

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09395

研究課題名(和文)ミトコンドリア機能に着目した膠芽腫におけるHDAC7の機能解析

研究課題名(英文) functional significance of HDAC7 expression in glioblastoma focusing on the mitochondria function

研究代表者

吉本 幸司 (Yoshimoto, Koji)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：70444784

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)：HDAC7は、核から細胞質に移行することで腫瘍細胞の悪性化に関与している可能性が考えられるが、これまでの一連の研究結果ではHDAC7は細胞質には局在するものの、ミトコンドリアには存在しないことが分かった。また、HDAC7と関連する蛋白を解析したところ、解糖系を制御する蛋白が同定できた。実際に、U251細胞を用いて、HDAC7を抑制した細胞では、glucoseの取り込みが低下することが確認できた。したがって、HDAC7は、細胞質での解糖系に関わる酵素をregulationすることによって腫瘍細胞の悪性化に関与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は依然難治性の疾患であり、有効な治療法が開発されていない。本研究成果は、HDAC7が細胞質の解糖系を制御することで、腫瘍の悪性化に関与していることを示唆するものである。近年は腫瘍細胞の代謝が治療標的として注目を浴びており、その機序としてHDACの関与が考えられるため、HDAC7を標的にすることで膠芽腫の新たな治療戦略の確立に結びつけられる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：HDAC7 plays an important role in acquisition of malignant feature of glioma, shuffling between nucleus and cytoplasm. We first speculate that HDAC7 localize in mitochondria, but the result is that HDAC7 does not localize in mitochondria, but in the other compartment of cytoplasm. Also, we have identified that HDAC7 binds with glycolysis pathway related proteins. Accordingly, we demonstrated that HDAC7 knockdown in U251 cell decrease the glucose intake. Therefore, our results suggest that HDAC7 functions in regulating glycolysis pathway in glioma cells and tissues.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：glioblastoma HDAC7 glycolysis

1. 研究開始当初の背景

生体内の遺伝子発現は、ヒストンの epigenetic な修飾により制御されている。その中でもヒストンのアセチル化は代表的なクロマチン修飾の一つである。ヒストンがアセチル化されると転写因子等が結合しやすくなり転写が促進される。逆に脱アセチル化されると転写が抑制される。これらの過程を制御するのがそれぞれ、ヒストンアセチル化酵素 (HAT: histone acetyltransferase) とヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC: histone deacetylase) である。HDAC は構造から class I, II, IV に分類され、サブタイプごとの機能が異なっている。申請者は、class II に分類される HDAC7 の発現が膠芽腫の悪性形質獲得に関与していることを見出し、研究を行ってきた。HDAC7 はヒストンのアセチル化を制御し、遺伝子発現の調節を行うのみならずシグナル伝達系に関与する非ヒストン蛋白であるさまざまな転写因子 (TF) の調節も行うことが知られているが、核移行シグナルを有するため核と細胞質の間を移動すると考えられている。したがって細胞内での局在により機能制御されていると考えられているが、細胞質での機能についてはほとんど分かっていない。

ミトコンドリアは細胞質に存在し、融合と分裂を繰り返すダイナミックなオルガネラである。従来は主にエネルギー産生を担うと考えられていたが、近年ではそれ以外にさまざまな生体シグナルを感知して、細胞の機能制御に重要な役割を果たすオルガネラであることが明らかになった。ヒストン修飾、転写調節などのシグナル伝達系の制御、細胞死や酸化ストレスに関連するシグナル伝達分子の放出等を通して多様な生物学的過程に関与している。

HDAC7 は HDAC のサブタイプの中でもミトコンドリアでの局在が示唆されている数少ない分子である (Sheikh Nature Review Genetics 2019)。我々はこれまでの研究で、膠芽腫細胞質内での HDAC7 とミトコンドリアの局在は一致している可能性を示す結果が得られた。そこでこれらの結果を踏まえ、本研究では、膠芽腫組織において HDAC7 がミトコンドリアの機能に及ぼす影響を解析し、HDAC7 が膠芽腫の悪性形質獲得に果たすメカニズムを明らかにすることを考え本計画を立案した。

2. 研究の目的

膠芽腫は集学的な治療を行っても依然完治が難しい疾患である。HDAC7 は、膠芽腫が悪性形質を獲得する上で重要な役割を果たしている可能性がある分子として我々が見出したヒストン脱アセチル化酵素である。前述したように、現在ではヒストン脱アセチル化以外の HDAC7 の機能も報告されているが、どのような機序で膠芽腫の悪性形質を獲得に関与しているのかは分かっていない。

一方でミトコンドリアの機能は、多様な生物学的過程に関わっており、細胞のエネルギー産生の観点からも重要な細胞内オルガネラである。最近では癌やさまざまな疾患で病態に関与していることが明らかにされ、ミトコンドリア機能の重要性が高まっている。しかしながら膠芽腫の病態に関して、代謝に関連付けた研究の報告は散見されるようになったが、ミトコンドリア機能に着目した研究はほとんどなされていないのが現状である。現在代謝疾患などでは、ミトコンドリア機能を標的にした薬剤も数多く存在する。したがって本研究成果により HDAC7 とミトコンドリア機能との関連が明らかになれば、HDAC7 に対する標的療法だけでなく、ミトコンドリア機能を制御する薬剤との併用療法による新たな治療法の確立が期待できる。

3. 研究の方法

(1) グリオーマ組織と細胞を用いた HDAC7 発現の細胞内局在の解析

手術摘出したグリオーマ検体を用いて免疫染色を行った。用いた検体は、low grade glioma と high grade である glioblastoma の腫瘍組織である。腫瘍細胞としては、U87, U251, LN229 以外に、独自に樹立したグリオーマ幹細胞様細胞 2 株 (KNS1435, KNS1451) に HDAC7 強発現させた細胞 (KNS1435-HDAC7 O/E, KNS1451-HDAC7 O/E) を用いた。また別のグリオーマ幹細胞様細胞 (MGG8, MGG65, MGG125) は HDAC7 の遺伝子発現レベルが比較的高い。そこでまずこれらの細胞を用いて HDAC7 の発現とミトコンドリアの局在が一致するかを蛍光免疫染色を用いて詳細に解析した。

(2) HDAC7 の細胞内局在を直接的に調べるために、KNS1451-HDAC7 O/E を用いて細胞成分分析の解析を行った。

(3) HDAC7 と結合する関連蛋白の同定

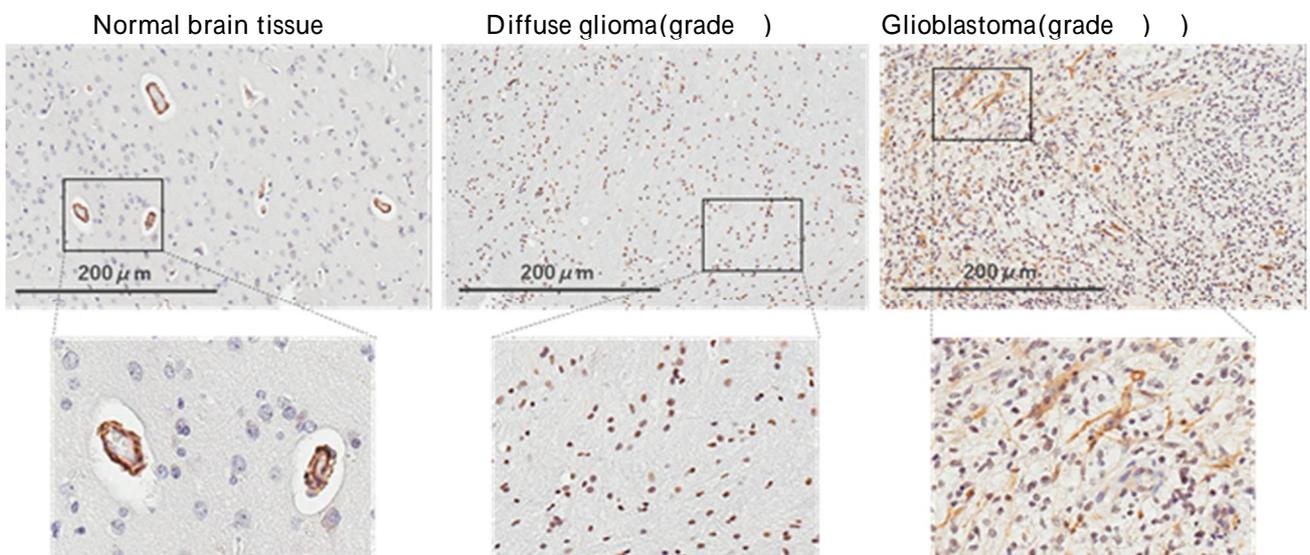
HDAC7 は他の分子と多量体を形成し、生物活性を及ぼすことが知られている。そこでミトコンドリアに局在する場合に、HDAC7 と多量体を形成する分子を同定することと目指す。具体的には HDAC7 を高発現するグリオーマ幹細胞様細胞を選択し、HDAC7 の特異抗体を用いて免疫沈降を行い、回収した蛋白を質量分析することによって結合している蛋白の同定を行った。

(4) HDAC7 を抑制することによる腫瘍細胞内への glucose 取り込みと glycolysis pathway の評価を行った。

4 . 研究成果

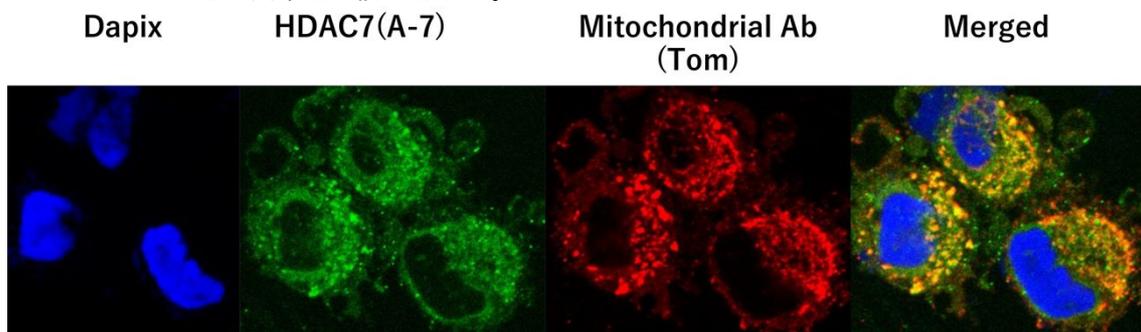
コントロールの正常脳表組織では血管内皮にHDAC7が局在していた。またグリオーマ40症例中、核のみに局在している組織、核と細胞質にも局在している組織が存在した(下記【図1】)。核のみに局在している組織はグレード 2 の脳腫瘍であるびまん性神経膠腫(Diffuse glioma)で、核と細胞質の両方に局在している組織はグレード 4 の特に予後不良の悪性度の高い膠芽腫(Glioblastoma)であった。これらの結果は、HDAC7 は腫瘍の悪性化に従って、核から細胞質に移動することで、膠芽腫の悪性形質獲得に関与していることを示す結果である。

(1) グリオーマ組織における HDAC7(KG-17)の発現 (免疫染色)



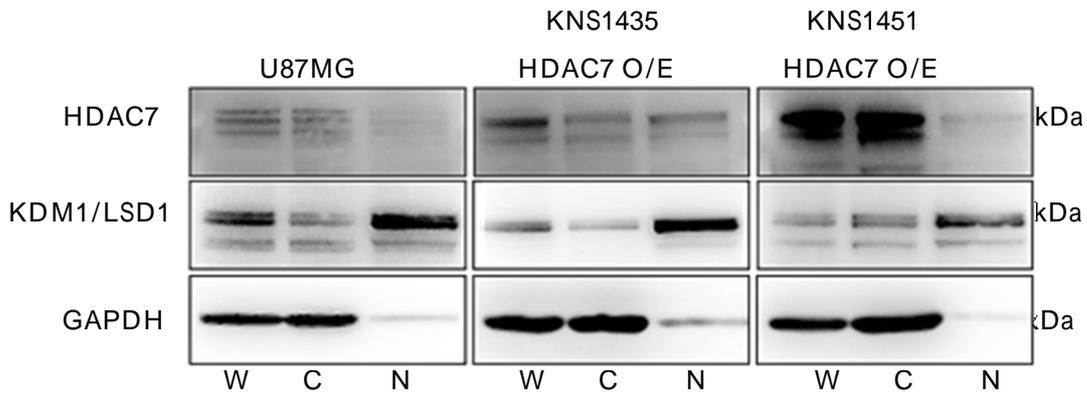
【図1】グリオーマ組織の HDAC7 抗体での免疫染色像

(2) グリオーマ幹細胞様細胞を用いた、HDAC7 とミトコンドリアマーカ-との共染色 HDAC7 の抗体とし、KG-17,A-7,NBP1 などのクローンを用いてミトコンドリアマーカ-との共染色を行った結果、クローン間で異なった結果が得られた。下記【図2】では、HDAC7 とミトコンドリアマーカ-との共染色が認められた。



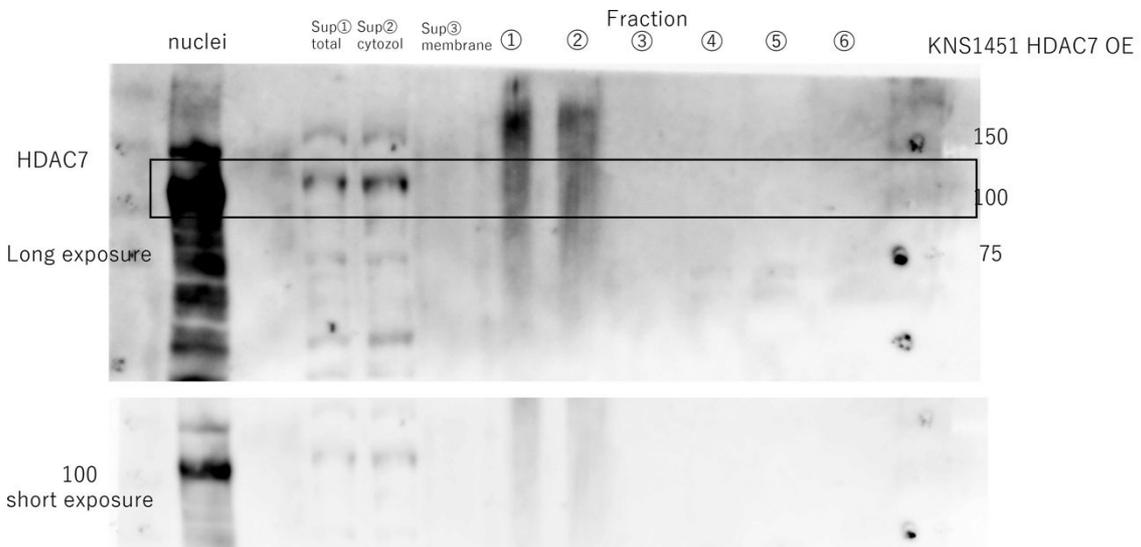
【図2】グリオーマ細胞の HDAC7 と Tom 蛍光免疫染色

(3) U87, KNS1435(HAC7 0/E), KNS1451(HAC7 0/E)を用いて細胞分画ごとの HDAC7 のウエスタンブロッティングを行ったところ、KNS1451(HAC7 0/E)では特に細胞質に局在していた【図3】。



【図3】全画分、細胞質画分、核画分のウェスタンブロット結果
全画分：Whole(W) 細胞質画分：Cytoplasm(C) 核画分：Nucleus(N)

(4) KNS1451(HAC7 O/E)を用いて、細胞質の fraction 解析を行ったところ、HDAC7 は細胞質には発現が認められるが、ミトコンドリア分画には発現が認められなかった【図4】。

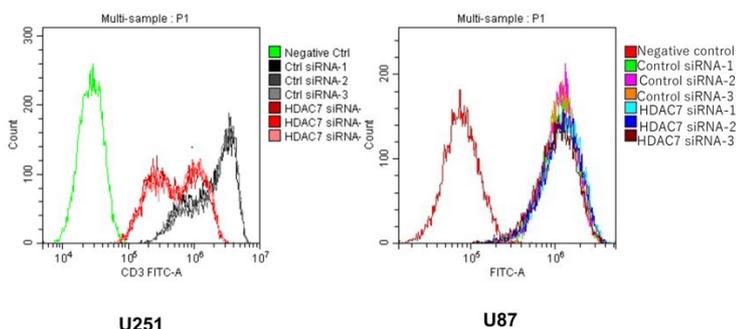


HDAC7は核に主に発現しているが細胞質にも発現あり、膜には発現なし

【図4】KNS1451(HAC7 O/E)における細胞質の fraction 解析

(5) KNS1451 HDAC7 O/E 細胞株の抽出タンパク質を使用して免疫沈降を行ったところ、HDAC7 に結合するタンパクとして、HK1, HK2, PKM, GLUT-1 などの glycolysis に関連するタンパクが同定された。

(6) U251 と U87 細胞で HDAC7 のノックダウンを行い、glucose(2-NBDG)の取り込みを解析したところ、U251 では glucose の取り込みが低下した。これらのことから HDAC7 は腫瘍細胞の glycolysis を制御している可能性が示された【図5】。



【図5】KNS1451(HAC7 O/E)における細胞質の fraction 解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	比嘉 那優大 (Higa Nayuta) (90792200)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員 (17701)	

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