

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月10日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790378

研究課題名（和文）ミトコンドリア呼吸鎖活性に依存したアノイクス誘導機構とがん化による破綻

研究課題名（英文）Regulation of anoikis by mitochondrial activity and its ablation during oncogenesis

研究代表者

石川 文博（ISHIKAWA FUMIHIRO）

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：60515667

研究成果の概要（和文）：

本課題ではヒト乳腺上皮細胞(HMEC)でアノイクスに伴って起こる TFAM の下方制御機構および呼吸鎖活性の低下がアノイクスを誘導する機構に焦点を当てて解析を行った。その結果、脱接着により転写因子 ZNF143 がタンパク質レベルで発現が抑制されることで、TFAM 遺伝子の転写が低下する可能性を見出した。また、呼吸鎖活性の低下によるアノイクス制御因子として新たに TRAIL を同定し、脱接着により誘導された TRAIL が DR4 を介してアノイクスを誘導することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

A mechanism underlying repression of TFAM transcriptional activity during anchorage loss

Anchorage-independent growth and survival (AIG/S) are prerequisite for cancer cell metastasis. In normal epithelial cells, cell death so-called anoikis is induced under loss of anchorage. To get insights into the molecular mechanisms of anoikis and/or AIG/S, we focused on transcriptional regulation of mitochondrial transcription factor A (TFAM) in this study. The expression of TFAM is downregulated in response to anchorage loss in human mammary epithelial cells (HMEC) but not in metastatic breast cancer cells. Of note, sustained expression of TFAM was required for metastasis in human breast cancer cells. We first performed reporter assay using a TFAM upstream region to identify factors contributing to the downregulation of TFAM. We found that the upstream region containing well-conserved sequence called SBS mediated the downregulation, suggesting a role of zinc finger transcription factor ZNF143 that recognized SBS. Similar to TFAM, SKP2, another target gene of ZNF143, was also downregulated during anchorage loss, supporting a role of ZNF143 in the transcriptional response. Western blot and real-time RT-PCR analysis showed that the expression of ZNF143 was decreased at a protein level in response to anchorage loss. Taken together, these results suggest that TFAM was transcriptionally downregulated by ZNF143, which expression was reduced upon loss of anchorage.

Anoikis promoted by reduction of mitochondrial respiratory chain activity

We previously demonstrated that a transcription factor CHOP-10 was induced by mitochondrial dysfunction and mediated cell death. The finding prompted us to examine the involvement to CHOP-10 in the cellular responses to anchorage loss under which mitochondrial activity was decreased. However, we observed no induction of CHOP-10 under loss of anchorage. On the other hand, cDNA microarray analysis revealed that TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) was remarkably induced under the conditions. We confirmed the induction at mRNA and protein levels. Interestingly, when the expression of TRAIL and its receptor, DR4 but not DR5, was repressed by RNAi, cell death rate under anchorage loss was decreased. Collectively, these results suggest that TRAIL is upregulated during anchorage loss, leading to the activation of death signaling through DR4 and induction of anoikis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・病態医化学

キーワード： 癌、アノイクス、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

独自の DNA を持つミトコンドリアは、酸素を利用することで効率的なエネルギー産生を可能にしているオルガネラであり、真核生物の複雑な生命活動を支えている。しかし正常細胞とは対照的に、がん細胞は好氣的条件下でもエネルギー産生を主に嫌氣的解糖に依存しているとされており (Warburg 効果)、その原因としてミトコンドリア機能障害が考えられてきた。実際に、ほとんどのヒトのがんにおいてミトコンドリア DNA (mtDNA) に変異が見つかるという事実は、この仮説を強く支持している。しかし逆に、正常なミトコンドリア機能ががん化に必要である例や、その機能亢進が転移能と正の相関にある例など、一見相反する報告が存在しており、がん形質とミトコンドリア機能との関係については未だ不明な点が多く残されている。このような状況の下、最近、申請者らは呼吸鎖活性ががん細胞のアノイクス抵抗性 (転移能) の獲得に関与している可能性を見出した。

具体的には、

1) 正常上皮細胞 (乳腺) の場合、脱接着状態にするとアノイクスが誘導されるが、その際、ミトコンドリア特異的転写因子 TFAM の発現量 (mRNA、タンパク質) が顕著に減少した。この因子は mtDNA の複製/転写に関わっているため、その発現の低下は呼吸鎖複合体の形成不全を経て呼吸鎖活性の低下に至る。注目すべきことに、アノイクスが誘導されないがん細胞ではこの減少が見られなかった。このことから、正常上皮細胞では TFAM の減少により呼吸鎖活性が低下してアノイクスの誘導が可能となるが、がん細胞では TFAM の恒常的発現により脱接着状態でも呼吸鎖活性が維持されるため、アノイクスに抵抗性を示す可能性が考えられた。そこで、

2) 転移型乳がん細胞の TFAM を強制的にノックダウンし、アノイクスが誘導されないか検討したところ、予想通りアノイクス感受性が回復して細胞死が誘導され、結果、マウスモデル系で肺への転移がほぼ完全に抑制された。

以上の結果から、転移性がん細胞において TFAM 発現量を人為的に低下させることができれば、アノイクス感受性の回復により転移

が抑制的に制御できる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本課題では、第一に、がん細胞内で TFAM が恒常的に発現するようになる原因を明らかとするため、正常細胞で機能している TFAM の脱接着応答性転写抑制機構を分子レベルで解析し、がん細胞と比較検討する。成果として、がん細胞内の TFAM 転写活性を特異的に低下させる標的分子を同定し、がん転移の抑制のための人為的手段の開発を目指す。第二に、TFAM 発現低下とそれに続く呼吸鎖活性低下の結果、がん細胞にアノイクスが誘導できるようになる機構について、これまでに検討してきたミトコンドリアストレス転写因子 CHOP-10 の関与を中心に解析し、がん転移抑制のための新たな分子標的の提案を目指す。

3. 研究の方法

①ミトコンドリア特異的転写因子 TFAM 転写活性の脱接着応答機構について (正常とがん細胞の違い)

1) 正常細胞内で TFAM の転写が脱接着に応答する機構を明らかにするため、TFAM の発現制御に関わることが知られている既知の転写因子の関与について、RNAi を用いて検討する。それらの関与が認められなかった場合には、定法に従い、TFAM 遺伝子上流を用いたレポーターアッセイにより脱接着応答配列 (DRE) を同定し、その配列情報から結合が予想される転写因子の候補を得て、候補因子について、先と同様に RNAi の手法等により関与を検討する。配列情報から結合する転写因子が予測できない場合や、候補とした転写因子の関与が全て否定された場合には、応答配列をタンデムにつないだオリゴ DNA を用いてアフィニティー精製を行い、新規に結合タンパク質を質量分析装置を用いて同定する。その後、同定した因子に関して、先と同様に関与を検討する。関与が認められた場合、脱接着依存的な変化について DNA 結合能、転写活性をゲルシフトアッセイやクロマチン免疫沈降法、レポーターアッセイを用いて検討し、さらに因子自身のリン酸化やアセチル化など翻訳後修飾について解析し、機能変化と

の関連を調べる。明らかとなった機構について、がん細胞でも検討を行い、脱接着応答機構の破綻メカニズムを探る。

②呼吸鎖活性低下によるアノキス促進機構について（転写因子 CHOP-10 ならびに新規因子の同定）

正常上皮細胞に脱接着状態でみられる TFAM の発現抑制は、上述のように最終的に呼吸鎖機能の低下に至ると考えられる。我々は以前に、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の阻害剤である Antimycin A1 や Rotenone を正常乳腺上皮細胞に処理した際に、ストレス応答性転写因子 CHOP-10 が誘導され、細胞死誘導の一端を担っていることを報告した。従って、脱接着状態でも同様の機構が働いている可能性は十分に考えられる。そこで先ず、CHOP-10 の関与について、RNAi を用いて調べる。並行して、CHOP-10 の関与が否定された場合のために、呼吸鎖活性の下流でアノキス制御に関わる新規因子の同定を目指す。そのために、TFAM を遺伝子操作した細胞を用い、TFAM の発現レベルにより発現が変化する遺伝子群を cDNA マイクロアレイ法により網羅的に解析する。具体的には、正常細胞で脱接着状態に反応して発現が変化するもののうち、TFAM の強制発現で変化がみられなくなるものや、逆にがん細胞で TFAM をノックダウンした場合に、正常と同様の変化がみられるようになるものが候補として有力である。得られた遺伝子群について、アノキス誘導能を指標に siRNA によるスクリーニングを行い、関与因子を同定し、さらにその因子による細胞死制御機構について検討を加える。

4. 研究成果

①ミトコンドリア特異的転写因子 TFAM 転写活性の脱接着応答機構について（正常とがん細胞の違い）

まず正常細胞内で TFAM の転写が脱接着に反応して減少する機構を明らかにするために、これまで TFAM の発現制御に重要である事が示されている因子について、その関与を調べた。しかしながら、いずれも因子も TFAM 発現の脱接着への応答性に影響を与えなかった。そこで新たな制御因子の候補を同定するため、TFAM 遺伝子上流 2.2 kbp を用いてレポーターアッセイを行った結果、脱接着によりその転写活性が低下した。すなわち TFAM mRNA は転写レベルで減少する可能性が示唆された。次に TFAM 遺伝子上流に存在すると考えられる DRE を同定するため、いくつかの欠損変異体を作成した。その結果、DRE は上流 200bp 以内に存在する可能性が示唆された。そこで、その配列に結合し得る転写因子をデータベース検索した結果、TFAM 制御因子の候補として ZNF143/76 が同定された。その標的

遺伝子として知られる SKP2 も脱接着により mRNA が低下しており、ZNF143 による転写活性が低下していることが示唆された。そこで脱接着による ZNF143 の制御機構について検討を加えた結果、mRNA レベルではなくタンパク質レベルでの制御の可能性が示唆された。以上から、脱接着依存的な TFAM 転写活性制御は ZNF143 のタンパク質が減少することによって起因するという新たな可能性を得た。

②呼吸鎖活性低下によるアノキス促進機構について（転写因子 CHOP-10 ならびに新規因子の同定）

以前にミトコンドリア障害時に誘導され、細胞死に関与する転写因子として同定した CHOP-10 について検討を行ったが脱接着による誘導は確認できなかった。そこで、新たなミトコンドリア障害依存的なアノキス制御因子を同定するために、マイクロアレイ解析を行い、いくつかの候補遺伝子を同定した。その一つである TRAIL について脱接着による誘導を mRNA およびタンパク質レベルで確認した後、ノックダウンすることでアノキスへの関与を検討した。その結果、TRAIL のノックダウンによりアノキスが抑制される傾向が得られた。さらにその受容体について同様に検討を行った結果、DR4 のノックダウン特異的にアノキスが抑制された。従って、脱接着により誘導された TRAIL が DR4 を介してアノキスを誘導している可能性が示唆された。次に TRAIL の誘導機構について検討するために、TRAIL 上流 4kbp を用いてレポーターアッセイを行ったが脱接着への応答性は得られなかった。従って TRAIL は mRNA の安定性を変化させることで発現量を増加させていると考えられた。

以上の結果に加えて、メタボローム解析から、アノキスの誘導に伴い細胞内代謝物量のダイナミックな変化が生じていることが明らかになった。

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）

〔学会発表〕（計 2 件）

①磯崎 玄、杉山 祥子、関戸 匡恵、石川 文博、柴沼 質子、脱接着誘導性細胞死に伴う細胞内代謝系の変化とその意義、日本薬学会関東支部大会、2012 年 10 月 13 日～2012 年 10 月 13 日、昭和大学 旗の台キャンパス（東京）

②石川 文博、森 一憲、柴沼 質子、Impact of mitochondrial transcription/replication downregulation on cell growth/survival

and metastatic potential、日本癌学会、2012
年 09 月 19 日～2012 年 09 月 21 日、ホテルロ
イトン札幌（札幌）

〔その他〕

<http://www10.showa-u.ac.jp/~cancer/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 文博 (ISHIKAWA FUMIHIRO)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：60515667