

令和元年6月10日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18434

研究課題名(和文)細胞外放出されるimportin 1が肝がん微小環境で果たす役割

研究課題名(英文)Roles of importin alpha1 in tumor microenvironment

研究代表者

山田 幸司(Yamada, Kohji)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：90570979

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： Importin 1は、核輸送因子として知られ、細胞内で核移行シグナルを有する蛋白質の核輸送を介在する。本研究は核輸送因子であるImportin 1が細胞外に存在し、肝癌細胞株の細胞増殖に寄与する知見を得ることに成功した。さらに、皮下移植モデルマウスを用いた解析を通して、腫瘍細胞から細胞外放出されたImportin 1が腫瘍細胞以外にマウス由来の血管内皮細胞の細胞膜にも局在することを見出した。このデータは、がん微小環境におけるImportin 1の機能的役割を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌は現在も依然として患者数が多く、年間約3万人が死亡しており、その疾患対策が求められている。肝癌は再発を繰り返しやすい、他の悪性腫瘍と比較して長期生存の困難な疾患でもあり、背景肝疾患からの肝癌を早期に判別できるバイオマーカーや肝癌を根治する療法の開発は治療成績に大きく影響することから臨床的ニーズは極めて高い。本研究によって、肝癌特異性の高い新しい機構として核移行タンパク質の細胞外局在を先駆的に提示することができた。今後、診断や治療への応用が見込まれる。

研究成果の概要(英文)： Liver cancers are among the common cancers and the fifth leading cause of cancer mortality in Japan. Surgical resection and liver transplantation are the only curative treatments for early-stage patients with liver cancers. However, the majority of patients are diagnosed in advanced stages of the disease during which the extant therapies are ineffective. Therefore, it is important for developing novel therapy to target for liver cancers.

This study showed that intracellular nuclear trafficking protein, importin alpha 1, was localized at the extracellular space. Extracellular importin alpha 1 was specifically detected in liver cancer cell lines. In mouse subcutaneous model, extracellular importin alpha 1 was localized at the cell surface of mouse-derived vascular endothelial cells, as well as human cancer cells. These data suggested that extracellular importin alpha 1 was involved in tumor microenvironment.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核輸送因子 肝がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核輸送因子 importin は、タンパク質の核移行シグナル(NLS)を認識、会合することで、NLSを有する核移行タンパク質の核膜通過を介在する。一方で、10年程前から、肝がんや乳癌などの多くの患者症例の腫瘍組織で importin 1 の高発現が、他の研究機関から複数報告されはじめ、importin 1 が新規の腫瘍マーカーになる可能性が示唆されている。しかし現在までに、importin 1 がどのように腫瘍形成・構築に関与するかについてはほとんど研究が進んでいない。

2. 研究の目的

報告者らは最近になって、患者検体や細胞株を用いた網羅的プロテオミクス解析の結果から、importin 1 が細胞外に局在することを示す予備的データを得ることができた。そこで本研究では、importin 1 ががん細胞の細胞膜や細胞外液中において局在することの特徴付けを行うとともに、がん機能への影響を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

種々のがん細胞株を利用して、細胞膜および細胞外液中の importin 1 の局在を検討する。またリコンビナントタンパク質やモノクローナル抗体の添加実験を行い、細胞外の importin 1 のがんにおける機能的役割を明らかにする。

4. 研究成果

種々のがん細胞を用いて細胞表面の importin 1 の発現量をフローサイトメトリーで検討したところ、細胞外の importin 1 の検出は、肝がん細胞株や大腸がん細胞株において特に高頻度に検出されることがわかった(図1)。一方で、正常細胞であるヒト線維芽細胞 TIG-1 やヒト血管内皮細胞 dHMEC、乳腺上皮細胞 MCF-10A、またヒト胃癌株 AGS や乳がんの

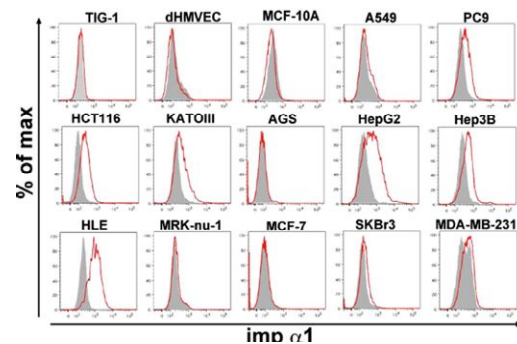


図1 細胞表面importin α1の発現

細胞株では細胞膜での importin 1 の発現は観測されなかった(図1)。さらに、ELISA系を立ち上げ、培養上清中の importin 1 の濃度を測定したところ、細胞表面発現量に比例して、肝がんや大腸がんの細胞株で高い importin 1 が検出された(図2)。細胞外液中の importin 1 の検出は細胞表面で発現が認められなかった株では見られなかった(図2では AGS を示した)。このことから、importin 1 はがん細胞において構成的に細胞外に排出されることが示唆された。

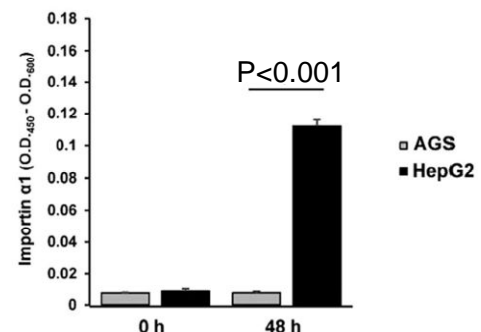


図2 培養上清中importin α1の検出

細胞膜に局在する importin 1 の存在様式を知るために、importin 1 を含む核移行タンパク質が有する NLS に着目した。細胞膜タンパク質や分泌タンパク質の多くは小胞体・ゴルジ体で糖鎖修飾を受ける場合が多い。糖鎖修飾のうちヘパラン硫

酸プロテオグリカンは硫酸特性を有するため、塩基性アミノ酸残基で構成される NLS と電気化学的に相互作用する可能性が高い。そこで GST-GFP に NLS を繋いだりコンビナントタンパク質を用いて生きた細胞に処理した。その結果、GST-GFP は細胞膜に結合しなかったが、GST-NLS-GFP

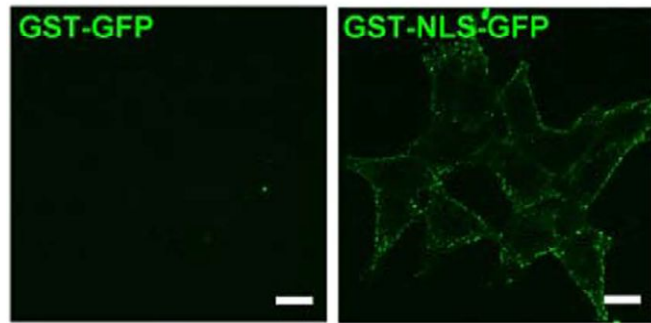


図3 NLSは細胞膜表面に局在するための基質である

は細胞膜に結合した(図3)。また NLS を除去した importin 1 を細胞に処理しても結合能は明らかに減退することが確認された。このことから細胞外に排出された importin 1 が NLS を介して細胞膜に結合していることが推察される。

細胞外の importin 1 の機能を知るために、細胞外での相互作用を探索した。

分泌タンパク質のうち塩基性アミノ酸残基のクラスターを持つものをバイオインフォマティクスの手法で検索し、importin 1 と結合する候補を絞った。その上で、実際の結合を in vitro の結合実験で検証した結果、FGF 1 を見出した。FGF 1 は血管新生を始め、細胞増殖に関わることが知られる。そこで細胞外 importin 1 と FGF 1 機能との関係を調べるため、細胞への刺激実験を行った。その結果、細胞外における importin 1 の存在は FGF 1 が関わるがん細胞増殖を有意に亢進させることが分かった(図4)。また、importin 1 の添加は FGF 1 が関わる増殖性の細胞内シグナル伝達の活性化を増強させることが分かった(図5)。このことから、importin 1 が FGF 1 を介した細胞増殖機構に寄与することが示された。

細胞外に存在する importin 1 の細胞増殖への関与をさらに調べるために、importin 1 のモノクローナル抗体を用いてがん細胞株に処理して細胞増殖を調べた。その結果、抗体処理は細胞外の importin 1 量が多い細胞株に対して有意に増殖抑制を示した(図6)。一方で、細胞外 importin 1 の局在量の少ないがん細胞株 AGS では抗体による抗増殖抑制効果は見られなかった(図6)。さらに、抗体処理は FGF 1 との相互

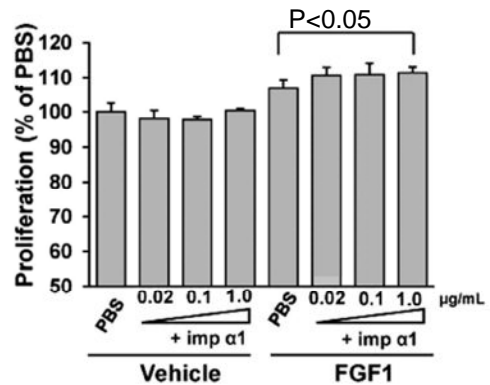


図4 細胞外importina1は増殖亢進性に働く

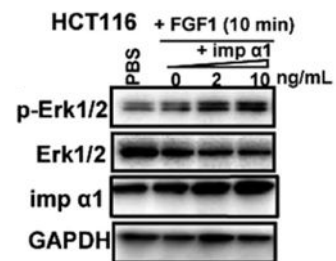


図5 細胞外importina1はFGF1シグナルを増強する

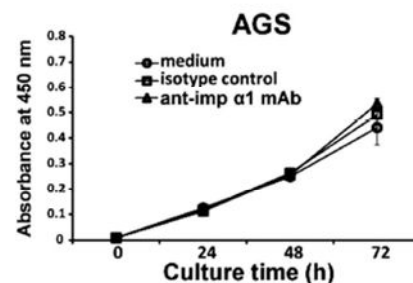
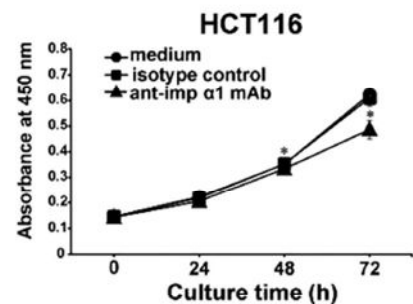


図6 抗importina1モノクローナル抗体は細胞外importina1陽性細胞の増殖を抑制する

作用や FGF 1 が関わるシグナル活性化を抑制することも突き止めた(図 7)。これらの結果は、細胞外の importin 1 ががん増殖に重要な役割を果たすことが示された。また importin 1 の抗体はがんの抗体療法の標的になりうると思われる。

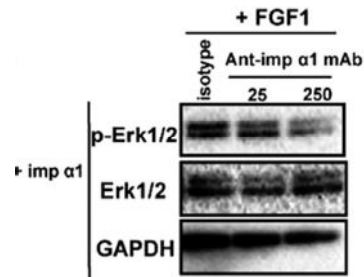


図7 抗importin α 1モノクローナル抗体はFGF1シグナルの減少をもたらす

以上の実験結果から、これまで細胞内での局在と機能が知られてきた importin 1 が細胞膜表面や細胞外液中に局在し、がん細胞機能に寄与することが示唆された。NLS は細胞内では核局在化シグナルとして核局在移行に利用されるが、細胞外ではヘパラン硫酸を含む糖鎖と結合する能力があると推察される。さらに生きたがん細胞から細胞内タンパク質の排出が起きていることはがん細胞の発症や悪性化進展に寄与する可能性を示唆している。今後、シグナルペプチドを持たない importin 1 の細胞外排出機構の観点からがんとの関連を解析したいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件) 査読あり

Miyamoto Y, Yamada K, Yoneda Y. Importin : a key molecule in nuclear transport and non-transport functions *J. Biochem.* 2016,160,69-75

Moriyama T, Tanaka S, Nakayama Y, Fukumoto M, Tsujimura K, Yamada K, Bamba T, Yoneda Y, Fukusaki E, Oka M. Two isoforms of TALD01 generated by alternative translational initiation show differential nucleocytoplasmic distribution to regulate the global metabolic network. *Sci. Rep.* 2016,6,34648

Hayashi M, Madokoro H, Yamada K, Nishida H, Morimoto C, Sakamoto M, Yamada T. A humanized anti-CD26 monoclonal antibody inhibits cell growth of malignant mesothelioma via retarded G2/M cell cycle transition. *Cancer Cell Int.* 2016,6,35

Yamada K, Miyamoto Y, Tsujii A, Moriyama T, Ikuno Y, Shiromizu T, Serada S, Fujimoto M, Tomonaga T, Naka T, Yoneda Y, Oka M. Cell surface localization of importin alpha1/KPNA2 affects cancer cell proliferation by regulating FGF1 signalling. *Sci. Rep.* 2016,6,21410

Oka M, Mura S, Yamada K, Sangel P, Hirata S, Maehara K, Kawakami K, Ohkawa Y, Kimura H, Yoneda Y. Chromatin-prebound Crm1 recruits Nup98-HoxA9 fusion to induce aberrant expression of Hox cluster genes. *eLife.* 2016,5

〔学会発表〕(計4件)

Yamada K, Miyamoto Y, Yoneda Y, Oka M “Extracellular released importin 1 stimulates proliferation of cancer cells” 第75回日本癌学会学術総会、横浜、2016年10月

生野 雄大, 山田 幸司, 宮本 洋一, 米田 悦啓, 岡 正啓. 「細胞外放出される importin 1 の生物活性の解析」.『第68回日本細胞生物学会大会』,T6-10,京都, 2016年6月

山田幸司、世良田聡、岡正啓、藤本穰、仲哲治、米田悦啓 Cold stimulation evokes cellular sensitivity to antinuclear antibodies of patients with systemic sclerosis via induction of cell surface localization of hnRNP-K 第68回日本細胞生物学会年会・第11回日本ケミカルバイオロジー学会 合同学会 シンポジウム講演: S5; 温度生物学の創成(展開を目指して) 2016年6月

Yamada K, Oka M “Cell surface localization of a nuclear transport factor importin 1 that contributes to proliferation of cancer cells” 第74回日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月

〔図書〕(計3件)

山田 幸司、米田 悦啓 遺伝情報の発現と継承『人体の細胞生物学』日本医事新報社、2018年、pp.50-69.

山田 幸司、米田 悦啓、岡 正啓 核輸送因子インポータイン 1の細胞外放出とがん機能 『月刊 細胞』(株)ニューサイエンス社、pp.263-266. 2018年

山田 幸司、米田 悦啓、岡 正啓 核輸送因子インポータイン 1の新たな機能『次世代がん治療 - 発症・転移メカニズムからがん免疫療法・ウイルス、診断法まで - 』(株)NTS、pp.285-294. 2017年

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 新規肝がんマーカー

発明者: 山田幸司、吉田清嗣

権利者: 東京慈恵会医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-095674

出願年: 平成 30 年 5 月 17 日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等：<http://researchmap.jp/yakohji>

6．研究組織

(1)研究分担者

該当しない

(2)研究協力者

研究協力者氏名：米田悦啓

ローマ字氏名：Yoshihiro Yoneda

研究協力者氏名：岡正啓

ローマ字氏名：Masahiro Oka

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。