

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790846

研究課題名（和文） ゲノムワイド siRNA ライブラリーを用いた新規解糖系制御遺伝子探索と疾患への応用

研究課題名（英文） Exploring novel genes that regulate glycolysis using a genome-wide siRNA library

研究代表者

坂本 毅治（SAKAMOTO TAKEHARU）

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70511418

研究成果の概要（和文）：解糖系は癌や炎症性疾患などで重要な役割を果たすエネルギー産生機構であるが、その制御機構は未だ不明な点が多い。そこで本研究では、ゲノムワイド siRNA ライブラリーを用いて解糖系制御に関わる遺伝子を探索し、新規に解糖系制御に関わる遺伝子を 19 個同定した。これらの遺伝子の中には、その遺伝子発現を抑制することで癌細胞の増殖を抑えるものや、マクロファージの機能を抑制するものが見られた。これらの新規遺伝子は、解糖系制御を介して癌、炎症性疾患などの疾患の新たな治療標的になるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Glycolysis is a system of energy production which plays an important role in many diseases such as cancer and inflammatory diseases. However, how glycolysis is regulated remains unclear. To address this, we explored novel genes that regulate glycolysis using a genome-wide siRNA library, and identified novel 19 genes. Some of these genes regulate cancer cell growth or macrophage function. Therefore, these genes we identified in this study might be therapeutic targets for cancer or inflammatory diseases.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：解糖系、siRNA ライブラリー、癌細胞、マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

解糖系は癌、免疫疾患、糖尿病など多くの疾患で重要な役割を果たすエネルギー産生機構であるが、その制御機構は未だ不明な点が多い。申請者はマクロファージ、癌細胞の研究から細胞浸潤に関わる膜型の細胞外基質分解酵素である MT1-MMP が酵素活性非依存的に解糖系を制御するという既存の報告から

は予測され得ない発見をしたことから、真に解糖系制御を理解するにはバイアスのない遺伝子機能解析が重要だと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究ではゲノムワイドの siRNA ライブラリーを用いて新規解糖系制御遺伝子を網羅的に同定し、解糖系制御の新たなパラダイムの

創生と解糖系関連疾患への応用を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) siRNA ライブラリー導入細胞株の低酸素下、解糖系阻害剤存在下での培養とアレイ解析

肺癌細胞株 PC-8 にゲノムワイドの siRNA ライブラリー GeneNet™ Human 50K siRNA Library (B-bridge) を導入し、通常酸素下での解糖系を制御する遺伝子を解糖系阻害剤 2-deoxyglucose 存在下での培養群との比較することで、また低酸素下での解糖系の影響を 1% O<sub>2</sub> 下での培養細胞群との比較することで、酸素依存的、非依存的解糖系制御因子の探索を行った。

アレイ解析により選出された解糖系制御候補遺伝子に対して、再度 shRNA を導入してノックダウン細胞を作製し増殖アッセイを行い、アレイ解析と同様の結果が出る遺伝子を同定した。次に、増殖に影響が出た遺伝子について、解糖系制御に関わるかどうかを解糖系の最終代謝産物である乳酸の産生量を測定することで解析した。

#### (2) 解糖系機能解析

ノックダウン細胞で乳酸産生に異常がみられた新規解糖系制御遺伝子を中心に、グルコース取り込み量、解糖系遺伝子の発現、解糖系酵素や PDH など各酵素活性を解析し、解糖系のどのステップに影響を与えるかを解析した。

#### (3) 分子間相互作用のネットワーク解析

解糖系の同じステップに影響を与える新規解糖系制御遺伝子ごとにグループ分けをし、データベースを利用したパスウェイ解析を行うことで、新規解糖系制御遺伝子どうしの関連性を整理し、共通する相互作用分子を中心に解糖系制御メカニズムを明らかにした。

#### (4) 腫瘍増殖に対する新規解糖系制御遺伝子の機能解析

癌細胞は解糖系に依存して増殖するが、癌の種類により特定の遺伝子の腫瘍増殖に対する影響度が異なることが考えられる。そこで PC8 以外にも肺癌、胃癌、乳癌など各種癌細胞株での新規解糖系制御遺伝子の機能を確認し、どの種類の癌で一番影響が見られるかを確認した。続いて、通常培養よりさらに解糖系に依存した腫瘍増殖が確認され in vivo での腫瘍増殖をよく反映する軟寒天培養を行い、in vivo への解析へ進める新規解糖系制御遺伝子を選抜した。In vitro での実験で選抜した新規解糖系制御遺伝子をノックダウンした

癌細胞、野生型および変異体を発現した細胞、ドキシサイクリンによる誘導性発現またはノックダウン細胞を作製し、ヌードマウス皮下や同所性に移植し腫瘍の増殖を解析した。

(5) マクロファージの機能および関連炎症性疾患に対する新規解糖系制御遺伝子の機能解析

新規解糖系制御遺伝子が癌以外の疾患にどのように影響するかを解析するため、解糖系を利用し炎症性疾患に重要な役割を果たしているマクロファージとその関連疾患を研究の対象とした。新規解糖系制御遺伝子のマクロファージでの発現を shRNA 発現レンチウィルスベクターを用いて抑制し、その解糖系への影響、運動能、サイトカイン産生能や食欲といった細胞機能への影響を解析した。

### 4. 研究成果

2010年度に実施したスクリーニング、および検証実験の結果、酸素依存性の細胞性増殖に関わる遺伝子13個、解糖系阻害剤2DG存在下での細胞増殖に関わる遺伝子7個を同定した。この中で酸素依存性細胞増殖に関わる遺伝子1個は酸素依存性増殖に関して既知のものであったが、残りの19遺伝子については新規の遺伝子であった。またこれら19遺伝子間のパスウェイ解析、gene ontology 解析を行った結果、RNA代謝に関わる遺伝子が6個見出された他は、特定の機能やパスウェイに偏ることはなく、さまざまな細胞機能と解糖系に関わることが示唆された。この成果の一部は論文報告を行っている (Yoshino et al., PLoS ONE, 2012)。

2011年度では、これらの遺伝子についてがん細胞とマクロファージにおける役割について解析を行った。その結果、分子Aはがん細胞において足場非依存状態でのエネルギー代謝に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、分子Aをノックダウンすることでin vivoでのがん細胞の増殖を制御することが明らかとなった (論文投稿中)。また分子Bは、エネルギー飢餓環境でのがん細胞の増殖・生存を制御していることが明らかとなり、この分子を抑制することで造腫瘍能が著しく低下することが明らかとなった (投稿準備中)。一方マクロファージにおいては、分子Cが解糖系を介したエネルギー産生と運動能、サイトカイン産生能などの細胞機能に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

本研究では全研究期間を通じて、ゲノムワイド siRNA ライブラリーを用いることで新たな解糖系制御分子の網羅的同定に成功し、新

たな解糖系制御のメカニズムが明らかとなった。またこれら新規解糖系制御分子ががん細胞やマクロファージで重要な役割を果たしていることが明らかとなった。今後これらの知見を基にさらなる研究を展開することによって、解糖系制御機構を利用した疾患治療への応用が期待される

今後は同定した遺伝子の生理的な役割について、ノックアウトマウスを作製するなどして個体レベルでの解析を進める予定である。また、同定した遺伝子が治療標的になるかについて疾患モデルを用いた解析を進める。

#### 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 7 件)

1. Yoshino S, Hara T, Weng JS, Takahashi Y, Seiki M, Sakamoto T (2012) Genetic Screening of New Genes Responsible for Cellular Adaptation to Hypoxia Using a Genome-Wide shRNA Library. *PLoS one* **7**: e35590、査読有。  
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0035590>
2. Hara T, Mimura K, Seiki M, Sakamoto T (2011) Genetic dissection of proteolytic and non-proteolytic contributions of MT1-MMP to macrophage invasion. *Biochemical and biophysical research communications* **413**: 277-281、査読有
3. Hara T, Mimura K, Abe T, Shioi G, Seiki M, Sakamoto T (2011) Deletion of the Mint3/Apba3 gene in mice abrogates macrophage functions and increases resistance to lipopolysaccharide-induced septic shock. *The Journal of biological chemistry* **286**: 32542-32551、査読有
4. Sakamoto T, Niiya D, Seiki M (2011) Targeting the Warburg effect that arises in tumor cells expressing membrane type-1 matrix metalloproteinase. *The Journal of biological chemistry* **286**: 14691-14704、査読有
5. Nagano M, Hoshino D, Sakamoto T, Akizawa T, Koshikawa N, Seiki M (2011) ZF21 is a new regulator of focal adhesion

disassembly and a potential member of the spreading initiation center. *Cell adhesion & migration* **5**: 23-28、査読有

6. Nagano M, Hoshino D, Sakamoto T, Kawasaki N, Koshikawa N, Seiki M (2010) ZF21 protein regulates cell adhesion and motility. *The Journal of biological chemistry* **285**: 21013-21022、査読有
7. Sakamoto T, Seiki M (2010) A membrane protease regulates energy production in macrophages by activating hypoxia-inducible factor-1 via a non-proteolytic mechanism. *The Journal of biological chemistry* **285**: 29951-29964、査読有

[学会発表] (計 25 件)

1. Takeharu Sakamoto, Motoharu Seiki. Mint3 is a new molecular target for metastasis suppression. The 16th JFCR- ISCC, 2012/01/25, 東京
2. Takeharu Sakamoto, Motoharu Seiki. Targeting the Warburg effect that arises in tumor cells expressing membrane type-1 matrix metalloprotease. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011/12/15、横浜
3. Takeharu Sakamoto, Motoharu Seiki, Targeting the Warburg effect that arises in tumor cells expressing membrane type-1 matrix metalloprotease, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011/10/04, 名古屋
4. Takeharu Sakamoto, Motoharu Seiki, MT1-MMP/Mint3 は通常酸素下で HIF-1 を活性化しマクロファージおよび癌細胞の解糖系を亢進させる, 日本がん分子標的治療学会第 15 回学術集会, 2011/06/25, 東京
5. Takeharu Sakamoto and Motoharu Seiki, A membrane protease regulates energy production in macrophages by activating Hypoxia-Inducible Factor-1 via a non-proteolytic mechanism, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010/12/07, 神戸
6. Takeharu Sakamoto and Motoharu Seiki, A membrane protease regulates energy production in macrophages by activating Hypoxia-Inducible Factor-1 via a

non-proteolytic mechanism, 第 69 回日本  
癌学会学術会議, 2010/09/22, 大阪

7. Takeharu Sakamoto and Motoharu Seiki,  
MT1-MMP/Mint3 axis augments glycolysis in  
macrophages and cancer cells, 「がん研究  
分野の特性等を踏まえた支援活動」がん若手  
ワークショップ, 2010/09/03, 蓼科

8. Takeharu Sakamoto and Motoharu Seiki,  
Mint3 enhances the activity of HIF-1 in  
macrophages by suppressing the activity of  
FIH-1, 第 19 回日本がん転移学会学術集会・  
総会, 2010/06/16, 金沢

9. Takeharu Sakamoto and Motoharu Seiki,  
Mint3 enhances the activity of HIF-1 in  
macrophages by suppressing the activity  
of FIH-1, 18th International Symposium  
on Molecular Cell Biology of Macrophages,  
2010/05/20, 熊本

他 16 件

〔図書〕 (計 1 件)

坂本毅治・清木元治、南山堂、がんの浸潤・  
転移 第 20 章 細胞外マトリックス (ECM)、  
p191-200, 2011

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.motoharu-seiki.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂本 毅治 (SAKAMOTO TAKEHARU)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：70511418

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：