

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640082

研究課題名(和文)ミトコンドリア機能亢進マウスを用いた癌の進展における代謝の役割に関する研究

研究課題名(英文)Dissecting the roles of metabolism in the development of cancer by means of the mitochondrial hyperactive model mice

研究代表者

山本 一男 (YAMAMOTO, Kazuo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：70255123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌の進行における代謝の役割を調べるために白血病マウスとミトコンドリア機能亢進マウスを用いて解析した。その結果、生後160日までにリンパ腫で死亡するマウスが、ミトコンドリア機能の亢進により延命することが確認された。この鍵となる蛋白質は、核、ミトコンドリア、ゴルジ体、小胞体、ペルオキシソーム、エンドソーム、いずれの小器官とも異なる細胞質中で点状に存在した。またこの細胞の遺伝子発現分析から、いくつかの転写因子が支配的に働くことが判明した。さらにこの細胞で蛋白質合成が上昇していたことから生体における影響を調べたところ、ミトコンドリアの機能亢進により蛋白質合成率が上昇していることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：To investigate the roles of metabolism in cancer development, leukemia model mice and mitochondrial hyperactive transgenic mice were analyzed. Mitochondrial hyperactivation resulted in significant extension of the death caused by leukemia. The key protein responsible for this phenomenon was turned out to localize as dots in cytoplasm any other than mitochondria, the Golgi body, endoplasmic reticulum, peroxisome, nor endosome. Transcriptome analysis revealed that a few specific transcription factors governed the unique transcription profile in the cells overexpressing this protein. As the protein synthesis was upregulated in these cells, the effect induced by this protein was analyzed in vivo. The result suggested that the rate of protein synthesis was raised by mitochondrial hyperactivation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア トランスジェニックマウス 白血病 リンパ腫 代謝

1. 研究開始当初の背景

近年、「代謝～メタボリズム」が生命科学の様々な分野におけるキーワードとして取り上げられるにつれ、ミトコンドリアへの注目が高まっている。それは即ちミトコンドリアが、酸化的リン酸化を通じて細胞におけるエネルギー供給源となる ATP の大半を産生する器官であるのみならず、リン脂質やヘム、ステロイドなどの合成や細胞内カルシウム濃度の調整など多岐にわたる代謝機構に関わっているからである。その機能や構造の破綻は、細胞死や炎症反応を惹起させることも知られている。さらに最近では、活発な ATP 産生の結果生じる活性酸素が、DNA やタンパク質を傷害することにより癌化や老化を促進するとのデータがある一方、同じ作用が外部からの病原体に抵抗するための武器としても働くという例も挙げられている。これらの証拠は、癌や代謝疾患、免疫不全などの現代病に、生体内におけるミトコンドリアの機能バランスが深く関与していることを示唆している。

本研究代表者は、細胞のサイズ調節という事象に着目して遺伝子スクリーニングを行うことにより、ある機能未知の遺伝子がミトコンドリア機能を増進することにより細胞サイズを調節していることを突き止めた。興味深いことに、この遺伝子を肝臓や心臓で強制発現させたマウスでは、ミトコンドリアが増大し肝細胞や心筋細胞が大きくなることが分かった(引用文献①)。本研究では、このマウスを用いて、特にミトコンドリア機能の亢進と癌の発症・進行に焦点を当てて解析を行う。

2. 研究の目的

細胞サイズ調節因子として新たに同定した遺伝子を臓器特異的に発現するトランスジェニックマウス(=ミトコンドリア機能亢進マウス)を用いて、細胞の癌化におけるミトコンドリアの関わりを明らかにする。同マウスに実験的発癌を誘導するモデル(例:白血病モデルマウス)を適用することにより、ミトコンドリア機能と癌の発症と進展の関連を探る。また、培養細胞を用い試験管内での実験を合わせることで、その分子機序の解明にも臨む。

3. 研究の方法

(1) 上記トランスジェニックマウスに発癌モデルマウスを掛け合わせ、ミトコンドリアの機能亢進が、それら癌の発症や進展にどのような影響を与えるかを観察する。
(2) 培養細胞による試験管内の実験系を用いて癌遺伝子・癌抑制遺伝子との関係を探り、ミトコンドリア機能が細胞内シグナル伝達・代謝経路のどの部分に作用するのか分析することにより、マウスの実験で観察された現象の分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリアの機能亢進を呈するトランスジェニックマウスと、人為的にリンパ腫を誘導するために条件付きで癌抑制遺伝子 *Pten* をリンパ球特異的にノックアウトできるモデルマウス(=白血病モデルマウス)との交配を行い、得られた産仔について PCR による遺伝子型を判定し、実験群と対照群に分類した。白血病モデルマウスでは生後約 90 日から 160 日までにリンパ腫によって死亡するが、ミトコンドリア機能を亢進させると延命効果があることが確認された。

(2) ミトコンドリア機能亢進の鍵となるトランスジーン産物に緑色蛍光タンパク質(GFP)を付加した人工タンパク質を安定発現する細胞株を用いて実験を行った。まず、様々な細胞内小器官マーカーと赤色蛍光タンパク質(DsRed2)との融合タンパク質を発現するプラスミドを構築し上記細胞株に導入することにより、トランスジーン産物がいずれかの細胞内小器官に局在するかどうかを GFP と DsRed2 に由来する蛍光の重なりを検出することで解析した。核、ミトコンドリア、ゴルジ体、小胞体、ペルオキシソーム、エンドソームへの局在に関して検討したが、いずれの小器官とも重ならない細胞質中で点状に存在することが分かった。

(3) この細胞株における遺伝子発現の変動をトランスクリプトームの手法で網羅的に解析することにより、いくつかの転写因子がミトコンドリア機能亢進において支配的な働きを担っていることが明らかになった。

(4) さらにこの細胞を用いた解析により、トランスジーンが発現がタンパク質の合成効率を上昇させていることが明らかになった。この事実を受け、上記ミトコンドリア機能亢進マウスにタンパク質合成阻害剤であるピューロマイシンを静注して一定時間置いた後に白血球に取り込まれたピューロマイシンを定量することで生体内におけるタンパク質合成率を検定した。その結果、ミトコンドリアの機能亢進マウスではタンパク質合成効率が上昇していることを示唆する結果を得た。

(5) 以上の成果から、白血病の進行においてミトコンドリアの機能亢進は抑制的に働くことが示唆された。従って、これらモデルマウスを用いた研究をさらに発展させていく必要があると考えられる。さらに、本研究で用いたミトコンドリア機能亢進マウスのもととなる遺伝子の機能や性状について、上記(2)や(3)で示した結果を基にさらに解析を深めることにより、ミトコンドリアの機能を安全に制御する技術が確立できれば、癌の抑制につながることも期待される。

<引用文献>

① Yamamoto, K., Gandin, V., Sasaki, M., McCracken, S., Li, W., Silvester, J.L., Elia, A.J., Wang, F., Wakutani, Y., Alexandrova, R., Oo, Y.D., Mullen, P.J., Inoue, S., Itsumi, M., Lapin, V., Haight, J., Wakeham, A., Shahinian, A., Ikura, M., Topisirovic, I., Sonenberg, N., Mak, T.W. Largin: a molecular regulator of mammalian cell size control. *Molecular Cell*, 査読有、Vol. 53、No. 6、2014、pp. 904-15. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.02.028

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 4 件)

① Harris, I.S., Trelor, A.E., Inoue, S., Sasaki, M., Gorrini, C., Lee K.C., Yung, K.Y., Knobbe-Thomsen, C.B., Brenner, D., Cox, M.A., Elia, A., Thorsten, B., Cescon, D.W., Adeoye, A., Brüstle, A., Molyneux, S.D., Mason, J.M., Blaser, H., Li, W.Y., Yamamoto, K., Wakeham, A., Berman, H.K., Khokha, R., Done, S., Kavanagh, T.J., Lam, C.W., Mak, T.W. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathway synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer Cell*, 査読有、Vol. 27、No. 2、2015、pp. 211-222. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.11.019

② 山本一男. 細胞の大きさを規定する分子基盤. 脊椎動物特異的細胞サイズ調節因子 Largin の同定. *化学と生物*、査読有、Vol. 53、No. 3、2015、pp. 141-142.

③ Itsumi, M., Inoue, S., Elia, A.J., Murakami, K., Sasaki, M., Lind, E.F., Brenner, D., Harris, I.S., Chio, I.I., Afzal, S., Cairns, R.A., Cescon, D.W., Elford, A.R., Ye, J., Lang, P.A., Li, W.Y., Wakeham, A., Duncan, G.S., Haight, J., You-Ten, A., Snow, B., Yamamoto, K., Ohashi, P.S., Mak, T.W. Idh1 protects murine hepatocytes from endotoxin-induced oxidative stress by regulating the intracellular NADP(+)/NADPH ratio. *Cell Death and Differentiation*、査読有、Vol. 22、No. 11、2015、pp. 1837-1845. DOI: 10.1038/cdd.2015.38

④ Ichinose, K., Ushigusa, T., Nishino, A., Nakashima, Y., Suzuki, T., Horai, Y., Koga, T., Kawashiri, S.Y., Iwamoto, N., Tamai, M., Arima, K., Nakamura, H., Obata, Y.,

Yamamoto, K., Origuchi, T., Nishino, T., Kawakami, A., and Tsokos, G.C. Lupus nephritis IgG induces the expression of calcium/calmodulin-dependent kinase type IV in podocytes and alters their function. *Arthritis and Rheumatology*、査読有、Vol. 68、No. 4、2016、pp. 944-952. DOI: 10.1002/art.39499

[学会発表] (計 4 件)

① Yamamoto, K. A molecular regulator that links mitochondrial activity to mammalian cell size control. Nagasaki-Taiwan Joint Seminar on Ageing and Pathology. 2015年7月23日、長崎大学医学部ポーンペ会館、長崎、長崎.

② 山本一男, Susan McCracken, Tak W. Mak. 細胞の大きさを制御する遺伝子ネットワークの抽出. 第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会合同大会. 2015年12月1日-12月4日、神戸国際展示場、兵庫、神戸.

③ Yamamoto, K. A molecular regulator that links mitochondrial activity to cell size control. The 6th Busan-Nagasaki Joint Seminar on Ageing Research. 2016年3月11日、釜山、韓国.

④ Yamamoto, K. A molecular basis of mammalian cell size control. CDB Symposium 2016. Size in Development: Growth, Shape and Allometry. 2016年3月28日-3月30日、理化学研究所多細胞システム形成研究センター、兵庫、神戸.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/brsc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 一男 (YAMAMOTO, Kazuo)

長崎大学 医歯薬学総合研究科 (医学系)

准教授

研究者番号：70255123