

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15516

研究課題名（和文）呼吸鎖複合体Iによるヒストン修飾制御を介した癌増殖メカニズムの解明と臨床的意義

研究課題名（英文）Respiratory complex I-mediated cancer cell proliferation control via histone modification and its clinical significance

研究代表者

日暮 大渡（Higurashi, Masato）

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：50882487

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）：呼吸鎖複合体IのNADH脱水素酵素を阻害すると、NAD⁺レベルの低下に伴いp21Cip1が発現誘導される。この時、NAD⁺の低下によりSIRT7の活性が低下し、p21Cip1の転写開始点付近において、H3K18のアセチル化が亢進することが明らかとなった。さらに、NAD⁺の低下はSIRT3の活性低下も引き起こし、これはp21Cip1を翻訳レベルで増加させることを見出した。以上のことから、癌細胞は呼吸鎖複合体I活性によりNAD⁺を産生することでp21Cip1の発現を抑制し、増殖能を維持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

癌細胞の代謝は一般に解糖系に依存しているが、一方で、本研究の成果によると、呼吸鎖複合体によるNAD⁺からのNAD⁺の再生が十分に行われないと、SIRT3/SIRT7の活性が低下して翻訳/転写レベルでp21Cip1が誘導され、癌細胞は増殖できなくなる。従って、呼吸鎖活性も癌細胞の増殖能維持に必須である。実際、複合体の構成サブユニットの高発現はLuminal型乳癌の予後不良因子であった。従って、呼吸鎖複合体活性を標的とする癌治療はLuminal型乳癌に有望なアプローチとなることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, I found that inhibition of NADH dehydrogenase activity in respiratory chain complex I induces expression of p21Cip1, accompanying a decrease in NAD⁺ levels within cells. The decrease in the NAD⁺ increased acetylation of H3K18 in the region proximal to p21Cip1 promoter by downregulation of SIRT7. Furthermore, a reduction in NAD⁺ levels result in a decline in SIRT3 activity, which increased p21Cip1 expression at the translational level. These findings suggest that cancer cells maintain their proliferative potential by suppressing 21Cip1 expression by regenerating NAD⁺ through respiratory chain complex I activity. Importantly, high expression levels of complex I core subunits correlated with poor prognosis in patients with the hormone receptor (+)/HER2(-) subtype of breast cancer. Therefore, NADH dehydrogenase and SIRT3/7 have emerged as promising therapeutic targets against the breast cancer subtype.

研究分野：腫瘍細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア 呼吸鎖複合体I NAD⁺ SIRT3 SIRT7 p21Cip1

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは呼吸鎖による ATP 産生をはじめ、アミノ酸、脂肪酸代謝などに関わる多機能のオルガネラであり、癌細胞の増殖にとっても重要な機能を果たしている。中でも TCA 回路は、グルタミン代謝などを通して、癌細胞の増殖に必須の生体高分子の材料を提供している。一方、呼吸鎖については不明な点が多い。特に、ATP 産生を解糖系に依存する傾向にある癌細胞において、ATP 産生以外の呼吸鎖機能が癌細胞の増殖にどのように関わっているかについてはほとんど解明されていない。

申請者はこれまで癌細胞における呼吸鎖機能の生物学的意義に関して検討を重ねてきた。その結果、主な成果として、癌細胞は呼吸鎖機能を増殖能維持のために必要としていることを明らかにした。さらに解析を進めた結果、呼吸鎖複合体のうち複合体 I の機能が、NAD⁺の産生を介して細胞周期阻害因子 p21^{Cip1} の発現を転写レベルで制御し (p53 非依存的) 乳癌細胞の増殖能維持に働いていることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では乳癌と肝細胞癌に焦点を当てて、それぞれの細胞株についてミトコンドリア呼吸鎖機能のうち複合体 I の NADH 脱水素酵素 NDUFV1 による NAD⁺の産生に着目し、NAD⁺による細胞周期制御機構の詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 責任酵素の特定

複合体 I が産生する NAD⁺による p21^{Cip1} 発現制御機構について、p21^{Cip1} プロモーター上のヒストン H3 の特異的リジン残基のアセチル化の関与が示唆された。P53 非依存的な p21^{Cip1} 発現制御にはヒストン脱アセチル化酵素の関与が知られている。そこで、本研究ではまず、脱アセチル化酵素の候補として NAD⁺依存的に脱アセチル化活性を示すサーチュイン(SIRT)に着目した。SIRT はヒトでは 7 種類のサブタイプが存在するため、SIRT1 SIRT7 について RNAi 法によりノックダウンし、p21^{Cip1} 発現に関わる SIRT の特定を行った。

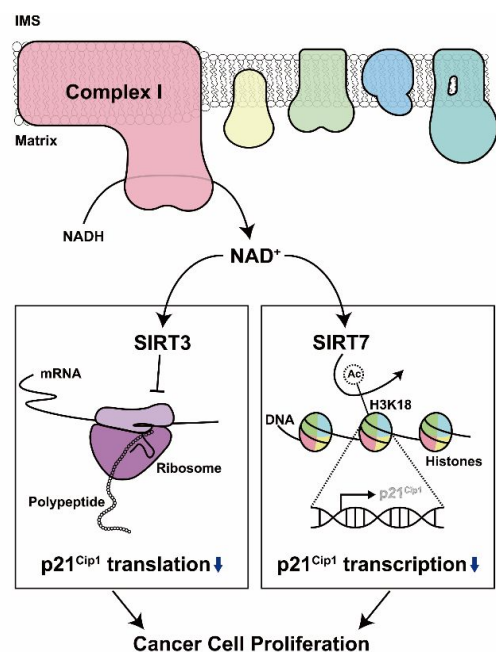
(2) 特定した責任酵素による p21^{Cip1} 発現制御メカニズムの解明

特定した SIRT によるヒストン修飾制御を受ける p21^{Cip1} プロモーター領域を決定するために、ChIP Assay を行った。また、転写レベルの関与を明らかにするために Dual Luciferase Reporter Assay を行った。

さらに、解析を進める中で post-transcriptional な p21^{Cip1} 発現制御機構も介在することが示唆された。そこで、p21^{Cip1} のタンパク質レベルの制御についても明らかにするために、Cycloheximide Chase Assay によりタンパク質の安定性について調べるとともに、翻訳レベルの制御についてクリックケミストリーを利用した BONCAT(Bioorthogonal non-canonical amino acid tagging)法により検討した。

4. 研究成果

p21^{Cip1} の発現制御に関わる SIRTs を同定するため、乳癌および肝細胞癌由来細胞株を用いて SIRT1-7 をノックダウンし、スクリーニングを行った。その結果、多くの細胞で共通して SIRT7 が p21^{Cip1} の転写を抑制的に制御していることが示唆された。SIRT7 は H3K18 の脱アセチル化に関わることが知られている。ChIP Assay を行ったところ、呼吸鎖複合体 I の NADH 脱水素酵素 NDUFV1 のノックダウンによる NAD⁺低下時に、p21^{Cip1} の転写開始点近傍における H3K18 のアセチル化が亢進していた。このアセチル化の亢進は、野生型 SIRT7 の発現により抑制され、脱アセチル化活性を持たない変異型 SIRT7 の発現は影響が見られなかった。さらに、SIRT7 が p21^{Cip1} の転写制御に関わっていることを明らかにするために、NDUFV1 ノックダウン条件下、野生型 SIRT7 または変異型 SIRT7 を発現させ、Dual Luciferase Assay を行った。NDUFV1 のノックダウンで上昇した転写活性は、アセチル化レベルと同様に、野生型 SIRT7 でのみ抑制された。以上のことから、癌細胞において呼吸鎖複合体 I が産生する NAD⁺は SIRT7 の活性化を介して p21^{Cip1}



の転写を抑制していることが示唆された。

また、解析を進める中で新たに発見した post-transcriptional な p21^{Cip1} 発現制御機構には SIRT3 が関与していることが明らかとなった。Cycloheximide Chase Assay により、NDUFV1 および SIRT3 の活性は p21^{Cip1} タンパク質の半減期には影響がないことが示されたため、翻訳レベルの制御の可能性を考えた。BONCAT 法を行ったところ、新生 p21^{Cip1} タンパク質が、NDUFV1 および SIRT3 ノックダウン時に増加する結果が得られたことから、SIRT3 が p21^{Cip1} タンパク質の翻訳過程の抑制的制御に関わることがわかった。また、NDUFV1 ノックダウン条件下、SIRT3 の基質である SOD2 のアセチル化が亢進することから、SIRT3 は呼吸鎖複合体 I で産生される NAD⁺ を利用していることが考えられた。

以上のことから、癌細胞の増殖を支えるミトコンドリア代謝と増殖カップリング機構として NAD⁺-SIRT3/7-p21^{Cip1} 経路が存在していると結論付けた。この経路は癌細胞の増殖に必須であり、NADH 脱水素酵素ならびに SIRT3/7 は、抗悪性腫瘍薬の標的となりうることが示された。

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 Nakagawa Hidetsugu, Higurashi Masato, Ishikawa Fumihiko, Mori Kazunori, Shibamura Motoko	4. 巻 649
2. 論文標題 An indispensable role of TAZ in anoikis resistance promoted by OTUB1 deubiquitinating enzyme in basal-like triple-negative breast cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.01.080	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 Maruyama Tsuyoshi, Saito Koji, Higurashi Masato, Ishikawa Fumihiko, Kohno Yohko, Mori Kazunori, Shibamura Motoko	4. 巻 114
2. 論文標題 HMGA2 drives the IGFBP1/AKT pathway to counteract the increase in P27KIP1 protein levels in mtDNA/RNA-less cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 152~163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15582	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日暮 大渡
2. 発表標題 ミトコンドリアDNA減少肝細胞癌で維持される細胞増殖メカニズムの解明
3. 学会等名 日本組織培養学会 第94回
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日暮 大渡
2. 発表標題 NAD+-SIRT3/6によるp21Cip1発現抑制と癌細胞増殖抑制
3. 学会等名 第82回 日本癌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 日暮 大渡
2. 発表標題 SIRT3とSIRT7は呼吸鎖複合体IのNAD+再生機能に依存してそれぞれ翻訳/ 転写レベルでp21Cip1発現を制御する
3. 学会等名 第83回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2024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://rira.showa-u.ac.jp/profile/ja.2270f0782f73c6bd5471fd186680f595.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

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