

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08469

研究課題名(和文) 肝細胞癌における lncRNA による癌幹細胞制御メカニズムの解明と治療への応用

研究課題名(英文) Regulation of liver cancer stem cells by a lncRNA

研究代表者

土谷 博之 (TSUCHIYA, Hiroyuki)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：00403402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究により NEAT1 は、オートファジーの一種であるマイトファジーを誘導することで、放射線によって障害を受けたミトコンドリアの除去を促進していることが明らかになった。これによって肝細胞がんにおいて、がん幹細胞の特徴の一つである放射線抵抗性が、NEAT1 によりもたらされていることが示唆された。さらにこのメカニズムには、オートファジー誘導因子である GABARAP と、ミトコンドリア特異的な抗酸化酵素である SOD2 が関与していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な技術的進歩によって、近年、放射線治療の改善が進んでいる。肝細胞がんに対する放射線治療は現在のところほとんど行われていないが、このような技術革新の結果、症例数が今後増えていくのではないかと想定されている。本研究では肝細胞がんにおける放射線抵抗性誘導メカニズムの一端を解明した。今後、この成果を基に、放射線治療効果予測の診断法の開発といった、応用研究への発展が期待できる。また肝細胞がんは、高い効果を持つ治療法がほとんどないことから、今回の研究成果を基に放射線治療効果のさらなる改善を図ることで、肝細胞がん患者へさらなる治療選択肢をもたらすことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this present study, it was clarified that NEAT1 induces mitophagy, a mitochondria-specific autophagy, in hepatocellular carcinoma cells, and thereby promotes the removal of mitochondria injured by radiation. Therefore, it was concluded that NEAT1 confers HCC cells radioresistance that is one of the characters of cancer stem cells. It was further demonstrated that the underlying mechanism involves an autophagy inducer, GABARAP, and a mitochondria-specific anti-oxidative enzyme, SOD2.

研究分野：腫瘍学

キーワード：lncRNA ミトコンドリア オートファジー マイトファジー 放射線抵抗性 GABARAP SOD2 NEAT1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

NEAT1 は、核内小器官であるパラスペックルの形成に必要な長鎖非コード (lncRNA) として同定されたが、Neat1 欠損マウスは、雌性不妊である以外、明らかな表現型の異常を示さない (EMBO J. 2012;31:4020-4034, Development. 2014;141:4618-4627)。しかし、肝細胞がん (HCC) では悪性度に伴って NEAT1 が発現亢進することや、他の消化器癌では NEAT1 発現量と予後不良との相関が報告されている (Int J Clin Exp Pathol. 2015;8:5395-402, Oncotarget. 2017;8:17665-17683)。また HCC や前立腺癌では、高頻度な NEAT1 遺伝子変異と発癌や転移との関連が示唆されている (Nat Genet. 2016;48:500-509, Nat Genet. 2018;50:682-692)。また癌組織における NEAT1 の機能として、miR-613 や miR-485、miR-129-5p 等の癌抑制性 microRNA の機能阻害が報告されている (Cell Prolif. 2017;50:e12329, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2017;313:G150-G156, Biomed Pharmacother. 2017;94:612-618, J Cell Physiol. 2018;233:6733-6741)。しかしながら、HCC のがん幹細胞 (hepCSC) における NEAT1 の機能についてはこれまで報告はなく、本研究により新たな知見の獲得や革新的技術の開発が期待できると考えた。

CSC では OXPHOS が活性化しており、オリゴマイシンなどの OXPHOS 阻害剤に高い感受性を示す (Oncotarget. 2014;5:11029-11037, Oncotarget. 2015;6:14777-14795, Oncotarget. 2017;8:9868-9884)。UCP2 は脱共役により OXPHOS を抑制するが、癌細胞での機能的意義について結論は得られていない (PLoS One. 2012;7:e30714, Cell Cycle. 2013;12:172-182)。hepCSC における UCP2 の発現低下に注目した研究は、本研究課題が初めてである。

アデノウイルス複製に必要な E1 遺伝子を TERT プロモーター下流に組込んだアデノウイルス (TRAD) は、癌細胞特異的な細胞溶解活性を示す (Clin Cancer Res. 2004;10:285-292)。一方、hepCSC では TERT プロモーター活性化により TERT が発現亢進している (J Hepatol. 2013;59:746-752)。このため TRAD は hepCSC に対し、より強力な腫瘍溶解活性を発揮するものと考えられる。この TRAD に、さらに NEAT1 プロモーター依存的に UCP2 を発現する機能を付与した TRAD-NU は、本研究において初めて検討される技術である。

これまで申請者は、NEAT1 が hepCSC の誘導・維持に重要な lncRNA であることを明らかにした。また複数のヒト HCC 細胞株で、スフェロイド培養による UCP2 発現低下と NEAT1 発現上昇を示し、さらに NEAT1 欠損による UCP2 発現上昇を見出した。また予備的な結果ではあるが、CSC の OXPHOS 制御に関わる ATP 合成酵素 ATP5H (J Clin Inv. 2018;128:4098-4114) が、NEAT1 により発現誘導されていることを見出した。

これらの研究成果は、NEAT1 が UCP2 を介して hepCSC の OXPHOS を制御している可能性を示唆していると考え、本研究課題でそれを立証し、さらにこれを応用した HCC 治療法を開発することを着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、NEAT1 による OXPHOS 制御の検証と、これを介した hepCSC 制御メカニズムの解明である。さらにこのメカニズムに基づいた、新規腫瘍溶解性アデノウイルスの開発も目的としている。

学術的独自性と創造性 CSC の発生・維持に関わる重要なシグナル伝達経路として、WNT/ β カテニンや Hedgehog、NOTCH などの経路が知られているが、lncRNA による制御はほとんど解明されていない。また CSC における OXPHOS の機能的意義や活性制御メカニズムも不明である。本研究の学術的独自性は、lncRNA である NEAT1 による UCP2 の発現制御とその意義、すなわち OXPHOS 活性化を介した hepCSC 制御メカニズムの検証であり、この研究成果から腫瘍生物学における新たな研究領域の確立が期待できる。

またさらに本研究では、NEAT1 の機能解明を基にした臨床応用に関する検討も計画している。NEAT1 は、HCC だけでなく様々な腫瘍組織でも発癌や悪性化との関係が示唆されている。このことは、NEAT1 による CSC 制御メカニズムの普遍性を示唆する研究結果であり、NEAT1 が様々な腫瘍組織に対する予防・治療戦略の標的分子となりうることを示唆するものである。そのため NEAT1 によるメタボロームの解明は、HCC を始め様々な腫瘍に対し、リキッドバイオプシーによる早期発見や予後予測に有用である。また、腫瘍溶解性ウイルスは、免疫チェックポイント阻害剤とともに次世代の癌治療薬として注目を集めており、多くの製薬企業が開発に取り組み、大規模な臨床試験が現在進行中である。この腫瘍溶解性ウイルスに、CSC を抑制する機能を付与することで、腫瘍の縮退だけでなく再発抑制効果も併せ持つ革新的癌治療薬の創成が期待できる。

3. 研究の方法

NEAT1 の発現抑制は、CRISPR/Cas9 システムを使った KO 細胞株あるいはアデノウイルスベクターによる shRNA の過剰発現により、それぞれ行った。また NEAT1 の過剰発現は、発現ベクターを安定導入した過剰発現細胞株を作製した。GABARAP および SOD2 の発現抑制は、ア

デノウイルスベクターによる shRNA の過剰発現により行った。

放射線照射は、X 線照射装置 (MX-160Labo, mediXtec Japan, Chiba, Japan) を使って行った。放射線感受性は、コロニー形成アッセイにより評価した。

細胞内酸化ストレスは DCFDA/H2DCFDA - Cellular ROS Assay Kit (abcam, ab113851) により、ミトコンドリア酸化ストレスは MitoSOX™ Red (Thermo Fisher, M36008) により、それぞれ評価した。

4. 研究成果

(1) NEAT1 による GABARAP を介したオートファジー制御

NEAT1 による癌幹細胞制御メカニズムについて検討し、NEAT1 ノックアウト細胞では、オートファジーの抑制と、ネクロトーシスの増加が生じていることを明らかにした。またそれぞれを制御する NEAT1 の標的遺伝子として GABARAP と PELI1 が、それぞれ関与していることを明らかにした。オートファジーは細胞の代謝と深く関与していることから、OXPHOS との関連が強く示唆された。そこで以降の実験では、GABARAP とオートファジーに着目して実験を行った。

(2) NEAT1 による GABARAP および SOD2 を介したオートファジー誘導による放射線抵抗性

オートファジーは放射線照射によるがん細胞死誘導に深く関与している。そこで、HCC 細胞株に放射線を照射し、さらにその際、NEAT1 を過剰発現あるいはノックダウンすることで、放射線感受性に与える影響について検討を行った。その結果、NEAT1 はオートファジー誘導を促進することによって放射線抵抗性を促進していることがわかった。さらにこのメカニズムには、GABARAP とミトコンドリア特異的な抗酸化酵素である SOD2 が関与することが明らかになった。

(3) NEAT1 による GABARAP および SOD2 を介した放射線による酸化ストレス抑制

放射線照射後の細胞内酸化ストレスを測定した結果、NEAT1 による放射線による酸化ストレス亢進作用が軽減していた。このとき GABARAP および SOD2 をノックダウンしたところ酸化ストレスは再度上昇した。この結果から NEAT1 は GABARAP および SOD2 を介して、放射線による酸化ストレス誘導作用を抑制していたことが明らかになった。

さらにミトコンドリア由来スーパーオキシドに特異的な蛍光試薬を使って、同様の実験を行った。その結果、NEAT1 は放射線によるミトコンドリア障害とそれに伴う酸化ストレスを軽減すること、この作用には GABARAP と SOD2 が関与することを明らかにした。

(4) NEAT1 によるマイトファジー誘導

放射線を照射した HCC 細胞株では、ミトコンドリア由来酸化ストレスの亢進とともにミトコンドリア DNA 量が上昇していた。このことは放射線により障害を受けたミトコンドリアの除去が進んでいない可能性を示唆している。一方、NEAT1 過剰発現細胞では、放射線照射後でもミトコンドリア由来酸化ストレスは軽減しており、さらにミトコンドリア DNA の上昇も起きていなかった。このことから NEAT1 は、オートファジーの一種であるマイトファジーを誘導することで、放射線によって障害を受けたミトコンドリアの除去を促進していることが明らかになった。現在、NEAT1 によるマイトファジー誘導の詳細なメカニズムについて検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Tsuchiya Hiroyuki, Shiota Goshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Immune evasion by cancer stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 20 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2021.02.006	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 -
1. 著者名 Tsuchiya Hiroyuki, Shiota Goshi	4. 巻 64
2. 論文標題 Clinical and Biological Implications of Cancer Stem Cells in Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Yonago Acta Medica	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.33160/yam.2021.02.002	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 -
1. 著者名 Koyama Shigemi, Tsuchiya Hiroyuki, Amisaki Masataka, Sakaguchi Hiromi, Honjo Soichiro, Fujiwara Yoshiyuki, Shiota Goshi	4. 巻 21
2. 論文標題 NEAT1 is Required for the Expression of the Liver Cancer Stem Cell Marker CD44	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1927 ~ 1927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21061927	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 -
1. 著者名 Hoi Shotaro, Tsuchiya Hiroyuki, Itaba Noriko, Suzuki Kyosuke, Oka Hiroyuki, Morimoto Minoru, Takata Tomoaki, Isomoto Hajime, Shiota Goshi	4. 巻 -
2. 論文標題 WNT/ catenin signal inhibitor IC 2?derived small molecule compounds suppress TGF 1?induced fibrogenic response of renal epithelial cells by inhibiting SMAD2/3 signalling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology	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) 10.1111/1440-1681.13270	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 -

1. 著者名 Hiroyuki Tsuchiya, Masataka Amisaki, Ai Takenaga, Soichiro Honjo, Yoshiyuki Fujiwara, Goshi Shiota.	4. 巻 20
2. 論文標題 HBx and c-MYC Cooperate to Induce URI1 Expression in HBV-Related Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5714 ~ 5714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20225714	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 -

1. 著者名 Asai Ryoma, Tsuchiya Hiroyuki, Amisaki Masataka, Makimoto Kazuki, Takenaga Ai, Sakabe Tomohiko, Hoi Shotaro, Koyama Shigemi, Shiota Goshi	4. 巻 8
2. 論文標題 CD44 standard isoform is involved in maintenance of cancer stem cells of a hepatocellular carcinoma cell line	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 773 ~ 782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.1968	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 -

1. 著者名 Amisaki Masataka, Tsuchiya Hiroyuki, Sakabe Tomohiko, Fujiwara Yoshiyuki, Shiota Goshi	4. 巻 110
2. 論文標題 Identification of genes involved in the regulation of TERT in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 550 ~ 560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13884	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 -

1. 著者名 Suzuki Tetsuya, Wakao Yusuke, Watanabe Tadashi, Hori Mika, Ikeda Yoshito, Tsuchiya Hiroyuki, Kogure Kentaro, Harada-Shiba Mariko, Fujimuro Masahiro, Kamiya Hiroyuki	4. 巻 38
2. 論文標題 No enhancing effects of plasmid-specific histone acetyltransferase recruitment system on transgene expression in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 942 ~ 949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2019.1638514	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 -

1. 著者名 土谷博之、朝井良磨、汐田剛史	4. 巻 51
2. 論文標題 CD44による肝細胞癌の悪性化メカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 55～57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 土谷博之、朝井良磨、汐田剛史	4. 巻 34
2. 論文標題 肝癌におけるCD44の機能	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 85～87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Hiromi Sakaguchi, Hiroyuki Tsuchiya, Yutaka Kitagawa, Tomohiko Tanino, Kenji Yoshida, Nobue Uchida, Goshi Shiota	4. 巻 23
2. 論文標題 NEAT1 Confers Radioresistance to Hepatocellular Carcinoma Cells by Inducing Autophagy through GABARAP	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23020711	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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 土谷博之、汐田剛史
2. 発表標題 肝細胞癌における長鎖非コードRNA NEAT1によるCD44の発現誘導
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土谷博之、汐田剛史
2. 発表標題 NEAT1による肝癌幹細胞の制御に対するp21CDKN1Aの抑制機能
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂口弘美、土谷博之、汐田剛史
2. 発表標題 肝細胞癌におけるlncRNA NEAT1によるオートファジー制御
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土谷博之、網崎正孝、本城総一郎、藤原義之、汐田剛史
2. 発表標題 肝細胞癌における長鎖非コードRNA NEAT1の発現と予後との関連
3. 学会等名 第16回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土谷博之、網崎正孝、本城総一郎、藤原義之、汐田剛史
2. 発表標題 肝細胞癌における長鎖非コードRNA NEAT1とCD44発現および予後との関連
3. 学会等名 第31回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土谷博之、汐田剛史
2. 発表標題 長鎖非コードRNA NEAT1とp21CDKN1Aによる肝癌幹細胞制御メカニズム
3. 学会等名 第31回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土谷博之、汐田剛史
2. 発表標題 長鎖非コードRNA NEAT1による肝癌幹細胞マーカーCD44の発現誘導
3. 学会等名 第27回肝細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土谷博之、汐田剛史
2. 発表標題 肝細胞癌における長鎖非コードRNA NEAT1による癌幹細胞制御機能
3. 学会等名 第26回肝細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹永亜衣、土谷博之、汐田剛史
2. 発表標題 HBV関連肝発癌のメカニズム：HBxとc-MYCによるURI1発現誘導作用
3. 学会等名 第26回肝細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土谷博之、汐田剛史
2. 発表標題 LncRNA NEAT1によるCD44非依存的な肝癌幹細胞の制御
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土谷博之、汐田剛史
2. 発表標題 長鎖非コードRNA NEAT1による肝癌幹細胞維持メカニズム
3. 学会等名 第15回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土谷博之、汐田剛史
2. 発表標題 LncRNA NEAT1によるCD44非依存的な肝癌幹細胞の制御
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土谷博之、網崎正孝、本城総一郎、藤原義之、汐田剛史
2. 発表標題 肝細胞癌においてテロメラーゼ逆転写酵素の発現を制御する新たな因子の同定
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土谷博之、汐田剛史
2. 発表標題 肝細胞癌における長鎖非コードRNA NEAT1による癌幹細胞制御
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2019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	坂部 友彦 (SAKABE Tomohiko) (50639747)	鳥取大学・医学部・助教 (15101)	

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