

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32622
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K07390
研究課題名(和文)呼吸鎖複合体I由来NAD+を介した代謝-増殖共役機構の解明と新規がん治療への応用

研究課題名(英文)Impact of mitochondrial complex I activity on cancer cell proliferation: importance of NAD+ levels

研究代表者
森 一憲 (Kazunori, Mori)

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号：60349040
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、癌細胞における呼吸鎖機能と増殖能の関連性について検討し、呼吸鎖複合体Iから供給されるNAD+により細胞周期抑制因子p21Cip1の遺伝子発現が抑制されることを見出した。さらに、その制御機構として、NAD+依存性脱アセチル化酵素SIRT6によるヒストンのアセチル化修飾が関与することを見出した。本機構は、エネルギー代謝と細胞増殖の共役に意義を持つと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
活発に増殖する癌細胞は、正常細胞とは異なる代謝様式をとっており、このような癌特異な代謝様式は、有用性の高い新たな創薬標的として期待されている。本研究では、エネルギー代謝と細胞増殖を共役させる機構として、ミトコンドリア呼吸鎖複合体Iの機能が、NAD+を介して増殖を制御することを明らかにした。また、本機構による増殖制御は、臓器やサブタイプが異なる癌細胞でも確認できた。癌細胞の代謝様式の変化は、活発な増殖能が基盤となっていることから、臓器特異性は低く、その臨床応用においては、臓器横断的な治療法への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Electron transport chain (ETC) activity plays a critical role in bioenergetics and redox control as well as impacts cancer cell proliferation. In this study, we identified an important role of NADH dehydrogenase activity of mitochondrial ETC complex I in the regulation of cancer cell proliferation. The depletion of a core subunit of NADH dehydrogenase significantly reduced intracellular NAD+ levels and induced cell cycle arrest at the G1 phase in human mammary and hepatocellular carcinoma cells. Conversely, increasing NAD+ levels attenuated p21Cip1 upregulation. Further, histone acetylation within the p21Cip1 promoter was elevated concurrently with NAD+ reduction. Sirtuin 6, a class III Histone Deacetylase among NAD+-consuming enzymes, senses reduced levels of NAD+ and contributes to the transactivation of p21Cip1. Our study uncovered a novel mechanism in cancer cells where an imbalance in NAD+/NADH is linked with cell cycle arrest via p21Cip1-induction.

研究分野：細胞生物・分子生物学

キーワード：ミトコンドリア呼吸鎖 サイクリン依存性キナーゼ阻害因子p21Cip1 NAD+

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、呼吸鎖でのエネルギー産生だけでなく、アミノ酸や脂肪酸の代謝、細胞内レドックス制御にも関わる多機能なオルガネラである。その中で、TCA 回路は代謝経路の重要なハブとして機能しているが、癌細胞ではその中間体 (クエン酸、 α -ケトグルタル酸) を経由する代謝が亢進しており、生体高分子の材料とエネルギーを供給している。一方、呼吸鎖機能については、癌細胞の生存や増殖にどのように関わっているかまだ不明な点が多い。癌細胞は ATP 産生を解糖系に依存しており、さらにグルコース以外の栄養源からもエネルギーを産生できるため、呼吸鎖は少なくとも ATP 産生には必須ではない。

申請者は、癌細胞における呼吸鎖機能の生物学的意義を明らかにするために、研究を進めている。その一環として、癌細胞の呼吸鎖機能と増殖能の関連を調べるため、 ρ^0 細胞 (ミトコンドリア DNA 枯渇細胞) を樹立したところ、癌細胞の増殖が著しく抑制された。また、ミトコンドリア DNA の複製/転写に必要な遺伝子 (TFAM、POLG) をノックダウンしてミトコンドリア DNA を枯渇させても、やはり増殖停止が観察された。意外にも、呼吸鎖を破綻させても ATP 量は正常レベルに維持されていたので、呼吸鎖は ATP 産生とは別に、癌細胞の増殖能の維持に必要であった。しかし、これらの実験では呼吸鎖機能全般を破綻させたために、詳細な情報を得られなかった。そこで、メカニズムの解析に当たり、各複合体をそれぞれ抑制して、細胞増殖に必要な呼吸鎖複合体を特定することを試みた。その結果、複合体 I コア酵素 (NADH:ユビキノ還元酵素) を抑制するだけで、呼吸鎖不全と同じ効果が得られることがわかった。さらに、この増殖停止は、サブタイプの異なる複数の乳癌細胞株でも観察されたため、乳癌で一般性のある増殖制御であると考えられた。酵素活性の低下によりミトコンドリア内の NAD^+ 量が減少するので、逆に NAD^+ 量を増加させて影響を調べたところ、増殖停止が観察されなくなり、増殖が回復した。従って、複合体 I は NAD^+ の供給源として機能し、 NAD^+ の産生を通して細胞増殖の制御に密接に関わっていることがわかった。本課題では、癌細胞の増殖能維持に機能しているメカニズムとして、ミトコンドリア内の NAD^+ レベルを感知して、エネルギー代謝と細胞周期の進行を共役させる新しい増殖機構の解明に取り組む。

2. 研究の目的

上述したように、これまでの研究により、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I が癌細胞の増殖に必要であることがわかった。本研究では、呼吸鎖複合体 I から供給される NAD^+ を感知して、癌細胞の増殖を制御するメカニズムを明らかにすることを目的とする。

本課題で取り組むエネルギー代謝-細胞増殖共役機構は、継続して取り組んでいる呼吸鎖機能と細胞増殖能に関する研究成果を基に、独自に展開する内容である。呼吸鎖活性、さらには複合体 I の機能が転写を介して増殖を制御する例はこれまでにないことから、新たな細胞の恒常性維持機構の解明につながることを期待できる。また、本機構による増殖抑制は、臓器やサブタイプが異なる癌細胞でも確認できた。癌細胞の代謝様式の変化は、その旺盛な増殖能が基盤となって生じていることから、臓器特異性は低く、先端的癌治療として臓器横断的な治療法開発への貢献を目指す。

3. 研究の方法

(1) ヒストンのアセチル化状態の変化：複合体 I の機能抑制に伴う NAD^+ の低下によりアセチル化ヒストンが増加するか、抗アセチル化ヒストン H3 (Lys9, Lys27) 抗体を用いた Western blotting で調べる。また、 $p21^{\text{Cip1}}$ プロモーター上の局所的なアセチル化状態については、抗アセチル化ヒストン H3 (Lys9, Lys27) 抗体を用いた CUT&RUN 法にて行う。また、他の実験データから、転写の活性化が示唆される場合には、ヒストン H3 の 4 番目のリジンのトリメチル化 (H3K4me3) についても CUT&RUN 法にて調べる。

(2) ヒストンのアセチル化を介する $p21^{\text{Cip1}}$ 遺伝子発現のエピジェネティック制御： $p21^{\text{Cip1}}$ 発現のエピジェネティックな制御について、遺伝子上流を含むルシフェラーゼレポーターを用いて、ミトコンドリア内 NAD^+ の低下に応答する転写制御領域を探索する。

(3) $p21^{\text{Cip1}}$ 発現制御に関与するヒストン修飾酵素の特定：ヒストンの修飾状態変化から、想定される酵素群の活性化剤または阻害剤を用いて、候補となる酵素を絞り込む。その後、候補酵素に対する siRNA を導入し、 $p21^{\text{Cip1}}$ が誘導されるか調べ、候補酵素とする。さらに、呼吸鎖複合体 I の下流で候補酵素が機能していることを調べるため、野生型発現系および酵素活性欠失変異体を構築する。これら発現系によって、呼吸鎖複合体 I 抑制時の $p21^{\text{Cip1}}$ 誘導が、酵素活性依存的に抑制されるか調べ、 $p21^{\text{Cip1}}$ 発現制御に関与する酵素を特定する。

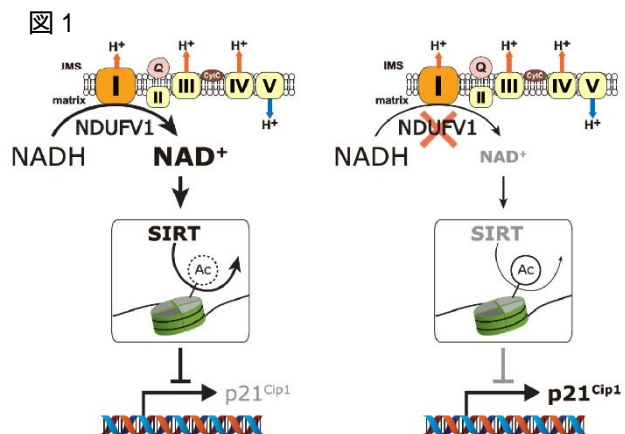
(4) ミトコンドリア NAD^+ 量の操作による $p21^{\text{Cip1}}$ 発現への影響：ミトコンドリア内の NAD^+ 量を操作するために、ミトコンドリア局在化配列を付加した NAD^+ 合成酵素 (*Lactobacillus* 属由来酵素 *LbNOX*, *Science* Vol. 352, p231-235 (2016)) を誘導型発現系で発現させる。細胞内 NAD^+ レベルが増加し、 NAD^+/NADH が上昇していることを確認する。その後、細胞増殖への影響を調べる。

4. 研究成果

(1) p21^{Cip1} 転写活性化に関する解析：p21^{Cip1} の転写活性化について、p21^{Cip1} 上流 2.2kbp を含む Luciferase レポーターを用いて、転写活性化に必要な領域として、転写開始点周辺の領域であることを特定した。様々な代謝経路に関わる NAD⁺ は、ヒストンや DNA の修飾酵素の基質となっていることから、その変動はエピジェネティックな遺伝子発現制御に関わる可能性がある。そこで、この領域についてヒストンの修飾変化について検討した結果、Luciferase assay で特定した転写開始点周辺ではヒストン H3K9 のアセチル化 (H3K9Ac) およびヒストン H3K4 のトリメチル化 (H3K4me3) が増加していた。一方、ヒストン H3K27 のアセチル化は変化しなかった。また、転写開始点ではない複数の他領域では H3K9Ac と H3K4me3 は変化しなかった。

(2) NAD⁺ およびその関連分子に関する解析：呼吸鎖複合体 I を抑制すると、p21^{Cip1} の転写開始点周辺では、活性化ヒストンマークである H3K9Ac と H3K4me3 が増加し、転写が活性化していることが示唆されたため、ヒストンのアセチル化およびメチル化修飾に関わる候補分子を探索した。まず、ヒストンの修飾に関わる酵素群の活性化剤および阻害剤を用いた検討を行った。その結果、複合体 I の抑制による p21^{Cip1} の誘導は、SIRT6 活性化剤存在下で誘導されなくなった。さらに、野生型 SIRT6 を発現させたところ、NADH: コピキノン還元酵素阻害による p21^{Cip1} は抑制された。一方、酵素活性欠失 SIRT6 変異体はこの p21^{Cip1} 誘導を抑制できなかった。したがって、本機構による p21^{Cip1} の転写活性化には、SIRT6 が H3K9Ac を脱アセチル化して p21^{Cip1} を抑制する可能性が考えられた。

(3) ミトコンドリア NAD⁺ 量の操作による細胞増殖への影響：ミトコンドリア内の NAD⁺ 量を操作するため、*Lactobacillus* 属由来 NAD⁺ 合成酵素 (*LbNOX*) の野生型およびミトコンドリア局在化配列を付加したミトコンドリア局在型の発現系を構築した。これらの安定発現株を樹立し、p21^{Cip1} 遺伝子発現への影響を調べた。*LbNOX* の過剰発現により、細胞内 NAD⁺ 量は増加し、呼吸鎖複合体 I の抑制する NAD⁺ 量は通常時と同程度まで回復した。さらに、p21^{Cip1} への影響を real-time RT-PCR 法、Western blotting 法で調べた結果、p21^{Cip1} の発現は mRNA レベルで抑制された。



これらの結果から、複合体 I は NAD⁺ の供給源として機能し、NAD⁺ の産生を通して細胞増殖の制御に密接に関わっていることが明らかになった。さらに、その制御に関わる因子として、p21^{Cip1}、NAD⁺ 依存性ヒストン脱アセチル化酵素クラス、サーチュイン 6 (SIRT6) を同定した。そのメカニズムとして、複合体 I から供給される NAD⁺ を感知して機能する SIRT6 が、NAD⁺ の低下により機能しなくなり、p21^{Cip1} 転写開始点周辺のヒストン H3K9 のアセチル化 (H3K9Ac) が亢進する結果、p21^{Cip1} の発現が誘導され、増殖停止に至ると考えられた (図 1)。

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 1件）

1. 著者名 Kazunori Mori, Masato Higurashi, Fumihiro Ishikawa, Motoko Shibamura	4. 巻 112
2. 論文標題 Rac1-mediated sustained 4 integrin level develops reattachment ability of breast cancer cells after anchorage loss.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3205-3217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14985.	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 Masato Higurashi, Tsuyoshi Maruyama, Yusuke Nogami, Fumihiro Ishikawa, Yukiko Yoshida, Kazunori Mori, Ken-ichi Fujita, Motoko Shibamura	4. 巻 389
2. 論文標題 High expression of FOXM1 critical for sustaining cell proliferation in mitochondrial DNA-less liver cancer cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 111889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2020.111889.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masato Higurashi, Kazunori Mori, Fumihiro Ishikawa, Motoko Shibamura
2. 発表標題 Epigenetic control of p21Cip1 expression and cell proliferation by respiratory chain complex I via NAD+ supply
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazunori Mori, Masato Higurashi, Fumihiro Ishikawa, Motoko Shibamura
2. 発表標題 Rac1-mediated and sustained 4 integrin expression supports persistence of reattachment ability in breast cancer cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsuyoshi Maruyama, Masato Higurashi, Kazunori Mori, Motoko Shibamura
2. 発表標題 HMGA2 is critical for sustaining cell proliferation in mtDNA-less hepatocellular carcinoma cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazunori Mori, Masato Higurashi, Fumihiro Ishikawa, Motoko Shibamura
2. 発表標題 The impact of mitochondrial complex I activity on p21Cip1 expression: the importance of NAD+ levels
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazunori Mori, Masato Higurashi, Fumihiro Ishikawa, Motoko Shibamura
2. 発表標題 Impact of mitochondrial complex I activity on cancer cell proliferation: importance of NAD+ levels
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日暮 大渡、森 一憲、石川 文博、柴沼 質子
2. 発表標題 ミトコンドリア呼吸鎖複合体IはNAD+の供給を介してp21Cip1の発現を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大学研究者情報・業績集
https://researchers-achievements.showa-u.ac.jp/profile/?user_id=c14311cf25d0e34e70203ec8f1ee49127cd36496
基礎薬学講座 腫瘍細胞生物学部門
<https://www.showa-u.ac.jp/education/pharm/major/cancer.html>

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	柴沼 質子 (Shibanuma Motoko) (60245876)	昭和大学・薬学部・教授 (32622)	
研究分担者	石川 文博 (Ishikawa Fumihiro) (60515667)	昭和大学・大学共同利用機関等の部局等・講師 (32622)	

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
---------	---------