

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15019

研究課題名（和文）Leading edgeのGTP代謝コンパートメントによる新規細胞遊走制御の解明

研究課題名（英文）Novel Regulation of Cell Migration by the GTP Metabolic Compartment of the Leading Edge

研究代表者

鎌田 諒（Kamata, Ryo）

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・特任研究員

研究者番号：60801420

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞は低栄養および低酸素のストレス条件下であるにも関わらず、異常な細胞遊走の誘発が継続的に行われている。しかしながら、がん細胞はストレス条件下で、どのようにして継続的な細胞遊走をONにしているのか謎が多い。申請者らは細胞内エネルギー代謝の区画形成によって細胞遊走を制御するという新たなエネルギーシステムの存在を掴むに至った。本研究はエネルギー代謝の区画形成(Metabolic Compartmentalization)に着目し、がん細胞の持続的な細胞遊走の分子メカニズムを明らかにすることで、がん治療戦略開発の新たな可能性を報告する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、細胞内のGTPの分布は急峻な勾配を形成し、GTP生成酵素群は細胞遊走先端部leading edgeに蓄積することを明らかにした。これまでに腫瘍形成・増殖における細胞内エネルギー物質“GTP（グアノシン三リン酸）”の役割と、GTP代謝の制御が治療標的になり得ることを報告している。これらの研究により癌の本態を解き明かし、新たな治療方法の確立に大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Cancer cells continuously induce abnormal cell migration despite low nutrition and hypoxia stress conditions. However, how cancer cells turn on continuous cell migration under stress conditions remains a mystery. We have identified a novel energy system that regulates cell migration by compartmentalizing intracellular energy metabolism. This study focuses on the metabolic compartmentalization of energy metabolism to elucidate the molecular mechanism of sustained cell migration of cancer cells, which may provide new possibilities for developing cancer therapy strategies.

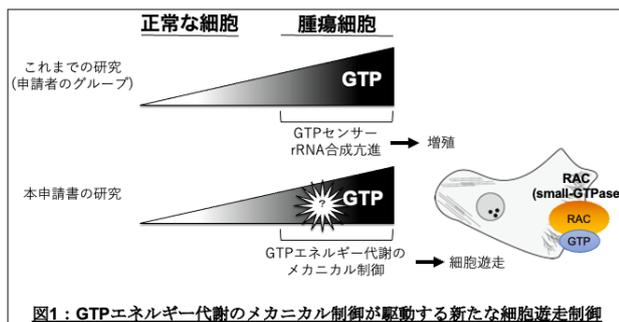
研究分野：分子生物学

キーワード：細胞遊走 代謝

1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞は、低栄養および低酸素のストレス条件下であるにも関わらず、異常な細胞遊走の誘発が継続的に行われている。このストレスに強い細胞移動能力は、単細胞生物に至るまで保存されており、多細胞生物においては、発生、免疫、創傷治癒に不可欠である。細胞移動が機能しないと、先天性欠損症、臓器の線維化、がんなどの病態の原因となる。ATP (アデノシン三リン酸) と GTP (グアノシン三リン酸) は、細胞の主要なエネルギー通貨であり、運動活性、細胞骨格のダイナミクス、シグナル伝達などを駆動する。GTP 代謝の制御システムは、細胞の移動やオルガネラの機能に関連する新たなエネルギー物質である。しかしながら、細胞内代謝ががん細胞の移動や浸潤に時間的・空間的に制御されているかどうかについては理解されておらず、腫瘍細胞はストレス条件下で、どのようにして継続的な細胞遊走を ON にしているのか謎が多い。

これまで腫瘍形成・増殖における細胞内エネルギー物質“GTP (グアノシン三リン酸)”の役割と、GTP 代謝の制御が治療標的になり得ることを明らかにしてきた(図 1, 引用:1-4 など)。GTP はグアニンヌクレオチド代謝系の律速酵素である IMP dehydrogenase (IMPDH)により合成され、タンパク質の合成やシグナル伝達、細胞内のエネルギー代謝に不可欠な存在である。本課題の推進により、GTP 代謝による細胞遊走活性化の制御システムという新たな概念創出だけでなく、細胞遊走先端部分 **leading edge** における GTP 代謝の区画化を標的とした新たながん治療戦略の可能性を拓くことが期待出来る。



2. 研究の目的

本研究の目的は、**leading edge** における GTP エネルギー代謝が、がん転移の特徴である異常な細胞遊走をどのように制御するのかを解明し、転移性 **ccRCC** (進行/再発性腎細胞癌)における新たな治療戦略を確立することである。本研究により、1) 腫瘍微小環境における低栄養条件下で継続する異常な細胞遊走に GTP 代謝の関与があることを提唱する。2) **leading edge** へ GTP 合成の区画化が起こるメカニズムの解明により、細胞遊走における GTP 代謝の区画化の役割を定義する。3) **leading edge** における GTP エネルギー代謝のメカニカル制御が駆動する新たな細胞遊走機構について示唆する。本研究の推進により、がん転移における GTP 代謝を介した細胞遊走の制御システムを新たに提唱することが期待出来る。**ccRCC** は腎臓がんのタイプの多くを占めているにもかかわらず、これまでの治療法に対して非常に高い抵抗性をもつことが問題になっている。本課題の推進で、GTP 代謝による細胞遊走活性化の制御システムという新たな概念創出だけでなく、**leading edge** における GTP 代謝の区画化を標的とした新たながん治療戦略の可能性を拓くことが期待出来る。

3. 研究の方法

本研究は **leading edge** における GTP 代謝と細胞遊走メカニズムの解明を行い、転移性腎がん治療への応用を目指す。以下 2 点を具体的な達成目標として設定する。

目標 1:細胞遊走時における GTP 代謝の区画化メカニズムを明らかにする。

目標 2:**leading edge** における GTP 依存的な Rac 活性化のメカニズムを解明する。

<具体的な研究計画・方法>

計画 1:GTP 代謝の区画化メカニズムの解明

- ・ **leading edge** における GTP 代謝を検討するため、薬剤誘導型(Tet-on システム)核局在化シグナル (NLS)付 IMPDH ウイルスベクターを作製。腎臓がん細胞株に導入する。

- ・ **leading edge** に発現する IMPDH を Tet-on NLS-IMPDH2 システムにより核内にトラップすることで細胞遊走への影響をスクラッチアッセイにより確認する。

- ・ 細胞遊走先端部での Rac の活性化を GTP-Rac 抗体を用いて細胞免疫染色により検討する。

4. 研究成果

本研究では GTP 代謝による新規細胞遊走活性化の制御システムを解明し、腫瘍転移における GTP 代謝の役割を明らかにする。

(1) 細胞内 GTP レベルの減少は細胞遊走を抑制する(図 2)。

GTP はグアニンヌクレオチド代謝系の律速酵素である IMP dehydrogenase (IMPDH)により生合成され、タンパク質の合成やシグナル伝達、細胞内のエネルギー代謝に不可欠な存在である。細胞内 GTP レベルと細胞遊走能の関係を明らかにするため IMPDH を非競合的・可逆的・特異的に阻害するミコフェノール酸 (MPA) を添加し、細胞内 GTP レベルを減少させ、スクラッチアッセイによる細胞遊走能の経時解析を行った。その結果、細胞内 GTP レベルの減少により細胞遊走は抑制されることを示唆した。

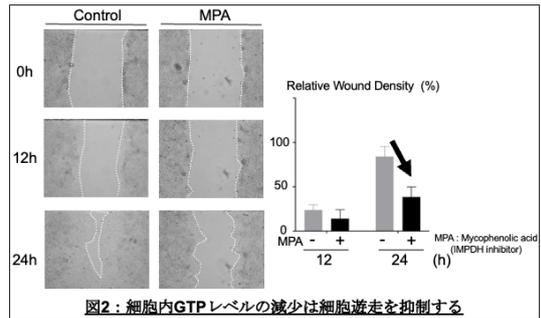


図2: 細胞内GTPレベルの減少は細胞遊走を抑制する

(2) 細胞遊走先端部分(leading edge)に GTP 合成酵素が集積する(図 3, 4)。

細胞内 GTP レベルによって細胞遊走は制御される結果から、GTP 合成に関与する酵素群の細胞内局在を調べるため、蛍光免疫染色を行い、これまでに細胞遊走時の先端部分に GTP 合成酵素が集積することを報告している(図 3, 引用:5, 6)。さらに詳細な解析により細胞内の GTP 合成酵素の分布は急峻な勾配を形成し、特に細胞遊走時の細胞先端端(leading edge)に集積していることが示唆された(図 4)。

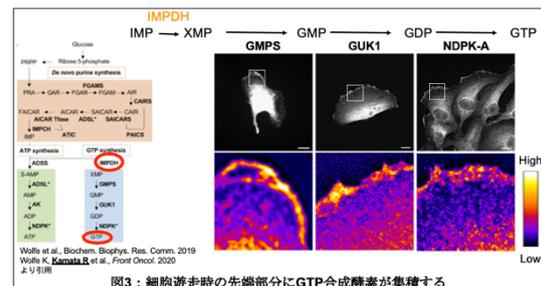


図3: 細胞遊走時の先端部分にGTP合成酵素が集積する

(3) leading edge における GTP 合成酵素は細胞遊走の駆動力として働く(図 5)。

leading edge における GTP 代謝を検討するため、薬剤誘導型 (Tet-on システム) 核局在化シグナル (NLS)付 IMPDH ウイルスベクターを製作し、腎臓がん細胞に導入した後、leading edge に発現する IMPDH を核内にトラップすることで細胞遊走への変化を確認した。その結果、IMPDH を核内トラップすることで leading edge における Rac-GTP (活性型)は低下し、さらに細胞遊走が抑制されることが明らかとなった。

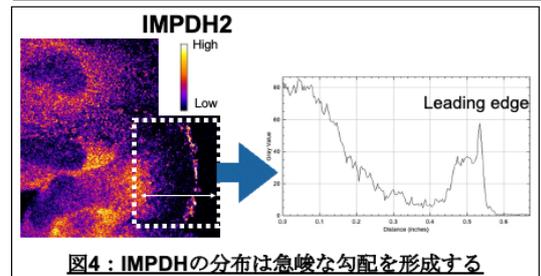


図4: IMPDHの分布は急峻な勾配を形成する

本研究により、細胞内の GTP の分布は急峻な勾配を形成し、GTP は先端部に蓄積することを見出した。この GTP の局在と一致して、デノボおよびサルベージ GTP 合成経路の全 GTP 生合成酵素 (律速段階の IMP デヒドロゲナーゼ 2 (IMPDH2) を含む) もリーディングエッジに局在しているデータを得た。さらに IMPDH の leading edge への局在が細胞遊走制御に重要な役割を担っていることを明らかにした。今後、GTP 代謝による制御システムを明らかにすることで、生命現象の理解とそれを基盤とした治療法に繋げたい。

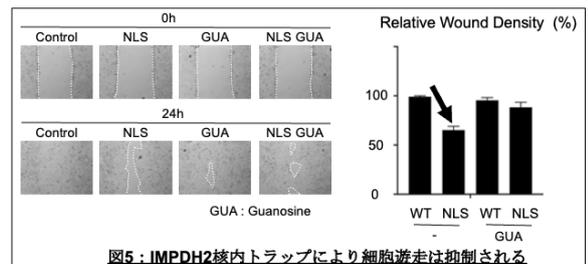


図5: IMPDH2核内トラップにより細胞遊走は抑制される

<引用文献>

- Sumita K, Lo YH, Takeuchi K, Senda M, Kofuji S, Ikeda Y, Terakawa J, Sasaki M, Yoshino H, Majd N, Zheng Y, Kahoud ER, Yokota T, Emerling BM, Asara JM, Ishida T, Locasale JW, Daikoku T, Anastasiou D, Senda T, Sasaki AT. The Lipid Kinase PI5P4K β Is an Intracellular GTP Sensor for Metabolism and Tumorigenesis. *Mol Cell*. 2016 Jan 21;61(2):187-98.
- Kofuji S, Hirayama A, Eberhardt AO, Kawaguchi R, Sugiura Y, Sampetean O, Ikeda Y, Warren M, Sakamoto N, Kitahara S, Yoshino H, Yamashita D, Sumita K, Wolfe K, Lange L, Ikeda S, Shimada H, Minami N, Malhotra A, Morioka S, Ban Y, Asano M, Flanary VL, Ramkissoon A, Chow LML, Kiyokawa J, Mashimo T, Lucey G, Mareninov S, Ozawa T, Onishi N, Okumura K, Terakawa J, Daikoku T, Wise-Draper T, Majd N, Kofuji K, Sasaki M, Mori M, Kanemura Y, Smith EP, Anastasiou D, Wakimoto H, Holland EC, Yong WH, Horbinski C,

- Nakano I, DeBerardinis RJ, Bachoo RM, Mischel PS, Yasui W, Suematsu M, Saya H, Soga T, Grummt I, Bierhoff H, Sasaki AT.
IMP dehydrogenase-2 drives aberrant nucleolar activity and promotes tumorigenesis in glioblastoma. *Nat Cell Biol.* 2019 Aug;21(8):1003-1014.
3. Naffouje R, Grover P, Yu H, Sendilnathan A, Wolfe K, Majd N, Smith EP, Takeuchi K, Senda T, Kofuji S, Sasaki AT. Anti-Tumor Potential of IMP Dehydrogenase Inhibitors: A Century-Long Story. *Cancers (Basel).* 2019 Sep 11;11(9):1346.
 4. Kofuji S, Sasaki AT. GTP metabolic reprogramming by IMPDH2: unlocking cancer cells' fuelling mechanism. *J Biochem.* 2020 Oct 1;168(4):319-328.
 5. Wolfe K, Kofuji S, Yoshino H, Sasaki M, Okumura K, Sasaki AT. Dynamic compartmentalization of purine nucleotide metabolic enzymes at leading edge in highly motile renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Aug 13;516(1):50-56.
 6. Wolfe K, Kamata R, Coutinho K, Inoue T, Sasaki AT. Metabolic Compartmentalization at the Leading Edge of Metastatic Cancer Cells. *Front Oncol.* 2020 Nov 2;10:554272.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikeda Yoshiki, Hirayama Akiyoshi, Kofuji Satoshi, Hirota Yoshihisa, Kamata Ryo, Osaka Natsuki, Fujii Yuki, Sasaki Mika, Ikeda Satsuki, Smith Eric P, Bachoo Robert, Soga Tomoyoshi, Sasaki Atsuo T	4. 巻 170
2. 論文標題 SI-MOIRAI: a new method to identify and quantify the metabolic fate of nucleotides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 699 ~ 711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab077	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 Osaka Natsuki, Hirota Yoshihisa, Ito Doshun, Ikeda Yoshiki, Kamata Ryo, Fujii Yuki, Chirasani Venkat R., Campbell Sharon L., Takeuchi Koh, Senda Toshiya, Sasaki Atsuo T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Divergent Mechanisms Activating RAS and Small GTPases Through Post-translational Modification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 707439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2021.707439	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鎌田 諒
2. 発表標題 GTPエネルギー代謝のメカニカル制御が駆動するストレス-レジリエンスな細胞遊走
3. 学会等名 日本分子生物学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 METHODS AND MOLECULAR PROBES FOR SUPER-RESOLUTION IMAGING AND QUANTIFICATION OF GUANINE NUCLEOTIDE TRIPHOSPHATE	発明者 Ryo Kamata	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、63/284,124	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 METHODS AND MOLECULAR PROBES FOR SUPER-RESOLUTION IMAGING AND QUANTIFICATION OF GUANINE NUCLEOTIDE TRIPHOSPHATE	発明者 Atsuo Sasaki, Mika Sasaki	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、63/284,124	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 METHODS AND MOLECULAR PROBES FOR SUPER-RESOLUTION IMAGING AND QUANTIFICATION OF GUANINE NUCLEOTIDE TRIPHOSPHATE	発明者 Harri Harma, Karri Kopra	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、63/284,124	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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		
米国	シンシナティ大学		