

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17460

研究課題名（和文）IncRNAによる癌幹細胞制御メカニズムに基づいた肝細胞癌治療・診断法の開発

研究課題名（英文）Development of hepatocellular carcinoma treatment and diagnostic methods based on the mechanism of cancer stem cell regulation by lncRNA

研究代表者

坂口 弘美 (SAKAGUCHI, Hiromi)

鳥取大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00772287

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）：本研究により、長鎖非コードRNAであるnuclear enriched abundant transcript 1 variant 1（NEAT1v1）が、オートファジー誘導を介して肝細胞癌細胞の放射線抵抗性を誘導することが示された。そのメカニズムとして、NEAT1v1がGABARAPとsuperoxide dismutase 2を介してparkinの発現を誘導し、PINK1/parkin経路によるミトファジーを促進していることが明らかになった。これらの結果より、NEAT1v1は放射線により障害を受けたミトコンドリアの再生を、ミトファジーにより促進していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌に対する定位放射線治療は高い局所制御率が得られるが、局所再発が問題であり、放射線抵抗性のメカニズムの解明が求められている。今回我々は、長鎖非コードRNAであるNEAT1v1による、ミトファジーを介した放射線抵抗性メカニズムを解明した。この発見から、NEAT1v1や、その下流のGABARAP、SOD2、Parkinの発現量、さらには腫瘍内のミトファジー活性などが、放射線治療効果の予測や診断に有用である可能性が示唆された。またNEAT1v1によるミトファジー誘導経路を標的とする治療法を開発することで、放射線治療成績の改善が期待できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrates that the long non-coding RNA NEAT1v1 induces radioresistance in hepatocellular carcinoma cells through autophagy induction. NEAT1v1 upregulates parkin expression via GABARAP and superoxide dismutase 2, promoting mitophagy via the PINK1/parkin pathway. These findings suggest that NEAT1v1 enhances the regeneration of radiation-damaged mitochondria through mitophagy.

研究分野：放射線治療

キーワード：NEAT1 HCC lncRNA GABARAP SOD2 PINK1/Parkin経路 ミトファジー オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

放射線治療は切除不能肝癌への局所療法の一つであり、近年放射線治療の照射技術の発展に伴い、放射線治療(特に定位放射線治療や粒子線治療)により高い局所制御率(2年で80-90%程度)が得られるようになってきている。しかし放射線治療後の局所再発が問題であり、肝細胞癌細胞の放射線抵抗性のメカニズムの解明が求められている。その一因として、癌幹細胞の存在が挙げられる。

そこで今回我々は肝細胞癌における癌幹細胞性を制御する因子として、長鎖非コードRNAの一種である nuclear enriched abundant transcript 1 (NEAT1)に着目した。NEAT1は、日本人肝細胞癌患者のゲノム解析により、TERT 遺伝子プロモーターの次に変異が多い非コードゲノム領域として報告されており、肝細胞癌病態において何らかの機能を持つことが示唆されている。しかし、NEAT1 遺伝子の変異は散在的で、TERT プロモーターや p53 遺伝子のように変異のホットスポットは今のところ見つかっておらず、このような遺伝子変異が肝発癌にどのように関与しているかは今のところ不明である。この NEAT1 には同じ転写開始点を持ち、終結点異なる 2 種類のバリエーションアイソフォームが存在し、以前我々は、NEAT1v1 が肝細胞癌の癌幹細胞性を維持する機能を持つことを明らかにしている。放射線抵抗性の要因の一つに癌幹細胞の存在が挙げられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、NEAT1v1 が肝細胞癌の放射線抵抗性にどのように関与しているかを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

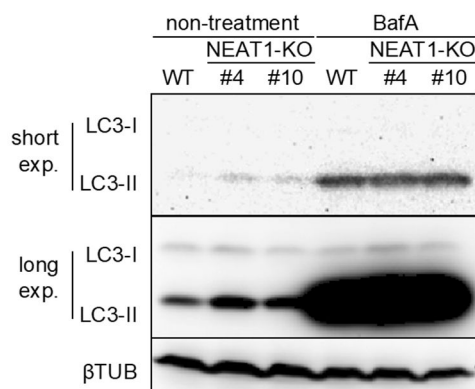
ヒト肝細胞癌細胞株(HuH7, HLF, HuH6)を使用した。NEAT1 ノックアウト (NEAT1-KO) 細胞は、CRISPR-Cas9 システムにより作製した。遺伝子のノックダウンは short hairpin RNA 発現アデノウイルスベクターを用いて行った。NEAT1 過剰発現 HCC 細胞株は、NEAT1 発現ベクターの安定導入により作製した。細胞の放射線処理は X 線照射装置 (MX-160Labo, mediXtec Japan) を使用し 0、1、2.5、または 5 Gy 照射した。放射線感受性はコロニー形成アッセイにより評価した。遺伝子発現は定量的逆転写 PCR およびウェスタンブロットにより測定した。酸化ストレスは DCFDA および MitoSOX Red で染色し蛍光測定した。オートファジー誘導の有無はパフィロマイシン A を用いたオートファジーフラックスアッセイにより評価した。マイトファジーの検出は Mitophagy Dye および Hoechst 33342 で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

### (1) NEAT1v1 による GABARAP を介したオートファジー誘導

まず HLF および HuH6 に X 線を照射し、放射線感受性をコロニー形成アッセイで評価した結果、NEAT1 のノックダウンにより放射線感受性が亢進していた。照射後の autophagy flux を調べると、オートファジーが抑制されていた。HuH7 から作製した NEAT1-KO 細胞でも同様にオートファジーが抑制されていた(図1)。これに対し HLF および HuH6 で NEAT1 v1 を過剰発現させたところ、オートファジーが亢進し放射線感受性が低下した。

図 1



続いて HuH7 の NEAT1-KO 細胞で発現異常を示すオートファジー関連因子を探索した結果、 $\gamma$ -aminobutyric acid receptor-associated protein (GABARAP)が発現低下していることを同定した(図2)。これと同様に、HLF や HuH6 においても、NEAT1 のノックダウンによって GABARAP の発現が低下した。これに対し NEAT1v1 の過剰発現は、GABARAP の発現を上昇させた。

最後に NEAT1v1 過剰発現細胞において GABARAP をノックダウンした結果、オートファジーが抑制され、放射線感受性が上昇することが確認された(図3)。また、GABARAP の発現は、無再発生存率とは相関しなかったものの、全生存率の低下と有意に相関していた。以上のことから、NEAT1 は GABARAP の発現誘導を介してオートファジーを促進することで、肝細胞癌細胞株に放射線抵抗性を付与していることが明らかとなった(図4)。

図 2

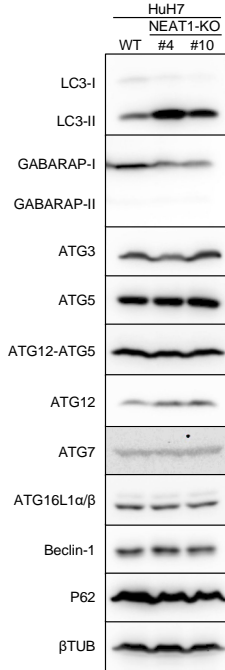


図 3

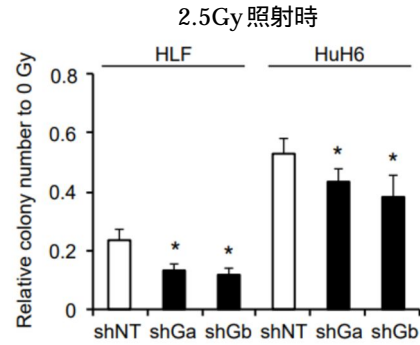
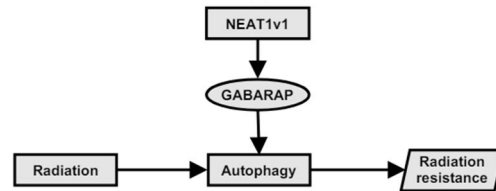


図 4



## (2) NEAT1v1 による PINK1/Parkin 経路を介したミトファジー誘導

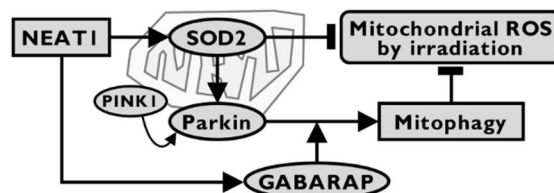
放射線照射は癌細胞内の酸化ストレスを上昇させたが、NEAT1 の過剰発現はこれを抑制した。特に損傷ミトコンドリアから生じるスーパーオキシドアニオンの発生が、NEAT1 によって有意に抑制されていた。さらに NEAT1 はミトコンドリア特異的な抗酸化酵素である SOD2 の発現を上昇させていることが明らかとなった。

続いて細胞内ミトコンドリア DNA 量を測定した結果、放射線によりミトコンドリアが増加したが、NEAT1 はこの増加を抑制していた。また放射線によってオートファジーが抑制されていたことから、機能を失ったミトコンドリアのミトファジーによる除去が進んでいないことが想定された。そこでミトファジー特異的蛍光試薬を使って検討したところ、放射線照射によって抑制されたミトファジーを、NEAT1 は回復させていることが示された。

続いてミトファジー誘導において重要な経路である Parkin/PINK1 経路について検討した結果、NEAT1 は Parkin を発現誘導していることが明らかになった。また Parkin 発現量は、SOD2 のノックダウンにより減少し、GABARAP のノックダウンにより上昇した。このことから、NEAT1 は SOD2 を介して Parkin 発現を誘導する一方で、GABARAP を介したミトファジーにより Parkin の分解を促進していることが示唆された。

以上のことから、NEAT1 は、GABARAP および SOD2 を介して、PINK1/Parkin 経路によるミトファジーを誘導していることを明らかにした。さらにこのミトファジー誘導によって、放射線によって傷害されたミトコンドリアの修復が促進され、その結果、癌細胞に放射線抵抗性を付与していることが示唆された(図5)。

図 5



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 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakaguchi H, Tsuchiya H, Kitagawa Y, Tanino T, Yoshida K, Uchida N, Shiota G.	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 Int J Mol Sci.	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） 10.3390/ijms23020711.	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, Ririko Shinonaga, Hiromi Sakaguchi, Yutaka Kitagawa, Kenji Yoshida and Goshi Shiota	4. 巻 23
2. 論文標題 NEAT1 Confers Radioresistance to Hepatocellular Carcinoma Cells by Inducing PINK1/Parkin-Mediated Mitophagy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	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） 10.3390/ijms232214397.	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 -

〔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 坂口弘美、土谷博之、北川寛、谷野朋彦、内田伸恵、吉田賢史、汐田剛史
2. 発表標題 肝細胞癌におけるlncRNA NEAT1による放射線抵抗性の誘導メカニズム
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会
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
---------	---------