

令和元年5月31日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14992

研究課題名（和文）PGAMによるエピジェネティクスリモデリングを介したがん悪性化機構の解明

研究課題名（英文）Tumor progression through epigenetics remodeling by RB-PGAM

研究代表者

河野 晋 (Kohno, Susumu)

金沢大学・がん進展制御研究所・特任助教

研究者番号：30625463

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）：解糖系あるいはTCA回路において産生される代謝中間体は、様々な経路において利用される。我々は、がん悪性進展過程において高頻度に不活性化されるがん抑制遺伝子RBに着目し、解糖系酵素PGAM1がRBの支配下にあることを見出している。本研究では、RB不活性化により起こる代謝変化に着目し、エピジェネティクスに与えるインパクトを解析した。その結果、RBはKDM5Aを介して、胃癌におけるグローバルなメチル化を制御し、種々の解糖系酵素がその支配下にあることを明らかにした。加えて、RB依存的な細胞分化する系において、PGAMが細胞分化を制御することが見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、何故がん細胞は、グルコースを積極的に利用するのか、その生理的意義と本質に迫ることができていない。本研究では、がん悪性進展課程におけるRBの不活性化に伴い、グルコースの利用が下がるという、従来の「がん特異的代謝」の概念とは逆の現象に着目し、エピジェネティクスの観点からがん代謝の理解を試みたものである。

研究成果の概要（英文）：The metabolic intermediates produced in the glycolytic or TCA cycle are utilized in various pathways. We focused on the tumor suppressor gene RB, which is frequently inactivated in the malignant progression of cancer, and found that the expression of glycolytic enzyme PGAM1 is regulated by RB. In this study, we focused on the metabolic changes caused by RB inactivation and analyzed the impact given by the metabolic alteration on epigenetics. As a result, RB regulates global methylation in gastric cancer via KDM5A, and it is revealed that various glycolytic enzymes are controlled by the RB-KDM5A axis. In addition, we found that PGAM contributes RB dependent cell differentiation in myogenesis of C2C12 and adipogenesis of 3T3L1.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：RB PGAM KDM5A エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは遺伝子変異の蓄積によって発生するが、その変異は環境圧で選択され、同一腫瘍の中でも複数の系譜のがん細胞集団が形成される腫瘍内不均一性が起きていることがマクロ的視点により種々のがん種で示されている。このようなクローン進化に加え、ミクロ的視点では、がん幹細胞を頂点とするヒエラルキー構造性が腫瘍内の多様性に寄与すると考えられる。これらは、化学療法により、腫瘍内の多数を占めるクローンが減少しても、治療抵抗性を示すクローンが残存して、再び大多数を占めるようになることから、治療抵抗性の本態であると言える。したがって、腫瘍内不均一性を個々の視点から理解することが治療抵抗性を克服するために重要である。

がん細胞ではドライバー遺伝子の変異により、解糖系をはじめとする種々の代謝酵素が誘導され、ダイナミックな細胞内代謝変化がもたらされる。特に、酢酸から直接アセチル-CoA を供給する ACSS は、ヒストンアセチル化とその発現が良く相関している。一方で、腫瘍内のがん細胞は極端な栄養源の枯渇と低酸素環境下におかれている。グルタミンやグルコース由来の代謝中間体はヒストン修飾などに関わるため、これら炭素源の枯渇はダイナミックなヒストン修飾変化をもたらすことが報告されている。これらを合わせると、細胞内外の代謝物の変化がエピジェネティックに大きな影響を与えている。

これまでに、p53・RB 両欠損マウスの解析よりカルシトニン産生甲状腺腫瘍のカルシトニン発現が消失していることを手がかりに、p53 欠損背景における RB の追加欠損が線維芽細胞の未分化性の獲得、つまり細胞の可塑性に関与することを報告した。また、p53 ノックアウトマウスより腫瘍モデル細胞を樹立し、RB 追加欠損を行うことにより、細胞のがん幹細胞性を獲得するモデルを新規に確立した。本モデル細胞は、RB の追加欠損により PGAM 発現低下による代謝変化を介して、がん幹細胞性を獲得することが判明している。

2. 研究の目的

細胞内不均一性を理解するには、クローン進化の視点に加え、ヒエラルキーを逸脱する細胞の可塑性獲得機構の解明が腫瘍内不均一性の理解に寄与すると考えた。RB の不活性化は、コンテキストに依存して、PGAM 発現低下を介して代謝を調節していると同時にがん幹細胞性獲得に寄与している。細胞内の代謝変化はヒストン修飾に影響を与えると推測されるが、がん幹細胞性の獲得維持とその関係は不明である。Ras などのドライバー変異が解糖系酵素を発現誘導することから、がんにおけるグルコース利用の亢進は「がん特異的代謝」として定着してきた。しかし、何故がん細胞は、グルコースを積極的に利用するのか、その生理的意義と本質に迫ることができていない。そこで本研究では PGAM 発現低下に伴うエピジェネティクス変化に着目して、細胞内代謝の変化が未分化性獲得に果たす役割と、そのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

染色体不安定型のヒト胃がん細胞では、RB の不活性化により、PGAM の発現が低下することを見出している。そこで、本研究では、以下に記した4つの項目に分けて研究を進め、ヒト胃がんにおいて、PGAM の発現低下によりヒストン修飾のリモデリングが起こることを証明し、がん細胞における代謝変化の生理的役割を細胞分化・エピジェネティクスの観点から明らかにした。

(1) PGAM 発現低下ヒト胃がん細胞における代謝動態の解析

モデル細胞のデータから、ヒト胃がん細胞でも解糖系酵素 PGAM により代謝リモデリングが引き起こされると考えた。そこで、モデル細胞から得た知見をヒト胃がんにも外挿するために、RB 欠損ヒト胃がん細胞における代謝動態を解析した。培地に放出された乳酸および消費されたグルコースの変化を定量し、比速度を算出した。加えて、細胞外フラックス解析によりリアルタイムなグルコースおよびグルタミン利用動態を計測した。また、CAGE による網羅的な mRNA 解析とそのシグネチャーの解析を行い、RB 不活性化による代謝経路の変化を明らかにした。

(2) PGAM 発現抑制下におけるヒストン修飾動態の解析

これまでの解析で、RB 欠損胃がん細胞において PGAM 発現低下に加えて、また、特定の遺伝子コード領域のヒストンアセチル化が低下していることが判明している。このことから、PGAM 発現低下によって、グルコースから供給されるピルビン酸量が減少した結果、アセチル基供与体であるアセチル CoA が低下していると推測された。そこで、培地中にピルビン酸を添加、あるいは PGAM を強制発現させた場合に、ヒストンアセチル化レベルがどのように変化するかを WB などにより明らかにした。

(3) ヒストンリモデリングと細胞機能の関係の解析

PGAM 発現を戻した胃がん細胞機能は、スフェアアッセイ、免疫不全マウスにおける造腫瘍能、BrdU を用いた細胞周期、ALDH 活性を指標として解析した。また、化学療法剤に対する耐性についても細胞生存率や Annexin V・PI 染色を指標に評価した。培地中にピルビン酸を添加した場合や KDM5A を阻害した場合も同様に検討した。また、CIN 型胃がんでは PGAM の発現が他のサブタイプと比べて抑制されているが、KDM5A 阻害により PGAM の発現が劇的にレスキューされることをこれまでに見出している。特に、複数の CIN 型胃がん細胞株における KDM5A の阻害効果を上記の方法で検討し、KDM5A-PGAM-ヒストンアセチル化が有効な治療標的になることを証明した。

また、筋芽細胞 C2C12 は、RB 依存的に分化すると同時に PGAM の発現が誘導されることに加えて、PGAM をノックアウトすることにより、分化が完全に阻害されることを見出している。そこで、この細胞分化系を用いて、RB 欠損による分化阻害が PGAM 強制発現や培地中ピルビン酸添加によりレスキューできるかどうか、分化マーカーの発現により検討した。

(4) ヒストンリモデリングによるがん幹細胞性誘導機構の解析

KDM5A-PGAM によるヒストンリモデリングを受ける遺伝子群の同定し、ヒストンリモデリングを介したがん幹細胞性誘導機構の解明を試みた。従来の RNA シーケンスでは、成熟した mRNA を測定するため、mRNA の転写変化を直接的に検出することは難しい。そこで、本研究では、転写中の mRNA を回収して測定する NET-CAGE 法を用いて、RB-KDM5A-PGAM による転写変化を定量した。

4 . 研究成果

- (1) 胃がん細胞 SNU638 あるいは AGS にて RB をノックダウンすると、PGAM の発現低下とともに培地中グルコース消費比速度、乳酸排出比速度が低下した。加えて、新規に合成される脂質に含まれるグルコース由来の炭素は RB ノックダウンによっても減少していた。リアルタイムなグルコースフローは、RB ノックダウンにより低下したが、PGAM を過剰発現させることにより、レスキューされた。また、PGAM をノックダウンすると、グルコースフローが減少したことから、RB は PGAM の発現を介してグルコース代謝を調節していることが明らかになった。
- (2) RB 胃がん細胞におけるヒストンメチル化を WB にて確認したところ、H3K4 トリメチルおよびジメチルが減少していた。一方で、グローバルな H3K9 あるいは H3K27 アセチル化は変化が認められなかった。NET-CAGE 法による解析では、eRNA も検出するので、クロマチンのオープン領域を同定できる。その結果、以前に特定したヒストンアセチル化レベルが低下していた遺伝子の領域が RB ノックダウンによりクローズしていた。
- (3) 胃がん細胞の RB をノックダウンすると、スフェア形成が誘導された。一方で、RB 欠損胃がん細胞に PGAM を過剰発現させるあるいは、培地中にピルビン酸を添加するもしくは、KDM5A 阻害剤で処理すると、スフェア形成が抑制された。しかしながら、RB 欠損胃がん細胞において、PGAM を過剰発現しても、細胞周期や増殖、薬剤耐性、以前に報告されている胃がん幹細胞マーカーの ALDH 活性や CD44v 発現に影響は認められなかった。一方で、PGAM 過剰発現胃がん細胞や KDM5A ノックダウン細胞の腫瘍形成は抑制されることが判明した。さらに、RB インタクトな胃がん細胞において PGAM をノックダウンするとスフェア形成が誘導された。また、RB をノックダウンした筋芽細胞 C2C12 の分化誘導培地にピルビン酸を添加すると、RB 欠損により阻害された分化が一部レスキューされた。つまり、RB は PGAM の発現を介して未分化性獲得あるいは終末分化をコントロールしていることが示唆された。
- (4) RB-KDM5A-PGAM による発現制御を受ける遺伝子を NET-CAGE 法を用いて同定した。RB-KDM5A で制御される遺伝子数は 70 であり、この内には PGAM をはじめとして複数の解糖系酵素が含まれていた。また、RB-PGAM により制御される遺伝子には、幅広い遺伝子変化が予想されたが、一定の傾向が認められ、特に脂質・コレステロール代謝に関わる酵素が多数含まれていた。

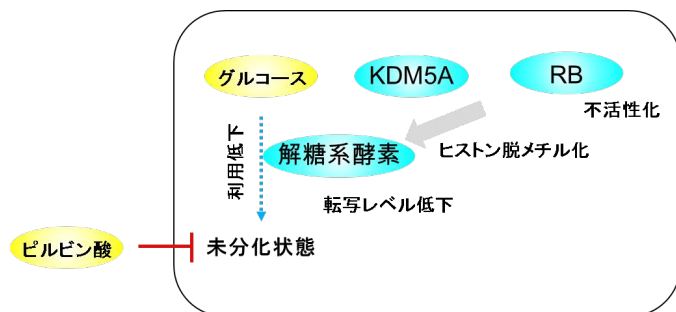


図 1 : RB 不活性化細胞における代謝様式

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Murata T, Yamaguchi Y, Kohno S, Takahashi C, Kakimoto M, Sugimura Y, Kamihara M, Hikita K and Kaneda N. Regucalcin confers resistance to amyloid-β toxicity in neuronally differentiated PC12 cells. *FEBS openbio*, 8:349-360, 2018. doi:10.1002/2211-5463.12374

Nishimura T, Nakata A, Xiaoxi C, Nishi K, Meguro-Horike M, Sasaki S, Kita K, Horike S, Saitoh K,

Kato K, Kaori I, Murayama T, Kohno S, Takahashi C, Mukaida M, Yano S, Soga T, Tojo A and Gotoh N. Cancer stem-like properties and gefitinib resistance are dependent on purine synthetic metabolism mediated by the mitochondrial enzyme MTHFD2. *Oncogene*, 38: 2464–2481, 2018. doi: 10.1038/s41388-018-0589-1.

Kitajima S, Yoshida A, Kohno S, Li F, Suzuki S, Nagatani N, Nishimoto Y, Sasaki N, Hayato M, Wan Y, Thai T C, Okahashi N, Matsuda F, Shimizu H, Nishiuchi T, Suzuki Y, Tominaga K, Gotoh N, Suzuki M, Ewen M E, Barbie D A, Hirose O, Tanaka T and Takahashi C. The RB-IL-6 axis controls self-renewal and endocrine therapy resistance by fine-tuning mitochondrial activity. *Oncogene*, 36:5145-5157, 2017. doi:10.1038/onc.2017.124

Yoshida A, Kitajima S, Li F, Chaoyang C, Yujiro T, Kohno S, Wan Y, Hayashi N, Muranaka H, Nishimoto Y, Nagatani N, Nishiuchi T, Thai T C, Suzuki S, Nakao S, Tanaka T, Hirose O, Barbie D A and Takahashi C. *MicroRNA-140* mediates RB tumor suppressor function to control stem cell-like activity through interleukin-6. *Oncotarget*, 8:13872-13885, 2017. doi: 10.18632/oncotarget.14681

Muranaka H, Hayashi A, Minami K, Kitajima S, Kohno S, Nishimoto Y, Nagatani N, Suzuki M, Kulathunga N, Sasaki N, Okada N, Matsuzaka T, Shimano H, Tada H and Takahashi C. A distinct function of the retinoblastoma protein in the control of lipid composition identified by lipidomic profiling. *Oncogenesis*, 6:e350, 2017 Jun 26. doi: 10.1038/oncsis.2017.51.

〔学会発表〕(計 6 件)

河野晋, 岡橋伸幸, 松田史生, 清水浩, 高橋智聡. ヒストン脱メチル化酵素 KDM5A と RB が制御する代謝分子の探索. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 28 日 (大阪市/リーガロイヤルホテル大阪 : 9/27-29)

河野晋, 岡橋伸幸, 松田史生, 清水浩, 高橋智聡. ヒストン脱メチル化酵素 KDM5A と RB が制御する代謝分子の探索. 第 1 回 金沢大学がん進展制御研究所・国立がん研究センター研究所若手研究発表会 2018 年 7 月 5 日 (和倉町/ホテル海望 : 7/5-6)

Kohno S and Takahashi C. RB controls differentiation through positive regulation of phosphoglycerate mutases. Abcam Cancer and Metabolism conference 2018 2018 年 6 月 26 日 (Cambridge, UK / Fitzwilliam college : 6/25-27)

河野晋, 岡橋伸幸, 松田史生, 清水浩, 高橋智聡. ヒストン脱メチル化酵素 KDM5A と RB が制御する代謝分子の探索. 第 6 回がん代謝研究会 2018 年 5 月 11 日(奄美市/奄美観光ホテル : 5/10-11)

河野晋, 岡橋伸幸, 松田史生, 清水浩, 高橋智聡. 悪性進展過程における RB の代謝調節機能. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 8, 9 日 (神戸市/神戸ポートアイランド : 12/6-9)

河野晋, Paing Linn, 高橋智聡. 前立腺がんにおける RB ホモ欠損に伴う脆弱性の獲得. 第 5 回がん代謝研究会 2017 年 7 月 14 日 (札幌/北海道大学医学部学友会館 : 7/13-14)

〔図書〕(計 5 件)

河野晋. 実験医学 News and Hot Paper Digest 「GTP 合成経路は小細胞肺がんのアキレス腱になる」 Vol.36 No.16 p2751, 2018 菅浪孝祥 編, 羊土社刊

河野晋. 実験医学 News and Hot Paper Digest 「腫瘍内微小環境では窒素源としてアンモニアが再利用される？」 Vol.36 No.6 p983-984, 2018 井上尊生 編, 羊土社刊

河野晋. 実験医学 News and Hot Paper Digest 「ゲムシタピン耐性は細胞内 CTP 合成の亢進により引き起こされる」 Vol.35 No.16 p2732-2733, 2017 武部貴則 編, 羊土社刊

河野晋. 実験医学 News and Hot Paper Digest 「腫瘍内不均一性はグルタミン欠乏により引き起こされる？」 Vol.35 No.6 p955-956, 2017 佐々木努編, 羊土社刊

河野晋, 村中勇人, 北嶋俊輔, 佐々木信成, 鈴木美砂, 高橋智聡. 実験医学増刊号「RB とがんの代謝」 Vol.35 No.10 p21-25, 2017 曾我朋義編, 羊土社刊

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://omb.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。