

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06548

研究課題名(和文) 光学的p38活性制御により明らかになる細胞増殖抑制シグナルの時間情報コーディング

研究課題名(英文) Temporal information coding of cell proliferation inhibitory signal revealed by optical measurement and control of p38 activity in living cells

研究代表者

富田 太一郎 (Tomida, Taichiro)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：70396886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト細胞には、細胞周期制御や細胞死を誘導することで増殖抑制に寄与する経路が存在する。本研究は、癌の増殖抑制に寄与するp38に着目しその動態と細胞機能との対応を明らかにすることを目的とした。新規のp38活性レポーターおよび光遺伝学的p38制御系の開発を進めた結果、光照射なしに高効率にシグナル検出を可能にする新規レポーターの構築と、光遺伝学的p38操作系の構築に成功した。そこで、培養癌細胞における単一細胞レベルの可視化解析を行ったところ、特に結腸癌由来細胞株において、抗がん剤により活性化されるp38活性と細胞死との間で時間的な関連が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、細胞内情報伝達分子の網羅的な解析技術が進み、増殖抑制に関わる分子の同定は数多く報告されているが、個々の分子が実際に生きた細胞内でどのように振る舞うかはほとんど明らかになっていない。本研究によって、さまざまな細胞種に普遍的に存在するp38分子が細胞死を誘導する際にどのような活性変動をするかを明らかにすることができた。さらに、その動的挙動と細胞機能との関連を解析するのに有用な光遺伝学的活性操作系も新規に構築することができた。これらの知見を活用することで、癌や異常免疫等に対する新たな診断法や治療法開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Human cells have pathways that contribute to growth suppression by induction of cell cycle arrest or cell death. In this study, we focused on growth suppressing stress-activated kinase p38 and proceeded with the development of a novel p38 activity reporter and optogenetic p38 control system for the purpose of understanding the regulatory mechanism of cell-growth suppressing signaling. As a result, I succeeded in constructing a new reporter that enables high-throughput signal detection even under condition without light irradiation. In addition, using this reporter, imaging analysis was performed on colon cancer-derived cells, and the temporal relationship between p38 activity and cell death was found.

研究分野：生理学、分子生物学、薬理学

キーワード：ストレス応答 癌細胞 増殖抑制 キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

癌病態における Ras-MAPK 経路の異常は臨床的にもエビデンスが蓄積されており、全癌の 20%程度にみられる Ras 活性化型の変異は、特に ERK-MAPK 経路の増殖シグナルを亢進させて、癌細胞に過剰な増殖をもたらすことが知られる。一方、Cisplatin や Etoposide など現在の癌化学療法で頻用される薬剤の多くは細胞に DNA 損傷や酸化ストレスを惹起させ、ストレス応答経路の p38/JNK の活性化を介して、細胞死や細胞周期停止を引き起こす。しかしながら、実際に生きた細胞内でストレス応答 MAPK 活性がどのように変動しているか、さらにその活性化がどのように細胞増殖や細胞死に作用するのかはほとんど理解が進んでいない。

抗がん剤などのストレスによって惹起される「細胞死誘導」のシグナルは、アポトーシスやネクロプトーシスなどの細胞死を誘導して細胞を排除する。一方で、細胞死ではなく、細胞周期を停止させる形で増殖抑制に作用し、結果的に細胞が生存したまま適応する「ストレス適応」の状態はいわゆる抗がん剤耐性の状態に至るため、「細胞死誘導」と「ストレス適応」とのバランスが、癌病態の進展や治療の予後に重要な因子と考えられている。

もし、実時間にこれらの MAPK 活性の挙動を可視化して解明し、さらに、光照射によって MAPK を任意に活性調節する手法が実現すれば、どのようなタイミング(持続時間、周期)や場所(細胞内局在)で生じた MAPK 活性が細胞の増殖抑制や死を招くのかを理解する上で非常に有効である。動的なシグナルの研究は、従来方法論的に困難であったが、近年、イメージング技術の進歩等により新しい研究が可能になりつつある。そのため、ストレス応答研究における新しいトピックとして世界的に注目されている。また近年、脳科学分野ではチャンネルロドプシン分子等を用いて光照射依存的に神経興奮や抑制を誘導する研究が広まっているが、がん研究の分野ではまだ一般的ではない。がん関連シグナル分子を光照射によって直接制御する手法は、一部の small-G 蛋白では報告されているが、ストレス応答キナーゼや他のシグナル経路においては、未だ効率的な分子活性の検出法に欠くことがその理由と考えられる。したがって、効率の良い検出法ができれば、同時に、これを用いて新たな活性操作法の開発も大きく進展することが期待された。

2. 研究の目的

本研究では、癌細胞に増殖抑制をもたらす際の p38MAPK の動的な挙動を解明し、これが細胞レベルの増殖抑制とどのように対応するかを解明することを目的とする。特に、「ストレス応答 MAPK 活性の時間・空間的な変動」が癌細胞の生存と死にどのような意味を持つのかを問う。より具体的な目標は以下の通りである。

- ・ p38MAPK の活性可視化法を活用して、増殖抑制の刺激を受けた細胞内の p38MAPK 活性化動態を解明する。
- ・ 新規 p38 光遺伝学ツールを創出し、イメージング系と組み合わせることにより、癌細胞における p38 活性の動的挙動とその結果生じる細胞応答との対応を明らかにする。

3. 研究の方法

p38 活性可視化実験系に関しては、光遺伝学的操作系と同時に使用する目的で、光照射が不要な新規レポータ実験系を独自に開発して実験を行った。新規レポータの性能評価および p38 シグナルの解析については、培養細胞系(HEK293 細胞、C2C12 細胞)を用いて、分子イメージングおよび生化学的 western 解析、遺伝子発現解析を用いて行った。また、抗がん剤、リボソーム阻害剤、炎症性サイトカイン等のストレス刺激に対する細胞応答を評価する際には、上記培養細胞に加えて、結腸癌由来培養細胞 HCT116 および肺がん由来 A549 細胞の株化細胞を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 新規 p38 活性可視化実験系の構築

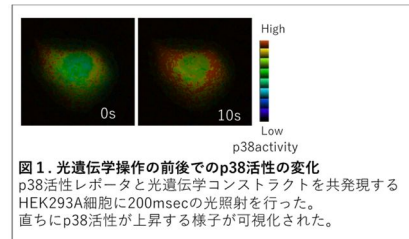
既知のメカニズムにより増殖能が亢進している細胞株を用いて、p38 活性の新規イメージング実験系を構築した。既存の FRET 型 p38 活性レポータでは、蛍光測定のために励起光照射が必要となる。そこで、自律発光により励起光がなくても活性が測定可能なレポータコンストラクトを新規に構築し、さらにこれを最適化することにより、p38 活性を評価できるようになった。HEK293 細胞および C2C12 細胞で評価を行い、感度と安定性の高いコンストラクトを選別し、新規レポータを得た。その評価のコントロールとして用いた C2C12 細胞系では細胞分化誘導に伴って細胞周期が停止することが知られるが、その分化進行のタイミングで p38 活性が持続的に高くなることを見出された。また、HEK293 細胞系ではリボソーム阻害剤処理により p38 活性を上昇させるが、新規測定系を用いて既知の用量作用関係が光照射なしに測定できることを確認できた。

(2) 新規 p38 活性化操作実験系の構築

先行研究で得ていた候補コンストラクトを改変し、光応答ドメインを有する p38 経路の上流キナーゼコンストラクト(発現ベクター)を作成した。その作動原理としては、光応答ドメインが光照射時に構造変化することにより、これに融合して発現する上流キナーゼの活性部位が露出して、活性を示すことを狙った。上流キナーゼとしては、p38 経路の上流 MAP2K と p38 の恒常的活性化型変異体を用いた。光応答ドメインに既知の恒常的明型、あるいは暗型の変異を持たせたコンストラクトを複数作成し、これを p38 レポータと共に HEK293 細胞に導入して、期待通りの活性を示す候補コンストラクトを選別することに成功した。

次に、得られた候補コンストラクトが実際に p38 活性をどのような時間経過で活性化するかを検証するため、(1)で作成した p38 測定系と一緒に HEK293 細胞系に導入して、光照射前後の p38 活性の変化をタイムラプス解析により検証した(図1)。

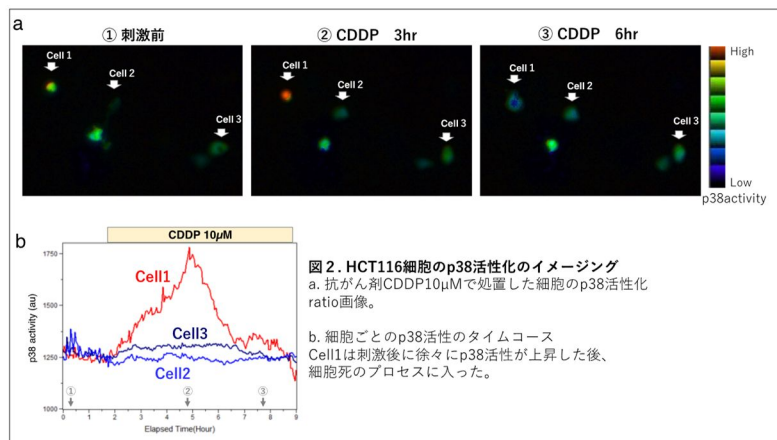
200msec 程度の光照射を与えた際には、20 秒以内にシグナルがピークに達して、その後数分程度かけて活性が元のレベルにまで減衰することがわかった。このカイネティクスは同様の光応答ドメインの構造変化についての報告とほぼ一致していた。また、光照射によるシグナル上昇は複数回繰り返せることもわかった。詳細な作用機序については、現在さらに解析を進めている。



(3) 増殖抑制における p38 活性化動態の解析

肺がん由来 A549 細胞および結腸癌由来 HCT116 細胞を用いて、典型的な増殖抑制の刺激を試験し、その際の細胞応答を解析した。これらはいずれも K-Ras に変異を有する。CDDP、Etoposide の抗がん剤を高用量 (>10 μ M) で与えた際には、一部に細胞死が生じる様子が観察された。そこで、細胞死を生じる細胞とそうでない細胞との違いを観察するために、p38 レポータを一過的に発現させて、抗がん剤に対する応答を観察した。その結果、特に HCT116 細胞において、CDDP により細胞死を生じる過程では、刺激後およそ 2 時間程度かけて p38 活性が徐々に上昇し、その後に細胞死のプロセスが開始されて、最終的にアポトーシス様の形態変化を起こして細胞死に至ることが見出された(図2)。

一方で、細胞死誘導が生じなかった細胞では p38 活性の上昇はほとんど生じておらず、細胞死に至るプロセスに p38 の持続的な上昇が関与する可能性が見出された。p38 制御の詳細な機序については今後さらに研究を進める必要がある。



また、リボソーム阻害剤による効果についても検討を行ったが、HEK293A 細胞とは異なり、HCT116 細胞では顕著な p38 活性の増加や細胞死誘導は生じないことがわかった。また、HCT116 細胞に p38 の光依存的な活性誘導を試みたが、HEK293A 細胞と同じ条件で光照射の刺激をしても同程度の p38 活性化は生じないことから、この細胞では MAPK ホスファターゼ等の発現亢進など何らかの抑制的な作用が生じており、それが原因で細胞死や増殖抑制が抑制される可能性がある。この細胞では K-Ras 変異により ERK 経路が亢進しており、これが p38 経路に抑制的に作用する可能性が想定される。この結果は細胞の抗がん剤耐性の分子機序とも関連する可能性がある。

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 1件）

1. 著者名 Tatebayashi Kazuo, Yamamoto Katsuyoshi, Tomida Taichiro, Nishimura Akiko, Takayama Tomomi, Oyama Masaaki, Kozuka Hata Hiroko, Adachi Akahane Satomi, Tokunaga Yuji, Saito Haruo	4. 巻 39
2. 論文標題 Osmostress enhances activating phosphorylation of Hog1 MAP kinase by mono phosphorylated Pbs2 MAP2K	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e103444
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2019103444	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Taichiro Tomida, Kimitaka Yamaguchi, Masanori Ito, Yoshinori Mikami, Daisuke Ohshima, Satomi Adachi-Akahane
2. 発表標題 Regulatory mechanism of cell fusion in skeletal myogenesis
3. 学会等名 2020年度生理研心血管国際研究集会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taichiro Tomida, Kimitaka Yamaguchi, Masanori Ito, Yoshinori Mikami, Daisuke Ohshima, Satomi Adachi-Akahane
2. 発表標題 Temporal regulation of IL-1 induced JNK signaling dynamics
3. 学会等名 第97回生理学会大会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taichiro Tomida, Kimitaka Yamaguchi, Yoshinori Mikami, Daisuke Ohshima, Satomi Adachi-Akahane
2. 発表標題 Gene regulation by cell-cell fusion in skeletal myogenesis
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

〔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
---------	---------