

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870443

研究課題名(和文)がん抑制遺伝子Rbによるミトコンドリア代謝制御を介した腫瘍抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文)Study on the antitumor mechanism of Rb-dependent mitochondrial metabolic remodeling

研究代表者

竹林 慎一郎 (Takebayashi, Shin-ichiro)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50392022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：最近の研究で、がん遺伝子の活性化により誘導される細胞老化は、細胞内エネルギー代謝にも大きな変化をおこしていることが分かってきた。我々は、培養細胞をモデルとして用い、網膜芽細胞腫の原因遺伝子として知られるRbが細胞老化にともなうエネルギー代謝変化を調節していることを明らかにした。具体的には、老化細胞におけるミトコンドリア呼吸の活性化がRb依存的におこっていることを見出した。さらに、網羅的な遺伝子発現および代謝産物解析により、Rbタンパク質が解糖系を中心とする複数の代謝関連遺伝子の発現レベルを上昇させることでエネルギー源供給を亢進させ、下流のミトコンドリア呼吸を活性化していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cellular senescence is widely recognized as an important tumor suppressor function and accompanies metabolic remodeling. In this study, we demonstrate a novel role of Retinoblastoma (Rb) in oncogene-induced senescence. Our combined metabolic and gene expression analyses show that Rb mediates senescence-associated metabolic remodeling through transcriptional activation of a set of metabolic genes including glycolytic genes.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：細胞老化 エネルギー代謝 Retinoblastoma

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は正常細胞と異なり、エネルギー産生のために解糖系（嫌気呼吸）に偏った代謝をおこなっている。他にもグルタミン代謝などの特徴的な代謝経路の活性化ががん細胞では見られ、がんの悪性化に重要な役割を果たしている。これまでの研究は、主にごん細胞で活性化している代謝経路を同定することで、関連する代謝酵素を標的とした創薬や治療戦略に活かすというものであった。一方で、正常細胞が代謝経路を積極的に変化させることで、がん遺伝子活性化などのストレスに対抗していることも明らかになりつつある。

最近の研究で、がん遺伝子の発現などでストレスを受けた正常細胞は、ミトコンドリアでの好気呼吸（酸素呼吸）を上昇させることで、抗腫瘍効果を発揮していることが示された。これは、ミトコンドリア好気呼吸の上昇が、DNA 損傷を引き起こす活性酸素（ROS）の産生などを促進することで、細胞周期の停止や細胞老化のプログラムを活性化するためである（図1）。しかしながら、どのようなメカニズムでミトコンドリア好気呼吸の上昇が引き起こされるのかについては、ほとんど何も分かっていないのが現状である。

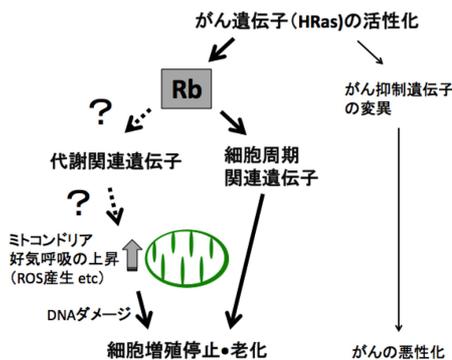


図1 Rb依存的なミトコンドリア好気呼吸の上昇とその抗腫瘍効果

我々もヒト正常繊維芽細胞 (IMR90) にがん遺伝子 HRas を誘導すると、ミトコンドリアでの好気呼吸が上昇し、細胞周期の停止や細胞老化 (Oncogene-induced senescence, OIS) が起こることを確認した。さらに研究を進めたところ、このミトコンドリア好気呼吸の上昇が、がん抑制遺伝子である Rb 依存的に起こっているという興味深いデータを得た。この現象の詳細なメカニズムは不明であるが、原因としてミトコンドリア呼吸鎖複合体の遺伝子群そのものの発現調節や、好気呼吸に必要なエネルギー源を供給する他の代謝経路の活性化などが考えられる。実際、トランスクリプトーム解析から、細胞代謝に関係する多くの

遺伝子の発現が Rb 依存的に変動することが分かった。これらは、Rb 依存的に発現が促進または抑制される約 50 遺伝子からなり、解糖系、TCA 回路、ミトコンドリア呼吸鎖などを構成する代謝遺伝子に加え、それらの遺伝子の発現調節に関わる転写因子群などを含んでいた。このように、最近の我々の研究から、がん遺伝子の活性化に対して、Rb が代謝関連遺伝子の発現調節を介してミトコンドリア好気呼吸の上昇に関与していることが分かり、これまで知られていなかった Rb の抗腫瘍活性の存在が明らかになりつつあることから、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、がん抑制遺伝子 Rb がもつ新規がん抑制作用のメカニズム解明を目指す。ミトコンドリア好気呼吸の上昇が、細胞増殖の停止や老化の引き金となり、がんの悪性化に対して抑制的に働くことが知られている。この現象の分子メカニズムの解明は、ミトコンドリアの機能制御をターゲットとしたがん治療法を確立するための情報基盤として必須である。最近、我々は、HRas 誘導時におこるミトコンドリア好気呼吸の上昇に Rb が関わっていることを明らかにした。本研究では、Rb 制御の下流にあり、これまで不明であったミトコンドリア活性化の鍵となる代謝経路の同定とそれに関連する代謝酵素の発現調節のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

1) メタボローム解析によるミトコンドリア好気呼吸上昇の原因となる代謝関連遺伝子を同定

まず、メタボローム解析(CE-TOFMS)を行い、老化細胞において Rb 依存的に変動する細胞内代謝産物を同定する。以前行ったトランスクリプトームの解析結果から IMR90 の HRas 誘導系で Rb 依存的な発現変動を示す遺伝子候補のリストをすでに得ているので、両者を照らし合わせ Rb 依存的な代謝遺伝子発現変動と実際の代謝産物の変動がリンクしているものに着目し、候補遺伝子の絞り込みを行う (一次スクリーニング)。Rb に対する siRNA 処理は HRas 誘導 2 日目から 6 日目までの計 4 日間行い、誘導 6 日後に細胞老化を評価した。

2) siRNA ノックダウンによる候補遺伝子のミトコンドリア好気呼吸への寄与を検証

Rb の標的候補として絞り込まれた代謝関連遺伝子に対する siRNA ノックダウンを行い、実際に Rb 依存的なミトコンドリア好気呼吸の上昇がキャンセルされるのか

を調べた。(二次スクリーニング)。この実験に必要な代謝活性測定には、シーホース社の細胞外フラックス解析装置を用いた。この装置は、専用のウェルに培養した細胞上の微小環境における酸素やプロトン濃度を測定することで、ミトコンドリア呼吸活性や解糖系の活性を評価できる。

4. 研究成果

メタボローム解析を行った結果、老化細胞において多くの代謝産物量が Rb 依存的に増加していることが明らかになった。特に解糖系を中心とする複数の代謝産物の増加が顕著であった(図2)。このことから、Rb がまず解糖系を活性化し、それによって下流のミトコンドリアでの好気呼吸が活性化しているのではなかと推測された。実際、フラックス解析装置により解糖系の活性を測定したところ、老化細胞では Rb 依存的に解糖系が活性化していることが示された。

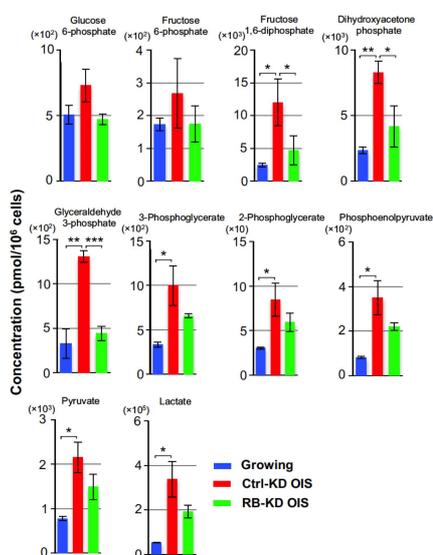


図2 老化細胞におけるRbに依存した代謝産物量の変化

メタボローム解析の結果と、すでに得ていた Rb 依存的な代謝遺伝子発現データを照らし合わせ、両者の変動がリンクしているものを抽出した。その結果、*H6PD*, *PFKM*, *HK1*, *ALDOC* といった解糖系関連遺伝子を候補として絞り込むことができた。絞り込みに使用した発現データはマイクロアレイ解析によって得られたものであったので、qPCR による再評価も行き、実際に Rb 依存的に老化細胞で転写活性化さ

れることを確認した(図3)。

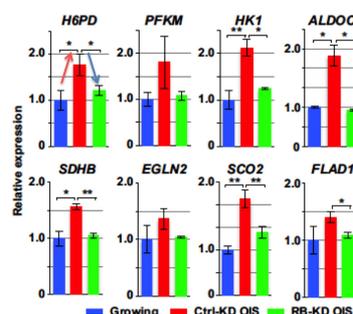


図3 老化細胞におけるRbに依存した代謝関連遺伝子の転写活性化

同定したこれら解糖系遺伝子の発現制御メカニズムに関して考察するため、ChIP-seq データを用いて Rb タンパク質のプロモーター領域への結合の有無を検証した。その結果、Rb は *ALDOC* 以外の遺伝子のプロモーター領域に直接結合していることが明らかとなった。さらに Rb が直接結合するプロモーター領域の配列を結合転写因子予測ツールである TRANSFAC を用いて解析した。その結果、Cebpb や Sp1 といった転写因子の結合が予測されたが、これらの因子は実際に Rb と協調的に遺伝子の転写活性化に働くことが報告されていた。これらのことから、Rb は直接または間接的に複数の解糖系関連遺伝子の転写を活性化していることが分かった。一般に Rb は細胞周期関連遺伝子の発現抑制に働くことが知られているが、代謝関連遺伝子に対しては転写活性化に働くという興味深い結果であった。

最後に、これら Rb のターゲットとなっている解糖系関連遺伝子のノックダウンを行ったところ、老化細胞における解糖系の活性化および下流のミトコンドリア好気呼吸の活性化をキャンセルすることが示された。

以上の結果をまとめると、がん遺伝子などの活性化により細胞老化が誘導されると、Rb タンパク質が解糖系などの代謝関連遺伝子の発現レベルを上昇させることが分かった。これにより解糖系における代謝が活性化し、その結果として下流のミトコンドリア呼吸が活発になっていることが明らかとなった(図4)。

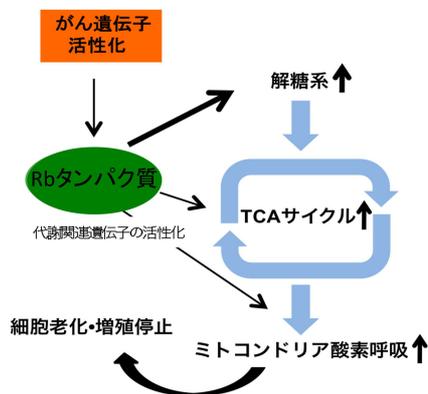


図4 Rbによる老化細胞ミトコンドリア呼吸の活性化

近年、代謝リモデリングは、がんなどの疾患細胞だけでなく、分化や発生過程にある細胞でもおこなっていることが明らかになりつつある。しかしながら、代謝リモデリングを誘導するメカニズム、代謝リモデリングの結果どのような細胞機能が影響をうけるのかといった問題は、研究の端緒についたにすぎない。本研究は、がん化を抑制する因子として長年研究されてきた Rb タンパク質に着目し、その下流にあるこれまで知られていなかった代謝制御を明らかにした点に意義がある。

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 3 件)

1. Kuriya, K., Higashiyama, E., Avşar-Ban, E., Okochi, N., Hattori, K., Ogata, S., Takebayashi, S. I., Ogata, M., Tamaru, Y. and Okumura, K. (2016) Direct visualization of replication dynamics in early zebrafish embryos. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 29:1-4. 査読有
2. Kuriya, K., Higashiyama, E., Avşar-Ban, E., Tamaru, Y., Ogata, S., Takebayashi, S., Ogata, M., and Okumura, K. (2015) Direct Visualization of DNA Replication Dynamics in Zebrafish Cells. **Zebrafish** 12:432-439. 査読有
3. Takebayashi, S., Tanaka, H., Hino, S., Nakatsu, Y., Igata, T., Sakamoto, A., Narita, M. and Nakao, M. (2015) Retinoblastoma protein promotes oxidative phosphorylation through upregulation of glycolytic genes in oncogene-induced senescent cells. **Ageing Cell** 14:689-697. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

(口頭発表)

1. Shin-ichiro Takebayashi
Retinoblastoma protein promotes oxidative phosphorylation through upregulation of glycolytic genes in oncogene-induced senescent cells. **The 2nd International Symposium for Bioengineering Research and Education**. Aug. 4. 2015 (UCSD campus, La Jolla, CA, USA)

2. 竹林慎一郎、緒方正人 「BAF クロマチンリモデリング複合体による哺乳類染色体複製ドメイン構造の制御」、**第37回日本分子生物学会年会**(ワークショップ: ゲノム DNA 複製制御のメカニズム: 生物種を超えた統一像と多様性)、平成26年11月27日 (パシフィコ横浜・横浜)

(ポスター発表)

3. 竹林慎一郎、緒方正人 「BAF クロマチンリモデリング複合体による哺乳類染色体複製ドメイン構造の制御」、**第37回日本分子生物学会年会**、平成26年11月27日 (パシフィコ横浜・横浜)
4. 田中宏、坂元顕久、竹林慎一郎、日野信次朗、中尾光善 「ミトコンドリア活性に関わるエピジェネティック因子の探索」、2P-0215、**第37回日本分子生物学会年会**、平成26年11月26日 (パシフィコ横浜・横浜)
5. 竹林慎一郎、緒方正人 「BAF クロマチンリモデリング複合体による哺乳類染色体複製ドメイン構造の制御」、**第8回日本エピジェネティクス研究会年会**、平成26年5月26日 (伊藤国際学術研究センター・東京)

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学発生医学研究所プレスリリース
<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/category/press/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹林 慎一郎 (Takebayashi, Shin-ichiro)

三重大学大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 50392022