

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570205

研究課題名（和文） ミトコンドリア依存性新規 TGF β シグナルによる細胞悪性化及び幹細胞形質誘導機構研究課題名（英文） A potential role of mitochondria-mediated signaling in induction of malignancy and stemness by TGF β

研究代表者

柴沼 質子 (SHIBANUMA MOTOKO)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：60245876

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリア呼吸鎖機能が低下すると、CREB 転写因子が活性化され、HMGA2 転写因子の誘導を経て、細胞形態、接着に関わる因子の発現が変化することがわかった。このことから、TGF β 刺激下でのミトコンドリア機能の低下が細胞の悪性化形質誘導に関与している可能性が示唆された。さらに、ヒトがん細胞株でも同じ経路が活性化されている例が見出され、ミトコンドリア機能不全が実際のヒトがんの悪性化に関与している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：cAMP-responsive element-binding protein (CREB) was found to be activated and cause morphological disruption of epithelial cells under mitochondrial dysfunction. Of note, activated CREB upregulated HMGA2, resulting in activation of epithelial-mesenchymal transition (EMT) program and modulation of integrin α 1 expression. Overall, the results suggest that mitochondrial dysfunction potentially mediates TGF β -induced malignancy and contributes to neoplastic transformation of epithelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア、CREB、HMGA2

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞（マウス乳腺細胞：NMuMG）は TGF β シグナルにより上皮-間充織転換 (EMT) を起こし、悪性化形質を獲得するが、そのシグナルの包括的理解は未だ十分ではない。我々は、TGF β シグナルに関して、細胞の悪性化誘導活性に焦点を当てて解析を行ってきた。その結果、新たに、ミトコンドリア電子伝達系の活性が低下して、細胞内、

及びミトコンドリア内のレドックス状態が変化し、それが二次シグナルとなって遺伝子発現が制御される経路を見出した。DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、TGF β 誘導性遺伝子のうち約 15% の誘導がこの経路の制御下にあることが示唆され、その中には、MMP(matrix metalloproteinase)9 を始め、上皮細胞の間葉系への形質転換 (EMT)、すなわち悪性転換を担う遺伝子（接着、運動、

浸潤関連)が多く含まれていた。ちなみに、この経路は TGF β の細胞増殖抑制作用には関与せず、細胞の悪性化形質の誘導に特異的な経路であることが示唆された。

2. 研究の目的

この新規 TGF β シグナルについて、先ず、ミトコンドリア活性低下から遺伝子発現制御に至るメカニズムの全容を分子レベルで明らかとし、さらにその分子機構と細胞悪性化形質(運動・浸潤能)及び幹細胞様形質誘導との関連を検討する。標的として CREB 転写複合体の機能に注目する。将来的には、解明した分子機構を遺伝子操作により人為的に制御して、個体レベルでがん転移抑制の可能性を探る。成果として幹細胞様形質を含め細胞悪性化誘導に特異的に寄与する TGF β シグナル分子を同定し、がんの悪性化を抑制する分子標的治療薬開発への貢献を目指す。

3. 研究の方法

マウス乳腺上皮細胞 NMuMG の呼吸鎖機能を以下の処理により不全にし、ミトコンドリア活性低下モデル細胞として用いた。用いた薬物は、呼吸鎖複合体の阻害剤(複合体 I、IIIの阻害剤である rotenone、antimycin A)、或いは、ethidium bromide (EtBr)である。EtBr は、低濃度でミトコンドリア DNA (mtDNA) の複製/転写を特異的に阻害し、呼吸鎖機能を低下させる。

遺伝子発現は、全 RNA を抽出し、real-time RT-PCR により、或いは DNA マイクロアレイにより、定量した。タンパク質の解析には、Western blot 法や細胞免疫染色法を用いた。

RNAi は、siRNA を Lipofection 法にて導入、または、shRNA をレンチウイルスベクターに組み込み、細胞に感染させて、行った。

その他、分子・細胞生物学的手法は定法に拠った。

4. 研究成果

(1) モデル細胞を用いた解析結果：呼吸鎖活性低下による上皮細胞形質の喪失とその制御機構：最初に、呼吸鎖機能を低下させた NMuMG 細胞の形態変化を観察したところ、時間を追って、細胞形態の扁平化と細胞間接着の乱れが観察された。細胞間接着構造の乱れは、ZO-1 や E-cadherin などの細胞間接着を担う分子の免疫染色の結果からも明らかであった。この変化は EtBr 処理だけでなく、呼吸鎖複合体阻害剤によっても直接的に誘導され、呼吸鎖活性の低下によるものであると考えられた。

次に、そのメカニズムに関する手掛かりを得るために、E-cadherin を中心とした一連の細胞間接着分子について、その量的変化を検討したが、細胞間接着分子の発現量には変化

は見られなかった。一方、細胞と細胞外基質との接着を担う分子、integrin について発現量を調べたところ、integrin $\alpha 1$ の発現が mRNA レベルで顕著に低下していることがわかった。また、以前の結果より、同条件下で、細胞外基質の分解に関わる matrix metalloproteinase (MMP) 分子種のうち、MMP-13 の発現が mRNA レベルで誘導されること、MMP-2、-9 が、タンパク質、或いは、活性レベルで制御され、呼吸鎖不全状態では、両者の基底膜分解活性 (gelatinase 活性) が上昇することもわかっている。以上のことから、上皮形態(細胞間接着構造)の乱れは、これらの integrin や MMP などの接着関連因子の変化により、細胞間接着分子機能が間接的に影響を受けて引き起こされた可能性が考えられた。

そこで、これら接着関連因子の発現や活性が変化するメカニズムについて検討を加えた。先に同定したミトコンドリアストレス制御因子、CHOP-10 (転写因子)、ならびに既にミトコンドリアストレス応答への寄与が知られていた CREB 転写因子について、その関与の有無を shRNA や低分子阻害剤を用いて調べた。その結果、MMP-13 の発現誘導は CHOP の下流で、一方、integrin $\alpha 1$ の発現抑制は CREB の下流で制御されていることがわかった。細胞間接着の乱れに関しては、CREB を阻害することにより抑制され、上皮形態が回復したことから、CREB の活性化が上皮形態の喪失に関わっていることが示唆された。さらにそのメカニズムについて検討したところ、活性化された CREB によって、EMT の誘導因子である HMGA2 が、タンパク質の安定化を介して誘導され、その結果、Snail 等の EMT 制御転写因子の発現が上昇して EMT 様の形態変化が引き起こされた可能性が示された。ちなみに、HMGA2 は、核内に存在する非ヒストンタンパク質であり、DNA 高次構造の変化等を介して Snail を含む標的遺伝子の転写を制御する。多様ながん組織で過剰発現が報告されており、がん遺伝子の一種と考えられる。

以上、マウスの呼吸鎖不全モデル細胞の解析結果からは、上皮形態喪失の誘因として CHOP による MMP-13 の誘導、或いは、CREB/HMGA2 経路による EMT 制御因子の誘導、integrin $\alpha 1$ の発現抑制の寄与が示唆された。

(2) ヒトがん細胞におけるミトコンドリアストレス応答機構活性化の可能性とその意義：

最近の報告によると、調べられた殆どのヒトがんで、mtDNA 上に変異が見つかる。(1)の結果に基づけば、それらのがんの中には、mtDNA 変異を背景として、モデル細胞のように CHOP-10 や CREB が活性化され

て悪性化形質が誘導された例が存在する可能性がある。

そこで、実際のヒトがん細胞株 10 種について、CHOP の発現量、ならびに CREB の活性化とその下流で発現が上昇する HMGA2 の発現量を調べたところ、肝がん細胞株 HepG2 において、CREB の活性化と HMGA2 の発現上昇が同時に生じていた。CHOP の発現は、1 株以外、検出できなかった。そこで、HepG2 での CREB と HMGA2 の関係について、さらに検討したところ、CREB の阻害により HMGA2 の発現が抑制されたことから、CREB/HMGA2 経路が活性化されていることがわかった。さらに、この経路上流で CREB の活性化に関わるキナーゼについて阻害剤を用いて検討したところ、calcium/calmodulin kinase であることがわかった。このキナーゼはミトコンドリアストレス下での CREB リン酸化の責任キナーゼであることが報告されており、このことから、HepG2 でも、おそらく呼吸鎖不全が生じており、それが背景となって、CREB/HMGA2 経路が活性化された可能性が示唆された。最近になって、HepG2 のミトコンドリア全 DNA 配列が決定され、実際に呼吸鎖機能が不全になる変異が生じていることが報告された。

CREB/HMGA2 経路のがん形質獲得における意義について、改めて HepG2 を用いて検討したところ、このがん細胞の場合、Snail やその他 EMT 制御因子の発現レベルは CREB/HMGA2 経路に依存しておらず、NMuMG のような正常細胞とは CREB/HMGA2 経路の意義が異なる可能性が示唆された。そこで、同じく CREB 経路の下流に位置することが示唆された integrin α 1 について調べたところ、この場合は、HepG2 でも CREB によって抑制的に制御されていることがわかった。integrin α 1 は collagen 特異的な細胞外基質受容体であるので、HepG2 の接着性の変化を検討したところ、CREB/HMGA2 経路を阻害することにより、collagen への接着性が特異的に上昇し、当該経路の細胞接着性制御における意義が示された。

(3)ミトコンドリア複製/転写因子ノックダウンによるがん形質の変化

以上は、呼吸鎖活性とがん形質について、正常からがん化への移行過程で呼吸鎖活性が低下した場合を想定した検討である。それとは別に、最終的ながん細胞において、呼吸鎖機能を人為的に操作し、低下させた場合、どのような形質の変化がもたらされるか、観察した。今回は、(2)の検討で、ミトコンドリアストレスシグナルの活性化が否定的であったがん細胞、乳がん細胞株 MDA-MB-231 を用い、ストレ

ス負荷の影響を観察することとした。操作した遺伝子は、ミトコンドリア特異的複製/転写制御因子 TFAM である。その結果、細胞の増殖速度が低下し、予想されたことではあるが、解糖系のみではがん細胞の増殖を維持出来ないことがわかった。但し、ATP 量に関しては、顕著な低下は認められず、増殖が抑制されたメカニズムの詳細は現在解析中である。興味深いことに、接着喪失に伴う細胞死である anoikis に対する抵抗性も低下し、浮遊状態での細胞死が促進された。そこで、マウスモデルにて造腫瘍能、転移能を調べたところ、両者とも劇的に抑制された。

(4) TGF β シグナルとミトコンドリア活性

NMuMG 細胞は、TGF β 刺激により、悪性転換 (EMT) を起こす有名な細胞である。そこで、NMuMG を TGF β で処理し、EMT 過程での呼吸鎖活性変化 (膜電位; $\Delta\Psi_m$)、ならびにそれに随伴すると考えられる変化 (活性酸素 (ROS) 産生、細胞質酸化還元状態 (GSH 量)) を観察した。その結果、EMT の誘導に伴って $\Delta\Psi_m$ が低下し、ミトコンドリア内 ROS 産生が低下する一方、細胞質の ROS は上昇し、結果、細胞内 GSH 量が低下 (細胞内酸化状態にシフト) することが観察された。そこで、これらの呼吸鎖活性低下にともなう変化のうち、ROS 産生、 $\Delta\Psi_m$ 低下について、TGF β シグナルにおける役割を同定することを試みた。

ROS については、酸化還元酵素チオレドキシンの発現系を用いた検討を加えた。 $\Delta\Psi_m$ については、EtBr や脱共役剤 CCCP 処理、さらには、脱共役タンパク質 UCP2 の遺伝子操作細胞を用いて検討した。なお、観察したのは、TGF β 誘導性の遺伝子発現について、これまでに呼吸鎖機能低下によりその発現が影響を受けることがわかっている代表的遺伝子、MMP-9、plasminogen activator inhibitor (PAI) -1、Fibronectin (FN) である。さらに、 $\Delta\Psi_m$ のシグナルを担う因子として protein kinase C (PKC) δ に注目し、検討した。

その結果、ROS の役割について、TGF β による MMP-9 と FN 誘導への関与が示唆された。 $\Delta\Psi_m$ の役割については、PAI-1 の発現を制御している可能性が示された。PKC δ についてであるが、先ず $\Delta\Psi_m$ と PKC δ の活性化との関係を検討したところ、 $\Delta\Psi_m$ の低下により PKC δ 活性化体が増加することがわかった。そこで、PKC δ の発現を遺伝子操作して調べたところ、PKC δ が PAI-1 の発現を抑制的に制御していることがわかった。結果として、 $\Delta\Psi_m$ の低下は PKC δ の活性化を促進して TGF β による PAI-1 の発現を抑制的に制御していることが考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

① Shibanuma, M., Mori, K., and Nose, K. HIC-5: A mobile molecular scaffold regulating the anchorage dependence of cell growth. *Int J. Cell Biol.*, in press.

② Shibanuma, M., Inoue, A., Ushida, K., Uchida, T., Ishikawa, F., Mori, K., and Nose, K. Importance of mitochondrial dysfunction in oxidative stress responses: A comparative study of gene expression profiles. *Free Radic. Res.*, 45: 672-680 (2011).

③ Ishikawa, F., Miyoshi, H., Nose, K., and Shibanuma, M. Transcriptional induction of MMP-10 by TGF- β , mediated by activation of MEF2A and down-regulation of class IIa HDACs. *Oncogene*, 29: 909-919 (2010).

④ 柴沼 質子: TGF- β による細胞内レドックス制御とミトコンドリア. 医学のあゆみ、234: 906-910 (2010).

⑤ Ishikawa, F., Akimoto, T., Yamamoto, H., Araki, Y., Yoshie, T., Mori, K., Hayashi, H., Nose, K., and Shibanuma, M. Gene expression profiling identifies a role for CHOP-10 during inhibition of the mitochondrial respiratory chain. *J. Biochem.*, 146:123-132 (2009).

⑥ Mori, K., Hirao, E., Toya, Y., Oshima, Y., Ishikawa, F., Nose, K., and Shibanuma, M. Competitive nuclear export of cyclin D1 and Hic-5 regulates anchorage-dependence of cell growth and survival. *Mol. Biol Cell.*, 20:218-232 (2009).

[学会発表] (計 14 件)

① Phenotypic disruption of mammary epithelial cells caused by mitochondrial dysfunction and the underlying mechanisms.

Shibanuma, M., Mori, K., Ishikawa, F. Keystone Symposia (Banff, Alberta, Canada) 2012 年 2 月 12~17 日

② Phenotypic disruption of mammary epithelial cells caused by mitochondrial dysfunction and the underlying mechanisms.

Shibanuma, M., Mori, K., Ishikawa, F. 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2011 年 12 月 13~16 日

③ ミトコンドリア機能不全による EMT プログラムの活性化と上皮形質の破綻

柴沼 質子, 森一憲, 石川 文博
第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋) 2011 年 10 月 3~5 日

④ Mitochondria-mediated signaling cascade plays a role in the regulation of gene expression by TGF- β

Shibanuma, M., Kaneko, E., Sugimoto, T., Wakamatsu, M., Mori, K., Ishikawa, F.
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (神戸) 2010 年 12 月 7~10 日

⑤ ミトコンドリア特異的転写因子 TFAM 発現抑制による腫瘍の転移能抑制の可能性

内田 徹, 石川 文博, 森一憲, 柴沼 質子
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (神戸) 2010 年 12 月 7~10 日

⑥ ミトコンドリア機能不全により誘導される上皮細胞形質の変化

石川 文博, 森一憲, 柴沼 質子
第 69 回日本癌学会学術総会 (大阪) 2010 年 9 月 22~24 日

⑦ ミトコンドリア由来 ROS による TGF β 遺伝子発現の抑制的制御機構の存在について

石川 文博, 金子 瑛美, 柴沼 質子
第 32 回 日本分子生物学会年会 (横浜) 2009 年 12 月 9~12 日

⑧ Transcriptional induction of MMP10 by TGF β mediated by MEF2 and class IIa HDACs.

Ishikawa, F., Kaneko, E., Yoshie, T., Nose, K., Shibanuma, M.
Keystone Symposia (Vancouver, British Columbia, Canada) Mar 17 (2009)

[その他]

ホームページ等

<http://www10.showa-u.ac.jp/~cancer/publication%202011.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴沼 質子 (SHIBANUMA MOTOKO)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号: 60245876

(2) 研究分担者

森 一憲 (MORI KAZUNORI)
昭和大学・薬学部・助教
研究者番号：60349040

石川 文博 (ISHIKAWA FUMIHIRO)
昭和大学・薬学部・助教
研究者番号：60515667