

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08650

研究課題名(和文) 低酸素誘導性ミトコンドリア休眠(HiMS)障害による胃癌悪性度増強機序の解明

研究課題名(英文) Impaired hypoxia-induced mitochondrial sleep may increase malignant behavior of gastric cancer cells

研究代表者

北島 吉彦 (Kitajima, Yoshihiko)

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30234256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素環境下(1%O₂)でROS上昇とともに浸潤能が亢進する58As9ではMQCが障害されていることが推測された。一方、低酸素下で低浸潤能を維持するMKN45ではROS上昇がみられずMQCが正常であると思われた。平成30年：MKN45のMieap発現が低酸素誘導性MQCを制御する責任分子であることを示した。令和元年：iTRAQ法を用いてプロテオーム解析を行い、MKN45で低酸素下で発現量が減少するミトコンドリアタンパクを5種類抽出した。令和2年：58As9株でのMMP-1は低酸素環境下での浸潤能亢進の責任遺伝子であること、さらにHIF-1のターゲット遺伝子であることを立証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、低酸素環境下にある固形癌では、MALMというミトコンドリア品質管理機構の破綻が契機となり、細胞内にROSが蓄積することで浸潤能が亢進し、癌悪性度を増強することを胃癌細胞株を用いて証明した。さらにmieapがMALM機序には必須な遺伝子であることも立証した。さらにこの低酸素下での胃癌細胞浸潤能亢進には、HIF-1ターゲット遺伝子であるMMP-1の低酸素発現誘導が重要であることも立証した。本研究は、生体内では低酸素環境下に置かれている固形癌の悪性度増強がmieap発現を基軸にしたMALMという新たな機序により惹起されることを初めて立証した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used two GC cell lines. 58As9 GC cells increased ROS accumulation and cancer invasion under hypoxia whereas MKN45 cells do not alter invasion or ROS accumulation. 2019: Mieap expression was observed in MKN45, but not in 58As9 cells. We demonstrated mieap plays a central role in controlling ROS production and cancer invasion in GC cells under hypoxia. We reported these evidences in Scientific Reports in 2020. 2020: Using iTRAQ technology, we tried to isolate mitochondria proteins, which is specifically expressed in MKN45, but not in 58As9. However we failed to isolate significant protein. 2021: In this year, we tried to isolate HIF-1 target gene, which is specifically expressed in 58As9 cells and contributes to hypoxia-induced cancer invasion. As a result, we demonstrated MMP-1 expression is a HIF-1 target and essential in hypoxia-induced cancer invasion in 58As9 cells.

研究分野：gastric cancer

キーワード：HIF-1 ROS mieap MALM MMP-1 hypoxia

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

固形癌の低酸素環境は癌悪性度(浸潤・転移能、放射線・抗がん剤耐性)を亢進させる。また、低酸素環境はミトコンドリアでの電子伝達系(ETC)効率を阻害し、活性酸素(ROS)産生増強 癌悪性度亢進に作用する(Chandel NS. Mol Cell 2012)。低酸素下 ROS 産生能は個々の癌細胞で異なるが、その原因については未知な部分が多い。ミトコンドリア品質管理(Mitochondria quality control: MQC) はミトコンドリアでの余剰 ROS 産生を制御するホメオスタシス機構である。MQC では ROS 障害を受けたミトコンドリアが選択的に排除あるいは修復される。代表的 MQC 機構としては選択的オートファジーであるマイトファジー(障害ミトコンドリアのライソソーム内取込み 消化)が知られている(Ding WX. Bio Chem 2012)。近年、荒川らは Mieap(mitochondria eating protein)がミトコンドリア外膜上で BNIP3 と複合体を形成し、ライソソームのミトコンドリア内移入を誘導し、ROS による酸化を受けたタンパクを消化・修復する MQC 機序 MALM(mieap-induced accumulation of lysosome-like organelles within mitochondria)を提唱し報告している (Miyamoto Y. PLoS ONE 2011)。

これまで研究代表者(代表者)は低酸素環境下(1%O₂)で浸潤能が顕著に亢進する胃癌細胞株 58As9 では低酸素経時的に ROS が増加するのに対し、低酸素下でも低浸潤能を維持する MKN45 では ROS 上昇がみられない事を見出した(図1)。さらに蛍光顕微鏡解析にて MKN45 では低酸素下にてライソソームがミトコンドリアに集積するが 58As9 ではその集積を認めなかった。以上より、MKN45 では低酸素誘導性 MQC が正常作動し ROS 産生が制御されるが、58As9 では低酸素誘導性 MQC が障害されており余剰 ROS 蓄積 浸潤能が亢進する機序が示唆された(Shida M. Int J Oncol 2016⁴)。その後、MKN45、58As9 間での MQC 関連遺伝子の発現比較を行った。マイトファジー関連遺伝子 Parkin, PINK1, FUNDC1 発現は 2 細胞株間に差を認めなかった。さらに MKN45 のミトコンドリア総量は常・低酸素間で不変であったため、マイトファジーは誘導されないことが示唆された。一方、MALM 責任遺伝子 Mieap 発現を RT-PCR・WB 解析すると、58As9 にのみ Mieap 発現が欠失していることを見出した(図2)。尚、MKN45 の Mieap 発現は常・低酸素間で差を認めなかったが、Mieap と複合体を形成する BNIP3 は顕著な低酸素誘導性発現を認めた(data not shown)。よって代表者は、この時点では MKN45 の低酸素誘導性 MQC は mieap/BNIP を介した MALM 機序によると推測した。

図1 低酸素環境での胃癌細胞株58As9、MKN45の浸潤能とROS産生

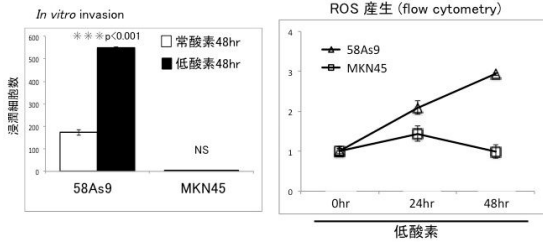
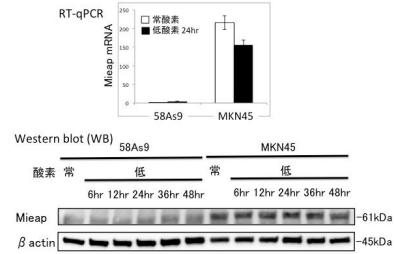


図2 胃癌細胞株58As9、MKN45でのMieap発現解析



2. 研究の目的

mieap 発現の低酸素環境下ミトコンドリア品質管理機構に果たす役割を胃癌細胞株を用い解析・検討する

3. 研究の方法

(1)低酸素下MKN45でのミトコンドリア内ライソソーム移入をライソソームマーカーのミトコンドリア分画内存在をWBにて立証する。(2)Mieap発現がライソソーム移入に必須であることをMKN45のMieap-KD株を用い立証する。(3)MKN45, 58As9のエネルギー代謝解析(酸素消費速度(OCR)・細胞外乳酸産生量)を行い、低酸素下のOCR(ETC指標)/乳酸量(解糖系指標)比がMKN45<58As9となることを立証する。(4)Mieap KD株を用いMieap発現が低酸素下MKN45のエネルギー代謝変容(ETC休止)に必須であることを立証する。(5)Mieapがミトコンドリア内ライソソーム移入・エネルギー代謝変容に必須であることを立証する。(6)MKN45 Mieap-KD株での低酸素下ROS上昇/浸潤能亢進を立証する。

4. 研究成果

(1) 平成 30 年度

2細胞株：Mieapを発現する胃癌細胞株MKN45およびMieap発現のない胃癌細胞株。MKN45-Mieapノックダウン株：KDおよびコントロールSC株。MKN45は低酸素下にて活性酸素(ROS)産生上昇なく、低癌浸潤能。58As9は低酸素下にてROSが上昇し、高癌浸潤能を示した。MKN45では低酸素下でライソソームのミトコンドリア内侵入が見られ、ミトコンドリア品質管理機構が正常に作動する結果、ROS産生が制御され癌浸潤を抑制していることが推測された。一方、58As9では低酸素下でライソソームのミトコンドリア内侵入は見られず、ミトコンドリア品質管理機構が破綻した結果、ROS上昇し癌浸潤が亢進していると推測された。MKN45の低酸素下ライソソーム侵入がMieapを介して行われていることをKD, SC株を用いて証明した。KD株では58As9と同じように低酸素下にてROSが上昇し、高癌浸潤能を示した。また、Mieap発現があると低酸素下にてライソソームタンパクであるカテプシンDがミトコンドリア分画に認められることをウエスタンブロットにて証明した。以上の研究結果は世界的なonline journalであるScientific Reports に投稿し受理された。

(2) 令和元年度

MKN45 では、低酸素誘導性 MALM によりライソソームがミトコンドリア内に侵入し、何らかのミトコンドリアタンパクを消化することでミトコンドリア品質管理(MQC)を維持し、ROS 産生を制御し癌浸潤能を抑えていることが推測された。そこで H31 年 2 月より iTRAQ 法を用いてプロテオーム解析に着手した。(iTRAQ によるプロテオーム解析)
その結果、低酸素環境下 48 時間で培養した MKN45 で常酸素環境に比し、極端に発現量が減少するミトコンドリアタンパクを 5 種類抽出することに成功した。しかしながら、WB 法で再現性が得られずこの研究計画は頓挫した。

(3) 令和 2 年度

令和 2 年度は、視点を変えて mieap 発現がなく低酸素下で高浸潤能を示す 58As9 株の浸潤能責任遺伝子を同定することを立案した。まず、過去の論文で癌細胞の低酸素環境下での浸潤能亢進に寄与する遺伝子を探索したところ、RhoA, AMFR, ROCK1, S100A4, uPAR, MMP-1, MMP-7, MMP-14, c-Met および LOXL2 が候補遺伝子として挙げられた。次に低酸素下で高浸潤能を示す 58As9 株と低浸潤能株 MKN45 を用いて上記した 10 候補遺伝子の mRNA 発現を RT-PCR にて解析した。その結果、MMP-1 mRNA のみが 58As9 株で低酸素にて発現誘導された。58As9 株では MMP-1 遺伝子が低酸素環境において HIF-1 により転写誘導されると想定された。そこでこの推測を証明するために 58As9 株を用いて MMP-1KD 株を樹立し、HIF-1KD 株とともに MMP-1 の RT-PCR を行った。その結果、HIF-1KD 株および MMP-1KD 株は、58As9 親株に比し、MMP-1 の低酸素誘導発現が消失していた。さらに HIF-1KD 株、MMP-1KD 株共に *in vitro* 浸潤能は親株に比し激減した。以上より、58As9 株において MMP-1 は低酸素環境下での浸潤能亢進の責任遺伝子であること、さらには HIF-1 のターゲット遺伝子であることが明白となった。一方では、MMP-1 発現がなく低浸潤能を示した MKN45 において MMP-1 無発現の機序を解明するために 5-aza-dC および TSA を MKN45 に添加し、MMP-1 の発現を解析したところ、5-aza-dC+TSA 併用投与により MKN45 の MMP-1 発現復帰が見られた。これより MKN45 においては MMP-1 の無発現は epigenetic gene silencing によることが明らかとなった。今後、胃癌切除標本を用いて MMP-1 発現と癌悪性度および患者予後に与える関連性を解析していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okuyama Keiichiro, Kitajima Yoshihiko, Egawa Noriyuki, Kitagawa Hiroshi, Ito Kotaro, Aishima	4. 巻 9
2. 論文標題 Mieap-induced accumulation of lysosomes within mitochondria (MALM) regulates gastric cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39563-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥山桂一郎
2. 発表標題 Mieap誘導性MALMは低酸素胃癌細胞での浸潤能増強をミトコンドリアROSを抑制することで制御している
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

〔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	田中 智和 (Tanaka Tomokazu) (60781903)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	
研究分担者	能城 浩和 (Noshiro Hirokazu) (90301340)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------