

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05789

研究課題名（和文）酸性適応におけるlysosomal exocytosisの普遍的重要性の解明

研究課題名（英文）The general importance of lysosomal exocytosis in acid adaptation

研究代表者

船戸 洋佑（Funato, Yosuke）

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：60505775

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 24,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は細胞の新たな酸性環境適応機構としてのlysosomal exocytosisの普遍的重要性の解明を目的として行った。その成果として、酸性環境下で起きるPRL3の発現上昇がlysosomal exocytosisの惹起に重要であることを見つけ、悪性がん細胞で起きているPRL3の過剰発現が本来細胞が有する、生理的な酸性環境適応の一端であることが明らかとなった。また標的既知の化合物ライブラリーを用いたスクリーニングより、悪性がん組織で活性化しているシグナル伝達経路の重要性も明らかにしつつあり、合わせてlysosomal exocytosisの普遍的重要性の解明に寄与できたと位置づけられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりlysosomal exocytosisの普遍的重要性を明らかにでき、酸性環境適応の理解が大きく進んだと考えられる。今後さらに多様な生物種においても同様の仕組みで酸性環境適応が行われているかなど、研究を展開させてゆくことで地球上の生命に共通した、さらに「普遍的」な重要性についても明らかにしてゆけると期待される。

研究成果の概要（英文）：We found that increased PRL3 expression under acidic conditions is important for the induction of lysosomal exocytosis, and that the overexpression of PRL3 in malignant cancer cells is part of the physiological adaptation to the acidic environment. In addition, from chemical screening using compounds with known targets we also revealed the importance of signaling pathways that are activated in malignant cancer tissues.

研究分野：医化学関連

キーワード：酸性環境適応 lysosomal exocytosis PRL リソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は常に様々な環境の変化を「ストレス」として感知、応答し、それに適応することで細胞としての機能を維持している。このようなストレスの感知・応答機構の研究は酸化ストレスや低酸素ストレスについて研究が進んでおり、それぞれの応答に必須の転写因子として NRF2 および HIF-1 が同定されている。一方、pH もまたその変動は細胞にとってストレスとなることは広く知られており、各種生化学反応の根源的パラメータであるにも関わらず、細胞が pH の変化を感知、応答する仕組みはよくわかっていない。腫瘍内の酸性環境に対する適応機構については注目されており、これまで細胞内の一般的な pH 制御分子として同定されてきた Na⁺/H⁺交換体 (NHE) やモノカルボン酸輸送体 (MCT)、炭酸脱水素酵素 (CA) などに着目した研究が進められてきた。これらの分子についてはヒトがん組織での高発現やがん細胞増殖への重要性等が報告されている一方、Na⁺/H⁺の 1:1 交換体である NHE は原理的に悪性腫瘍内で生じる pH 6.5 やそれ以下の強く酸性化された環境では H⁺を排出できず (Dascalu, FEBS Lett 1991 など)、他の分子もエネルギー的に不利な状況に逆らった H⁺排出に適さない。このため、既存の分子群では悪性腫瘍内での酸性環境への適応が説明できず、全く新たなメカニズムの発見が必要と考えられていた。

私は転移性ヒト大腸がんなど、各種悪性ヒトがん組織で高発現している PRL にフォーカスした研究を行っている。これまでその成果として、PRL は Mg²⁺排出トランスポーター-CNNM と直接結合しそのはたらきを阻害することや、この阻害が PRL によるがん悪性化に重要であることなどを明らかにしてきた (*J. Clin. Invest.* 2014; *EMBO Rep.* 2016 など)。さらに PRL を高発現する細胞を用いて細胞レベルでの PRL の機能を調べていたところ、PRL 高発現細胞では環境 pH に対する応答性が変化していた。すなわち、通常の細胞が私たちの体内の細胞外環境として知られる pH 7.4 前後で最も盛んに増殖するのに対して、PRL 高発現細胞では最も増えやすい「至適 pH」が腫瘍組織内など、病的な環境でしか見ることのできない pH 6.5 の弱酸性条件へとシフトしていた。

さらにこの仕組みを追究したところ、PRL 高発現細胞ではリソソームの動態が変化しており、リソソームが細胞膜と融合し、高濃度の H⁺などリソソーム内腔の物質を細胞外へと放出する「lysosomal exocytosis」が活性化していることを明らかにした。細胞が低 pH 環境に応答、適応する新しい仕組みと考えられ、この lysosomal exocytosis の分子機構と、その酸性適応における種を超えた重要性を明らかにすることで、この現象の pH ストレス応答機構としての普遍的な重要性を明らかにできると思われた。

2. 研究の目的

本研究では上述の予備的実験結果に立脚して、酸性適応における lysosomal exocytosis の分子メカニズム、およびそのがん種・生物種を超えた普遍的な重要性を明らかにすることを目的と定めた。Lysosomal exocytosis を介した H⁺の細胞外放出は V-ATPase による ATP 加水分解エネルギーをその原動力としている。つまり上述の NHE などでは H⁺の放出が不可能である、強く酸性化された悪性腫瘍内でも H⁺排出が可能であり、酸性適応機構の解明に支障となっていた一つの重要課題に答えるものである。

3. 研究の方法

(1) ノックダウン・ノックアウト細胞株の樹立

ノックダウン細胞株は、標的遺伝子に対する shRNA を安定発現させることで作成した。標的遺伝子に対応する配列を組み込んだ pLKO.1 puro (大阪大学大学院医学系研究科・附属共同研究実習センターより供与) を HEK293T 細胞に遺伝子導入することでレンチウィルスを作らせ、その後各種培養細胞に感染させることによって目的の細胞株を樹立した。

ノックアウト細胞株は CRISPR/Cas9 法によって行っている。標的配列を挿入した LentiCrispr v2 を HEK293T 細胞に遺伝子導入することでレンチウィルスを作らせ、その後各種培養細胞に感染させた。その後、限外希釈によって各細胞を分取し、ウェスタンブロットやゲノム DNA 解析により標的遺伝子のノックアウトを確認したものを以降の実験に使用した。

(2) 至適 pH の評価

各 pH に固定した培地は、DMEM 培地に 25 mM HEPES を加えた後、HCl または NaOH を用いて目的の pH に調節することで作成した。播種後 12 時間後の細胞を各 pH に調節した培地と交換後、3 日間培養しその生細胞数を計測することで評価した。

(3) Lysosomal exocytosis の評価

Lysosomal exocytosis の評価は、リソソームマーカー分子 LAMP に対する抗体を用いた FACS 解析により求めた。細胞を 4% パラホルムアルデヒドを用いて 4°C で固定後、抗 LAMP2 抗体 (ヒト細胞の場合) あるいは抗 LAMP1 抗体 (マウス細胞の場合) を用いて細胞を蛍光染色し、フロ

ーサイトメーターAttune NxT (Thermo) を用いて解析することで LAMP が細胞表面に露出している細胞の割合を求めた。また補助的に、リソソーム中の酵素 β -hexosaminidase の培地中への分泌量を測ることで lysosomal exocytosis を評価している。この場合は培地を回収後、 β -hexosaminidase の基質である 4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide と混和し、反応後 405 nm の吸光度を測ることで β -hexosaminidase の活性を求め、細胞溶解液中の活性との比較より lysosomal exocytosis の度合いを評価した。

4 . 研究成果

(1) 酸性環境適応における内在性 PRL の重要性の検証

これまでの実験結果は主に PRL の誘導発現系によって得られていたため、内在性 PRL の重要性を調べるべく、まず酸性環境 (pH 6.5) で細胞を培養した際の PRL の発現レベルを調べた。その結果、qPCR およびウェスタンブロットによりそれぞれ mRNA、蛋白質レベルで PRL3 の発現量が通常の範囲内である pH 7.5 での培養時と比べて明確に上昇することが明らかとなった (下図 1 左)。またこの際、この発現上昇に同期して lysosomal exocytosis もまた活性化することを確認している (図 1 右)。この酸性環境下で生じる lysosomal exocytosis の活性化に対する PRL3 の重要性を明らかにするべく、PRL3 のノックダウン実験を行ったところ、用いた 2 種類の siRNA のいずれにおいても、細胞を酸性環境下で培養することで起きていた PRL3 の発現上昇と lysosomal exocytosis の活性化が抑制されていた。これらの結果より、PRL による lysosomal exocytosis の活性化は本来細胞が酸性環境に晒されたときに起きる生理的・普遍的な現象であること、かつがん細胞は PRL を異常に高発現させることにより lysosomal exocytosis を過剰に活性化させることで、酸性環境に強く適応できていることが明らかとなった。

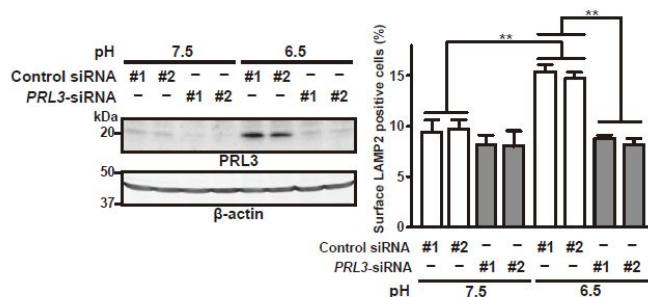


図 1 : 酸性環境下における内在性 PRL3 の発現上昇とその lysosomal exocytosis における重要性

(2) 標的既知の化合物ライブラリーを用いたケミカルスクリーニング

PRL によって生じる酸性環境適応のさらなる機構解明や、多様な生物種で用いることのできる lysosomal exocytosis/酸性環境適応の活性化・阻害剤を得るため、標的既知の化合物ライブラリーを用いたケミカルスクリーニングを実施した。PRL 発現細胞は酸性環境適応の代償として、pH 8.0 などの通常細胞にとっては盛んに増殖し続けることのできる弱アルカリ環境に対しても脆弱であり死滅する。このことを利用し、培地中添加によって弱アルカリ環境での PRL 発現細胞の減少を抑制できる化合物を選別した。約 1600 化合物の中から得られた 40 化合物のヒット化合物についてカテゴライズしたところ、そのうち 9 個はさまざまながん種の悪性化と関わるものが知られているシグナル伝達経路の受容体をターゲットとするものであった。実際、この分子のノックアウト細胞を作成したところ、PRL 依存的な lysosomal exocytosis および酸性環境適応が明確に抑制され、この分子およびシグナル伝達経路の重要性が新たに明らかとなった。同経路が広汎な悪性ヒトがん組織で活性化していることから、PRL 高発現細胞に限定されない、より広汎な酸性環境適応機構に迫れる結果と位置付けられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Lohani Sweksha, Funato Yosuke, Akieda Yuki, Mizutani Kiyohito, Takai Yoshimi, Ishitani Tohru, Miki Hiroaki	4. 巻 135
2. 論文標題 A novel role for PRL in regulating epithelial cell density by inducing apoptosis at confluence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs258550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.258550	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 Funato Yosuke, Miki Hiroaki	4. 巻 148
2. 論文標題 The emerging roles and therapeutic potential of cyclin M/CorC family of Mg ²⁺ transporters	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 14~18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.09.004	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 Funato Yosuke, Yamazaki Daisuke, Okuzaki Daisuke, Yamamoto Nobuhiko, Miki Hiroaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Importance of the renal ion channel TRPM6 in the circadian secretion of renin to raise blood pressure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24063-2	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 Huang Yichen, Mu Kaijie, Teng Xinyu, Zhao Yimeng, Funato Yosuke, Miki Hiroaki, Zhu Weiliang, Xu Zhijian, Hattori Motoyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Identification and mechanistic analysis of an inhibitor of the CorC Mg ²⁺ transporter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102370~102370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102370	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 該当する

1. 著者名 Huang Yichen, Jin Fei, Funato Yosuke, Xu Zhijian, Zhu Weiliang, Wang Jing, Sun Minxuan, Zhao Yimeng, Yu Ye, Miki Hiroaki, Hattori Motoyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Structural basis for the Mg ²⁺ recognition and regulation of the CorC Mg ²⁺ transporter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabe6140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abe6140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wu Yanying, Funato Yosuke, Meschi Eleonora, Jovanoski Kristijan D, Miki Hiroaki, Waddell Scott	4. 巻 9
2. 論文標題 Magnesium efflux from Drosophila Kenyon cells is critical for normal and diet-enhanced long-term memory	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e61339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.61339	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Funato Yosuke, Yoshida Atsushi, Hirata Yusuke, Hashizume Osamu, Yamazaki Daisuke, Miki Hiroaki	4. 巻 55
2. 論文標題 The Oncogenic PRL Protein Causes Acid Addiction of Cells by Stimulating Lysosomal Exocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 387 ~ 397 .e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2020.08.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kozlov Guennadi, Funato Yosuke, Chen Yu Seby, Zhang Zhidian, Illes Katalin, Miki Hiroaki, Gehring Kalle	4. 巻 295
2. 論文標題 PRL3 pseudophosphatase activity is necessary and sufficient to promote metastatic growth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11682 ~ 11692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014464	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hashizume Osamu, Funato Yosuke, Yamazaki Daisuke, Miki Hiroaki	4. 巻 33
2. 論文標題 Excessive Mg ²⁺ Impairs Intestinal Homeostasis by Enhanced Production of Adenosine Triphosphate and Reactive Oxygen Species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants & Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 20 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ars.2019.7951	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 船戸洋佑、橋爪脩、山崎大輔、三木裕明
2. 発表標題 Maintenance of magnesium homeostasis by CNNM and various diseases caused by its disruption
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 船戸洋佑、橋爪脩、山崎大輔、三木裕明
2. 発表標題 Mg ²⁺ トランスポーターCNNMの生物学的重要性と治療標的としての可能性
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 船戸洋佑、本田茉莉、山崎大輔、三木裕明
2. 発表標題 がん細胞の酸性環境適応機構「acid addiction」の分子メカニズム解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 船戸 洋佑, 橋爪 脩, 吉田 篤, 本田 茉莉, 山崎 大輔, 三木 裕明
2. 発表標題 がん細胞の酸性環境への新規適応機構「acid addiction」の発見
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 船戸 洋佑, 橋爪 脩, 吉田 篤, 山崎 大輔, 三木 裕明
2. 発表標題 CNNMによるマグネシウムの輸送とその医学生物学的重要性
3. 学会等名 2020年度生理研研究会『上皮膜輸送の多様性・調和機構を基盤とする異分野融合研究の創出』（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔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			
中国	Fudan University			
英国	The University of Oxford			
カナダ	McGill University			