

平成30年6月13日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10103

研究課題名(和文)ミトコンドリアマイトファジー機構の破綻を介した胃癌悪性度亢進の新規メカニズム解明

研究課題名(英文) A novel mechanism increasing gastric cancer aggressiveness via impaired mitophagy

研究代表者

中村 淳 (Nakamura, Jun)

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60404175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌をはじめとした固形癌に存在する低酸素領域は、HIF-1 を誘導し癌の悪性度(増殖能、浸潤能)亢進を惹起する。一方、低酸素ストレスにより生じた不良ミトコンドリアから発生するROSは、HIF-1 を安定化し癌の悪性度と関連することが分かっている。通常、不良ミトコンドリアはミトコンドリア選択的オートファジー(マイトファジー)によって処理を受けるが、本研究は、スキルス胃癌において、マイトファジー機構が破綻しており、蓄積した不良ミトコンドリアからのROS産生が亢進することで、HIF-1 の誘導・安定化を惹起し癌悪性度が亢進することを証明した。

研究成果の概要(英文)：The hypoxic environment is substantial in solid tumors including gastric cancer (GC), where it accelerates their malignant behavior via HIF-1 pathway. Whereas, hypoxia is known to stimulate ROS production from mitochondrial complex III in the electron transport chain, and mitochondrial ROS (mtROS) stabilize HIF-1 leads to increased cancer aggressiveness. Mitochondrial autophagy (mitophagy) is a selective form of autophagy and a critical step in excluding mitochondria damaged by stress, including hypoxia. Our data suggested that mtROS is accumulated under hypoxia in scirrhous GC cells due to impaired mitophagy, while mtROS is controlled at a low level through the normal mitophagy process in non-scirrhous GC cells. This study demonstrated that the integrity of mitophagy determined the cancer aggressiveness of GC cells under hypoxic environment via the activation of the mtROS/HIF-1 interplay.

研究分野：一般・消化器外科

キーワード：マイトファジー HIF-1 ROS 胃癌 低酸素

1. 研究開始当初の背景

固形癌は、腫瘍の増大に伴い腫瘍内部に低酸素領域を生じる。HIF-1 は、癌の低酸素応答において中心的な役割を果たし、血管新生、浸潤・転移能亢進、エネルギー代謝、抗癌剤耐性などに関与している。一方で、腹膜播種を有する胃癌は、手術不能であるばかりでなく抗癌剤治療にも抵抗性を示し、胃癌の予後不良因子の一つである。しかしながら、高頻度に腹膜播種をきたす未分化型・スキルス胃癌の悪性形質獲得のメカニズムは、未だに解明されていない。

ヌードマウスにおいて高度腹膜播種形成能を有するスキルス胃癌細胞 (58As9, 44As3) は非スキルス胃癌細胞と比較して、低酸素下での HIF-1 発現量が高く安定しており、細胞増殖能・浸潤能とも相関している。また、ROS は HIF-1 を安定化させ、その一方で、HIF-1 は BNIP3 や BNIP3L を介して、ミトコンドリア選択的なオートファジー (マイトファジー) を誘導し ROS を調節する。(J Biol Chem 2000: 275; 25130-8, Mol Cell Biol 2009: 29; 2570-81) しかし、胃癌細胞における HIF-1 と ROS・マイトファジーの関係についての報告は、現在のところ皆無である。

HIF-1 発現量の高いスキルス胃癌細胞は、低酸素で培養すると、ROS 産生が著明に増加するのに対し、非スキルス胃癌細胞ではほぼ ROS 産生を認めない。この結果、胃癌細胞株における HIF-1 発現の違いは、低酸素ストレスによって生じる不良ミトコンドリアから産生される ROS 量の差が原因である、と考えられる。さらに ROS 産生の差は、各細胞株におけるミトコンドリア品質管理 (マイトファジー) 機構の差ではないかと推測した。

2. 研究の目的

固形癌には低酸素領域が存在し、癌の悪性形質獲得と密接に関連している。一方、低酸素ストレスにより生じた不良ミトコンドリアから発生する ROS は、HIF-1 の安定化に寄与し癌悪性を亢進させる。不良ミトコンドリアはミトコンドリア選択的オートファジー (マイトファジー) やリソソームでの酸化タンパク消化機構 (MALM) により処理を受けるが、本研究は、これら不良ミトコンドリア

の処理機構 (MQC) の破綻により惹起される、“未分化型・スキルス胃癌の悪性形質獲得の機序解明”を目的とする。

つまり、低酸素環境におけるスキルス胃癌悪性形質獲得機序として、MQC (マイトファジー、MALM) の破綻 不良なミトコンドリアが蓄積 ROS の産生亢進 HIF-1 の誘導・安定化 増殖・浸潤能の亢進、という仮説を提唱し、その全貌解明を目標として掲げた。

3. 研究の方法

1. 胃癌細胞における、HIF-1 発現量と ROS、マイトファジーとの関連の解明

[細胞株]

スキルス胃癌細胞株: 58As9, 44As3
非スキルス胃癌細胞株: MKN74, MKN45
HIF-1 安定欠失胃癌細胞株:
58As9-KD, MKN74-KD

1) ROS 阻害剤による HIF-1 発現量の変化の検討

低酸素下での HIF-1 発現誘導および経時的变化について、ROS 阻害剤である N-アセチルシステイン (NAC) を投与し検討、“ROS が HIF-1 安定化に寄与している”ことの証明。HIF-1 発現は、Western blot で評価・定量化した。

2) HIF-1 阻害による ROS 産生量の変化の検討

低酸素下での ROS 産生の経時的变化について、HIF-1 欠失株 (58As9-KD, MKN74-KD) を用いて検討し、“HIF-1 が ROS をコントロールしている”ことの証明。ROS 産生量は Enzo Life Science 社の Total ROS detection kit を用いて、FACS 解析した。

3) 低酸素環境におけるミトコンドリアオートファジー (マイトファジー) の評価

“低酸素ストレスによりオートファジーが生じる”ことの証明。各胃癌細胞株におけるオートファジーのマーカー (LC3-I, LC3-II と SQSTM1/p62) の発現を、常酸素および低酸素下で評価した。各マーカーの発現は、Western blot で評価・定量化した。

4) マイトファジー阻害による ROS 産生量の変化を検討
マイトファジー阻害剤クロロキンを使用し、各種オートファジーマーカーの発現変化について評価・検討した。さらにその際の ROS 産生量の変化を FACS 解析することにより、“マイトファジーの阻害により ROS 産生量が増加する”ことを証明した。

5) 蛍光顕微鏡によるマイトファジーの証明・可視化
オートファジーとマイトファジーの区別に関しては、Mitotracker と LysoTracker、さらには抗 LC3-II を使用して、“ミトコンドリアがオートライソソームに取り込まれる画像”を蛍光顕微鏡で捉え、マイトファジーを証明した。

II. Mieap によるミトコンドリア品質管理機構の評価

1) ROS 産生における Mieap の機能解析
58As9, 44As3 と MKN74, MKN45 における、HIF-1 発現および ROS 産生の違いは、MALM 関連遺伝子である Mieap の発現の差が要因と考えられる。Mieap を標的とする siRNA を作製し、MKN74 と MKN45 を使用し“Mieap 抑制による ROS 産生亢進と HIF-1 安定化”を証明した。

2) 蛍光顕微鏡によるミトコンドリア品質管理機構の画像化
抗 Mieap 抗体、LysoTracker, MitoSox, Mitotracker などを使用し、Mieap によるミトコンドリア品質管理を画像として評価した。

4. 研究成果

まず、スキルス胃癌細胞株 (44As3、58As9) は非スキルス胃癌細胞株 (MKN45) と異なり、低酸素環境下で HIF-1 発現が誘導され、ミトコンドリアで ROS が蓄積することを示した。さらに ROS 阻害剤である N-アセチルシステイン (NAC) を投与すると、低酸素下での ROS 産生が低下し、HIF-1 発現も抑制された。一方で HIF-1 をノックダウンすると低酸素での ROS 産生が低下し、ROS と HIF-1 が相互に作用していることが明らかとなった。

続いて、オートファジーマーカー LC3-I/II, SQSTM1/p62 を常酸素及び低酸素下で検討した結果、44As3 と 58As9 では低酸素下でのオートファジー機構が働いていないことが分かった。さらに蛍光顕微鏡を用いて、MKN45 における低酸素下でのオートファジーがミトコンドリア選択的に起こっている (マイトファジーである) ことを証明した。また、クロロキリン (オートファジー阻害剤) で処理すると、MKN45 においても低酸素下でのマイトファジーが阻害され ROS が蓄積し、その結果、増殖・浸潤能が亢進することを示した。

以上より、“マイトファジー機構の破綻 不良ミトコンドリアからの ROS 産生亢進 HIF-1 の誘導・安定化 増殖・浸潤能亢進”というメカニズムが証明され、ここまでの結果は、すでに Int J Oncol 2016; 48(4): 1379-90. に発表した。

さらに、MQC をミトコンドリア/リソソームマーカー標識で評価すると、低酸素下 58As9 では MKN45 と異なり、ミトコンドリアにリソソーム集積を認めず MQC 障害が示唆された。一方、MKN45 をリソソーム阻害剤クロロキリン処理すると低酸素下ミトコンドリア ROS 蓄積とともに浸潤能亢進が認められた。さらに MKN45 で MALM 関連遺伝子 Mieap をノックダウンすると、ミトコンドリア ROS の増加と浸潤細胞の増加を認めた。

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)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Waiyama K, Kitajima Y, Tanaka T, Kaneki M, Yanagihara K, Aishima S, Nakamura J, Noshiro H.
Low-dose YC-1 combined with glucose and insulin selectively induces apoptosis in hypoxic gastric carcinoma cells by inhibiting anaerobic glycolysis.
Sci Rep 2017; 7: 12653. 査読有
2. Baba K, Kitajima Y, Miyake S, Nakamura J, Wakiyama K, Sato H, Okuyama K, Kitagawa H, Tanaka T, Hiraki M, Yanagihara K, Noshiro H.

Hypoxia-induced ANGPTL4 sustains tumor growth and anoikis resistance through dual signaling pathways in scirrhous gastric cancer cell lines. Sci Rep 2017; 7: 11127. 査読有

3. Tanaka T, Nakamura J, Noshiro H. Promising Immunotherapies for Esophageal Cancer. Expert Opin Biol Ther 2017; 17: 723-33. 査読有
4. Shida M, Kitajima Y, Nakamura J, Yanagihara K, Baba K, Wakiyama K, Noshiro H. Impaired mitophagy activates mtROS/HIF-1 interplay and increases cancer aggressiveness in gastric cancer cells under hypoxia. Int J Oncol 2016; 48: 1379-90. 査読有
5. Kubo H, Kitajima Y, Kai K, Nakamura J, Miyake S, Yanagihara K, Morito K, Tanaka T, Noshiro H. Regulation and clinical significance of hypoxia-induced expression of ANGPTL4 in gastric cancer. Oncol Lett 2016; 11: 1026-34. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 第 76 回 日本癌学会
Mieap 発現欠失による低酸素下ミトコンドリア品質管理機構の破綻と胃癌悪性度増強機序
奥山桂一郎、北島吉彦、田中智和、中村淳、北川浩、江川紀幸、柳原五吉、中村康之、荒川博文、能城浩和
2017 年 9 月 28 日 ~ 30 日
横浜
 2. 第 76 回 日本癌学会
低用量 YC-1 + GI 療法による Warburg 効果をターゲットとした胃癌に対する新規薬物療法
脇山幸大、北島吉彦、田中智和、金木正夫、柳原五吉、相島慎一、中村淳、能城浩和
2017 年 9 月 28 日 ~ 30 日
横浜
 3. 第 76 回 日本癌学会
腫瘍内 8OHdG は進行大腸癌における予後
- 予測因子となりうる
北川浩、北島吉彦、中村淳、田中智和、古賀靖大、柳原五吉、真鍋達也、能城浩和
2017 年 9 月 28 日 ~ 30 日
横浜
 4. 第 117 回 日本外科学会
Mieap 発現欠失による低酸素下ミトコンドリア品質管理機構の破綻と胃癌悪性度増強機序
奥山桂一郎、北島吉彦、田中智和、志田雅明、馬場耕一、脇山幸大、佐藤博文、北川浩、中村淳、能城浩和
2017 年 4 月 27 日 ~ 29 日
横浜
 5. 第 117 回 日本外科学会
Warburg 効果をターゲットとした胃癌に対する新規薬物療法 : HIF1 阻害剤 YC-1+GI 療法の作用機序と臨床応用への可能性
脇山幸大、北島吉彦、田中智和、金木正夫、中村淳、柳原五吉、能城浩和
2017 年 4 月 27 日 ~ 29 日
横浜
 6. 第 75 回 日本癌学会
低酸素下でミトファジーは胃癌細胞の細胞増殖と浸潤能に寄与する
奥山桂一郎、北島吉彦、志田雅明、中村淳、脇山幸大、佐藤博文、馬場耕一、柳原五吉、能城浩和
2016 年 10 月 6 日 ~ 8 日
横浜
 7. 第 116 回 日本外科学会
低酸素誘導性ミトファジーの破綻を介したスキルス胃癌細胞の高悪性度獲得機序についての新知見
志田雅明、北島吉彦、中村淳、馬場耕一、脇山幸大、能城浩和
2016 年 4 月 14 日 ~ 16 日
大阪
 8. 第 74 回 日本癌学会
ミトファジー機構の破綻により、胃癌細胞株の悪性度は増強する
志田雅明、北島吉彦、中村淳、柳原五吉、能城浩和
2015 年 10 月 8 日 ~ 10 日
名古屋

9. 第3回 がん代謝研究会
低酸素誘導性ミトファジーの破綻を介したスキルス胃癌細胞の高悪性度獲得機序についての新知見
志田雅明、北島吉彦、中村淳、柳原五吉、能城浩和
2015年7月16日～17日
金沢

10. 第115回 日本外科学会
ミトファジー機構の破綻により、ROS/HIF1経路が活性化され、胃癌浸潤能が増強される
志田雅明、北島吉彦、中村淳、柳原五吉、能城浩和
2015年4月16日～18日
名古屋

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 淳 (Jun Nakamura)
佐賀大学・医学部・客員研究員
研究者番号：60404175

(2) 研究分担者

北島 吉彦 (Yoshihiko Kitajima)
佐賀大学・医学部・客員研究員
研究者番号：30234256

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()