

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08016

研究課題名(和文)オートファジー関連蛋白を介した細胞競合の機序解明と新規癌治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of cellular competition mediated by autophagy-related proteins

研究代表者

山科 俊平 (YAMASHINA, SHUNHEI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30338412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌では約7割にp62凝集体を有する肝癌細胞が観察される。p62蓄積肝癌細胞株からp62遺伝子を欠失させ共培養するとp62欠損細胞がp62蓄積細胞を貪食する細胞競合現象が確認される。この細胞競合における強者細胞では低栄養や酸化ストレス、小胞体ストレスに耐性を誘導するmRNAや蛋白が強く発現することがわかった。また薬物誘導性細胞死遺伝子導入p62欠損強者細胞をp62蓄積細胞と共培養しp62蓄積細胞を減少させたのちに強者細胞に細胞死を誘導することによって全腫瘍細胞数を減少させることが可能であった。以上より細胞競合を応用した新たな抗癌治療の有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物治療の進歩によってB型肝炎やC型肝炎などウイルス性肝炎からの肝癌が減少すると考えられている一方で、脂肪肝やアルコール性肝炎など生活習慣に関連した肝硬変・肝癌は増加すると予測されている。肝癌は難治であり死亡率は日本における全がん死の中で5番目に多い。本研究のような肝癌の特性に着目した新たな抗癌治療の開発は学術的にも社会的にも意義があると思われる。

研究成果の概要(英文)：In liver cancer, hepatocellular carcinoma cells with p62 aggregates are observed in about 70%. We found that p62, autophagy-specific substrate, plays a pivotal role on triggering cell competition. A cell competition phenomenon is confirmed in which p62-deficient cells phagocytose the p62-accumulated cells. It was found that winner cells in this cell competition strongly express mRNA and protein that induce resistance to low nutrition environment, oxidative stress, and endoplasmic reticulum stress. In addition, it is possible to reduce the total number of tumor cells by co-culturing p62-deficient winner cells with drug-induced cell death gene and p62-accumulating cells. It was suggested that new anti-cancer treatment using cell competition may be useful as a new treatment for cancer cells with accumulation of p62.

研究分野：消化器内科学

キーワード：細胞競合 オートファジー p62 癌治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本における全癌死の中で肝癌死の占める割合は5番目に多い。薬物治療の進歩によってB型肝炎やC型肝炎などウイルス性肝炎からの肝癌が減少すると考えられている一方で、脂肪肝やアルコール性肝炎など生活習慣に関連した肝硬変・肝癌は増加すると予測されている。肝脂肪化はmTORシグナル活性化によるオートファジー誘導抑制、リソソーム蛋白分解酵素の発現抑制、リソソーム酸性化障害、オートファゴソームとリソソームの融合障害など複数の機序によってオートファジー機能障害を誘導する。オートファジー機能障害は細胞内小器官ミトコンドリアや小胞体の機能障害を誘導し、またオートファジーの分解基質であるp62の過剰な蓄積によるNrf2シグナルの誘導を介して肝発癌や細胞増殖を促進させる。これらの機序が肝癌発症・進展に密接に関与するものと推測されている。実際に肝癌の約7割においてp62陽性の蛋白凝集体が観察される。しかし肝癌細胞が癌腫形成に至るまでのプロセスは不明な点が多い。そこで腫瘍化細胞の次のステップである細胞極性喪失とそれに引き続いて起こる周囲正常細胞による腫瘍原生細胞排除機構にオートファジーがどの様に関わるのかを検証したところ(科研費・課題番号25860561:共同研究)、p62蓄積癌細胞株よりp62を欠失させるとp62蓄積細胞を貪食・除去する細胞競合が観察された。既報の細胞競合の多くは正常細胞が隣接した癌細胞や古い細胞を排除する細胞競合の機序が主であるが、癌細胞で癌細胞を除去するという細胞競合の検討や治療応用に関しては報告が少ない。また細胞競合の機序が強者細胞の増殖能に依存したり(Myc活性)細胞移動によって弱者細胞を排除する(YAP, Wntシグナル)というモデルが多く、貪食という直接攻撃による細胞競合はJAK-STATシグナルモデルだけであった。JAK-STATシグナルモデルにおける細胞競合には細胞極性の変化が関係するが、本研究のモデルでも、p62蛋白が細胞極性蛋白PAR3発現に影響を与えることから、同様に細胞極性変化が関連していると思われる。しかし細胞間コミュニケーションに関連する介在分子などの詳細な検討は、JAK-STATシグナルモデルでも我々のモデルでもまだ行われていない。そこでp62蛋白欠損による細胞競合の介在分子同定とこの細胞競合機序を利用した新規癌治療への応用を目的として本研究を立案した。

2. 研究の目的

p62蛋白を介した細胞競合において細胞の弱者と強者を分ける関連分子の同定と機序解明ならびにこの細胞競合機序を利用した新規癌治療法開発を本研究の目的とした。

細胞競合における弱者と強者をわける細胞間コミュニケーションのメカニズムの解明(細胞競合マーカーの検出)

JHH5(p62蓄積性肝癌細胞)細胞株とp62欠損JHH5細胞株、Huh-1(p62蓄積性肝癌細胞)細胞株とp62欠損Huh-1細胞株よりmRNAを抽出し、発現遺伝子に変化が生じているかを解析する。さらに抽出した蛋白のプロテオミクス解析を行い、細胞競合関連蛋白を同定する。さらに各細胞より抽出した糖鎖を解析し、細胞膜上の細胞競合認識に関連する可能性のある糖鎖を同定する。

p62が関与する細胞競合機序を利用した新規癌治療法開発

ドキシサイクリン(DOX)プロモーターカスパーゼ7発現プラスミドをp62欠損細胞(JHH5, Huh-1)に遺伝子導入し、ドキシサイクリン添加によって細胞死を誘導する時限式強者細胞株を樹立する。p62発現細胞とこのDOX-Caspase7発現p62欠損細胞を共培養し、p62発現細胞が退縮したところでDOX添加を行い細胞が減少するかを検証する。

3. 研究の方法

細胞競合における弱者と強者をわける細胞間コミュニケーションのメカニズムの解明(細胞競合マーカーの検出)

mRNA解析: JHH5(p62蓄積性肝癌細胞)細胞株とp62欠損JHH5細胞株、Huh-1(p62蓄積性肝癌細胞)細胞株とp62欠損Huh-1細胞株よりmRNAを抽出し、cDNAを作成しマイクロアレイ解析を行い、p62欠損によって発現が増加するmRNAを検出し、p62欠損によって生じる強者細胞の特性を解析する。

発現蛋白解析: JHH5(p62蓄積性肝癌細胞)細胞株とp62欠損JHH5細胞株、Huh-1(p62蓄積性肝癌細胞)細胞株とp62欠損Huh-1細胞株より蛋白を抽出し、2次元電気泳動を行い、p62蛋白欠損によって発現が変化する蛋白を泳動ゲルより抽出しプロテオミクス解析によって細胞競合関連蛋白を同定する。

糖鎖解析: 各細胞より糖鎖をラベル化後に抽出しLC-MS解析を行い、発現糖鎖の比較によって細胞膜上の細胞競合認識に関連する可能性のある糖鎖を同定する。

動物モデルを用いたp62発現の変化と細胞増殖の解析: リソソーム蛋白分解酵素カテプシン群のうち一つを欠損させることによりオートファジー蛋白分解機能を保ちつつp62発現増加を誘導が可能なカテプシンL欠損マウスにおいて70%肝部分切除術を行った。経時的にサンプリングを行い、肝組織免疫染色によるBrdU取り込み能を評価し、ウエスタンブロット法にてcyclinD1、p62、Notchの発現を解析した。

p62が関与する細胞競合機序を利用した新規癌治療法開発

ドキシサイクリン(DOX)プロモーターカスパーゼ7発現プラスミドを p62 欠損細胞(JHH5, Huh-1)に遺伝子導入し、ドキシサイクリン添加によってカスパーゼ7が強制発現し細胞死を誘導する時限式強者細胞株を樹立する。p62 発現細胞とこの DOX-Caspase7 発現 p62 欠損細胞を共培養し、p62 発現細胞が退縮したところで DOX 添加を行い細胞の数的変化を検証する。

4. 研究成果

細胞競合における弱者と強者をわける細胞間コミュニケーションのメカニズムの解明(細胞競合マーカーの検出)

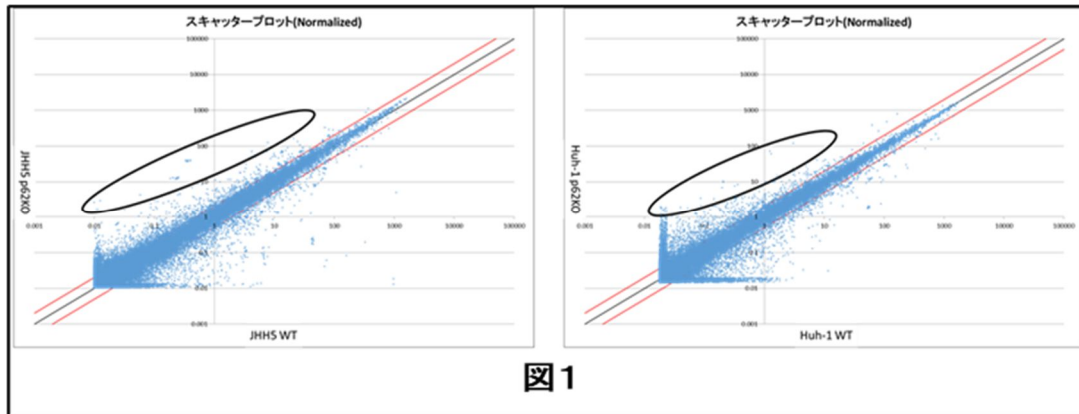


図1

JHH5 (p62 蓄積性肝癌細胞)細胞株と p62 欠損 JHH5 細胞株、Huh-1 (p62 蓄積性肝癌細胞)細胞株と p62 欠損 Huh-1 細胞株より mRNA を抽出し、cDNA を作成しマイクロアレイ解析を行った(図1)。スクアッタープロットによって p62 欠損によって発現が増加する mRNA の中で、JHH5 細胞株、Huh-1 細胞株両方の細胞株において、p62 欠損によって発現が 10 倍以上増加する mRNA として GSTP1、IGFBP2、S100A9 を同定した。

GSTP1 は、Glutathione S-Transferase (GST) ファミリーの一つで細胞内で解毒因子として機能することが分かっており、多くの抗がん剤等の医薬品も GST により GSH 抱合体に変換され細胞外に排出されてしまうため、GST は薬剤耐性因子として作用する。特に GSTP1 は様々な種類の癌において高発現が認められ、癌細胞の薬剤耐性獲得に大きく寄与する酵素であることから強者細胞誘導因子の一つとして有望と考えられた。IGFBP2 は、低栄養環境によって発現が増加する蛋白であり、肺癌や膵臓癌において発現が増加することが知られている。増殖因子に結合する蛋白であることから細胞増殖の制御に関係すると考えられ、またアポトーシス実行因子である caspase-3 の発現を抑制する働きも有しており、GSTP1 と同様に抗癌剤耐性に関与する蛋白と考えられる。S100A9 は、S100 ファミリーの一つで、カルシウム結合蛋白であり、細胞骨格の調節、細胞の移動と接着、宿主の酸化防御を含む重要な細胞経路を制御することが知られている。S100A9 を発現している食細胞は、初期に浸潤する細胞に属して、急性炎症部位を占拠する免疫細胞に発現している。さらにいくつかの悪性腫瘍と自己免疫病を含む数多くの炎症性疾患患者において血清レベルが亢進することが明らかにされ、癌転移に関連する蛋白を誘導することが報告されている。p62 蛋白欠損によって発現が増加するこれらの 3 つの分子は p62 蓄積細胞を貪食する強者細胞形成に関与する遺伝子群であることが示唆された。

次に JHH5 (p62 蓄積性肝癌細胞)細胞株と p62 欠損 JHH5 細胞株、Huh-1 (p62 蓄積性肝癌細胞)細胞株と p62 欠損 Huh-1 細胞株より蛋白を抽出し、電気泳動後に、銀染色を行ったところ、p62 発現有無によって蛋白発現が変化することがわかった。そこで 2 次元電気泳動による発現蛋白の解析を行い、p62 蛋白発現欠損によって発現が増加する蛋白スポットを同定したうえで、これらのスポットより抽出した蛋白の MS 解析を行った。p62 欠損によって発現が亢進する蛋白として Eukaryotic translation initiation factor 2(elf2) subunit 1、Endoplasmic reticulum chaperone protein 78 (GRP78) が同定された。elf2 は、小胞体ストレスなど様々なストレス関連シグナルに関連し、ストレス特異的な mRNA 転写産物の翻訳を促進する分子である。Endoplasmic reticulum chaperone protein 78 (GRP78) は別名ヒートショックタンパク質 90kDa メンバー1(HSP90B1)ともいい、癌細胞で発現増加し、治療耐性や悪転換とも関連するため癌の治療ターゲットとしても注目されている分子である。GRP78 も小胞体ストレス関連蛋白で小胞体内に立体構造が異常なタンパク質が蓄積すると発現し、異常タンパク質の正常化を促進する活性を有する。今回の蛋白解析では p62 欠損により小胞体ストレスに関連する蛋白群が増加し、細胞死抑制、細胞保護的に作用していると思われ、細胞競合において強者となる細胞においては小胞体ストレス関連蛋白の亢進が重要な因子となる可能性が示唆された。

次に p62 発現の変化が実際の肝組織において細胞死や細胞増殖に与える影響について検証した。

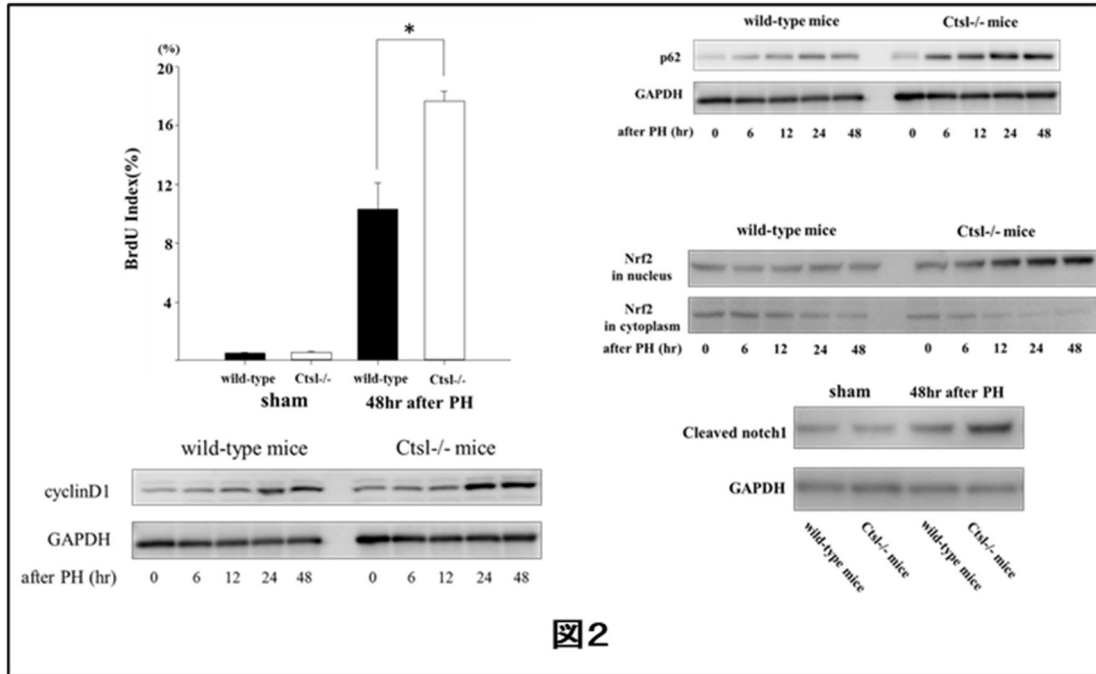


図2

リソソーム蛋白分解酵素カテプシンの一つを欠損させることによりオートファジー機能を保ちつつ p62 発現増加が誘導可能なカテプシンL 欠損マウスを用いて肝細胞の増殖に関して検討した。カテプシンL 欠損マウスでは、肝部分切除後の肝組織において p62 発現が増加することが分かった。このマウスでは、Wild type マウスと比較し、70%肝部分切除後の肝細胞における BrdU 取り込み能が亢進し、CyclinD1 発現が亢進するなど肝再生が促進することが分かった。さらに p62 蓄積によって Nrf2-Notch シグナルの活性化が惹起され肝再生亢進が誘導されることが明らかとなった(図2)。

既報では細胞競合で強者となる細胞では弱者細胞と比較し細胞増殖が優位であることが多いが、p62 有無によって誘導される細胞競合現象では p62 欠損の方が強者細胞となるので Notch シグナルによる細胞増殖能亢進とは関連しない別の機序による細胞競合現象であることが示唆された。

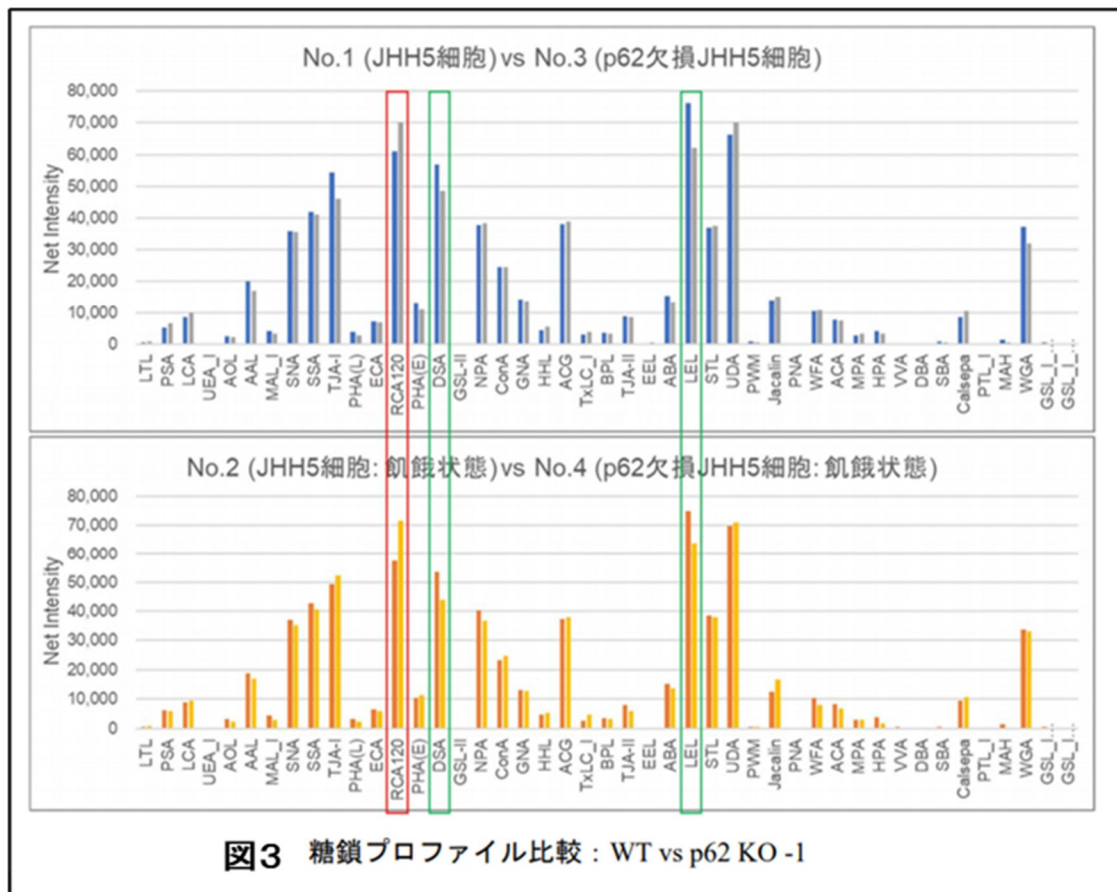


図3 糖鎖プロファイル比較 : WT vs p62 KO -1

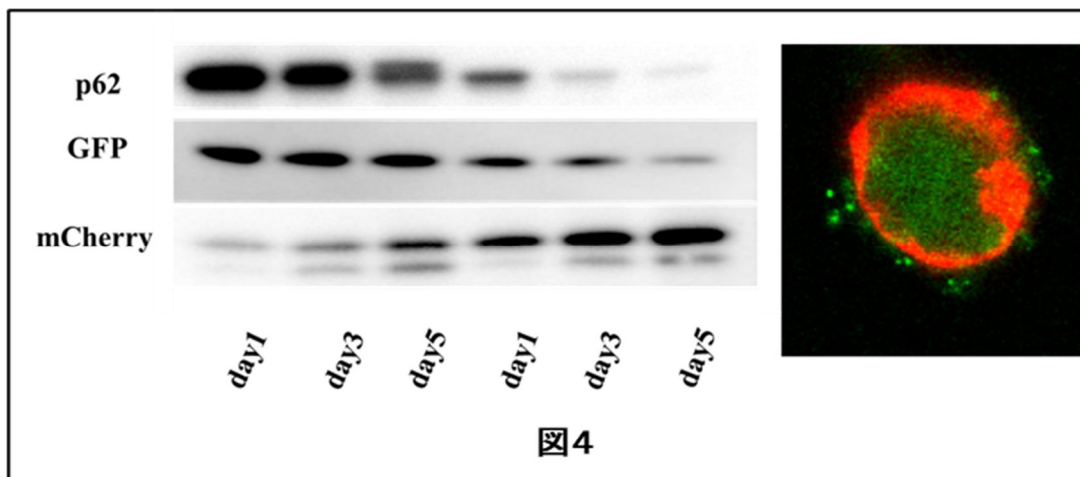
続いて p62 発現有無により発現が変化する細胞表面の糖鎖発現についても解析を行った(図3)。

p62 欠損株によって糖鎖 RCA120 シグナルの増加、DSA シグナルの減少、LEL シグナルの減少が認められた。しかし、その変化の程度は、一般的に変化があるとみなされる 50%未満であったため、これらの結果が糖鎖構造の変化を反映したものであるのかの検討を行った。他のレクチンシグナルの発現変化との推移を比較したが、これらの 3 つの糖鎖のいずれも糖鎖構造に違いがあると推測するには根拠が弱いと考えられた。

以上より p62 蛋白発現変化を介した細胞の強者細胞と弱者細胞を分ける Key となる糖鎖分子は同定されないと結論付けた。

p62 が関与する細胞競合機序を利用した新規癌治療法開発（時限式強者細胞株を用いた p62 蓄積癌細胞に対する新規治療法の開発の試み）

Huh-1 細胞株、JHH5 細胞株ともにドキシサイクリンを添加すると細胞死を誘導する強者細胞株であるドキシサイクリン（DOX）プロモーターカスパーゼ7 発現プラスミド（DOX-Caspase7）導入細胞を樹立した。p62-/-Huh-1 細胞と Wild type Huh-1 細胞ならびに p62-/-JHH5 細胞と Wild type JHH5 細胞を共培養すると p62 蛋白発現は経時的に減少し、p62 蓄積細胞である Wild type



細胞株が経時的に減少し、p62 欠損細胞（mCherry 発現）が増加することが証明された（図 4 左側）。また 3D 培養では p62 凝集体を有する JHH5（GFP 発現）生着後に p62 欠損 JHH5（mCherry 発現）を添加すると共培養 19 日目に p62 凝集体を有する JHH5 は p62 欠損 JHH5 に取り囲まれ、増殖が抑制される（図 4 右側）。2 次元培養において p62 発現がほぼ消失する共培養 5 日目にドキシサイクリンを添加すると p62 欠損 JHH5 が細胞死を起こし、結果として wild type JHH5 も p62 欠損 JHH5 細胞も細胞数が減少することが観察された。

以上の結果から、p62 有無による細胞競合現象においては、低栄養や酸化ストレス、小胞体ストレスに耐性となる機序が強者細胞になる上で重要であることが推測された。肝癌のように p62 蓄積が多く観察されるような癌では p62 遺伝子を欠損させ強者細胞を樹立させることができれば薬物誘導性細胞死遺伝子を組み込むことによって、細胞競合を応用した新たな抗癌治療が有効である可能性が示唆された。しかしこのような強者細胞が正常な肝細胞に対しどのような作用を引き起こすのか、また強者細胞が弱者細胞を完全に駆逐できるのかなど問題は残されているため、さらなる検討が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Toshifumi, Yamashina Shunhei, Izumi Kosuke, Ueno Takashi, Koike Masato, Ikejima Kenichi, Peters Christoph, Watanabe Sumio	4. 巻 221
2. 論文標題 Cathepsin L-deficiency enhances liver regeneration after partial hepatectomy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 293 ~ 300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2019.02.040	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

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	稲見 義宏 (Inami Yoshihiro) (70445500)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

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