

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19626

研究課題名（和文）オートファジー活性化とゲノム変異、エピゲノム異常の連携によるがん細胞の選択的淘汰

研究課題名（英文）Selective selection of cancer cells by cooperation of autophagy activation, genomic mutation, and epigenome abnormality

研究代表者

藤井 誠志（Fujii, Satoshi）

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・ユニット長

研究者番号：30314743

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：RAS、BRAF、TP53の変異の有無が異なる4種の大腸がん細胞株（HT-29、SW480、HCT116、DLD-1）の飢餓応答時と非飢餓時の細胞株を作製し、マルチオミクス解析として、ヒストン修飾（H3K4me3、H3K9me2、H3K27me3）を指標とするChIP-seqを行い、クロマチン構造の変化を見出した。Fucci導入細胞株では、オートファジーが活性化すると、G1/S期の割合が増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞は、低酸素、低栄養という過酷ながん微小環境下において、選択的淘汰を受けつつ、環境に適合するクローンへと進化を遂げる。その過程で、不要ながん細胞を自食して栄養源とし、生存し得る為のゲノム変異、エピゲノム異常を合わせて獲得することを連動させている可能性がある。本研究は、オートファジーの活性化シグナルの解明のみならず、飢餓応答としてのオートファジーの真の生物学的意義を解明する研究になる。

研究成果の概要（英文）：Multi-omics analysis of four colorectal cancer cell lines (HT-29, SW480, HCT116, DLD-1) with and without RAS, BRAF, and TP53 mutations was conducted and ChIP-seq using histone modification (H3K4me3, H3K9me2, H3K27me3) as an index revealed there was characteristic changes in chromatin structure. In the Fucci-introduced colorectal cancer cell lines, activation of autophagy increased the proportion of cells at G1/S phase.

研究分野：病理学

キーワード：オートファジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

応募者は、栄養飢餓応答によりオートファジー（自食作用）が誘導され、がん細胞の生存に働くことを *in vitro* の系を使って世界で初めて示した(文献1)。この論文までは、オートファジーが対象とする病態は、変性疾患、炎症疾患が中心であった。大腸の病理組織標本と抗 LC3 抗体による免疫組織化学的染色を用いた検討で、過形成性ポリープ、腺腫、癌腫が形成されること、腫瘍化、がん化過程において、オートファジーが段階的に活性化、増強すること等を見出した。続いてオートファジーの活性化が、がんの生物学的な態度にどのような影響を与えているかについて、膵がん組織を用いて検討した(文献2)。オートファジー活性化の指標として LC3 蛋白の発現を免疫組織化学的に評価した。腫瘍の辺縁部における LC3 蛋白の強発現と、予後不良、無病期間の短縮との間に有意な相関関係が存在した。さらに、LC3 蛋白の発現レベルと、腫瘍径、壊死という従来から膵がんの予後不良因子として認知されている臨床病理学的な因子との間に有意な相関関係を認めた。同時に HIF-1 $\alpha$ 、CA9 蛋白の発現との関係を検討し、オートファジーが低酸素や栄養飢餓等のがん微小環境に対する反応として捉えることができることも示した。これらの発表論文で、がん細胞が過酷な微小環境の変化に対応するべく、オートファジーを活性化し、より悪性度の高い形質を獲得して、生存していくことを示した(文献3)。一方で、応募者は、がん細胞ではヒストン修飾タンパクの発現が高く、がん抑制遺伝子をはじめとする遺伝子の発現改変を誘起し、ヒストン修飾タンパクの発現上昇が、ゲノム変異、MEK-ERK-E1k1 という生存シグナルの活性化によって起こることを見出した(文献4, 5, 6, 7)。以上より、がん細胞は、オートファジーの活性化と、ゲノム変異を起点としたシグナル伝達系活性化によるエピゲノム異常を合目的に行っていることが分かる。即ち、がん細胞は、オートファジーの活性化と新たなゲノム変異、エピゲノム異常の獲得を連携しながら、不要なクローンを淘汰して“生存”クローンを獲得し、増殖、進展していくことが指摘できることから、本研究を着想し、研究を開始した。

## 2. 研究の目的

がん細胞は、栄養飢餓応答としてオートファジーを活性化させて生存する。そして、がん細胞は低酸素、低栄養等の微小環境下でも増殖して転移を来す過程で、多段階的に多様なゲノム変異、エピゲノム異常を獲得する。がん細胞が生存、増殖し続ける過程において、ゲノム変異、エピゲノム異常が加わり、サブクローンを獲得し、生存し得ない細胞は淘汰され、その淘汰された細胞を自食して栄養源にしようとしてオートファジーを活性化させていることが想定される。ゲノム変異、エピゲノム異常の多様性の獲得と過酷な微小環境で生存し得るクローンを獲得する進化過程が、オートファジーと密接に絡んでいる可能性を指摘できる。本研究の目的は、がん微小環境下に対応する、がん細胞のゲノム変異、エピゲノム異常による生存に適合する進化したクローンの獲得とオートファジーの活性化の連携をマルチオミクス解析により明らかにすることであり、がん細胞の生存表現型の基盤構築の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

1) オートファジー活性化状態におけるゲノム変異、エピゲノム異常、トランスクリプトームの解明

オートファジーを活性化または抑制した場合の、ゲノム変異或いはエピゲノム異常についてマルチオミクス解析(ゲノム変異、エピゲノム異常、トランスクリプトームについての解析)を行う。栄養欠乏培地(アミノ酸とグルコース欠乏させる栄養飢餓培地)によってオートファジーを活性化する。主要なオートファジー関連タンパクをコードする遺伝子等の上流域を中心にクロマチン構造の変化を解析する。他、乳がん細胞株について、DNAメチル化状態を網羅的に解析するために RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing)法による解析を行い、オートファジーの活性化に寄与する可能性のある候補遺伝子のメチル化状態を解析する。

2) オートファジー活性化状態と細胞周期の関係についての解明

オートファジーによるがん細胞の生存、細胞死の機構の解明を細胞周期の状態から解明するために、細胞周期を測定する。より詳細に細胞周期について解析するために、Fucci 導入細胞株を作製する。mCherry-hCdt1(O,Q)導入細胞を Aria で PE-Tx-RED, positive population sorting し、10cm/dish までそれらの細胞が増えたら mVenus-hGeminin(M,N)を導入する。これらの導入細胞を Aria で PE-Tx-RED, FITC double positive population について sorting を行い、細胞周期の解析を行う。

## 4. 研究成果

飢餓応答時(栄養欠乏培地:アミノ酸とグルコース欠乏させる栄養飢餓培地を使用する)と非飢餓時の細胞株を作製した。実験に用いた細胞は、RAS、BRAF、TP53 の変異の有無が異なる4種の大腸がん細胞株 (HT-29, SW480, HCT116, DLD-1) であり、それらを飢餓応答時の状態を持続させ、飢餓耐性があるがん細胞とないがん細胞を細胞死、形態変化の視点から絞った。細胞死が顕著な細胞株と殆どない細胞株の代表として、それぞれ HCT116 と HT-29 に絞った。マルチオミクス解析として、ヒストン修飾(H3K4me3、H3K9me2、H3K27me3)を指標とする ChIP-seq を行い、特徴的なクロマチン構造を見出した。

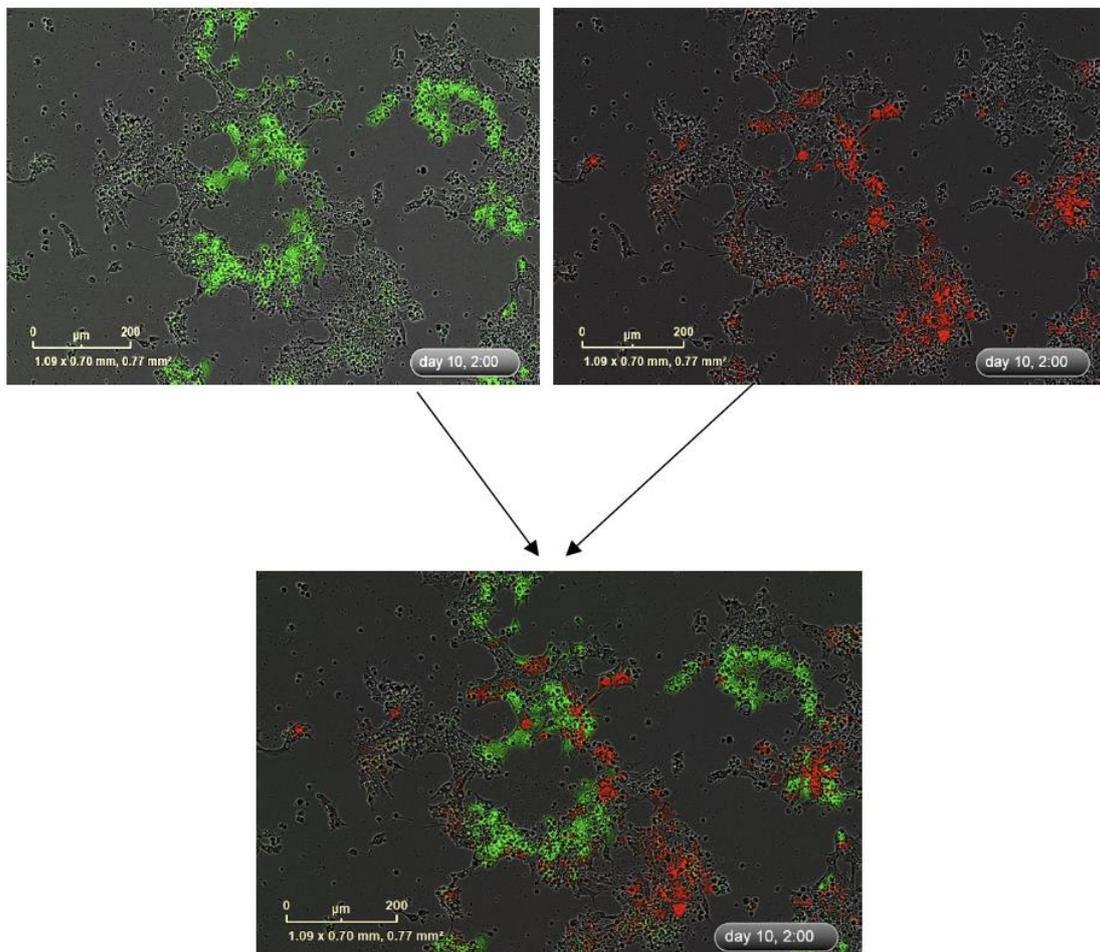
オートファジーによるがん細胞の生存、細胞死の機構の解明を細胞周期の状態から解明するために細胞周期を測定した。より詳細に細胞周期について解析するために、Fucci 導入細胞株を

作製した。その観察ではオートファジーを誘導すると、G1/S で停止する細胞の割合が増加した(下図)。

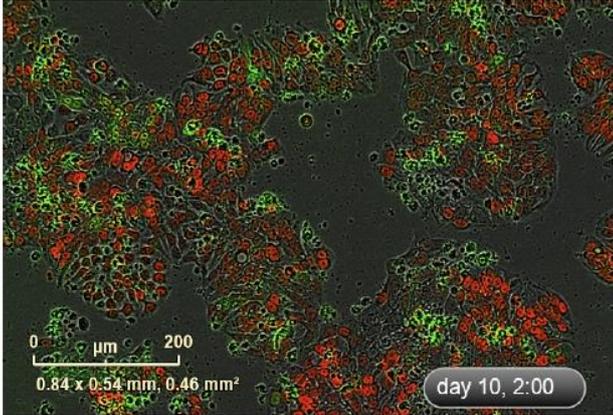
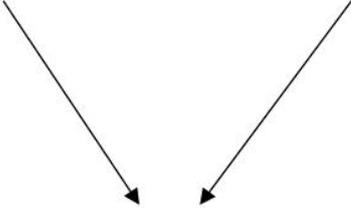
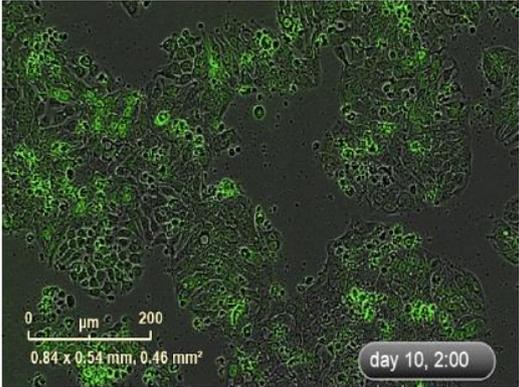
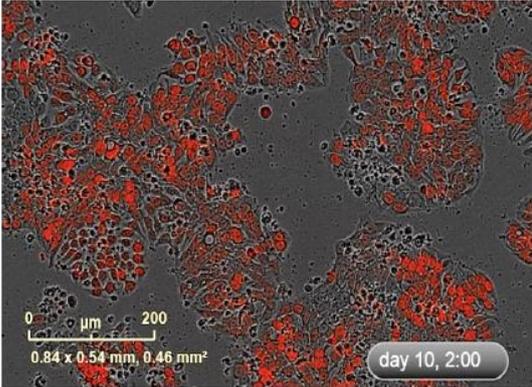
他、乳がん細胞株について、DNA メチル化状態を網羅的に解析するために RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing)法による解析を行い、オートファジーの活性化に寄与する可能性のある候補遺伝子のメチル化状態が判明した。

### Fucci 導入細胞株についての解析結果

#### HCT116 Autophagy(+) Day10



HT-29 Autophagy(+) Day10



## 引用文献

1. Sato K, Fujii S, et al. (他 7 人 ; 3 番目). Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Res.* 67:9677-84, 2007.
2. Fujii S, et al. (他 9 人 ; 1 番目). Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer Sci.* 99:1813-9, 2008.
3. Tsuchihara K, Fujii S, et al. (他 1 人 ; 2 番目). Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. *Cancer Lett.* 278:130-8, 2009.
4. Fujii S, et al. (他 1 人 ; 1 番目). Enhancer of zeste homolog 2 downregulates E-cadherin by mediating histone H3 methylation in gastric cancer cells. *Cancer Sci.* 99:738-46, 2008.
5. Fujii S, et al. (他 3 人 ; 1 番目). Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) down-regulates RUNX3 by increasing histone H3 methylation. *J Biol Chem.* 283:17324-32, 2008.
6. Fujii S, et al. (他 6 人 ; 1 番目). MEK-ERK pathway regulates EZH2 overexpression in association with aggressive breast cancer subtypes. *Oncogene.* 30:4118-28, 2011.
7. Fujii S, et al. (他 5 人 ; 1 番目). RAS oncogenic signal upregulates EZH2 in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 417:1074-9, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 穰  (Suzuki Yutaka)  (40323646)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授    (12601)	