

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650602

研究課題名（和文） ミトコンドリア複合体 II 活性制御による造腫瘍抑制効果の解析

研究課題名（英文） The effects of mitochondrial complex II regulation on Tumorigenesis.

研究代表者

石井 恭正 (ISHII TAKAMASA)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：20548680

研究成果の概要（和文）：高齢化・超高齢化社会を迎えた昨今、三大死因に挙げられる癌を克服する治療法の確立やその発症を予防する手段の解明は急務となっている。本研究では、がん制御遺伝子として知られる *SDHC* 遺伝子変異に着目し、造腫瘍から発癌過程における寄与を明らかにし、それらの工程を制御することに貢献する成果を得ることを目的とした。本研究により、細胞内エネルギー産生の中心的役割を担うミトコンドリア電子伝達系複合体 II の働きが造腫瘍の進行において重要な役割を果たしていることを明らかにする端緒を得た。

研究成果の概要（英文）：Recently, the cancer therapy and cancer prevention are very important in the medical field for the Japanese aging society. The *SDHC* gene which is encoding one of mitochondrial complex II subunit has been emphasized as a cancer regulatory gene. We focused on the effects of *SDHC* gene mutation on the tumorigenesis and carcinogenesis, and analyzed the energy metabolic and epigenetically histone modification changes in *SDHC*-mutated benign and malignant tumor process of spontaneous transformed cells.

交付決定額

（金額単位：円）

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん制御遺伝子・エネルギー代謝・ミトコンドリア・酸化ストレス・微小環境・エピジェネティクス・ヒストン

## 1. 研究開始当初の背景

近年我が国では、医療技術の発達に伴い寿命が延びたことで、加齢とともに発症率が増加する癌や神経変性疾患などの加齢性疾患が、国の医療費負担を高騰させるようになった。特に三大死因に挙げられる癌は、予防や治療が困難であり、高齢化する現代社会において脅威となっている。10 年程前に、*SDHC* 遺伝子変異が家族性傍神経節腫 (PGL3) の原因であることが報告された (Niemann S. et al., *Nat Genet.* 2000)。家族性傍神経節腫 (PGLs) は、PGL1, 2, 3, 4 に分類され、これ

らはミトコンドリア電子伝達系複合体 II の 3 つのサブユニット (SDHB, C, D) の遺伝子変異が原因で発症すると報告されている (Astuti D. et al., *Am J Hum Genet.* 2001; Baysal B. E. et al., *Science* 2000)。PGLs は、その大部分が良性腫瘍であり 10% 程度が悪性の癌へと転換するが、これらの分子機序は未だ不明である。このことから、ミトコンドリア電子伝達系複合体 II サブユニット SDHB, C, D やフマル酸水酸化酵素 (フマラーゼ; FH) がミトコンドリア癌制御遺伝子として悪性腫瘍の分子治療標的因子として考えられるようにな

った(Gottlieb E. et al., *Nat Rev Cancer*. 2005)。

近年では、消化管間質腫瘍(GISTs)が PGLs 同様に SDHB, C, D サブユニットの遺伝子変異により発症することも報告されている(Pasini B. et al., *Eur J Hum Genet*. 2008)。また最近、多くの癌細胞のミトコンドリア電子伝達系複合体 II 活性において、コハク酸からフマル酸を生成する好氣的代謝、コハク酸脱水素酵素(SDH)活性ではなく、嫌氣的代謝を亢進する Fumarate reductase 活性が誘導されるという興味深い報告がある(Tomitsuka E. et al., *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2009)。一方で、SDH 活性を担う SDHA サブユニットは癌関連遺伝子として報告されておらず、癌細胞としても生存に必須のサブユニットとして機能していると考えられる。

## 2. 研究の目的

上述したような背景において、申請者はミトコンドリア電子伝達系複合体 II の SDHC サブユニットにアミノ酸点変異 (G71E in *C. elegans*, V69E in Mammals) を導入した動物モデル (*mev-1*, SDHC E69 細胞株, *Tet-mev-1* コンディショナルトランスジェニックマウス) を作製し、解析を行ってきた (Ishii N., et al. *Nature* 1998, Ishii T., et al. *Cancer Res*. 2005, Ishii T., et al. *Mitochondrion* 2010)。特に、「ミトコンドリアエネルギー代謝変化による造腫瘍・発癌の機序」を明らかにする事で、これまで知られる事なかった癌の予防法や新たな治療法・新薬開発のための端緒と成り得る成果を期待して研究を進めてきた。本研究課題では、*Tet-mev-1* モデルマウスにおいて「ミトコンドリアエネルギー代謝変化⇔HIF 低酸素誘導因子による遺伝子発現変化⇔A-Raf リン酸化酵素活性変化の関連解析」から新たな腫瘍化・癌化の機序を明らかにする事を目的とした。

これまでに、ミトコンドリア癌制御遺伝子群の遺伝子変異は、「ミトコンドリアから過剰な活性酸素発生を促す。」、あるいは「クエン酸回路のエネルギー代謝異常を惹き起こす。」ことで発癌の原因になっていると考えられてきた。また、ミトコンドリア電子伝達系複合体 II の活性低下は、細胞質へのコハク酸流出を生じ、Prolyl hydroxylase (PHD) 酵素群の Prolyl 4-hydroxylase 活性を阻害する可能性が示唆されているが、その分子機序や癌細胞におけるその影響は不明であった。Prolyl 4-hydroxylase は、Hif-1 $\alpha$  をユビキチン化することで細胞増殖の無秩序化を防ぎ、その代謝産物としてミトコンドリア電子伝達系複合体 II の基質であるコハク酸を生成している (Gottlieb et al., *Nat Rev Cancer*. 2005 and Selak et al., *Cancer Cell*.

2005)。Hif-1 $\alpha$  に構成される HIF は、癌細胞の増殖に必要な不可欠なグルコース代謝亢進・細胞増殖亢進・血管新生などを司る遺伝子群の転写を誘導する低酸素誘導因子として知られ、造腫瘍から発癌過程における微小環境を構築する重要な因子として注目されている。

以上を踏まえ、申請者が独自に開発した SDHC V69E 変異モデル *Tet-mev-1* コンディショナルトランスジェニックマウスを用いて、ミトコンドリア電子伝達系複合体 II の活性変化を中心とした「エネルギー代謝の変化」、「活性酸素酸化ストレスの発生変化」、「低酸素誘導転写因子(Hif-1 $\alpha$ )活性の変化」の解明を目指し、“造腫瘍抑制と良性腫瘍形質維持機構の解明”に向けた研究、さらには“癌細胞の増殖・浸潤抑制化学予防効果を目指した創薬研究”の一端を担う研究成果を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究計画申請時の研究方法を以下に記載する。

(1) パラガングリオーマ (家族性傍神経節腫; PGL3) の原因遺伝子として報告されていたミトコンドリア電子伝達系複合体 II の SDHC サブユニットにアミノ酸点変異 (V69E) を有した *Tet-mev-1* コンディショナルトランスジェニックマウスから取得するマウス胎児線維芽細胞 (MEF, *Tet-mev-1 normal cells*) と、これを長期間高密度培養し無限増殖化させ、足場非依存的な増殖を示す自然形質転換細胞 (*Tet-mev-1 transformed cells*) を取得した。また、これをマウスの皮下へ移植し腫瘍組織を形成させ、この組織から取得する腫瘍組織細胞 (*Tet-mev-1 cancer cells*) を使用した。さらに、これらの基準となる標準株として、C57BL/6j マウスから取得する MEF (C57BL/6j *normal cells*) と上記モデル細胞同様に取得する自然形質転換細胞 (C57BL/6j *transformed cells*) と腫瘍組織細胞 (C57BL/6j *cancer cells*) を使用した。

(2) ミトコンドリア電子伝達系複合体 II コハク酸脱水素酵素 (SDH) と Fumarate reductase 活性変化、およびミトコンドリア電子伝達系複合体 II からの活性酸素発生機序の解明

癌細胞では、エネルギー代謝が解糖系に偏り、クエン酸 (TCA) 回路では嫌氣的なエネルギー代謝が亢進し、フマル酸からコハク酸の合成が行われる Fumarate reductase が活性化する (Tomitsuka E. et al., *Ann N Y Acad Sci*. 2010)。さらに、癌細胞でミトコンドリア電子伝達系酵素活性を亢進させると、活性酸素発生と伴に過剰なアポトーシスが誘導され、細胞増殖の抑制効果が得られることが報告されている。そこで、上記した細胞

(*Tet-mev-1* normal cells, C57BL/6j normal cells, *Tet-mev-1* transformed cells, C57BL/6j transformed cells, *Tet-mev-1* cancer cells, C57BL/6j cancer cells)を用いて、SDH活性、Fumarate reductase活性、複合体IIからの活性酸素発生量を測定した。

#### (3) $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素とProlyl 4-hydroxyrase (PHD) 活性変化、コハク酸と $\alpha$ -ケトグルタル酸代謝産物量変化、および HIF活性化機序の解明

ミトコンドリアでは、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素が $\alpha$ -ケトグルタル酸を基質として、好氣的条件下での高効率なATP合成を行うクエン酸(TCA)回路の律速段階を担っている。一方、細胞質側ではミクロソーム画分を中心にProlyl 4-hydroxyrase (PHD)が $\alpha$ -ケトグルタル酸を補因子として、コハク酸を合成する代謝過程で、細胞増殖や解糖系の亢進を惹き起こすHif-1 $\alpha$ のエピケチン化を誘導し、癌細胞の増殖抑制機構を担っている

(Schofield C. J. et al., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004)。このために、近年では癌療法の標的分子としてのPHDの活性制御機序の解明に注目が集まっている。そこで、上記した細胞株を用いて、 $\alpha$ -ケトグルタル酸・リンゴ酸・アスパラギン酸・コハク酸・フマル酸の代謝産物量の測定および $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素活性の測定を行った。

#### (4) フマラーゼ(FH)とProlyl 4-hydroxyrase (PHD) 活性制御におけるA-Rafキナーゼの役割の解析

Ras-Raf シグナル伝達系に働くRaf kinase familyに属するA-Rafは、ミトコンドリアに局在することが知られているが、その機能は未だ明らかにされていない。その中、我々は、ミトコンドリア電子伝達系複合体IIのSDHCサブユニットにアミノ酸点変異(V69E)を有したSDHC E69細胞株でA-Rafが過剰発現していることを見出した(Miyazawa M. et al., *Biosci Trends.* 2008)。さらに最近、過剰発現したA-Rafはミトコンドリアに局在するフマラーゼ(FH)と細胞質に局在するPHDのそれぞれに相互作用することでエネルギー代謝制御を担っていることを明らかにしつつある。そこで、既に樹立していた、A-Rafの過剰発現細胞株とノックダウン細胞株を用いて、FH活性とPHD活性測定を実施した。

#### 4. 研究成果

研究開始年度には、その年3月11日の未曾有の東日本大震災被災の影響により、自然形質転換株の取得を目的に長期培養を行っていた細胞株が死滅し、その後、人災ともいえる計画停電実施の際には、付属病棟への非常用電源供給が最優先となり、開始年度の研究スタートが大幅に遅れるという事態に見

舞われた。また、標準マウスより神経質で繁殖の難しい*Tet-mev-1*コンディショナルトランスジェニックマウスは、計画停電の影響による空調温度の変化や明暗周期のズレによる影響からか、その直接的原因は不明であるが4月から10月までの約半年間に新規マウス個体の取得が滞り、その飼育・繁殖改善のために苦慮した。その中、計画実施内容の遅れを取り戻すため、既に取得に成功していた*Tet-mev-1*マウス同様の変異を導入したSDHC E69細胞株(*Cancer Research*, 2005. 65: 203-209)を用いて自然形質転換株および腫瘍組織細胞株、およびそれらのコントロール株の取得に成功し、その後はおおむね順調に進展した。

長期間培養中に自然形質転換した細胞株は、樹立後凍結保存し、融解後に再培養を開始して1~2か月間は、樹立時の形質を再現できないことを確認した。本成果により、腫瘍侵襲療法において、凍結療法が補助療法として応用し得るか否かを検証するための端緒を得たと期待している。さらに、このような変化がエネルギー代謝制御に影響されるエピジェネティクス変化に依存していることを確認した。

さらに、自然形質転換株をヌードマウス皮下移植後、腫瘍化した組織細胞を再び*in vitro*培養することで癌微小環境を再現した。その結果、低酸素環境のみを再現した場合より、低酸素・低pH両環境を再現した培養環境において腫瘍細胞は安定した細胞分裂・増殖を示すことが示された。本成果は、ミトコンドリア電子伝達系複合体II変異に起因する癌微小環境の構築に寄与する低酸素誘導因子(HIF-1)活性制御の機序解明に貢献し得る成果と期待している。

本研究から、ミトコンドリア電子伝達系複合体II変異に起因するパラグングリオーマなど大部分が良性腫瘍である腫瘍細胞は「偽」癌幹細胞の特徴を有していることを示唆する成果を得た。

また最近、神経膠腫(グリオーマ)や骨髄性白血病等において、イソクエン酸脱水素酵素(IDH: isocitrate dehydrogenase)の遺伝子変異が2-ヒドロキシグルタル酸(2-HG)の蓄積を誘導し(*Nature*, 2009. 462: 739-744, *Cancer Cell*, 2010. 17: 225-234)、ヒストン脱メチル化酵素の阻害を惹き起こすことが続けて報告されている(*Cancer Cell*, 2011. 19: 17-30, *EMBO reports*, 2011. 12: 463-469, *Nature*, 2012. 483: 474-478, 479-483, 484-488)。我々は、ミトコンドリア電子伝達系複合体II変異がIDH変異と同様に、代謝産物の蓄積とエピジェネティクス制御の変容がパラグングリオーマなどの造腫瘍発生に寄与していると考えている。

今後、更なるエネルギー代謝産物量の測定、

酵素活性の測定、ヒストン翻訳後修飾酵素活性の測定、ヒストンメチル化存在量の測定を詳細に実施することで、腫瘍の根幹を叩く分子標的治療薬や治療法の開発の一端を担う、あるいはそれらの研究推進に貢献し得る成果が得られると期待している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- (1) Takamasa Ishii, (他6名/1番目). Model animals for the study of oxidative stress from complex II. *Biochim Biophys Acta*. 有. 2013, 1827: 588-597. DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.10.016.
- (2) 石井恭正. ミトコンドリア酸化ストレス発生mev-1モデルの解析. 基礎老化研究. 有. 2013, 37: 13-20.
- (3) Yuichi Uchino, (他10名/4番目). Oxidative stress induced inflammation initiates functional decline of tear production. *PLoS One*. 有. 2012, 7: e45805. DOI: 10.1371/journal.pone.0045805.
- (4) Yuichi Uchino, (他5名/3番目). A new mouse model of dry eye disease: oxidative stress affects functional decline in the lacrimal gland. *Cornea*. 有. 2012, 31: S63-67. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31826a5de1.
- (5) Hiromi Onouchi, (他9名/2番目). Mitochondrial superoxide anion overproduction in Tet-mev-1 transgenic mice accelerates agedependent corneal cell dysfunctions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 有. 2012, 53: 5780-5787. DOI: 10.1167/iovs.12-9573.
- (6) Takamasa Ishii, (他4名/1番目). Mitochondrial superoxide anion (O<sub>2</sub>-) inducible “mev-1” animal models for aging research. *BMB reports*. 有. 2011, 44: 298-305. DOI: 10.5483/BMBRep.2011.44.5.298

[学会発表] (計22件)

- (1) 石井恭正. ミトコンドリア酸化ストレスと角膜疾患. 日本ミトコンドリア学会第12回年会. 2012年12月19日~2012年12月21日. 筑波大学大会館(つくば).
- (2) Takamasa Ishii. Effects of mitochondrial oxidative stress induced by the complex II SDHC V69E mutation on infertility and habitual

abortion. The 2012 Cold Spring Harbor Laboratory meeting on Molecular Genetics of Aging. 2012年10月09日~2012年10月13日. Cold Spring Harbor Laboratory (NY, USA).

- (3) Takamasa Ishii. Mitochondrial oxidative stress-inducible mev-1 models for aging research. *Molecular and Cellular Biology of Aging*, The 34th Japan Society for Biomedical Gerontology Symposium and Micro-Nano Global COE (招待講演). 2012年10月16日. Nagoya University School of Medicine (Nagoya).
- (4) Takamasa Ishii. The mev-1 models with an excess mitochondrial ROS for aging research. *International Symposium of Asian Association of Aging Research 2012 in Fukuoka -Biology of Aging and Disorders-* (招待講演). 2012年08月24日~2012年08月26日. Tsukushi-Kaikan/ Hotel Fukuoka Garden Palace (Fukuoka).
- (5) 石井恭正. ミトコンドリア酸化ストレスによる不妊および習慣流産. 第65回日本酸化ストレス学会学術集会. 2012年06月07日~2012年06月08日. あわぎんホール (徳島).
- (6) Takamasa Ishii. Mitochondrial Superoxide-accelerated Age-dependent Corneal Cell Dysfunctions. 2012 Spring Conference of the Korean Society for Gerontology and the 11th Korea-Japan Gerontologist Joint meeting (招待講演). 2012年06月14日~2012年06月15日. Korean National Institute of Health (Osong).
- (7) 石井恭正. 細胞内活性酸素種の生体への影響の解明. 2011年度日本放射線影響学会奨励賞受賞講演 (招待講演). 2011年11月18日. 神戸商工会議所会館 (兵庫県).
- (8) Takamasa Ishii, et al. Effect of mitochondrial O<sub>2</sub>- inducible complex II mutation on fertility and delivery in mev-1 mouse model. The 5th Biennial Meeting of SFRR-Asia, 8th Conference of ASMRM and 11th Conference of J-mit (The winner of Young Investigator Award). September 2nd, 2011. Kagoshima Citizens' Culture Hall (Kagoshima).
- (9) Takamasa Ishii, et al. Oxidative stress-related aging diseases involving mitochondrial O<sub>2</sub>- inducible “mev-1” animal models. *Metabolism and Disease at Cold Spring Harbor*

Laboratory Symposium. June 1st-7th,  
2011. Cold Spring Harbor Laboratory  
(NY, USA)

- (10) 石井恭正. ミトコンドリア電子伝達系複合体II SDHCV69E変異による酸化ストレス発生の不妊と習慣流産への影響. 日本放射線影響学会第54回大会. 2011年11月17-19日. 神戸商工会議所会館(兵庫県).
- (11) 石井恭正. 電子伝達系複合体II SDHCサブユニットV69Eアミノ酸点変異の不妊症・習慣流産への影響. 第84回日本生化学会大会. 2011年9月21-24日. 京都国際会館(京都府).

他、計 22 件.

[その他]

ホームページ等

- (1) 東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学 石井研究室  
<http://mls.med.u-tokai.ac.jp/jp/index.htm>
- (2) 東海大学医学科伊勢原キャンパス 石井恭正  
[http://kyousho.pr.tokai.ac.jp/index.php?p=s&yyg\\_shoc=030066&tsc\\_shoc=&cmp\\_sho\\_kubun\\_cd=100&yyg\\_bu\\_cd=2230&yyg\\_kyoinc=261474](http://kyousho.pr.tokai.ac.jp/index.php?p=s&yyg_shoc=030066&tsc_shoc=&cmp_sho_kubun_cd=100&yyg_bu_cd=2230&yyg_kyoinc=261474)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 恭正 (ISHII TAKAMASA)  
東海大学・医学部・講師  
研究者番号：20548680