

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15526

研究課題名（和文）ミトコンドリア置換技術を用いた、がん細胞におけるmtDNAの影響の解明

研究課題名（英文）Study of mtDNA in cancer cells using mitochondrial DNA replaced cell technology

研究代表者

澤田 武志（Sawada, Takeshi）

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：90745100

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）：本研究の目的は、がん化におけるミトコンドリアゲノム(mtDNA)の影響を独自技術のMitochondrialDNA Replaced Cell(MirC)作製技術を用いて検証する事である。各種がん細胞と正常細胞とのMirCを作製し細胞増殖能について比較検討した結果、あるがん細胞株高転移モデルから分離したmtDNAを元細胞株に置換したものが増殖能が高まる事を見出した。検討の結果、増殖能に影響を与えた因子はmtDNA変異に由来するものではないと考えられたため、mtDNA置換により細胞増殖能に影響を与えた因子を様々な観点から検討し、因子を特定できた場合に治療標的となり得るかについて検証を進めたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん化におけるミトコンドリアゲノム(mtDNA)の影響を、既存の解析方法とは異なる全く新しい方法で検証を進めた研究であり、その研究成果は独自性が高く学術的意義は高いと考えられる。今後の展開によっては、がんの悪性度に関与する因子の特定につながる可能性もあり、その場合は新たな創薬ターゲットとなり得るため社会的意義も大きい研究に発展する可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to examine the influence of the mitochondrial genome (mtDNA) in cancer development by using our original technology, Mitochondrial DNA Replaced Cell (MirC) technology. As a result of comparative study on the cell proliferation ability of MirC generated from various cancer cells and normal cells, we found that the mtDNA isolated from a high metastasis model of a certain cancer cell line and replaced with the original cell line increased the proliferation ability of the original cell line. As a result of our investigation, we consider that the factors that affected proliferative ability do not originate from mtDNA mutation. Therefore, we would like to examine the factors that affected cell proliferative ability by mtDNA substitution from various perspectives, and if the factors can be identified, we would like to verify whether they can be considered as potential therapeutic targets.

研究分野：Translational Research

キーワード：mitochondrial DNA

1. 研究開始当初の背景

がん化やがんの発育及び転移巣形成の分子メカニズムの中でミトコンドリアが大きな役割を果たす事が示唆されている (Vyas S, et al. Cell, 2016) (Kopinski P, et al. Nature Review Cancer, 2021) が、mtDNA がどのように関与しているかに関しては明らかとなっていない。その理由は、mtDNA への直接介入技術が極めて限られていたからである。この技術的な問題点を解決するため、我々は標的細胞の mtDNA を高効率に直接置換する Mitochondrial DNA Replaced Cell (MirC) 作製技術を独自に開発した。MirC 作製技術は体細胞の mtDNA 置換技術である。この技術は、エンドヌクレアーゼをミトコンドリアへ選択的に送達させることで mtDNA を一定量減少させ、マクロピノサイトーシスが活性化され、ヘテロプラスミー状態 (変異のある mtDNA と変異のない mtDNA が共存する状態) にある細胞において、細胞外ミトコンドリアが大量に取り込まれ生着し、ホスト細胞の mtDNA をドナー mtDNA に置き換える技術である。安定した再現性を有するプロセスであり、mtDNA 置換を行うことで変異や欠失といった配列異常やコピーナンバーのがん化への影響や、がん発育及び転移巣形成への影響を直接的に観察できると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト細胞のがん化における mtDNA の影響を明らかにする事を目的とする。また、がんの遠隔転移に関わる血中循環腫瘍細胞 (CTC) に特に着目し、CTC の mtDNA とがん細胞及び正常細胞の mtDNA の差異を検討する事も目的とする。すなわち、細胞のがん化及びがん細胞の転移能獲得において、ミトコンドリアはどのような役割を果たしているのか、という事を明らかにする事が本研究の目的である。

3. 研究の方法

標的細胞の mtDNA を高効率に直接置換する MirC 作製技術

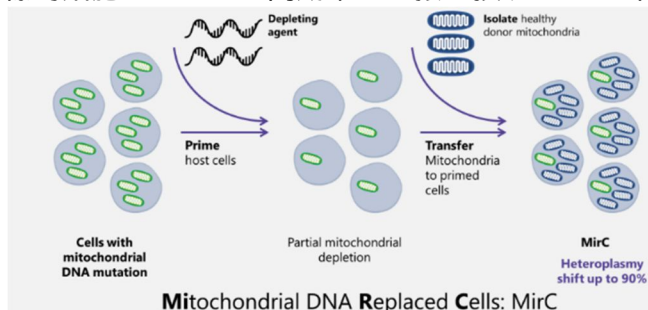


図1: MirC作製技術

次世代シーケンサーによるゲノム解析等の二次解析を可能とした状態で高効率に末梢血から CTC を単離解析する技術



図2: 誘電泳動法によるCTC単離解析技術

これらの独自技術を用いて今まで技術的に困難であったがん細胞及び CTC における mtDNA が表現型に与える影響の詳細な解析を進める。

まず、mtDNA replacement による細胞悪性度への影響について以下の方法で検討を行う。

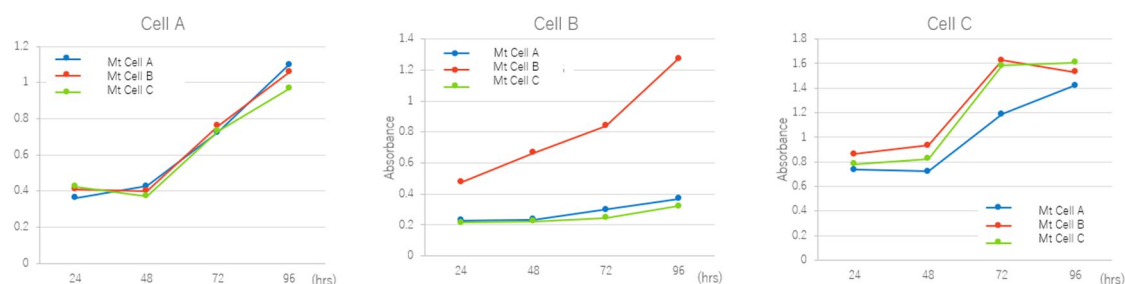
ヒトがん細胞株、および非がん細胞として線維芽細胞を用い、線維芽細胞から抽出した mtDNA を各々のがん細胞株の mtDNA と置換した MirC がん細胞を作製する。置換前のがん細胞と MirC がん細胞を比較し、形態学的な変化、がん細胞の増殖能、浸潤能、転

移能に関して評価する。また、CTC mtDNA については、がん患者から採血した血液検体を用いて誘電泳動分離法により CTC の単離を行い解析する。

4 . 研究の成果

まず、現行の MirC 作製では electroporation による遺伝子導入法を用いているが、細胞へ与える影響の軽減化ならびに導入効率の向上を目指して liposome transfection による遺伝子導入法の検討を行い、同手法による MirC 作製プロトコルを確立した。

同手法により各種がん細胞と正常細胞との MirC を作製し、細胞増殖能について比較検討した結果、あるがん細胞株高転移モデルから分離した mtDNA を元細胞株に置換したものが、増殖能が高まる事を見出した。



双方の mtDNA の全ゲノム解析を行い比較した結果、明らかな差異を認めず、増殖能に影響を与える因子は mtDNA 変異に由来するものではないと考えられた。

CTC の検討については、単離するためのコスト増により資金的に困難となったため、今後の検討課題として残る事となった。

今後の展開として、まず増殖能の変化しか評価できていないことから、形態学的な変化や浸潤能の変化、転移能の変化について検討を進めていく。また、mtDNA 置換によるサイトカイン分泌能の変化や核ゲノムの変化、mRNA の変化、代謝物質の変化などの検討を進め、mtDNA 置換により細胞増殖能に影響を与えた因子の特定を進める。因子を特定できた場合に治療標的となり得るかについて検証を進めたいと考えている。

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