

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：20K07312
研究課題名（和文）Lysosomal exocytosisを介した細胞の酸性環境適応機構

研究課題名（英文）Acid adaptation of cells via lysosomal exocytosis

研究代表者
船戸 洋佑（Funato, Yosuke）

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：60505775
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）：本研究は細胞のpH応答、特にがん悪性化に関わるPRLの高発現によって生じるlysosomal exocytosisを介した酸性環境応答の仕組みとそのがん悪性化における重要性について研究を行った。その成果として、PRLによって生じるlysosomal exocytosisの活性化ががん細胞の酸性環境適応やマウスにおける腫瘍形成に重要であることを明らかにしたほか、このPRL依存的な酸性環境適応に関わる新たな分子を複数同定することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍組織が酸性化していることは古くから知られているが、同じ「腫瘍内微小環境」として知られる低酸素などと比べその研究は大きく遅れている。本研究により細胞のpH応答性についての理解が進み酸性環境適応の機構解明に向けての取り組みが促進されることで、新たながん悪性化機構の理解や新規診断・治療法の開発へとつながる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the response of cells against environmental pH, typically focusing on the mechanism of acid adaptation of cancer cells via PRL-mediated activation of lysosomal exocytosis and its importance in cancer malignancy. As a result, we found that activation of lysosomal exocytosis is necessary for cancer cells to adapt to acidic environments upon PRL overexpression and for PRL-induced tumorigenesis in mice, and we also identified several new molecules involved in this PRL-dependent adaptation to acidic environments.

研究分野：医化学関連

キーワード：PRL がん悪性化 酸性環境適応 lysosomal exocytosis

1. 研究開始当初の背景

本研究は細胞の pH 応答、特に酸性環境に適応する仕組みとその医学生物学的意義を解明するものである。腫瘍組織内のがん細胞を取り巻く「がん微小環境」はがんの悪性化や治療抵抗性などに大きな影響を与えている。がん微小環境の特性として低酸素や酸性化が知られており、低酸素環境への適応については HIF-1 を中心とした応答機構の研究が進んでいる(2019年のノーベル生理学・医学賞の受賞対象)。一方の組織酸性化については、ワールブルグ効果などががん細胞の特殊な代謝様式により乳酸などの酸性代謝物が大量に産生され、それをがん細胞が積極的に排出することで進むことが知られている。このようながん細胞の代謝変容と、それを介した組織酸性化そのものは1920年代から知られているものの、細胞が酸性環境に適応する仕組みの解明は遅れており、通常の細胞には有害な酸性環境下でなぜがん細胞が増殖し続けられるのか、その仕組みはほとんどわかっていない。

私たちはヒト大腸がんなど、さまざまな悪性ヒトがん組織で高発現する phosphatase of regenerating liver (PRL) に着目した研究を行っている。PRL の高発現によりがん悪性化が積極的に押し進められることもわかっており、またこのがん悪性化の分子レベルでの仕組みとして、我々は PRL が Mg^{2+} 排出トランスポーターである CNNM と直接結合しその機能を阻害することが重要であることを見つけている (*J. Clin. Invest.* 2014; *EMBO Rep.* 2016 など)。しかし細胞レベルで PRL の高発現とそれに伴う細胞内 Mg^{2+} 量の増加がどのような影響をおよぼしがん悪性化へとつながるのかはよくわかっていなかった。私たちは PRL をドキシサイクリン (DOX) 依存的に発現誘導できる細胞株を樹立し解析を行ったところ、PRL を高発現させた細胞では環境 pH に対する応答性が変化しており、悪性がん組織で見られる弱酸性の pH 環境下で最も盛んに増殖することを見つけた。これまで未解明であるがん細胞の酸性環境適応の一端を担う可能性が考えられたので、さらにその仕組みを明らかにするべく、CRISPR-Cas9 sgRNA ライブラリーを用いたゲノムワイドなスクリーニングを行っている。そして得られた候補分子についての解析より、リソソーム膜と細胞膜が融合し、高濃度プロトンなどリソソーム内腔に蓄えられた物質を細胞外へ放出する“lysosomal exocytosis”が PRL 高発現により活性化していることがわかった。PRL による酸性環境適応を説明する現象と考えられ、この仕組みについてさらに検討を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究では上述の予備的実験結果に立脚して lysosomal exocytosis に着目した解析を進め、PRL の高発現によって細胞が酸性環境に適応する仕組みとその意義を明らかにする。ヒトの体内環境は pH 7.4 前後に調節されている一方、悪性化したがん組織などではがん細胞の代謝変容により乳酸などの酸性物質が産生され、細胞外へと排出されることにより酸性化している。しかし、このような環境 pH の変化に対するがん細胞の応答/適応機構はほとんどわかっていない。また、酸性適応の要因として本研究で着目する lysosomal exocytosis について、がん浸潤への寄与 (Kundu et al., *Nat. Commun.* 2018) など興味深い報告もあるが、酸性適応との関連はわかっておらず、また詳細な分子機序も未解明である。本研究は培養細胞や線虫、マウスなどを用いた多方面からのアプローチによりこの現象を司る分子ネットワークの解明を目指すものであり、インパクトの強い研究成果が期待できる。また本研究によりがん細胞が酸性環境に適応して増殖・進展する仕組みの理解が大きく進むだけでなく、この現象に関連する分子を標的とした、新たながん診断・治療法への開発へとつながる可能性もある。

3. 研究の方法

細胞の環境 pH 応答性の評価は、25 mM HEPES を加えたのち目的の pH に HCl または NaOH を用いて調節した DMEM 培地を用いている。播種後 12 時間後の細胞を各 pH に調節した培地と交換後、3 日間培養しその生細胞数を計測することで評価した。

Lysosomal exocytosis の評価は (1) リソソーム中の酵素 β -hexosaminidase の培地中への分泌量について、その基質 4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide を用いた酵素活性の測定、および (2) リソソームマーカー分子 LAMP に対する抗体を用いた FACS 解析により求めた。

各遺伝子のノックアウトは CRISPR/Cas9 法によって行っており、標的配列を挿入した LentiCrispr v2 を用いてレンチウイルスを作らせたのち、対象細胞に感染させることにより目的の遺伝子のノックアウト細胞を含む集団を得ている。その後、限外希釈によって各細胞を分取し、ウェスタンブロットやゲノム DNA 解析により標的遺伝子のノックアウトを確認したものを利用している。またノックダウンについては、標的配列を挿入した pLKO.1 puro を用いてノックアウトの際と同様にレンチウイルスを作成し感染させることで行っている。

マウスを用いた実験では、メスの C57BL/6J マウスに PRL 高発現 B16 細胞 (野生型および TRPML1 欠損株) を尾静脈より注入し、3 週間後に解剖し肺の表面にある B16 細胞由来の黒い腫瘍の数を計測した。

4. 研究成果

(1) Lysosomal exocytosis のがん悪性化における重要性の検証

この目的のため、PRL を安定発現する B16 メラノーマ細胞をベースに、lysosomal exocytosis の実行に必須のリソソーム上のチャネル分子 TRPML のノックアウト細胞株を作成した。この細胞株の lysosomal exocytosis の状態を調べたところ、PRL 依存的に活性化していた lysosomal exocytosis が抑制されていた(図 1A)。また pH 環境応答性を調べたところ、最も増えやすい「至適環境 pH」の PRL 発現による酸性側へのシフトが、やはり TRPML のノックアウトにより抑制されていた(図 1B)。

さらにこの細胞株を用いて、PRL によるがん悪性化への lysosomal exocytosis の重要性を検証することとした。PRL を安定発現する B16 細胞を C57BL/6J マウスに尾静脈注射すると肺でできる転移性腫瘍の数が増加することが知られている。そこで同様の実験を行い、肺の表面にできたメラノーマ細胞由来の黒い腫瘍の数を調べたところ、PRL 高発現によって増加した腫瘍の数が TRPML のノックアウトによりほぼ完全に抑制されていた(図 1C)。これらの実験結果より、PRL は lysosomal exocytosis を介して pH 応答性変化を促すことで細胞が酸性の腫瘍環境内でも旺盛に増殖できるようにし、がん悪性化をおし進めることが明らかとなった。

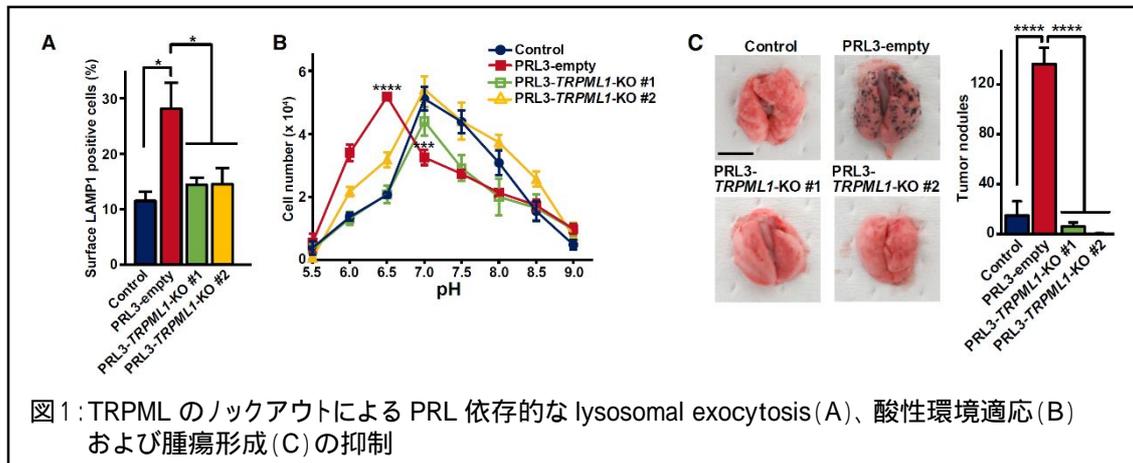


図 1: TRPML のノックアウトによる PRL 依存的な lysosomal exocytosis (A)、酸性環境適応 (B) および腫瘍形成 (C) の抑制

(2) Lysosomal exocytosis と酸性環境適応に関わる新たな分子の探索と同定

「1. 研究開始当初の背景」でも述べたように、私たちは CRISPR-Cas9 sgRNA ライブラリーを用いたゲノムワイドなスクリーニングから、PRL による酸性環境適応に関連する候補遺伝子をリストアップしている。このうちいくつかについては先行して解析を行い lysosomal exocytosis の重要性を明らかにするに至っていたが、その他の未解析の遺伝子群について、特にスコアの高いものを中心に解析を行った。各候補遺伝子に対するノックダウン細胞株を作成し、PRL 高発現細胞が環境 pH 応答性変化の結果、pH 8 などの弱アルカリ性で脆弱となることを利用し、この環境下での生存率を判定した。その結果、候補遺伝子の中でそのノックダウンにより生存率が有意に回復するものが見つかった。そして次にこれらのノックダウン細胞を各 pH に固定した培地で培養することで環境 pH 応答性を調べたところ、PRL 発現による至適環境 pH の酸性側シフトが抑制されていることを確認した。

次に中でも有望なものについては、当該遺伝子のノックアウト細胞も樹立した。そしてこれらのノックアウト細胞の環境 pH 応答性を調べたところ、やはり酸性側シフトが抑制されており、酸性環境適応に関わる新たな遺伝子群の同定に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ryu Kajung, Yoshida Atsushi, Funato Yosuke, Yamazaki Daisuke, Miki Hiroaki	4. 巻 47
2. 論文標題 PRL stimulates mitotic errors by suppressing kinetochore-localized activation of AMPK during mitosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 75～87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.22034	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 -

1. 著者名 Funato Yosuke, Hashizume Osamu, Miki Hiroaki	4. 巻 114
2. 論文標題 Phosphatase independent role of phosphatase of regenerating liver in cancer progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 25～33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15625	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 -

1. 著者名 Lohani Sweksha, Funato Yosuke, Akiyama Yuki, Mizutani Kiyohito, Takai Yoshimi, Ishitani Tohru, Miki Hiroaki	4. 巻 135
2. 論文標題 A novel role for PRL in regulating epithelial cell density by inducing apoptosis at confluence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs258550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.258550	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 Funato Yosuke, Miki Hiroaki	4. 巻 148
2. 論文標題 The emerging roles and therapeutic potential of cyclin M/CorC family of Mg ²⁺ transporters	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 14～18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2021.09.004	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 Funato Yosuke, Yamazaki Daisuke, Okuzaki Daisuke, Yamamoto Nobuhiko, Miki Hiroaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Importance of the renal ion channel TRPM6 in the circadian secretion of renin to raise blood pressure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24063-2	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 Huang Yichen, Mu Kaijie, Teng Xinyu, Zhao Yimeng, Funato Yosuke, Miki Hiroaki, Zhu Weiliang, Xu Zhijian, Hattori Motoyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Identification and mechanistic analysis of an inhibitor of the CorC Mg ²⁺ transporter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102370 ~ 102370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102370	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

1. 著者名 Huang Yichen, Jin Fei, Funato Yosuke, Xu Zhijian, Zhu Weiliang, Wang Jing, Sun Minxuan, Zhao Yimeng, Yu Ye, Miki Hiroaki, Hattori Motoyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Structural basis for the Mg ²⁺ recognition and regulation of the CorC Mg ²⁺ transporter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabe6140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abe6140	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

1. 著者名 Wu Yanying, Funato Yosuke, Meschi Eleonora, Jovanoski Kristijan D, Miki Hiroaki, Waddell Scott	4. 巻 9
2. 論文標題 Magnesium efflux from Drosophila Kenyon cells is critical for normal and diet-enhanced long-term memory	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e61339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.61339	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

1. 著者名 Funato Yosuke, Yoshida Atsushi, Hirata Yusuke, Hashizume Osamu, Yamazaki Daisuke, Miki Hiroaki	4. 巻 55
2. 論文標題 The Oncogenic PRL Protein Causes Acid Addiction of Cells by Stimulating Lysosomal Exocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 387 ~ 397.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2020.08.009	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 -

1. 著者名 Kozlov Guennadi, Funato Yosuke, Chen Yu Seby, Zhang Zhidian, Illes Katalin, Miki Hiroaki, Gehring Kalle	4. 巻 295
2. 論文標題 PRL3 pseudophosphatase activity is necessary and sufficient to promote metastatic growth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11682 ~ 11692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014464	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

1. 著者名 Hashizume Osamu, Funato Yosuke, Yamazaki Daisuke, Miki Hiroaki	4. 巻 33
2. 論文標題 Excessive Mg ²⁺ Impairs Intestinal Homeostasis by Enhanced Production of Adenosine Triphosphate and Reactive Oxygen Species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants & Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 20 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ars.2019.7951	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 船戸洋佑, 橋爪脩, 三木裕明
2. 発表標題 pHが織りなすがん生物学
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋重成, 船戸洋佑
2. 発表標題 pH/CO ₂ がもたらした有機物創成と生命の pH 適応戦略
3. 学会等名 pH/CO ₂ が支える地球上の生命 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 船戸洋佑、橋爪脩、三木裕明
2. 発表標題 上皮膜上のMg ²⁺ 排出分子CNNMの阻害を介した腫瘍内酸性環境への適応機構
3. 学会等名 2022年度生理研研究会「上皮膜輸送と細胞極性形成機構の統合的理解を目指して」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 船戸洋佑、橋爪脩、山崎大輔、三木裕明
2. 発表標題 Maintenance of magnesium homeostasis by CNNM and various diseases caused by its disruption
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

1. 発表者名 船戸洋佑、橋爪脩、山崎大輔、三木裕明
2. 発表標題 Mg ²⁺ トランスポーターCNNMの生物学的重要性と治療標的としての可能性
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 船戸洋佑、本田茉莉、山崎大輔、三木裕明
2. 発表標題 がん細胞の酸性環境適応機構「acid addiction」の分子メカニズム解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 船戸 洋佑, 橋爪 脩, 吉田 篤, 本田 茉莉, 山崎 大輔, 三木 裕明
2. 発表標題 がん細胞の酸性環境への新規適応機構「acid addiction」の発見
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 船戸 洋佑, 橋爪 脩, 吉田 篤, 山崎 大輔, 三木 裕明
2. 発表標題 CNNMによるマグネシウムの輸送とその医学生物学的重要性
3. 学会等名 2020年度生理研研究会『上皮膜輸送の多様性・調和機構を基盤とする異分野融合研究の創出』（招待講演）
4. 発表年 2020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			
中国	Fudan University			
英国	The University of Oxford			
中国	Fudan University			
カナダ	McGill University			