

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06563

研究課題名(和文)細胞膜イノシトールリン脂質の反転の分子機構と癌悪性化におけるその機能の解明

研究課題名(英文)A molecular mechanism of phosphoinositides transport to the plasma membrane outer leaflet and its function in cancer progression

研究代表者

米田 敦子(YONEDA, ATSUKO)

東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号：80590372

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)：細胞膜は脂質組成の異なる2重層からなる。細胞質側(内葉)に多い脂質の外側(外葉)への一過的反転は細胞死で知られているが、イノシトールリン脂質については未知であった。我々は、内葉にのみ局在するとされていたホスファチジルイノシトール4,5-ニリン酸(PIP2)が外葉にも局在し、悪性がんの性質であるがん細胞の接着、遊走に関与することを見出した。加えて、PIP2反転に関わる候補酵素Aを同定し、外葉PIP2依存的細胞接着に関わる受容体の候補分子を絞り込んだ。以上の結果の一部を国際誌と国際学会で発表した。本研究の成果は、外葉 PIP2 が関わる疾病の治療応用と阻害剤開発への基礎形成につながる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞膜内葉で様々な細胞応答に関わるPIP2が、外葉にも局在することを初めて見出した。また、外葉 PIP2 が悪性癌細胞の性質である細胞接着や遊走に関与することを見出し、国際誌に発表した。さらに、PIP2の反転に関わる酵素を同定し、PIP2が細胞膜外葉に露出する機構の一端を明らかにした。外葉PIP2依存的細胞接着に関わる候補因子も絞り込んでおり、外葉PIP2が制御する新しい形式のがん細胞の接着と遊走の機構解明につながる。本研究は、外葉PIP2依存的細胞接着や遊走に関わる疾病の発見や、これらの現象を阻害する方法の開発の基礎形成に繋がる。

研究成果の概要(英文)：The plasma membranes comprise lipid bilayers with distinct lipid composition. Transient transport of the lipids from the inner leaflet of the plasma membrane to the outer leaflet has been known in cell death (apoptosis). However, it is not known whether phosphoinositides in the inner leaflet can be transported to the outer leaflet. We found the presence of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphates (PIP2) in the outer leaflet of plasma membrane and that the PIP2 in the outer leaflet supports cell adhesion and migration of human cancer cells, which are characteristics of malignant cancer cells. Additionally, we identified an enzyme A to transport PIP2 to the plasma membrane outer leaflet. Moreover, candidate receptors to support outer PIP2-dependent cell adhesion were found. Some of these results were published in an international journal and presented at the international meeting. This study would lead to develop tools to treat diseases that outer PIP2 is involved in.

研究分野：細胞生物学

キーワード：イノシトールリン脂質 癌 細胞接着

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イノシトールリン脂質は、細胞膜脂質の中では微量であるが、重要な細胞応答に関与する。特にホスファチジルイノシトール 4,5-ニリン酸 (PIP2) は、ホスホリパーゼ C (PLC) による分解により産生されるセカンドメッセンジャーを介してシグナル伝達に関わるだけでなく、直接シグナル分子等と結合し、それらの局在制御や活性化に関わることで、細胞骨格動態、増殖、分化など様々な細胞応答を調節する (Tan X et al. J. Cell Sci. 2015)。PIP2 は、細胞膜の脂質 2 重層のうち細胞質側 (内葉) にのみ局在すると考えられていた。しかし、同様に細胞膜内葉に多いホスファチジルセリンはアポトーシス時に、ホスファチジルエタノールアミンは細胞分裂や細胞融合時に、反転酵素を介して細胞外側 (外葉) に出現し、機能することが知られている (Nagata S et al. Cell Death Differ. 2016)。我々は、PIP2 が細胞膜外葉にも局在する事を示唆する結果と、外葉 PIP2 ががん細胞の接着、遊走に関わることを示唆する結果を得ていた。

2. 研究の目的

細胞膜内葉に多い脂質の外葉への反転はアポトーシスなどで知られるが、イノシトールリン脂質については未知であった。我々は、PIP2 が細胞膜外葉にも局在し、がん細胞の悪性形質である接着、遊走に関与することを示唆する結果を得ていたことから、細胞膜外葉 PIP2 が癌悪性化に関与するという仮説を立てた。本研究では、細胞膜外葉の PIP2 はどのような機構で出現するか、外葉 PIP2 の生理的病理的意義は何かを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種培養細胞での細胞膜外葉 PIP2 の検出

当研究室で作成した PIP2 検出蛍光プローブを用いて、生きたヒトがん細胞上で外葉 PIP2 を染色した。対照には、PIP2 結合能を欠失したプローブを用いた。また、抗 PIP2 抗体 (対照には正常マウス IgG) を用いて、固定化培養細胞上の外葉 PIP2 を染色した。さらに、HiBiT 細胞外検出システムを用いて細胞膜外葉 PIP2 を定量するためのプローブと、対象として PIP2 結合能を欠失したプローブも作成した。

PIP2 分解酵素をオートクライン様式で細胞膜外葉 PIP2 に作用させるため、タグ付き分泌型組み換え酵素をデザインした。これを外葉 PIP2 が検出されている細胞株数種に導入した。酵素の発現は、免疫沈降とウエスタンブロットにより解析した。

(2) 細胞膜外葉 PIP2 のがん細胞における機能解析

細胞膜外葉 PIP2 をマスキングする試薬あるいはその対照 (不活性体) 存在下で、各種ヒトがん細胞の接着、遊走の解析を行った。

(3) PIP2 反転関連酵素の同定

外葉 PIP2 量の異なる各種ヒトがん細胞株での既知のリン脂質反転酵素の遺伝子発現を定量的逆転写 PCR により解析した。外葉 PIP2 染色シグナル強度と遺伝子発現レベルに相関のある酵素について siRNA で発現抑制し、外葉 PIP2 量の変化を調べた。PIP2 反転に関わると考えられる酵素について、さらにタグ付き組み換え酵素発現プラスミドを作成し、細胞に導入した。酵素の発現は、ウエスタンブロットにより解析した。

(4) 外葉 PIP2 依存的細胞接着関連受容体候補分子の探索

外葉 PIP2 依存的細胞接着に関わる細胞膜タンパク質を同定するため、細胞膜外葉 PIP2 の近傍に存在するタンパク質を単離同定するためのプローブを作成した。別法として、外葉 PIP2 量の異なる細胞株における遺伝子発現解析を行い、外葉 PIP2 量と発現量に相関のある複数の細胞接着受容体について、発現抑制と細胞接着解析を行った。

4. 研究成果

(1) 各種培養細胞での細胞膜外葉 PIP2 の検出

ヒト大腸がん細胞株、ヒト悪性黒色腫細胞株などのがん細胞や、マクロファージ細胞株などの癌悪性化に関わりうる細胞種において、生細胞と固定化細胞の両方で細胞膜外葉 PIP2 を検出した。また、HiBiT 細胞外検出システムを用いて細胞膜外葉 PIP2 を定量するためのプローブを作成し、定量系を構築した。PIP2 分解酵素をオートクライン様式で外葉 PIP2 に作用させるため、分泌型組み換え PIP2 分解酵素を細胞で発現した。組み換え酵素が培養上清に分泌され、タグ抗体により免疫沈降されることを確認したが、細胞膜外葉 PIP2 量を減少させるに十分な量の発現にはいたらなかった。しかし、3つの異なる抗 PIP2 抗体、新たに作成した PIP2 検出蛍光プローブ、HiBiT 細胞外検出システムを用いた PIP2 検出プローブと、異なる試薬で細胞膜外葉 PIP2 を検出した。

(2) 細胞膜外葉 PIP2 のがん細胞における機能解析

細胞膜外葉 PIP2 をマスクングする試薬あるいはその対照存在下で、各種ヒトがん細胞の接着、遊走の解析を行ったところ、試した全てのヒトがん細胞の接着、遊走が PIP2 のマスクング試薬によって活性特異的に阻害された(図1)。また、抗 PIP2 抗体によっても細胞接着が阻害され、外葉 PIP2 ががん細胞の接着や遊走に関与することが示された。

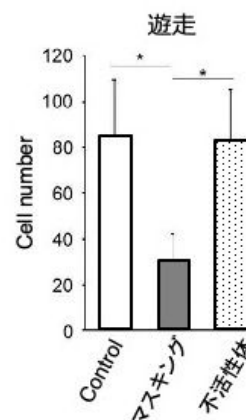


図1 ヒトスキルス胃がん細胞 58As9 の細胞遊走を PIP2 マスクング試薬あるいはその不活性体存在下で解析した。マスクング試薬存在下で、細胞遊走が阻害された。 * : $p < 0.05$

(3) PIP2 反転関連酵素の同定

外葉 PIP2 が検出されているヒト大腸がん細胞株、ヒト悪性黒色腫細胞株などでの既知のリン脂質反転酵素の遺伝子発現を解析した。そのうち、共通して発現し、かつ外葉 PIP2 染色シグナル強度と遺伝子発現レベルに相関のある酵素数種を、ヒト大腸がん細胞 DLD1 において発現抑制した。酵素 A の発現抑制により、外葉 PIP2 の減少が認められた(図2)。さらに、GFP との融合組み換え酵素 A を悪性黒色腫細胞 G361 で発現したところ、外葉 PIP2 の増加が認められた(図3)。これらの結果より、酵素 A が PIP2 の反転に関与することが示唆された。しかし、酵素 A の発現抑制によって外葉 PIP2 は消失しないことから、他の因子の関与も示唆された。

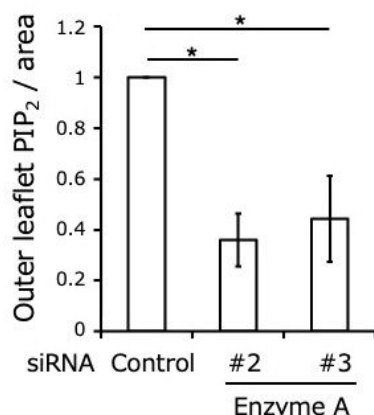


図2 対照細胞に比べ、酵素Aの発現抑制により外葉 PIP2 の染色が減弱した。大腸がん細胞 DLD1 * : $p < 0.05$

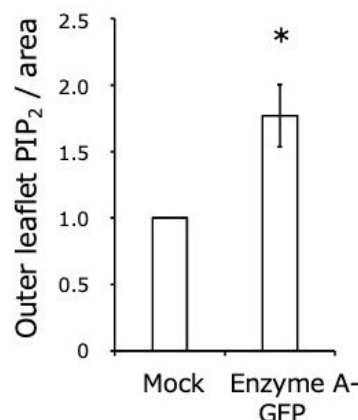


図3 対照細胞に比べ、酵素Aの過剰発現により外葉 PIP2 の染色が増強した。悪性黒色腫細胞 G361 * : $p < 0.05$

(4) 外葉 PIP2 依存的細胞接着関連受容体候補分子の探索

外葉 PIP2 依存的細胞接着に関わる細胞膜タンパク質を同定するため、細胞膜外葉 PIP2 の近傍に存在するタンパク質を単離するためのプローブを作成し、活性を確認した。細胞に添加し、候補タンパク質を単離するための条件検討を行ったが、良い条件の確立に至らなかった。別法として、外葉 PIP2 量の異なる細胞株の RNA-seq 解析より、外葉 PIP2 量とその発現量が相関する複数種の細胞接着受容体候補分子に絞り込んだ。DLD1 細胞での発現抑制と細胞接着解析により、候補分子 B に絞り込んだ。外葉 PIP2 依存的細胞接着への分子 B の関与については、さらに解析が必要である。

得られた成果の国内外における位置付けとインパクト

これまで細胞膜内葉にのみ存在すると考えられていた PIP2 が、本研究により初めて細胞膜外葉にも存在することが明らかになった。また、外葉の PIP2 が細胞接着、遊走に関わることが示され、外葉 PIP2 によるがん細胞の接着、遊走制御という新機構が存在することが示唆された。さらに、PIP2 反転の分子機構の一端が明らかになり、細胞膜脂質の著しい動態の解明の一助となる。

今後の展望

PIP2 の細胞膜外葉への反転に酵素 A 以外の因子の関与も考えられる(図2)ため、PIP2 反転のより詳細な分子機構の解明が必要であるが、酵素 A を標的とした阻害薬の探索や開発は、がん細胞の接着、遊走を阻害する新しい方法の開発や、外葉 PIP2 依存的未知の細胞応答や疾病の発見につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Satow Reiko, Suzuki Yudai, Asada Shinobu, Ota Sae, Idogawa Masashi, Kubota Shiori, Ikeo Noi, Yoneda Atsuko, Fukami Kiyoko	4. 巻 25
2. 論文標題 Downregulation of protein kinase C gamma reduces epithelial property and enhances malignant phenotypes in colorectal cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105501 ~ 105501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105501	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 -

1. 著者名 Satow Reiko, Watanabe Takeru, Nomura Moeka, Inagaki Shota, Yoneda Atsuko, Fukami Kiyoko	4. 巻 26
2. 論文標題 Patulin and <scp>LL_Z1640</scp> 2 induce apoptosis of cancer cells by decreasing endogenous protein levels of Zic family member 5	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 5680 ~ 5689
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.17598	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 -

1. 著者名 Satow Reiko, Aiga Yuna, Watanabe Takeru, Ishizuka Nako, Yoneda Atsuko, Fukami Kiyoko	4. 巻 31
2. 論文標題 Zic family member 5 promotes survival in human pancreatic cancer and cholangiocarcinoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101289 ~ 101289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101289	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 -

1. 著者名 Shibuya Takumi, Kamiyama Asami, Sawada Hirotaka, Kikuchi Kenta, Maruyama Mayu, Sawado Rie, Ikeda Naoki, Asano Kenichi, Kurotaki Daisuke, Tamura Tomohiko, Yoneda Atsuko, Imada Keisuke, Satoh Takashi, Akira Shizuo, Tanaka Masato, Yotsumoto Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Immunoregulatory Monocyte Subset Promotes Metastasis Associated With Therapeutic Intervention for Primary Tumor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 663115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.663115	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 -

1. 著者名 Yoneda A, Kanemaru K, Matsubara A, Takai E, Shimozawa M, Satow R, Yamaguchi H, Nakamura Y, Fukami K.	4. 巻 527
2. 論文標題 Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is localized in the plasma membrane outer leaflet and regulates cell adhesion and motility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 1050-1056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.040.	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 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 岡村優花, 米田敦子, 矢板咲音里, 深見希代子
2. 発表標題 インテグリンbeta1のコンフォメーションと細胞膜PIP2量の関係解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsuko Yoneda
2. 発表標題 Cancer cell adhesion regulated by phosphoinositide in the plasma membrane outer leaflet
3. 学会等名 JSPS二国間交流事業 2国間交流セミナー(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗村 緑, 米田 敦子, 深見 希代子
2. 発表標題 細胞膜外葉 PIP2 の動態解析とその細胞機能
3. 学会等名 第73回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗村 緑, 米田 敦子, 深見 希代子
2. 発表標題 細胞膜外葉イノシトールリン脂質 PIP2依存的細胞接着の特徴づけ
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米田敦子、金丸佳織、中村由和、深見希代子
2. 発表標題 細胞膜外葉PIP2 の存在検証と細胞接着における機能
3. 学会等名 第72回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米田敦子、金丸佳織、高井えりか、中村由和、深見希代子
2. 発表標題 細胞膜内葉と外葉に局在するイノシトールリン脂質PIP2による細胞 基質接着の制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高井えりか、米田敦子、深見希代子
2. 発表標題 細胞膜外葉イノシトールリン脂質PIP2が関わる細胞 基質接着の分子メカニズム
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋正光、米田敦子、深見希代子
2. 発表標題 破骨細胞形成過程における細胞膜 イノシトールリン脂質PIP2 の動態解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田萌佳、米田敦子、金丸佳織、中村由和、深見希代子
2. 発表標題 イノシトールリン脂質PI(4,5)P2の細胞膜外葉における機能解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金丸佳織、米田敦子、中村由和、深見希代子
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトール(4,5)ニリン酸の細胞膜外葉における検出
3. 学会等名 第62回脂質生化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>リサーチマップ 米田敦子 https://researchmap.jp/aty</p> <p>東京薬科大学生命科学部ゲノム病態医科学研究室ホームページ https://toyaku-ls-genome.com/publications.html</p>

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
---------	---------