

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05817

研究課題名(和文) がんにおけるジアシルグリセロールキナーゼの機能解明とその応用

研究課題名(英文) The functions of a diacylglycerol kinase on cancer cells

研究代表者

甲斐 正広 (KAI, Masahiro)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：80260777

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)：悪性黒色腫メラノーマにおけるジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)特にDGK γ の機能について研究を行った。メラノーマではDGK γ の発現が極めて低いものも多く、実際DGK γ の発現量と予後の間には相関が見られた。発現の低いメラノーマ細胞にDGK γ を過剰発現させたところ、細胞増殖に影響は見られなかったものの、細胞遊走や浸潤を強く抑制した。またNF- κ Bシグナリングも減弱させることが示された。本研究によりDGK γ がメラノーマにおいてがん抑制的に機能していることが明らかにされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はメラノーマにおいてDGK γ ががん抑制的に機能していることを明らかにしたものである。がん研究の観点からはそれほど大きなインパクトを与えることはないかもしれないが、がんに関する細胞内シグナリング経路に新たな一面を提示できたという点で一定の意味がある。一方DGK研究の分野ではDGKアイソフォームの一つに重要な機能が存在していることを解明した重要な研究である。本研究を進展させることでメラノーマの予後マーカーや治療薬の開発に応用できる可能性もあり、意義ある研究と評価できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the functions of diacylglycerol kinase gamma (DGK γ) in melanoma cells. We found that DGK γ was downregulated in melanoma cell lines and primary melanoma tissues. Ectopic expression of DGK γ significantly suppressed cell migration and invasion by melanoma cells, suggesting that DGK γ is a putative tumor suppressor in melanoma. To elucidate its biological function, we performed microarray assay and found that DGK γ may modulate expression of NF- κ B signaling-related genes in melanoma cells. Notably, ectopic expression of DGK γ significantly downregulated NFKB1 and RELB, suggesting that DGK γ may suppress NF- κ B signaling. Reporter assays further confirmed that DGK γ significantly suppressed tumor necrosis factor- α -induced NF- κ B signaling in melanoma cells. Our results suggest that DGK γ may play a tumor suppressor role via suppressing NF- κ B signaling in melanoma cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：diacylglycerol kinase cancer

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂質代謝酵素であるジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)が細胞内シグナル伝達系の制御に関与している可能性が示唆されて以来、その生理的機能には多くの興味が集まっていたが、長い間、実態が明らかにされることがなかった。近年ようやく幾つかのアイソフォームに関して重要な知見が報告され始めており、今後の発展が期待される研究分野である。研究開始時点では、DGK や DGK が T 細胞の抗原認識機構に関与することが明らかにされ、がん免疫療法の標的候補として注目を浴びようになっていた。また DGK が糖尿病発症の鍵の一つであることが示され、注目を浴びていた。

本研究で注目した DGK もまた DGK アイソフォームの一つである。本研究に 2 年ほど先立って我々は、(1)大腸がんにおいてエピジェネティックに抑制されていること、(2) 過剰発現によって大腸がん細胞の増殖、遊走、浸潤が有意に抑制されること、(3) DGK の腫瘍抑制能は DGK 酵素活性とは別のメカニズムに基づく可能性があること、を報告していた (Kai et al. Mol Carcinog, 2017)。これを踏まえて、DGK のより詳細な生理機能の解明を試みた。

2. 研究の目的

本研究はがんにおける分子異常に着目して、特に DGK の新たな機能を明らかにすることを目的とする。DGK は脂質代謝およびシグナル伝達に関わる事から、がんにおいても重要な役割を担っていると考えられるが、現時点での理解は、特定のがん種などにおける断片的なものにとどまっている。DGK ががんに関わる可能性を詳細に検討することを通じて、がんの新たな予防・診断・治療戦略の基盤となる知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

先行研究において我々は、DGK が大腸がんにおいてエピジェネティックに発現が抑制されていること、そして野生型 DGK が大腸がん細胞の増殖速度に影響を与えないにも関わらず、不活性型ミュータントおよび常時活性化型ミュータントの過剰発現ががん細胞の増殖を有意に抑制することを明らかにした (Kai et al. Mol Carcinog, 2017)。これらの結果は、DGK が酵素活性に依存しない分子機能によってがん細胞の増殖を調節している可能性を示唆している。我々は DGK のがんにおける機能を明らかにするために、DGK が同様の機能を示す他のがん種と比較することを計画した。幾つかのがん種を検索したところ、メラノーマで大腸がん同様に DGK の発現が抑制されていることがわかったので、メラノーマ細胞を用いて DGK の機能を調べることを試みた。

具体的には、メラノーマ細胞に野生型 DGK あるいはミュータント DGK を過剰発現させ、細胞遊走・浸潤、細胞増殖などを検証した。また、予備実験によりメラノーマ細胞では DGK の発現により NF- κ B シグナルを制御している可能性が示唆されており、DGK が与える影響を詳細に解析した。

4. 研究成果

メラノーマ検体 15 例とおよびコントロールとしてのほくる検体 2 例を用いて DGK の発現量を比較したところ、10 例のメラノーマではほくるよりも極めて少ないレベルの量の DGK 発現が認められた。公開データベースの一つである TCGA (the cancer genome atlas) を利用して調べたところ、DGK の発現量とメラノーマの予後には有意な相関が明らかにされたことから、メラノーマにおいて DGK ががん抑制的に機能している可能性が考えられた。

次に DGK の発現量が少ないメラノーマ細胞株に DGK を過剰発現させたときにフェノタイプの変化を観察した。細胞増殖には有意差は認められなかったが、細胞遊走および浸潤は DGK の発現により抑制された。これは大腸がんの場合と同様に、DGK の酵素活性にはよらないことが不活性型ミュータント (kinase-dead, KD) や常時活性化型ミュータント (constitutively-active, CA) での発現実験によって示された。

DGK γ が細胞遊走や浸潤に影響を与えるメカニズムとして Rho ファミリー-GTPase を介したアクチン再構成系への関与が考えられたので、RhoA および Rac1 の活性化への DGK γ 発現の影響を調べた。その結果、DGK γ の発現により RhoA の活性化は有意に増大する一方、Rac1 の活性化は有意に減少することがわかった。DGK γ がアクチン再構成系に関与することをにより細胞運動を抑制している可能性が考えられた。

DGK γ 発現が他の細胞機能に影響を与えている可能性を調べるために発現アレイ実験を行なった。その結果、KD および CA ミュータントどちらを発現しても同様の発現増減を示す遺伝子群の中に NF- κ B シグナル関連の遺伝子が認められた (図 1A)。幾つかの遺伝子を選んで qRT-PCR を行ったところ、確かに DGK γ の発現にตอบสนองして発現の変化が明らかにされた。

実際に細胞への影響を明らかにするためにメラノーマ細胞に TNF- α を加えて NF- κ B シグナルを活性化し、この活性化が DGK γ の過剰発現によりどう変化するかを確かめた。図 1B に示すように、DGK γ の発現はどれも NF- κ B 活性化を抑制する傾向が見られ、特に CA を発現したときに有意に抑制されていることが明らかになった。同様に p65 タンパク質のリン酸化によって NF- κ B 活性化を観察した場合も DGK γ 発現により活性化が抑制されていることが示された (図 1C)。メラノーマでは DGK γ は NF- κ B 活性化を抑制する役割の一端を担っており、細胞生存に影響を与えている可能性が示唆された。

大腸がん和メラノーマで DGK γ の影響を調べた結果、幾つかの相違点が明らかになった。細胞増殖への影響、発現量に変化の現れる遺伝子群などの異なるフェノタイプが観察されたのは臓器を形成する細胞の異なる性質へ DGK γ が作用した結果と考えられる。一方で、細胞遊走や細胞浸潤では全く同様の結果が得られており、多くの細胞で同様の影響を与えている可能性が高い。興味深いことに2つのがん種間で同じ点も違う点もいずれもがん抑制的に働いていた。最近、頭頸部扁平上皮がんでは DGK γ の高発現はがんの悪性化リスクが高くなるとの報告もあり、さらなる検討が必要だと思われる。

本研究成果は、がん研究の観点から見ればそれほど大きなインパクトを与えないかもしれないが、がんに関する細胞内シグナリングの新たな経路を提示できたことには一定の意味がある。一方で DGK γ 研究の分野では DGK γ の新しい機能を明らかにしたという点でかなり大きな成果では無いかと考えている。全部で 10 種存在する DGK アイソフォームの性質と機能を明らかにするために、さらに様々な観点からの研究が重要となってくるであろう。

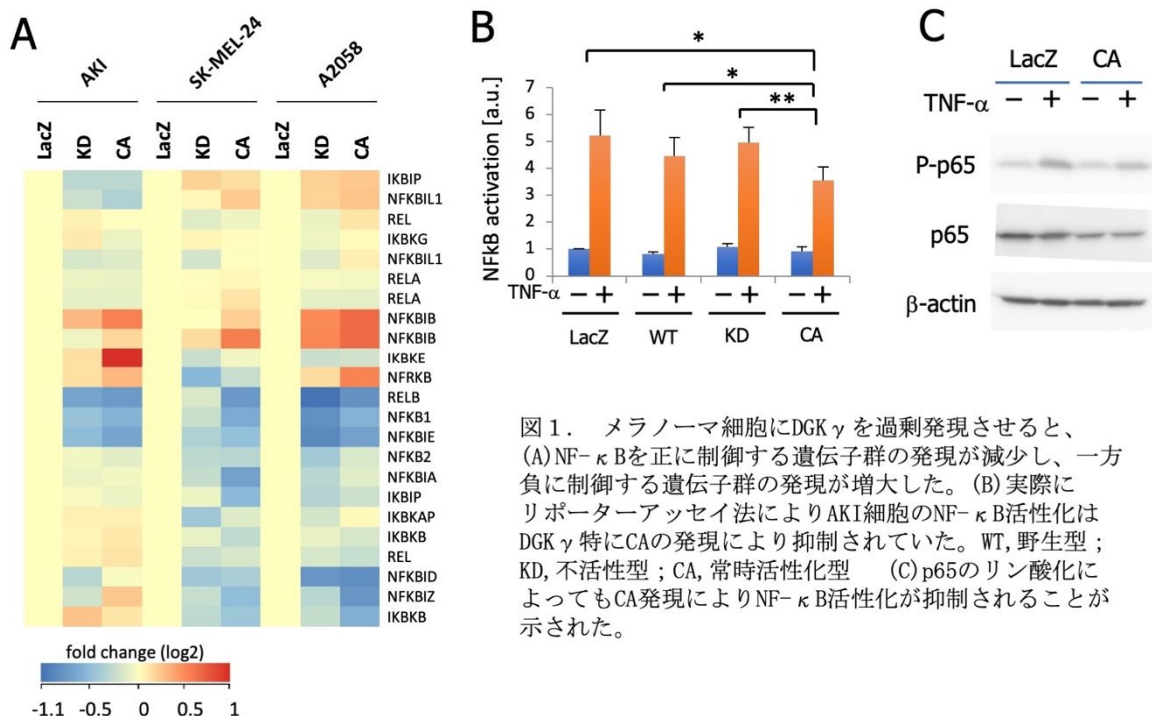


図 1. メラノーマ細胞にDGK γ を過剰発現させると、(A) NF- κ Bを正に制御する遺伝子群の発現が減少し、一方負に制御する遺伝子群の発現が増大した。(B)実際にリポーターアッセイ法によりAKI細胞のNF- κ B活性化はDGK γ 特にCAの発現により抑制されていた。WT, 野生型; KD, 不活性化型; CA, 常時活性化型 (C) p65のリン酸化によってもCA発現によりNF- κ B活性化が抑制されることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 甲斐正広、佐藤亜紀子、山本英一郎、新沼猛、北嶋洋志、鈴木拓
2. 発表標題 Functional analysis of Diacylglycerol kinase gamma in melanoma
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 甲斐正広、佐藤亜紀子、山本英一郎、新沼猛、北嶋洋志、鈴木拓
2. 発表標題 The downregulation of diacylglycerol kinase gamma in melanoma cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 甲斐正広、佐藤亜紀子、山本英一郎、新沼猛、北嶋洋志、鈴木拓
2. 発表標題 メラノーマ細胞におけるジアシルグリセロールキナーゼ の機能
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 甲斐正広、佐藤亜紀子、山本英一郎、新沼猛、北嶋洋志、鈴木拓
2. 発表標題 Diacylglycerol kinase suppresses NF- B signaling in melanoma cells
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022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
---------	---------