

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06657

研究課題名（和文）がん幹細胞性におけるミトコンドリア動態の果たす役割を明らかにする

研究課題名（英文）Exploring the role of mitochondrial dynamics in cancer stemless

研究代表者

笠原 敦子（KASAHARA, Atsuko）

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：00447244

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアの多彩な機能に関わる形態を制御する因子が、がん細胞の悪性形質の獲得や維持にどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。分子標的薬耐性肺がん細胞はミトコンドリア融合因子OPA1発現上昇によりその耐性を維持しており、OPA1の阻害により薬剤耐性が解除されることを示した。がん細胞は正常細胞に比べ、ミトコンドリア形態変化によるカルシウム制御が異なることを観察した。一方で、ミトコンドリア動態制御因子が悪性形質に関与することが報告されているグリオーマ細胞や、分子標的薬耐性肺がん細胞のミトコンドリア動態制御因子の発現を制御する上流因子の同定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア形態制御因子の発現を制御する上流因子の同定には至らなかったが、それは、悪性度の増したがん細胞は、より複雑に複数の生存シグナルを強化していると考えられる。一方で、ミトコンドリア動態は抗がん剤治療耐性となったがん細胞の耐性維持因子となっており、ミトコンドリア内膜融合因子を標的にすることで耐性を解除することができた。本研究の成果は、ミトコンドリア動態を治療標的とすることで、治療耐性となったがん細胞を駆逐する新規のがん治療研究となり、今後も他のがんでミトコンドリア動態の治療標的としての可能性を探りたい。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to understand how “mitochondria-shaping proteins” could be involved in the malignant phenotypes of cancer cells. Gefitinib-resistance lung adenocarcinoma cells maintain their resistance by mitochondrial inner membrane profusion factor OPA1 up-regulation, and down-regulation or pharmacological inhibition of OPA1 restore their gefitinib resistance. Prostate cancer cells display different calcium regulation upon mitochondrial shape alteration compared to healthy prostate cells. It was unsuccessful in identifying the upstream regulators to control the expression of “mitochondria-shaping” proteins that contribute to the malignant phenotypes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア動態

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、糖・アミノ酸・脂質代謝、 $Ca^{2+}$ をはじめとするイオンレベルの調整、またアポトーシスの制御に関与し、細胞最大のエネルギー産生を行う細胞小器官である。ミトコンドリアは、その融合と分裂が適切に調節されることで、細胞に必要な形態を示し、多彩な機能を維持している。外膜融合因子 Mitofusin (MFN) 1, 2, 内膜融合因子 Optic Atrophy 1 (OPA1), 細胞質局在の分裂因子 Dynamin-Related Protein 1 (DRP1) が主なミトコンドリア形態制御因子として、それらの GTPase 活性を発揮することでミトコンドリアの形態を制御し、幹細胞や分化細胞、さらには悪性がん細胞に必要なミトコンドリア形態を維持している。

細胞の分化や生死という重大な運命決定に、ミトコンドリアの機能や形態制御因子は重要である。しかし、悪性度の増したがん細胞の生存戦略において、ミトコンドリアの機能を最大限に発揮するために必要な細胞内局在や形態を制御する分子の役割は少しずつわかってきている状況である。申請者や他のグループによって、造腫瘍性を維持したグリオーマ細胞のミトコンドリアは短い形態を示すのに対し、造腫瘍性を失い、抗がん剤感受性となったグリオーマ細胞のミトコンドリアは長く伸長していることが報告され、このミトコンドリアの形態の違いと分裂因子 DRP1 の発現は相関し、DRP1 はグリオーマ細胞の悪性形質に直接関与していることがわかっている (Nat Neurosci 2015, EMBO J 2017)。しかし、この DRP1 発現を制御する上流因子はわかっていない。

申請者らは造腫瘍性を維持したグリオーマ細胞の短いミトコンドリアが、小胞体から離れており、そのためにミトコンドリアの  $Ca^{2+}$  取り込みが低下していることも示した (EMBO J 2017)。

ストア作動性  $Ca^{2+}$  流入は、小胞体貯蔵  $Ca^{2+}$  欠乏時に生じ、関わる細胞膜チャネルの発現量は、がんの転移や細胞死に関与する。一方で、申請者や他のグループによって、ミトコンドリアの細胞内局在がストア作動性  $Ca^{2+}$  流入を変化させることがわかっている (J Cell Biol 1997, Science 2013, PLoS One 2014, EMBO J 2017)。がん細胞において、ミトコンドリアの形態とストア作動性  $Ca^{2+}$  流入の関係はわかっていない。

これまでに申請者らは、分子標的薬耐性肺がん細胞で OPA1 の過剰な発現上昇を見出している。OPA1 は内膜クリステ構造制御によって、cytochrome c の放出に直接関与するため、耐性細胞は OPA1 過剰発現により抗アポトーシスとなっている。一方で、抗がん剤耐性を維持する OPA1 発現を制御する上流因子は全くわかっていない。

### 2. 研究の目的

悪性度の増したがん細胞で、ミトコンドリア形態制御因子の発現を上昇させている上流因子の同定、またがん細胞において、ミトコンドリア動態がストア作動性  $Ca^{2+}$  流入に与える影響について明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

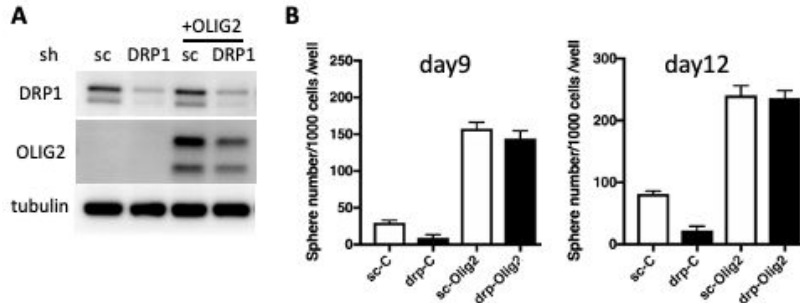
転写因子 OLIG2 は、過剰発現によりグリオーマ細胞培養での造腫瘍能力に相当する 3D-sphere 形性能が上昇することがわかっている。そこで、Olig2 過剰発現による DRP1 の発現、Olig2 過剰発現グリオーマ細胞で DRP1 の発現低下した時の sphere 形性能を評価した。EGFR 阻害剤耐性肺がん細胞 PC9M2 で、OPA1 発現を上昇させている因子として、c-myc, microRNA を検討した。

ストア作動性  $Ca^{2+}$  流入は、細胞質  $Ca^{2+}$  指示薬 Fura2-AM を用い、Sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA) を Thapsigargin で阻害し、小胞体  $Ca^{2+}$  貯蔵を欠乏させ、 $Ca^{2+}$  の添加により、細胞質

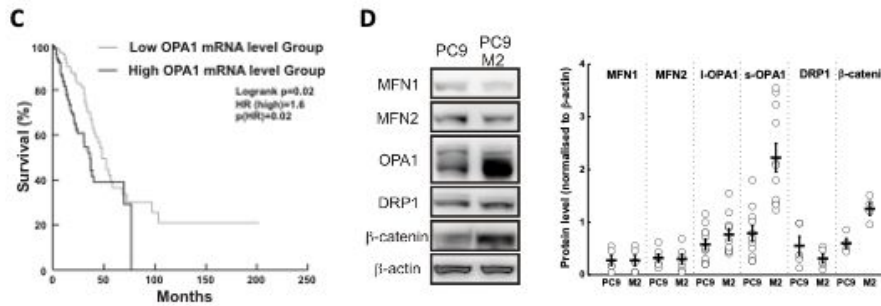
Ca<sup>2+</sup>の上昇を観察した。

#### 4. 研究成果

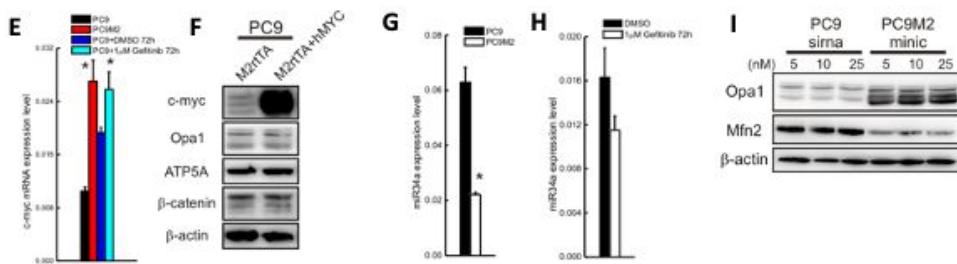
OLOG2 の過剰発現によっても、DRP1 の発現量は変化なかった (図 A)。また、DRP1 の発現低下によって、sphere 形性能は低下するが、OLIG2 過剰発現下ではその効果が覆われてしまうことがわかった (図 B)。



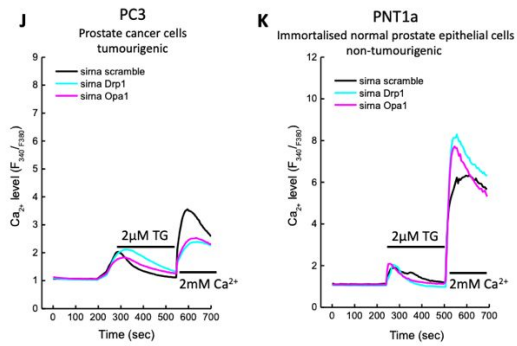
抗がん剤治療を受けた肺がん患者の OPA1 発現が高いグループは低いグループに比べその予後が悪く (図 C)、分子標的薬耐性肺がん細胞 PC9M2 も感受性細胞 PC9 に比べ OPA1 が過剰に発現している (図 D)が、この OPA1 の過剰発現させる上流因子の同定を試みた。



PC9M2 は PC9 に比べミトコンドリア呼吸が亢進しており、一方で c-myc はミトコンドリアの呼吸上昇やバイオジェネシスに関わることがわかっている。実際 PC9M2 では PC9 に比べ c-myc mRNA 発現は高く、PC9 に分子標的薬 (gefitinib) で処理することで、c-myc 発現が誘導された (図 E)。しかし、PC9 に c-myc を過剰発現させても、OPA1 のタンパク質発現は全く変化しなかった (図 F)。また、PC9M2 で発現の低下している miR34a (図 G)は、PC9 に gefitinib 処理することで PC9M2 のように発現が低下した (図 H)。そこで、PC9 には miR34a の siRNA を処理し、PC9M2 には miR34a mimic を処理したが、OPA1 の発現は全く変化しなかった (図 I)。



不死化前立腺正常細胞と前立腺がん細胞を用いて、ストア作動性 Ca<sup>2+</sup>流入を測定したところ、ミトコンドリア動態制御因子発現低下によって、ミトコンドリアを断片化、もしくは伸長させると、正常細胞ではストア作動性 Ca<sup>2+</sup>流入が上昇し、がん細胞では低下した (図 J, K)。



ミトコンドリア形態制御因子の発現を制御する上流因子の同定には至らなかったが、それは、悪性度の増したがん細胞は、より複雑に強力ながん遺伝子や生存シグナルを強化していると考えられる。一方で、ミトコンドリア動態は抗がん剤治療耐性となったがん細胞の耐性維持因子となっているため、標的にすることで耐性を解除することができることが確認できている。がん細胞でのミトコンドリア動態と Ca<sup>2+</sup>制御については、わからないことも多く、多様なシグナルと密接に関連する細胞質 Ca<sup>2+</sup>制御とミトコンドリア動態が、どのようにがん細胞の生存戦略に利用されているのか明らかにし、治療標的としての可能性を探りたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nomura Naho, Ito Chiaki, Ooshio Takako, Tadokoro Yuko, Kohno Susumu, Ueno Masaya, Kobayashi Masahiko, Kasahara Atsuko, Takase Yusuke, Kurayoshi Kenta, Si Sha, Takahashi Chiaki, Komatsu Masaaki, Yanagawa Toru, Hirao Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Essential role of autophagy in protecting neonatal haematopoietic stem cells from oxidative stress in a p62-independent manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81076-z	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

1. 著者名 Ueno Masaya, Tomita Takuya, Arakawa Hiroshi, Kakuta Takahiro, Yamagishi Tada-aki, Terakawa Jumpei, Daikoku Takiko, Horike Shin-ichi, Si Sha, Kurayoshi Kenta, Ito Chiaki, Kasahara Atsuko, Tadokoro Yuko, Kobayashi Masahiko, Fukuwatari Tsutomu, Tamai Ikumi, Hirao Atsushi, Ogoshi Tomoki	4. 巻 3
2. 論文標題 Pillar[6]arene acts as a biosensor for quantitative detection of a vitamin metabolite in crude biological samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42004-020-00430-w	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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 笠原敦子
2. 発表標題 幹細胞性におけるミトコンドリア動態の果たす役割について
3. 学会等名 第93回生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsuko Kasahara
2. 発表標題 Mitochondrial dynamics in malignant progression: retrograde control from mitochondria
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuko Kasahara
2. 発表標題 Mitochondrial dynamics and intraorganellar contact sites in stemness and differentiation
3. 学会等名 第94回生化学会大会
4. 発表年 2021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

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