

令和 6 年 9 月 13 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15515

研究課題名（和文）肝細胞癌の発育進展におけるミトコンドリア代謝に注目した革新的治療の開発

研究課題名（英文）Innovative mitochondrial-targeted gene therapy for hepatocellular carcinoma

研究代表者

恩田 真二（Onda, Shinji）

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：10459620

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）：ヒト肝細胞癌細胞株において、ライソソーム膜タンパク質であるPARK9ノックダウンにより、PARK9タンパク質の発現量は低下し、細胞増殖能、浸潤能、遊走能の抑制効果を認めた。また電子顕微鏡でミトコンドリアの蓄積を確認した。また、ミトコンドリア膜電位の低下とミトコンドリア選択的オートファジーであるマイトファジー活性の低下を確認した。ミトコンドリア内における鉄、脂質過酸化、ROSの蓄積をフローサイトメトリーと蛍光顕微鏡で確認した。ヒト肝細胞癌細胞株において、PARK9活性抑制によりミトコンドリア機能不全が誘導され、鉄代謝異常が生じることにより、フェロトーシスが誘導され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

今後はさらにPARK9と薬剤耐性の関与に関して、肝細胞癌に対する分子標的治療薬であるレンバチニブの投与下で、薬剤のPARK9タンパク質発現量を評価する。最終的に、PARK9をノックダウンしたレンバチニブ耐性肝細胞癌細胞株において、レンバチニブの耐性を克服することを確認する。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the function of acid α -glucosidase in hepatocellular carcinoma. In a human hepatocellular carcinoma cell line, PARK9 reduced the expression level of PARK9 protein and inhibited cell proliferation, invasion and migration ability. Mitochondrial accumulation was also confirmed by electron microscopy. We also confirmed a decrease in mitochondrial membrane potential and mitophagy activity, a mitochondrial-selective autophagy. Accumulation of iron, lipid peroxidation, and ROS in mitochondria was confirmed by flow cytometry and fluorescence microscopy. In human hepatocellular carcinoma cell lines, inhibition of PARK9 activity induces mitochondrial dysfunction, resulting in abnormal iron metabolism, which in turn induces ferroptosis.

研究分野：消化器外科学

キーワード：オートファジー マイトファジー ライソゾーム 酸性 グルコシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、脂肪肝炎などの肝臓の炎症を基盤として発症することが特徴であり、それぞれに固有なまたは共通した発癌や進展のメカニズムが存在する。慢性炎症に伴うランダムな遺伝子変異の蓄積が肝細胞癌の多様性につながっていると考えられており、肝細胞癌の発生および進展における分子生物学的機構の解明が必要である。進行・低分化肝細胞癌においては、乏しい栄養血管にも関わらず腫瘍の発育・浸潤転移がみられ、何らかの自己エネルギー供給機構を有している可能性が示唆されている。我々は、そのエネルギー供給のメカニズムとして、細胞内オルガネラのリサイクル機構であるオートファジーのうち、ミトコンドリア選択的オートファジーであるマイトファジーに注目した。癌細胞はオートファジーによって異常な高分子を分解することによって細胞内環境を維持し、細胞死から逃れている。そのためオートファジーを阻害することで抗がん剤耐性の改善が見込める可能性がある。オートファジーの最終段階はライソゾームに依存した分解系であり、特定のライソゾーム酵素を選択的に阻害することにより、オートファジーの分解不全を誘導し、抗がん剤の効果を高める方法を着想した。本研究では酸性 グルコシダーゼ(GBA)による糖脂質代謝ネットワークを解析し、肝細胞癌におけるキードラックであるレンバチニブ耐性の原因を明らかにするとともに、肝細胞癌治療における基礎的知見を提供する。また、いまだに解明されていない分子標的薬投与下のライソゾーム酵素の機能を解明する。

2. 研究の目的

肝細胞癌の増殖・進展において、ライソゾーム酵素による糖脂質代謝ネットワークがどのように関与するかを解明する。さらに、重要なライソゾーム酵素のノックダウンにより革新的な治療方法を見出すことを目的とする。最終的には肝細胞癌のライソゾームをターゲットとした治療における基礎的知見の提供を目的とする。

3. 研究の方法

ライソゾーム酵素と肝細胞癌の発癌進展メカニズム解明を目指した実験

1) ライソゾーム酵素活性・タンパク質発現量・細胞増殖能抑制効果の確認

ヒト肝細胞癌細胞株 (Huh-7, Hep3B, HepG2) を用いて、RNA-seq で抽出した重要なライソゾーム酵素の酵素活性を測定する。さらに、siRNA 法を用いた RNA 干渉でそれらのライソゾーム酵素をノックダウンし、ライソゾーム酵素活性が低下することを確認する。また、その際の細胞増殖能を確認し、増殖能が低下していた場合は、アポトーシスシグナル (Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-8, Cleaved PARP) をウエスタンブロットングで評価し、アポトーシス細胞の増減をフローサイトメトリー (Annexin V-FITC) で定量し、評価する。

2) ライソゾーム酵素ノックダウンによるミトコンドリアを中心とした細胞内変化の確認

臍臓細胞株を用いた予備実験では、電子顕微鏡における観察で、ライソゾーム酵素抑制により細胞内ミトコンドリアの形態変化、ミトコンドリアの蓄積が認められた。そこで、肝細胞癌でも同様の検討を行い、さらに免疫蛍光染色を用いてミトコンドリアとライソゾームを染色 (MitoTracker®, LysoTracker®) し、ミトコンドリアの蓄積とライソゾームの活性を評価する。ミトコンドリア機能の評価として、蛍光顕微鏡とフローサイトメトリーを用いてミトコンドリア膜電位を間接的に測定する。ミトコンドリアの機能低下を確認できれば、細胞内、ミトコンドリア内の活性酸素種 (ROS) 産生をフローサイトメトリーで測定する。

3) ライソゾーム酵素ノックダウンによるマイトファジーの評価

ミトコンドリア蓄積の原因を評価するため、ミトコンドリアの選択的オートファジーであるマイトファジーを定性・定量する。蛍光顕微鏡において、Mtpagy Dye®を用いて、赤色蛍光を発色

する蛍光法でミトファジーを評価する。さらのその蛍光をフローサイトメトリーで定量し、ライソゾームのノックダウンにおけるミトファジーを評価する。ミトファジーの低下が確認されれば、オートファジー関連タンパク質である LC3、p62/SQSTM1、ライソゾーム関連膜タンパク質である LAMP2、ミトファジーに重要な役割を果たすユビキチンリガーゼである PINK1/Parkin をウエスタンブロッティング法で評価する。

4) 分子標的薬投与におけるライソゾーム酵素活性・細胞増殖能の変化の評価

肝細胞癌に対する分子標的治療薬であるレンバチニブの投与下で、薬剤の濃度依存的にライソゾーム酵素活性を測定する。その際の薬剤投与濃度は、濃度別の細胞増殖抑制効果の評価し、IC50 に満たない濃度設定を行う。ライソゾーム酵素をノックダウンした肝細胞癌細胞において、薬剤の細胞増殖抑制効果がさらに増強することを確認する。

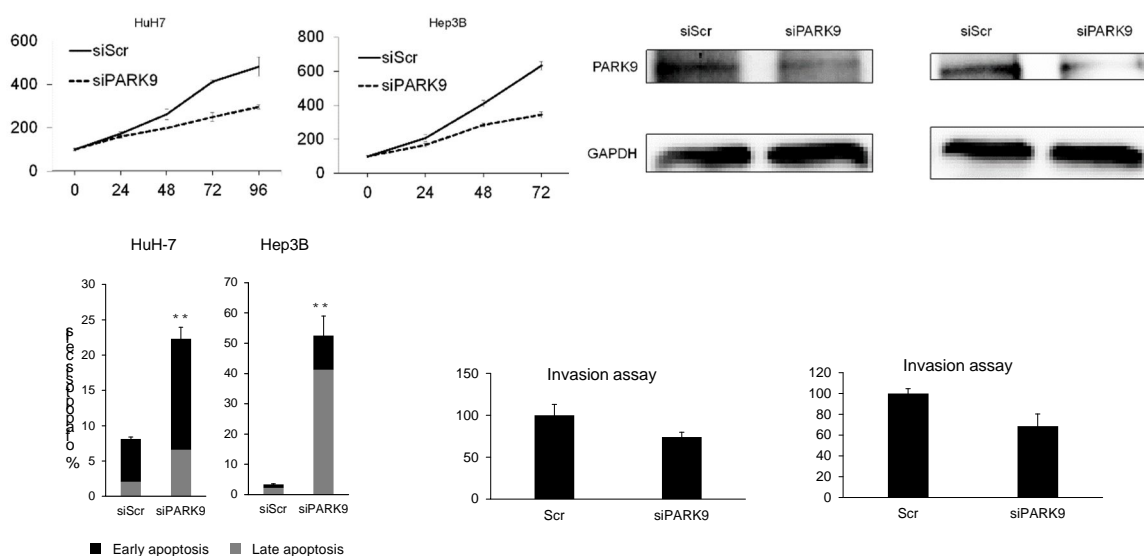
5) ウイルスベクターを作製し、皮下腫瘍モデルでの抗腫瘍効果の確認

ライソゾーム酵素に対する shRNA を搭載したアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を作成する。AAV による肝細胞癌細胞株への遺伝子導入効率を確認し、抗腫瘍効果の増強を確認する。ベクターの安全性を確認したのちにヌードマウス皮下担癌モデルを作成し、皮下腫瘍にベクターを同注し、抗癌剤の抗腫瘍効果を確認する。抗腫瘍効果の増強を確認した後、癌細胞特異的に遺伝子導入可能なプロモーターを導入する。肝細胞癌腹膜播種モデルに遺伝子導入し予後改善効果を確認する。

4. 研究成果

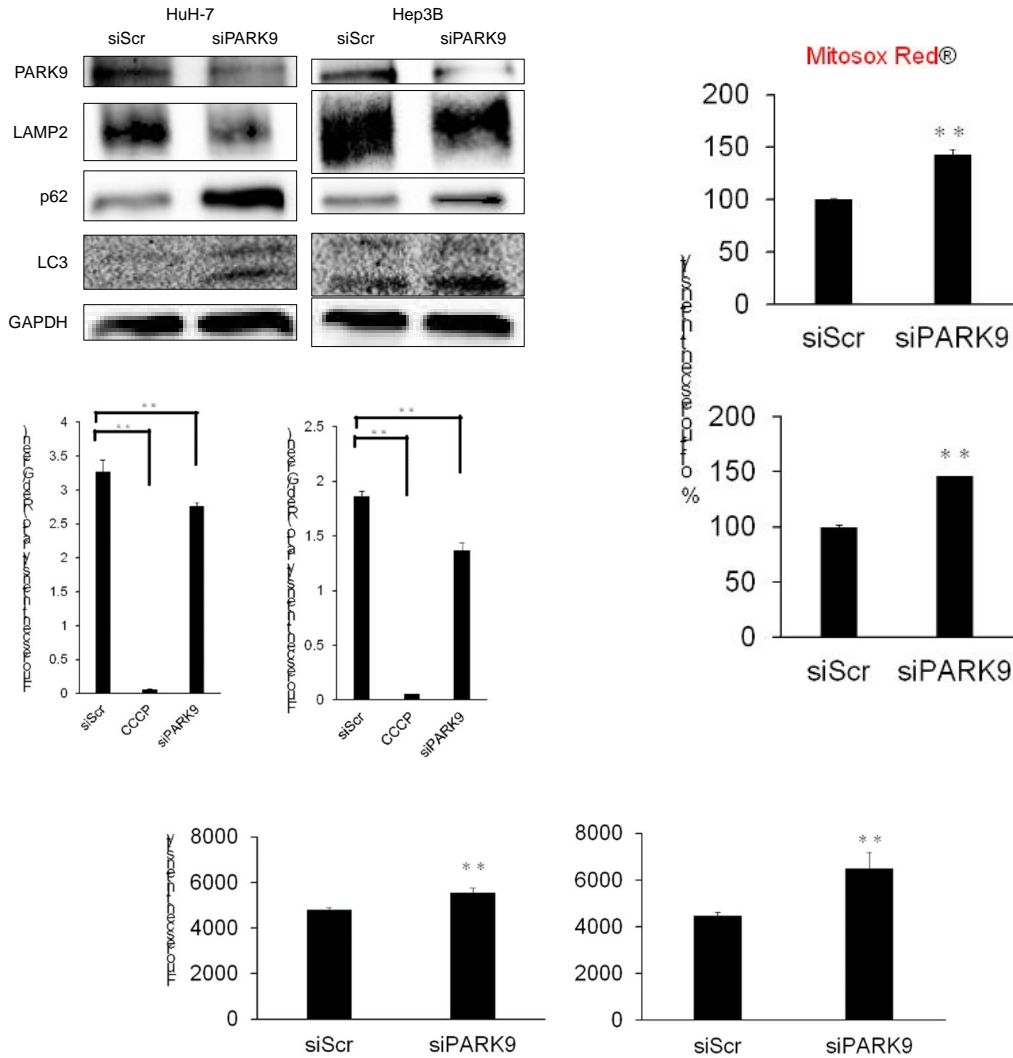
肝細胞癌細胞株 (Huh-7、Hep3B) を用いて主要なライソゾーム酵素のうち、酸性 グルコシダーゼをノックダウンすることで、肝細胞癌細胞株の増殖抑制効果を確認した。さらに上記肝細胞癌 2 細胞株でレンバチニブ耐性株を作成し、耐性前後で RNA シークエンスで、オートファジー・ミトファジー関連遺伝子群の発現が上昇していた。

54 種類のライソゾーム関連遺伝子を siRNA 法でノックダウンできるライブラリーをデザインした。ヒト肝細胞癌細胞株 (HuH-7、Hep-3B) を用いて、このライブラリーを用いてライソゾーム関連遺伝子をノックダウンし、細胞増殖、浸潤、遊走能を評価した。いずれの細胞株でも細胞増殖抑制を有意に誘導したライソゾーム膜タンパク質である PARK9 に着目した。siRNA 法を用いた PARK9 ノックダウン条件下で、PARK9 タンパク質発現量、細胞増殖能を評価した。



さらに、鉄、脂質過酸化、活性酸素種（ROS）の蓄積、ミトコンドリア機能を評価した。ヒト肝細胞癌細胞株において PARK9 ノックダウンにより PARK9 タンパク質の発現量は低下し、細胞増殖能、浸潤能、遊走能の抑制効果を認めた。PARK9 ノックダウンにより電子顕微鏡、蛍光顕微鏡でミトコンドリアの蓄積を確認した。また、ミトコンドリア膜電位の低下とミトコンドリア選択的オートファジーであるマイトファジー活性の低下を確認した。

ミトコンドリア内における鉄、脂質過酸化、ROS の蓄積をフローサイトメトリーと蛍光顕微鏡で確認した。ヒト肝細胞癌細胞株において、PARK9 活性抑制によりミトコンドリア機能不全が誘導され、鉄代謝異常が生じることにより、フェロトーシスが誘導されることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------