

平成 30 年 9 月 7 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08318

研究課題名(和文)細胞内pH制御を介したがん細胞移動におけるIRBITファミリーの機能解析

研究課題名(英文) Long IRBIT regulates cell migration through modulating bicarbonate/chloride anion exchanger activity.

研究代表者

濱田 浩一 (HAMADA, Koichi)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00343070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞では細胞内外pHの異常が悪性化に寄与している。IRBITファミリーは、種々のイオントランスポーターと結合し、細胞内pHを制御していることが知られている。そこでマスマスプロトメトリック解析によりIRBITファミリー結合タンパク質として陰イオン交換体を同定した。Long-IRBIT及び陰イオン交換体ノックダウン細胞は、ともに細胞移動能が顕著に低下していた。また免疫沈降により、Long-IRBITと陰イオン交換体の直接的な結合を確認した。さらにIRBITファミリーの陰イオン交換能の依存性を検討するために、細胞内pHを測定したところ、有意な陰イオン交換能が減少していた。

研究成果の概要(英文)：[Purpose] Migration of cancer cells is one of critical parameters in metastasis. We found that more highly metastatic cells showed higher expression of long-IRBIT in both mouse and human melanoma cell lines, suggesting the potential role of long-IRBIT in metastasis. To examine the possibility, we searched for long-IRBIT binding proteins in highly metastatic melanoma cells, and tried to clarify the function of long-IRBIT and its binding protein in cell migration. [Result] A bicarbonate/chloride anion exchanger is identified as a binding protein of Long-IRBIT. Each melanoma cell knocked down for Long-IRBIT or the anion exchanger showed drastic decrease in cell migration ability. Activity of the anion exchanger is significantly reduced in Long-IRBIT knockdown cells. These results suggest that long-IRBIT positively modulates activity of the anion exchanger causing enhancement of cell migration.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞内pH

1. 研究開始当初の背景

生体の恒常性維持は、細胞内 pH の影響を強く受けており、個々の細胞が正常に機能するためには、細胞内 pH が厳密に制御されなければならない。従って正常細胞では、細胞内の pH はおよそ 7.2 付近の極めて狭い範囲に維持されている。一方、がん細胞では、代謝異常のために細胞内 pH が正常細胞よりも低くなっていること (pH 7.0-7.2) が知られている。また、細胞外 pH に着目すると、正常組織では pH7.4 に維持されているのに対して、がん組織では pH6.7-7.1 と低 pH となっている。この理由として、がん細胞の代謝異常により乳酸をはじめとする多量の酸性物質が細胞内で産生されることや、これらの酸性物質が細胞外に排出されるためである。またがん組織には血管が全くない領域があり、その結果がん組織から酸性物質を拡散することが困難となっている。さらに、これらの細胞内外 pH の酸性化は、がん細胞の浸潤能・転移能を高めるだけでなく、基底膜の分解を促しており、がんの増殖・進展に選択的な利点をもたらしている。加えて悪環境に曝されたがん細胞ほど、悪性度が高くなっていることも報告されている。さらに、近年これらの細胞内外 pH 制御による新たながん治療の可能性も提示されており、詳細な細胞内 pH 制御機構の分子メカニズムの解析が必要とされている。

IRBIT(IP3 receptor binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate、別名 AHCYL1)は、2003 年に細胞内カルシウムチャンネルであるイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP3) 受容体に結合し、このレセプターの機能を負に制御する分子として同定された。その後、予想外にも Na⁺/HCO₃⁻-cotransporter である NBCe1-B に結合することで、細胞内の pH を制御する分子であることが示された(Shirakabe et al., Proc Natl Acad Sci USA 103, p9542, 2006)。さらに Na⁺/H⁺交換輸送体である NHE3 や、Cl-channel である CFTR、さらに Cl⁻/HCO₃⁻交換体 SLC26A6 などの pH 制御分子と結合し、その活性化に関与していることが示されている。一方、2009 年に IRBIT のホモログである Long-IRBIT が同定されているが、IRBIT と異なり IP3 受容体に結合できないことから、IRBIT とは異なった新たな役割を持つことが予想されている。しかし、これまで IRBIT/Long-IRBIT によるがん細胞の移動・転移の関係については、まったく報告されていないのが現状である。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究は IRBIT および Long-IRBIT ノックダウン細胞を作製、さらに、IRBIT および Long-IRBIT 欠損マウスを用い、がん細胞の移動・転移における IRBIT/Long-IRBIT の生理機能を解明し、IRBIT/Long-IRBIT を新たな創薬ターゲット

とした悪性腫瘍治療薬の開発への基盤となる基礎研究を行なう。

3. 研究の方法

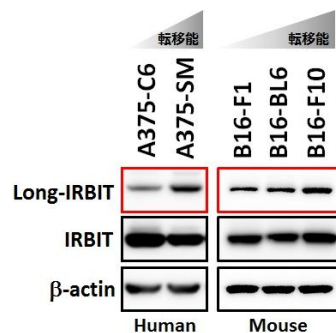
(1) 転移能の異なったマウスおよびヒトメラノーマ細胞における IRBIT ファミリーの発現の差異をウエスタンブロット法により検討を行った。さらに IRBIT ファミリー特異的 siRNA を用いてノックダウンを行い、スクラッチアッセイにより細胞移動能の検討を行った。

(2) IRBIT ファミリーの新規タンパク質の同定を行うために、高転移能の細胞溶解液を用いて、抗 Long-IRBIT 抗体で免疫沈降さらにマスペクトロメトリー解析を行った。さらに、得られた結合タンパク質の詳細な相互作用を調べるために、各タンパク質の変異体を作成し、結合能の確認を行った。

(3) 上述で同定した IRBIT 新規結合タンパク質を介して細胞内 pH を制御しているのかを、pH 指示薬である SNARF-1 AM を細胞に取り込ませて共焦点レーザー顕微鏡を用いて測定を行った。さらに細胞体積の変化を測定するためにフローサイトメトリーにより細胞直径の大きさの測定を行った。

4. 研究成果

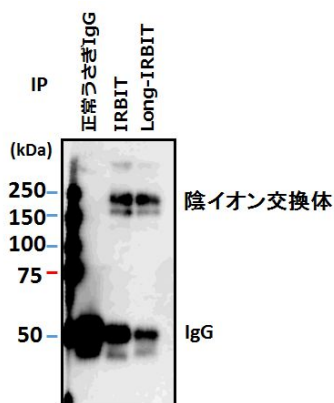
(1) マウスおよびヒトメラノーマ細胞では、転移能に伴って Long-IRBIT が強く発現していた。さらに IRBIT および Long-IRBIT ノックダウン細胞を用いてスクラッチ解析を行ったところ Long-IRBIT ノックダウン細胞では細胞移動能が低下していた。これらのことより Long-IRBIT が細胞移動に関与している可能性が示唆された。



Long-IRBITは、転移能が高い細胞ほど発現が亢進している

(2) Long-IRBIT に結合している新規タンパク質の同定を行うために、高転移能の細胞溶解液を用いて、抗 Long-IRBIT 抗体で免疫沈降を行いマスペクトロメトリー解析を行

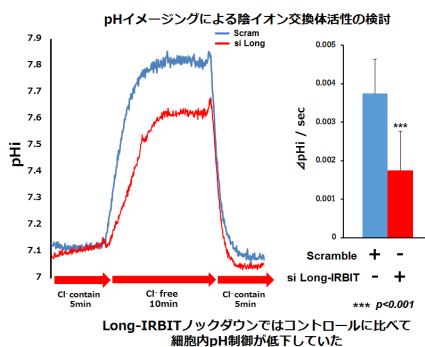
ったところ、陰イオン交換体がスクリーニングされた。さらに Long-IRBIT 変異体および陰イオン交換体変異体を用いて、これらの結合に重要な部位を同定した。さらに内在性タンパク質同士の結合も確認した。



WB : anti-陰イオン交換体

陰イオン交換体と
IRBIT/Long-IRBITの相互作用

(3) 結合が確認できた陰イオン交換体は細胞内の pH を変化させることが報告されている。そこで、IRBIT ファミリーがこの陰イオン交換体の細胞内 pH の変化を直接調節しているのかを検討するために、pH 指示薬である SNARF-1 AM 体を細胞に取り込ませ、細胞外緩衝液を変化させたところ IRBIT ファミリーが細胞内 pH の制御分子であることが明らかとなった。さらに細胞体積変化を測定したところ IRBIT ファミリーノックダウン細胞では細胞体積変化の低下が見られた。これらのことより IRBIT ファミリー - 陰イオン交換体の相互作用は、新規細胞内の pH 制御シグナルおよび細胞体積制御シグナルであることが示唆された。



Long-IRBITノックダウンではコントロールに比べて細胞内pH制御が低下していた

本研究を通して、IRBIT ファミリーが、このような陰イオン交換体を介して個々の細胞内で局所的に細胞体積を変化させ、細胞移動を制御していることが示唆されたので、IRBIT ファミリーを介した細胞移動の分子基盤を引き続き明らかにして行く。

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 0 件)

[学会発表](計 12 件)

伊藤 諒、瀧田 浩一、加藤 心一郎、三森 卓介、御子柴 克彦、水谷 顕洋 : Long-IRBIT による陰イオン交換体 AE2 を介した細胞移動制御 : 日本薬学会関東支部大会 第 59 回 (船橋)、9 月 12 日、2015

Koichi Hamada, Ryo Ito, Kousuke Mitsumori, Shinichiro Kato, Naoya Hatano, Katsuhiko Mikoshiba, Akihiro Mizutani : Long-IRBIT plays a critical role in cell migration through binding to anion exchange 2 : 日米癌合同会議 第 10 回 (マウイ)、2 月 16 日、2016

三森 卓介、瀧田 浩一、伊藤 諒、加藤 心一郎、波多野 直哉、御子柴 克彦、水谷 顕洋 : 細胞移動・伸展における IRBIT ファミリーの機能解析 日本薬学会 第 136 年会 (横浜) 3 月 26 日、2016

加藤 心一郎、瀧田 浩一、伊藤 諒、三森 卓介、高橋 透泰、波多野 直哉、御子柴 克彦、水谷 顕洋 : メラノーマ細胞における IRBIT ファミリーの発現調節機構の解析 日本薬学会 第 136 年会 (横浜) 3 月 26 日、2016

加藤 心一郎、瀧田 浩一、伊藤 諒、三森 卓介、高橋 透泰、齋藤 千秋、五月女 諒介、波多野直哉、御子柴 克彦、水谷顕洋
メラノーマ細胞における IRBIT ファミリーの発現調節機構の解析
第 71 回聖マリアンナ医科大学医学会学術集会 (川崎市) 7 月 30 日、2016

伊藤 諒、瀧田 浩一、三森 卓介、加藤 心一郎、川崎 聡子、五月女 諒介、波多野 直哉、御子柴 克彦、水谷 顕洋 : 陰イオン交換体 SLC4A2/AE2 を介した IRBIT ファミリーによる細胞移動制御 : 第 71 回聖マリアンナ医科大学医学会学術集会 (川崎市) 7 月 30 日、2016

伊藤 諒、瀧田 浩一、三森 卓介、加藤 心一郎、川崎 聡子、五月女 諒介、波多野 直哉、御子柴 克彦、水谷 顕洋
陰イオン交換体 SLC4A2/AE2 を介した IRBIT ファミリーによる細胞移動制御
第 60 回 日本薬学会 関東支部大会(文京区)、9 月 17 日、2016

三森 皐介、濱田 浩一、伊藤 諒、加藤 心
一郎、五月女 諒介、齋藤
千秋、波多野 直哉、御子柴 克彦、水谷 顕
洋
細胞移動・伸展における IRBIT ファミリーの
役割
第 60 回 日本薬学会 関東支部大会(文京区)、
9 月 17 日、2016

川崎 聡子、濱田 浩一、伊藤 諒、三森 皐
介、加藤 心一郎、五月女
諒介、波多野 直哉、御子柴 克彦、水谷 顕
洋
IRBIT ファミリーと陰イオン交換体
SLC4A2/AE2 の相互作用の解析
日本薬学会第 137 年会 (仙台市) 3 月 24
日、2017

伊藤 諒、濱田 浩一、川崎 聡子、三森 皐
介、加藤 心一郎、五月女
諒介、波多野 直哉、御子柴 克彦、水谷 顕
洋
AE2/SLC4A2 を介した IRBIT ファミリーによる
細胞内 pH 調節は、細胞移動を制御している
日本薬学会第 137 年会 (仙台市) 3 月 24
日、2017

伊藤 諒、濱田 浩一、川崎 聡子、御子柴 克
彦、水谷 顕洋
Long-IRBIT は陰イオン交換体の活性を調節
して細胞移動を制御している
日本分子生物学会、日本生化学会 合同年次
大会(神戸市) 12 月 6 日、2017

伊藤 諒、濱田 浩一、川崎 聡子、波多野
直哉、御子柴 克彦、水谷 顕洋
Long-IRBIT と陰イオン交換体の pH 依存的
な相互作用は、細胞移動を制御する
第 138 回日本薬学会 (金沢市)、3 月 25 日、
2018

〔図書〕(計 0 件)

〔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://www.shoyaku.ac.jp/research/laboratory/yakuchi/teacher/85>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

昭和薬科大学・薬学部・講師
濱田 浩一 (Hamada, Koichi)

研究者番号 : 0 0 3 4 3 0 7 0

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者