

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501312

研究課題名(和文) ProhibitinおよびHint2による低酸素下の細胞死の制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of cell death regulation by Prohibitin and Hint2 under hypoxia

研究代表者

佐藤 清敏 (SATO, Kiyotoshi)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・助教

研究者番号：50401386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：正常細胞は低酸素条件下で細胞死を引き起こすのに対して、癌細胞は低酸素のような劣悪な環境でも生存できる細胞である。研究代表者らは、低酸素による正常細胞の細胞死誘導過程でミトコンドリア内膜タンパク質Prohibitinが減少すること、ヒト大腸癌細胞においてProhibitinをノックダウンするとS期の割合が減少して細胞増殖が抑制されることを見いだした。さらに、Prohibitinとミトコンドリア内膜タンパク質Hint2との関連について解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells are more resistant to hypoxia than normal cells. We found that mitochondrial protein Prohibitin was decreased under hypoxic conditions, and that overexpression of Prohibitin inhibited cell death induced by hypoxia. Furthermore, Knockdown of Prohibitin in human colon cancer cells reduced S phase cell fraction and decreased cell proliferation. In addition, we analyzed functional cooperation of Prohibitin and mitochondrial protein Hint2 in colon cancer cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：細胞死 低酸素 癌

1. 研究開始当初の背景

正常細胞は低酸素条件下で細胞死を引き起こすのに対して、癌細胞は低酸素のような劣悪な環境でも生存できる細胞である。この違いが癌治療の標的とも成り得ると期待される。これまでの低酸素に対する細胞応答の研究の多くは低酸素条件下で発現が誘導される転写因子 Hypoxia inducible factor (HIF) に着目したものであったが、癌における HIF の遺伝子異常は一般的ではないことが知られている。

そこで研究代表者らは、正常細胞では HIF 非依存的な低酸素応答性の細胞死の制御機構が存在し、この機構の破綻が癌細胞の低酸素耐性を引き起こしていると考え、まず短時間の低酸素処理により正常細胞で誘導される細胞死の制御機構を解析することとした。具体的には、正常心筋細胞 H9c2 を低酸素条件下で 15 分間培養して発現量が変動する因子を数種類同定し、顕著に減少する分子としてミトコンドリア内膜タンパク質 PHB を見いだした (Muraguchi et al. Biomed. Res. 31:113-122 (2010))。

ミトコンドリアは TCA サイクルによりエネルギーの産生を行うと同時に、Bcl-2 ファミリータンパク質によるシトクロム c の放出を介してアポトーシスを制御している。一方、PHB はユビキタスに発現しており、ファミリータンパク質 PHB2 とともにミトコンドリアの形態制御し、核では転写制御因子として機能することが知られている。研究代表者らは、PHB の過剰発現により、低酸素条件下で誘導されるミトコンドリアにおける Bcl-2 の減少、ミトコンドリア膜電位の低下、シトクロム c の放出、細胞死が阻害されることを見いだした。これらの結果より、PHB は低酸素条件下の細胞死に対抗する細胞生存因子であると考えた。

さらに研究代表者らは、酵母 two-hybrid 法により PHB 結合因子としてミトコンドリアタンパク質 Histidine triad nucleotide-binding protein 2 (Hint2) を同定した。Hint2 は中性脂肪の代謝・空腹時血糖・ミトコンドリアの形態を制御することが知られている。研究代表者らは Hint2 が PHB と同様にミトコンドリア内膜近傍に局在していることを電子顕微鏡で確認した。加えて、

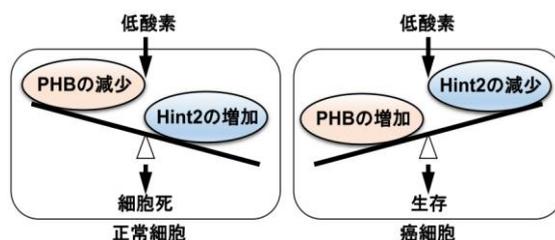


図1 PHBとHint2による細胞死制御機構のモデル

Hint2 の過剰発現により抗癌剤に対する感受性が亢進することを見いだした。これらの知見から、研究代表者らは Hint2 が細胞死促進因子として機能するという仮説を立てている。正常細胞では PHB が Hint2 の分解などを誘導することにより発現量または機能を抑制し、癌細胞では細胞生存因子 PHB と細胞死促進因子 Hint2 のバランスが崩れて PHB の方が Hint2 より機能的発現量が高いために低酸素耐性を獲得し、生存し続けているというモデルを考えている (図 1)。

2. 研究の目的

本研究では、細胞生存因子 PHB と細胞死促進因子 Hint2 のバランスの変化が低酸素条件下の細胞死を制御しているという仮説を検証し、この機構の破綻と癌細胞の低酸素耐性の因果関係を明らかにすることを目的とした。従来の癌の低酸素応答の研究は HIF を中心としたものであったが、PHB と Hint2 を中心とした HIF 非依存的な低酸素応答経路を明らかにすることを目標としている。また、これらの分子を標的とした癌の治療法の開発へと展開するための研究基盤を確立できると期待している。具体的には PHB と Hint2 の結合を阻害することで細胞死促進因子である Hint2 を活性化する薬剤の開発などが考えられる。

3. 研究の方法

大腸癌の研究に広く用いられているヒト大腸癌由来培養細胞株 HCT116 を使用して PHB と Hint2 の機能をノックダウン法により調べた。具体的には PHB または Hint2 に対する siRNA (ライフテクノロジーズ社およびシグマ社) をトランスフェクションすることによりこれらの遺伝子の発現を抑制した。この際、siRNA のオフターゲット効果を抑制するため、各社ともターゲット配列の異なる 3 種類の siRNA をプールしてトランスフェクションに使用した。トランスフェクション後の細胞は GE ヘルスケアバイオサイエンス社の Cytell Cell Imaging System により細胞増殖・細胞周期・核の形態などについて解析した。また、哺乳類においては PHB にはファミリー遺伝子 PHB2 が存在し、Hint2 にはファミリー遺伝子 Hint1 および Hint3 が存在するため、PHB ファミリーの siRNA または Hint ファミリーの siRNA を同時にトランスフェクションした。

4. 研究成果

PHB ファミリーまたは Hint ファミリーの siRNA をトランスフェクションし、96 時間後に Cytell Cell Imaging System により細胞増殖を測定した。その結果、PHB ファミリー

のノックダウンにより細胞増殖が抑制されることを見いだした(図 2)。この結果は PHB が細胞生存因子であるというモデルと一致するものであった。一方、Hint ファミリーのノックダウンでは細胞増殖に変化は認められなかった。

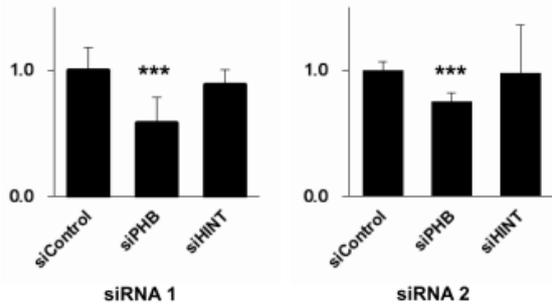


図2 PHBおよびHINTノックダウンの細胞増殖に対する効果 (n = 6)

次に、PHB ファミリーのノックダウンによる細胞増殖抑制効果を引き起こす原因を明らかにするため、細胞周期を測定した。その結果、PHB ファミリーのノックダウンにより、有意に S 期細胞の割合が減少していることを

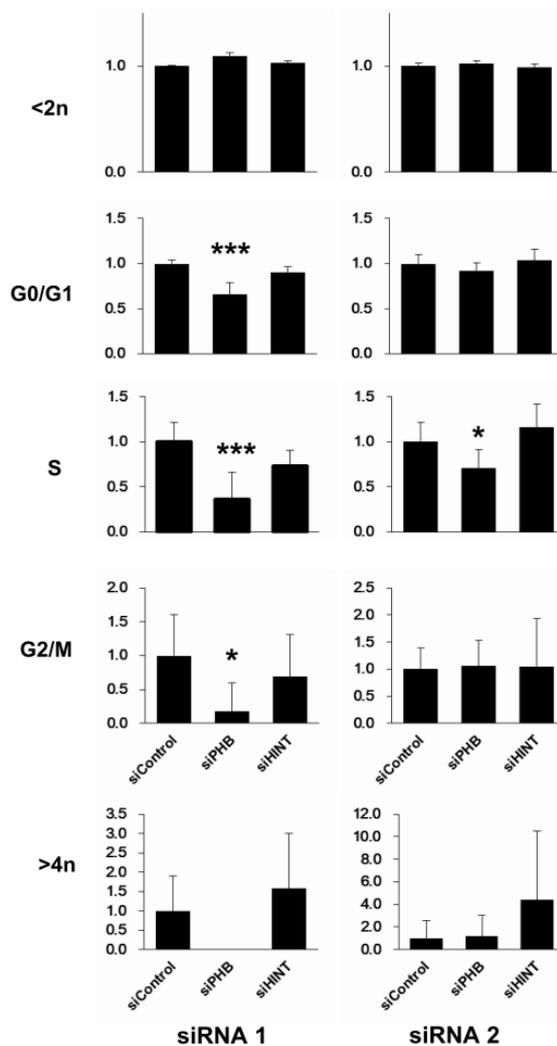


図3 PHBおよびHINTノックダウンの細胞周期に対する効果 (n = 6)

見いだした(図 3)。一方、Hint ファミリーのノックダウンでは細胞周期についてコントロール細胞との有意な差は認められなかった。

さらに、PHB ファミリーまたはHint ファミリーをノックダウンした際の核の面積と形態についても解析したが、顕著な変化は確認されなかった(図 4, 5)。

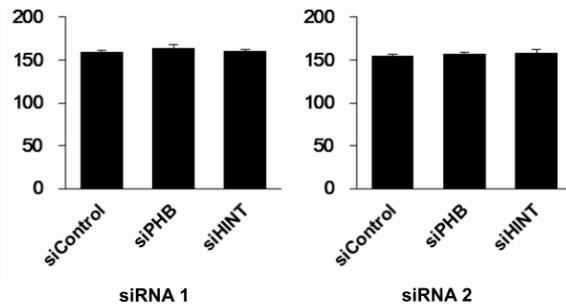


図4 PHBおよびHINTノックダウンの核面積に対する効果 (n = 6)

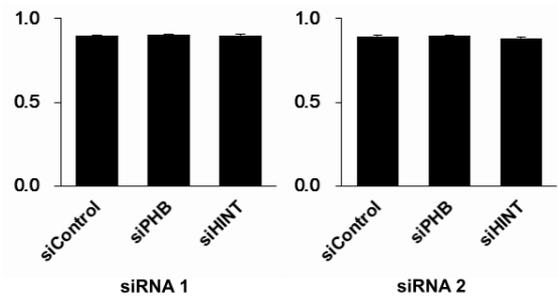


図5 PHBおよびHINTノックダウンの核形態に対する効果 (n = 6)

これまでに研究代表者らは、低酸素による正常細胞の細胞死誘導過程でミトコンドリアタンパク質 PHB が減少すること、PHB を過剰発現させると低酸素条件下で誘導される Bcl-2 の減少と細胞死が阻害すること、大腸癌細胞において PHB ファミリーをノックダウンすると S 期の割合が減少して細胞増殖が抑制されることを見いだした。これらの結果は PHB が細胞生存因子として機能することを示唆している。

さらに研究代表者らは PHB 結合因子としてミトコンドリアタンパク質 Hint2 を同定した。通常の培養条件では Hint ファミリーをノックダウンしても細胞増殖に有意な差は認められなかったが、細胞死が誘導されやすい条件において Hint のノックダウンの効果を調べることにより Hint が細胞死促進因子であるというモデルを検証するため研究を継続する予定である。また、研究期間内にマウスを用いた個体レベルの解析を行うことが出来なかったが、今後実施する計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 清敏 (SATO, Kiyotoshi)
慶應義塾大学・政策・メディア研究科・助教
研究者番号：50401386

(2) 研究分担者

久保田 俊一郎 (KUBOTA, Shunichiro)
帝京平成大学・薬学部・教授
研究者番号：00260480

(3) 連携研究者

なし