

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460399

研究課題名(和文) がん細胞ミトコンドリアDNA変異の意義：DNA損傷応答によるHMGA2誘導

研究課題名(英文) Significance of mitochondrial DNA mutations in cancer cells: induction of HMGA2 in response to DNA damage

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞で頻繁にみつかるとミトコンドリアDNA変異(D-loop)と胎児性抗原HMGA2の発現・機能との関係について、肝細胞癌(HCC)を対象に検討した。D-loop領域の変異は、通常、ミトコンドリア機能の低下を引き起こし、その結果、細胞増殖の低下を引き起こす。そのような状況下でDNA損傷応答キナーゼATMによってHMGA2が誘導されていた。そして、誘導されたHMGA2は細胞老化を抑制し、増殖能維持に機能していた。すなわち、呼吸鎖活性低下による増殖能低下/細胞老化誘導の克服に働いていた。具体的には、ミトコンドリア呼吸鎖の低下により低下するE2F1転写制御ネットワークの活性を回復させていた。

研究成果の概要(英文)：In most human cancers, mutations have been identified in mitochondrial DNA (mtDNA). Interestingly, HMGA2, an oncofetal transcriptional regulator, was upregulated in mtDNA replication/transcription (mtR/T)-deficient conditions. mtR/T deficiency generally causes deterioration in cell growth. In this study, we report that HMGA2 operates to overcome such cell growth defects and promotes EMT. HMGA2 knockdown significantly decreased growth rate and colony forming ability in hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines with low mtR/T activities. In parallel, cell-cycle regulators such as cyclin E and E2F2 were downregulated, concomitantly with an increase in SA- β -galactosidase activity. Conversely, the hepatocyte nuclear factor HNF-4a, which suppresses EMT regulators such as SIP, was upregulated. Thus, a novel bifacial role of HMGA2 has emerged in overcoming growth deterioration or senescence induction and promoting EMT, suggesting HMGA2 as a therapeutically promising target for HCC.

研究分野：腫瘍細胞生物学

キーワード：ミトコンドリアDNA HMGA2

1. 研究開始当初の背景

がん細胞では一般に解糖系の亢進がみられ、ATPの産生に関して、好气的条件下であってもミトコンドリアに依存する割合が低い。発見者の Warburg は、その原因を“がん細胞のミトコンドリア呼吸鎖機能が不全であるから”と推測し、がん細胞でみつかる mtDNA の変異は、この説の裏付けとされた。しかし、現在ではこの“Warburg 効果”は増殖の盛んな細胞に共通の“代謝系のリプログラミング”の結果であり、mtDNA の変異やミトコンドリア機能の低下とは関係がないと考えられるに至っている。従って、がん細胞で見つかる mtDNA 変異について、現在、その意義は不明である。

しかし、mtDNA のうち、特に non-coding 領域の D-loop に生じた変異については、がん細胞にとってなんらかの点で有利に働くと考えざるを得ない。何故ならば、この領域は mtDNA の複製と転写を制御する領域であり、その変異は、通常、mtDNA のコピー数と転写の低下を招き、最終的にミトコンドリア機能の低下に至る。このような状況下では細胞の増殖は著しく抑制される。従って、D-loop 変異は細胞の増殖には不利なのである。しかし、その不利なはずの変異が多くのがんで維持されている。しかも細胞内の mtDNA コピーのうち殆どが同じ変異をもつ状態、すなわちホモプラスミーの状態にまでなっている。従って、上述のように結論付けざるを得ない。

以上のように、がん化への積極的関与が示唆される non-coding(D-loop)領域の変異であるが、これまでのところ、細胞の悪性化との関係は殆ど解析されていない。そこで、申請者は、D-loop 変異を念頭に、mtDNA の複製/転写を抑制してがん形質への影響を検討することとした。そして、本課題に先立って、mtDNA の複製/転写を抑制したモデル細胞を用いて、上皮細胞の形質変化を観察したところ、悪性化形質として〔上皮-間充織転換(EMT)〕様の変化が引き起こされるという注目すべき結果を得た(Cancer Sci.,103:1803(2012))。これは、mtDNA の複製/転写阻害が、悪性化形質誘導の積極的要因となることを強く示唆するものである。さらに、そのメカニズムに関して、転写調節因子 high mobility group A2(HMGA2)が誘導されることを見出した。実際のヒトがん細胞では、肝細胞がん細胞で、D-loop 変異に伴う mtDNA/RNA の減少とともに HMGA2 が転写レベルで誘導され、悪性化に寄与している可能性を見出した。HMGA2 はがん遺伝子として多様な carcinoma で過剰発現していることが知られている。しかし、HMGA2 の遺伝子自身には変異が見つからず、そのがんでの過剰発現のメカニズムは未解明である。申請者は、この多くのケースが、本課題で解析対象とする mtDNA/D-loop 変異に基づく機序によるのではないかと考えている。

2. 研究の目的

以上のような経緯、先行研究を経て、本研究では、「mtDNA の複製/転写抑制下で HMGA2 が誘導されるメカニズム」について解析する。その手掛かりとして DNA 傷害(二本鎖切断)応答 kinase(ATM:Ataxia Telangiectasia Mutated)の関与を見出した。そこで、活性化 ATM による HMGA2 の転写促進機構について調べる。

さらに、「HMGA2 の抗細胞老化機能」について解析する。HMGA2 は non-histone クロマチンタンパク質の一種で、転写調節機能があり、上皮-間充織転換(EMT)の促進に関わるとして注目されてきた。申請者は、新たに HMGA2 が、がん細胞の増殖能の維持/促進に働いている可能性を見出した。そこで、その詳細を解析する。

また、当該経路のがん悪性化/進展への関与について in vivo で評価するために、実際の肝細胞がん組織/細胞について、mtDNA コピー数と HMGA2 発現レベル、悪性度との関係性を調べる。

3. 研究の方法

(1)細胞：HCC 細胞株 7 種について、mtDNA/D-loop 変異の存在、mtDNA/RNA 量、HMGA2 発現レベルを調べた。D-loop 変異が確認された細胞株では、mtDNA の複製/転写の抑制に応じて、HMGA2 の発現が高かった。本課題では、これら HCC 細胞株セットを実際のヒトがん細胞の mtR/T 阻害細胞(HCC/mtR/T 阻害細胞)として用いる。

一方、mtR/T 阻害細胞のモデルとして、primary hepatocyte を用い、低濃度 EtBr 処理、もしくは遺伝子操作〔mtR/T 制御因子 TFAM の shRNA 導入〕により mtDNA の複製、転写を阻害した細胞を用いる。

(2)ATM 活性化の確認：活性化体(Ser1981 リン酸化)特異抗体を用いて Immunoblot により調べる。

(3)HMGA2 の新規機能(抗細胞老化機構)の解析：予備的結果から、HMGA2 が、がん細胞内で細胞老化誘導機構に対し抑制的に機能していることが考えられた。そこで、HMGA2 発現操作細胞を用いて、細胞数、コロニー形成率と老化指標として Senescence-associated β -galactosidase(SA- β gal)活性、さらに soft agar 中での足場非依存性増殖能や sphere 形成能への HMGA2 発現レベルの影響を評価する。sphere 形成能に影響があった場合は、がん幹細胞の増殖について、肝細胞がんの幹細胞マーカー CD133⁺を指標に flow cytometry により評価する。

(4)in vivo 肝細胞がん患者由来の市販の Total RNA と DNA のセットを購入し、mtDNA コピー数、HMGA2 mRNA 量を定量して相関関係を調べる。また、がんの悪性度との関係を調べる。

4. 研究成果

がん細胞で頻繁にみつかるミトコンドリア DNA

(mtDNA)変異(D-loop)と胎児性抗原 HMGA2 の発現・機能との関係について、肝細胞癌(HCC)を対象に検討した。D-loop 領域の変異は、通常、ミトコンドリア機能(呼吸鎖)の低下を引き起こし、その結果、細胞増殖の顕著な低下を引き起こす。しかし、肝細胞癌株の中には呼吸鎖活性が低いにも拘らず増殖能を維持している株があり、それら HCC 細胞株では HMGA2 が高発現していた。

(1)「HMGA2 誘導機構」について

最初に、HMGA2 の HCC 細胞株での発現上昇メカニズムに関して、各種阻害剤、siRNA を用いた検討した。その結果、DNA 損傷応答に働く PI3 キナーゼのメンバーである ATM ならびに ATR が関与することがわかった。さらに、HMGA2 の発現が mTOR シグナル系により抑制的に制御されていること、そして、ATM/ATR キナーゼが、この抑制的制御を解除して HMGA2 の発現誘導に働いていることを見出した。

(2)「HMGA2 の抗細胞老化機能」について

一方、HMGA2 の「抗細胞老化機能」について、RNAi の手法により細胞内の HMGA2 の発現量を低下させ、細胞増殖低下/老化誘導について観察した。その結果、注目すべきことに、癌細胞が老化様形態を示して増殖を停止させた。具体的には、コントロールに比較して、細胞数の減少、コロニー形成率の低下がみられ、逆に老化指標である SA- β gal 活性の上昇が観察された。すなわち、HMGA2 が細胞増殖能の維持に重要な機能を果たしており、その低下により癌細胞に細胞老化様の増殖停止が誘導されることが分かった。要するにこれらの結果は、HMGA2 が呼吸鎖活性低下による増殖能低下/細胞老化誘導の克服に働いていることを示唆している。この克服により、細胞は最終的に癌化できたと考えられる。さらに、その詳細として、ミトコンドリア呼吸鎖の低下により E2F1 による転写制御ネットワークが下方制御されること、そして HMGA2 がその転写能の維持に働くことにより、細胞増殖能の維持に働いていることが示唆された。実際の観察事実としては、HMGA2 の発現を低下させた細胞では、E2F1 転写ネットワーク機能が呼吸鎖低下状態同様に不全となった。

(3)「in vivo 癌組織に関する検討」

最後に、実際の生体内のがん組織でも細胞株同様にミトコンドリア呼吸鎖低下例で HMGA2 の発現が特異的にみられるか検討した。ちなみに HMGA2 は胎児性抗原であり、正常組織では殆ど発現していない。まず腫瘍とその周辺の正常部位のペア検体についてミトコンドリア転写量を比較したところ、58%のペアの腫瘍部位で転写量が低下しており、約 60%の腫瘍部位で HMGA2 の発現が検出された。そして、細胞株の場合と同様に、この HMGA2 発現とミトコンドリア転写量との間に有意な相関関係が存在した。

(4)「FOXM1 発現について」

本課題について解析中に、ミトコンドリア活性が低下しているにも拘らず、高い増殖能を示す

肝細胞癌株で、HMGA2 とともに G2/M 期転写制御因子 FOXM1 と MYBL2 (BMYB) が高発現していることを新たに見出した。FOXM1 について、RNAi により発現を低下させて調べたところ、HMGA2 同様に細胞増殖の低下と細胞老化の誘導が観察された。HMGA2 との関係について、それぞれ単独、或いは同時に発現を低下させて比較したところ、同時に操作したときにも単独と同程度の効果しか観察されず、HMGA2 と FOXM1 は細胞増殖に対して同じ機能を標的としていることが示唆された。この結果と一致して、FOXM1 のノックダウンにより、E2F1 による転写ネットワーク機能が低下した。

(5)癌細胞には、特定の遺伝子変異や染色体不安定性に起因する様々な異常が蓄積しており、細胞内には、そのような異常に由来する様々なストレスが引き起こされている。癌細胞が生存/増殖するためには、そのようなストレスに対応する必要がある。要するに、癌細胞の生存/増殖は、これまで注目されてきたがん遺伝子やがん抑制遺伝子経路だけでなく、ストレス対応を担う経路(stress support pathways) [Cell, 136: 823 (2009)] にも依存している。悪性腫瘍に対する治療戦略も、がん遺伝子産物を主な標的分子とする戦略だけでなく、次世代の戦略として、stress support pathways の遮断、もしくはストレスの過負荷による戦略が有望視される。核 DNA に比べて変異原により傷害を受けやすいミトコンドリア DNA は、多くの癌で変異しており、それによる細胞増殖能低下に対して、癌細胞は何らかの克服機構を獲得し、依存していると考えられる。本研究課題により、具体的に、HMGA2 や FOXM1 の過剰発現がその克服機構であることが明らかとなってきた。今後、最終的に治療戦略として提案できるように、さらに解析を継続させる予定である。

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 6 件)

K. Mori, T. Uchida, M. Fukumura, S. Tamiya, M. Higurashi, H. Sakai, F. Ishikawa and M. Shibamura

『Linkage of E2F1 transcriptional network and cell proliferation with respiratory chain activity in breast cancer cells』
Cancer Sci., 107: 963-971 (2016) 査読有
doi:10.1111/cas.12953

M. Shibamura, K. Mori and F. Ishikawa
『Intracellular redox and mitochondria regulation by transforming growth factor- β its implication in induction of epithelial-mesenchymal transition』
J.Cell.Signal. (2016) 査読有
doi:10.4172/JCS.1000106

戸谷衣都子、柴沼質子
『酸化ストレス介在性病変におけるミトコンドリア機能不全の重要性について』
昭和学術会雑誌 75 巻 p.147 査読有
http://lilitory.showa-u.ac.jp/?action=repository_uri&item_id=3940

F. Ishikawa, K. Ushida, K. Mori, and M. Shibamura

『Loss of anchorage primarily induces non-apoptotic cell death in a human mammary epithelial cell line under atypical focal adhesion kinase signaling』
Cell Death & Dis. Jan 22;6:e1619 (2015)
査読有
doi:10.1038/cddis.2014.583

〔学会発表〕(計 11 件)

日暮大渡、斉藤光次、河野葉子、石川文博、森一憲、青木武士、村上雅彦、瀧本雅文、柴沼質子

『肝細胞がんに対する新規治療戦略：ATM/ATR-HMGA2 経路の遮断による老化形質誘導の可能性』
第 75 回 日本癌学会学術総会
2016 年 10 月 6 日 横浜

柴沼質子、石川文博、森一憲

『ミトコンドリア活性はがん細胞の増殖に必須である(ミトコンドリア活性による新奇細胞周期制御機構』
第 74 回 日本癌学会学術総会
2015 年 10 月 10 日 名古屋

柴沼質子、石川文博、森一憲

『ミトコンドリア機能不全による HMGA2 誘導の意義：肝細胞がんの増殖能維持と EMT 誘導への関与』
第 73 回 日本癌学会学術総会
2014 年 9 月 26 日 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

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

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・講師
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