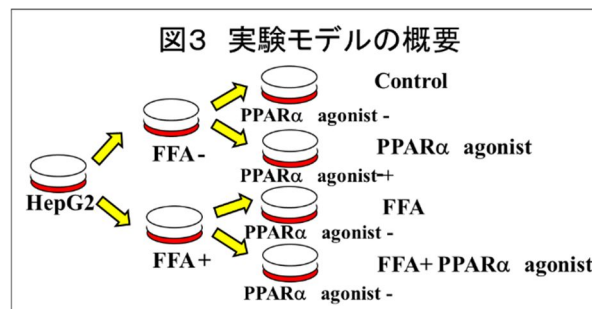


図 2 肝癌細胞株のカテプシン発現

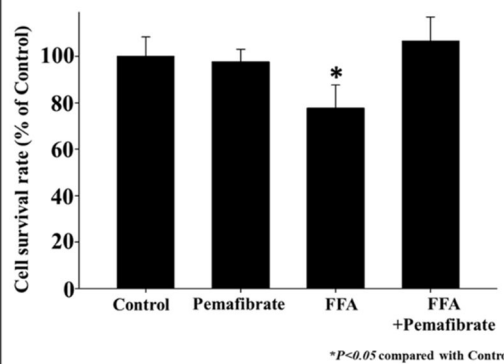


(2) PPAR を介したリソソーム・オートファジー制御と脂質代謝・細胞内酸化ストレス変化

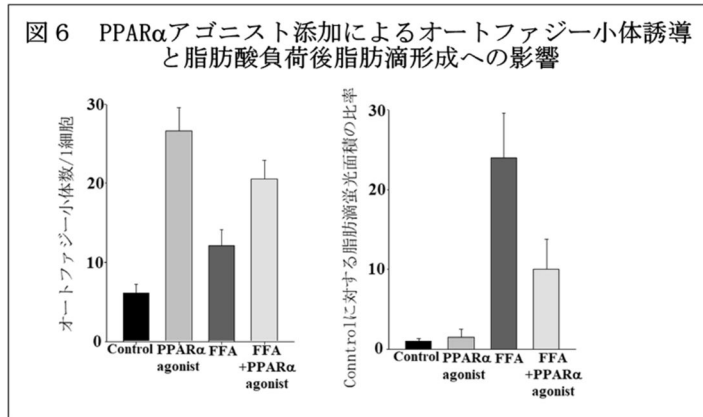
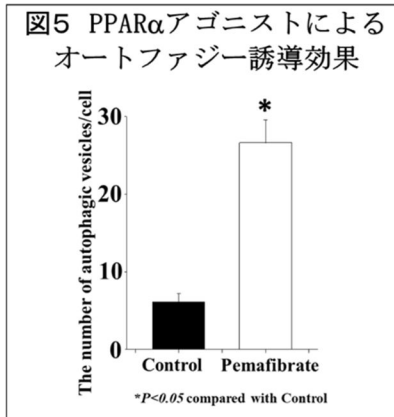


選択的 PPAR アゴニストが転写因子 TFEB 活性化を介してリソソームやカテプシン発現を誘導させる作用を有することが報告されている。そこで肝癌細胞株において選択的 PPAR アゴニスト添加によるカテプシン発現誘導が細胞内の脂質代謝や酸化ストレス誘導にどのように影響を与えるのかを評価した。HepG2 細胞株に脂肪酸を添加した群と非添加群を作成し、さらに選択的 PPAR

図 4 脂肪酸負荷後細胞障害に対する PPARα アゴニストの細胞死抑制作用



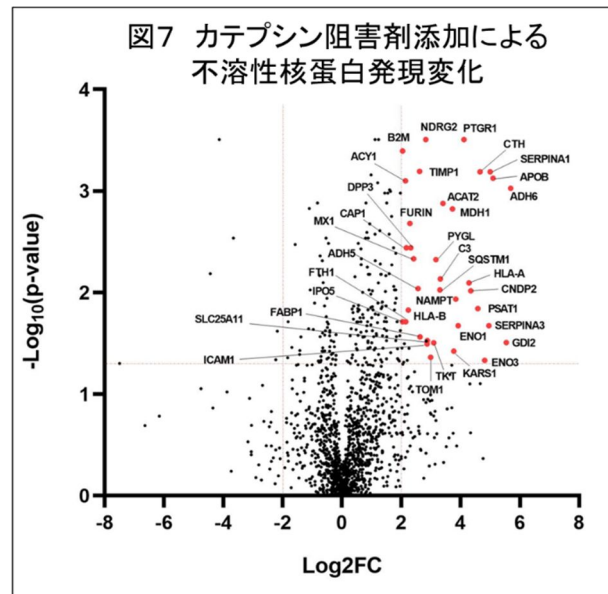
アゴニスト添加群と非添加群をそれぞれで作成し (図 3)、24 時間後の細胞生存率を評価したところ、脂肪酸添加群ではコントロールと比較し細胞の生存率が 77.6%であったのに対し、脂肪酸とペマフィブラートの同時添加群の細胞生存率は 106.4±10.6%であった (図 4)。GFP-LC3 プラスミドを導入した細胞株においてオートファジー小体数発現を共焦点顕微鏡観察にて評価した



ところ脂肪酸負荷後のオートファジー小体数はペマフィブラート添加によって約 4 倍に増加した(図5)。また脂肪酸添加 24 時間後の HepG2 細胞ではコントロール細胞と比較し細胞質内に脂肪滴が蓄積し、脂肪滴の約 13%が GFP 陽性のオートファジー小体と共局在していたが、脂肪酸とペマフィブラートの同時添加では脂肪滴の 74.7 \pm 8.0%がオートファジー小体と共局在していた。ペマフィブラートによって誘導されたオートファジー小体にはミトコンドリアが内包されており、脂肪酸添加により 85.0 \pm 3.2%の細胞において膜電位異常をきたしたミトコンドリアが観察されたが脂肪酸とペマフィブラートの同時添加群では 22.6 \pm 4.4%の細胞で観察された(図6)。以上のことから PPAR α アゴニストは、リソソーム・オートファジー誘導を惹起し、リポファジーやマイトファジー誘導を介して酸化ストレスを軽減し細胞保護的に作用することがわかった。これらの結果からもリソソーム蛋白分解酵素発現が細胞内の脂質代謝において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

(3) 細胞内リプログラミングに関連する核マトリクス蛋白の同定

蛋白分解酵素カテプシンの阻害剤をヒト化肝細胞に添加した群と非添加群を作成し、6 時間後に各群より不溶性核蛋白を抽出し LC-MS 解析を行った。Volcano plot 解析によってヒト化肝細胞におけるカテプシン機能に関連した核不溶性蛋白として抽出された蛋白は ADH6、GDI2、APOB、SERPINA1、SERPINA3、ENO3、CTH、PSAT1、CNDP2、HLA-A、PTGR1、ENO1、NAMPT、KARS1、MDH1、ACAT2、C3、SQSTM1、PYGL、TKT、TOM1、SLC25A11、ICAM1、C1S、NDRG2、FABP1、TIMP1、ADH5、MX1、DPP3、FURIN、APEH、HLA-B、SLC3A2、CAP1、FTH1、ACY1、GLOD4、APMAP、IPO5、B2M、RPS11 であった(図7)。これらのうち核内に局在する可能性があると考えられた蛋白はエノラーゼ 1(ENO1)、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ 1(PSAT1)、ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ(NAMPT)、C3、トランスケトラーゼ(TKT)、Isoform 2 of Glyoxalase domain-containing protein 4(GLOD4)、Importin-5(IPO-5)であった。エノラーゼ 1(ENO1)は解糖酵素、プラスミノゲン受容体および DNA 結合蛋白として機能し、癌発生過程において重要な役割を果たすことが報告されている。ENO1 は、10 種類以上のヒト癌において過剰発現することが見出されており、**癌代謝リプログラミングによって嫌気性代謝経路によるエネルギー産生を誘導する**。以上のことから ENO1 は新規癌治療ターゲットとしても注目されている。ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ 1(PSAT1)は細胞セリン合成に関与しており、細胞遊走能に寄与することが報告されている。ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ(NAMPT)は、核と細胞質の両方に位置し、**NAD 合成の律速段階を触媒する**。多くの癌で NAMPT 発現の増加が確認されており NAMPT の核内輸送は NAD 合成を増加させ細胞増殖を誘導する。C3 はヒストンタンパク質と相互作用しクロマチンリモデリングを介して DNA 転写を制御すると考えられている。**トランスケトラーゼ(TKT)は代謝リプログラミングに関連することが分かっている蛋白でペントースリン酸経路(PPP)に関連する重要な酵素であり、細胞増殖、細胞周期、遊走および生存率を促進させる**。興味深いことに TKT は HCC 細胞で強い核局在を示すことが最初に報告されており、TKT は発現だけでなく、その核局在も HCC 患者の予後に影響することがわかっている。**Isoform 2 of Glyoxalase domain-containing protein 4(GLOD4)は、細胞周期の調整蛋白として知られているが、ミトコンドリアの酵素解毒システムの一部で**



あるグリオキサラーゼ蛋白群の一つで、ミトコンドリア機能に関与していることが報告されている。 Importin-5 (IPO-5)は、細胞質から核への蛋白輸送に関わる蛋白で、シグナル伝達経路や細胞機能調節において重要な役割を果たしている。

以上のように今回検出されたカテプシン発現によって変化する不溶性核蛋白群は癌細胞において代謝リプログラミング誘導に密接に関与することが既に報告されている蛋白が多く含まれており、癌細胞の代謝リプログラミング誘導においてリソソーム内蛋白分解酵素であるカテプシンが主要な役割を果たしている可能性が示唆された。なお核不溶性蛋白は細胞障害時に血中に排出され、血液中で長期間安定して検出されることから、今回、検出されたカテプシン活性に関連する不溶性核蛋白は細胞内リプログラミングが生じている病態を評価するためのバイオマーカーとしても有望である可能性が示唆された。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Izumi Kousuke, Yamashina Shunhei, Fujimura Tsutomu, Watanabe Sumio, Ikejima Kenichi	4. 巻 298
2. 論文標題 Autophagic dysfunction in the liver enhances the expression of insoluble nuclear proteins 14-3-3 and importin 4	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 120491 ~ 120491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2022.120491	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shunhei Yamashina, Satoshi Sakuma, Toshifumi Sato, Hiroo Fukada, Hisafumi Yamagata, Akira Uchiyama, Reiko Yaginuma, Kyoko Fukuhara, Kazuyoshi Kon, Kenichi Ikejima
2. 発表標題 A selective PPAR modulator pemafibrate reduced palmitic acid-induced lipotoxicity via induction of autophagy.
3. 学会等名 The Asian Pacific Association for the Study of the Liver annual meeting 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山科俊平、今一義、池嶋健一
2. 発表標題 ペマフィブラートによるオートファジー誘導を介した脂肪酸添加後ミトコンドリア障害と細胞障害の抑制効果
3. 学会等名 第109回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2023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	山科 俊平 (Yamashina Shunhei) (30338412)	順天堂大学・医学部・先任准教授 (32620)	

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