

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19406

研究課題名（和文）がん細胞の分裂期に起こるpH依存性の新たな細胞死プログラムの研究

研究課題名（英文）Research on pH-dependent cell death program that occurs in the mitotic phase of cancer cells

研究代表者

三木 裕明（Miki, Hiroaki）

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：80302602

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、がん悪性化因子PRLを高発現する細胞で起こるpH依存性のユニークな細胞死についての解析を行った。PRL高発現細胞を弱アルカリ条件で培養すると、細胞周期のM期で染色体分配の異常を伴う細胞死を起こしていた。生理的なpH環境で細胞死は顕著ではないものの、分裂期での染色体整列にある程度の異常が見られ、さらに培養を続けることで染色体数の異常が生じた。染色体数の異常は悪性化したがん細胞の特徴でもあり、PRL高発現によるがん悪性化進展の基本となる分子機序と考えることができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん悪性化にはたらくPRLの分子機能解析から見つけたユニークな細胞死に着目した解析を進めることで、細胞分裂期の染色体アラインメントにおける異常を新たに見つけることができた。実際にPRL高発現細胞を培養し続けることで染色体数の異常が生じることも示され、新たながん悪性化進展機構の解明にもつながる重要な研究成果と考えられる。また、細胞のエネルギー状態に応じて活性化されるAMPキナーゼのキネトコア特異的な活性化異常を見出し、このキナーゼの活性調節における興味深い一面を明らかにできた点でも重要な意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the unique pH-dependent cell death that occurs in cells that highly express the oncogenic protein PRL. When cells overexpressing PRL were cultured under weakly alkaline conditions, cell death accompanied by abnormal chromosome segregation occurred during the M phase of the cell cycle. Although cell death was not noticeable in a physiological pH environment, some abnormality was observed in chromosome alignment during the division phase, and further abnormalities in the number of chromosomes occurred with continued culture. Abnormalities in the number of chromosomes are also a characteristic of malignant cancer cells, and can be considered as the basic molecular mechanism for the progression of cancer malignancy due to PRL overexpression.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞死

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞はグルコースを大量に消費して乳酸を産生する特徴的なエネルギー代謝を行っており、悪性化の進展に伴って周辺組織を酸性化することが知られる。近年の *in vivo* イメージング技術の進歩に伴って、生体内組織 pH の定量測定が可能となりつつあり、悪性化したがん組織で pH 6.5 以下にまで酸性化するケースも報告されている。がん細胞はこのような酸性環境の中でも活発に増殖できる一方で、通常の pH 環境 (pH 7.4 前後) やさらにアルカリ化した環境には脆弱であることが古くから指摘されてきた。本研究では、このがん細胞にとってのアキレス腱とも言えるユニークな pH 応答性に焦点を絞って解析に取り組む。

2. 研究の目的

(1) 私たちはこれまで、大腸がんの転移巣で特異的に高発現する PRL (phosphatase of regenerating liver) と、その結合標的分子として見つけた Mg^{2+} トランスポーター CNNM (cyclin M) の機能解析を進めてきた。高発現した PRL が CNNM に直接結合して Mg^{2+} 排出を阻害することや、遺伝子改変マウスを使ってがん悪性化における重要性も明らかにしている。さらに PRL を高発現する細胞の挙動を詳細に調べたところ、培地の pH を生体内環境に近い 7.5 に固定するとほとんど増殖せず、悪性化したがん組織で見られる 6.5 でもっとも活発に増殖する、ユニークな pH 応答特性を持っていることを見つけた。この酸性環境での選択的増殖を可能とする仕組みとして、リソソームが細胞膜と融合する lysosomal exocytosis が活発化することで細胞内のプロトンを積極的に細胞外に排出することが重要であることを明らかにしている。

(2) 上記のように、PRL 高発現細胞は pH 6.5 などの酸性環境で活発に増殖する一方で、pH 8.0 などの弱アルカリ環境に晒すと、細胞が死滅することを見つけた。この細胞死がどのように起こっているのかを調べるため、ヘキストで核を染色してその挙動を観察すると、核が凝縮して細胞が丸く round up して M 期が進行している途中で核が断片化して死んでいることが分かった。この細胞死の様子は通常の細胞をより強いアルカリ条件 (pH 9.0 など) に晒して起こした細胞死とは明らかに異なっていた。またカスパーゼが活性化されている一方で、その阻害剤はまったく細胞死抑制効果を示さなかった。さまざまな化合物の効果を調べたところ、フェロトシスなど既知の細胞死を阻害する化合物が軒並み無効であったのに対し、p38 MAPK の阻害剤だけが抑制効果を示した。がん細胞が酸性環境で選択的に生存・増殖できる一方で、アルカリ条件に極めて脆弱になる何らかのプログラムの存在を示唆していると考えられる。本研究ではこのユニークな細胞死現象の土台となる分子機構を解明し、がん細胞の選択的死滅への展開を探ることとした。

3. 研究の方法

上述の PRL の機能解析から見つけた「弱アルカリ環境で特異的に起こる細胞分裂に共役した細胞死」に焦点を絞り、その分子メカニズムの解析を行う。まず細胞がどのように死ぬのか、特に予備実験から関連が示唆されている細胞周期の M 期の状況を詳細に調べ、染色体やスピンドルの挙動や、その異常と細胞死の関連について明らかにする。また、細胞死の起こる状況の観察や阻害剤を用いた解析などから、最近明らかにされてきたさまざまなタイプの細胞死との相違点を明らかにする。さらに、この細胞死の分子メカニズムを明らかにするため、阻害剤を用いた解析から既に関連が示唆されている p38 MAPK や、また PRL が直接結合しての機能阻害する Mg^{2+} トランスポーター CNNM4 の関わるシグナル伝達の状況を調べ、PRL 高発現細胞が弱アルカリ環境でどのようにして特徴的な細胞死を起こすのかについて明らかにする。特に、p38 MAPK は M 期チェックポイントで重要な役割を果たすことが報告されているので、その細胞死との関連についても調べる。また、注目すべき点として、PRL を高発現する細胞は生体内環境に近い pH 7.5 でもほとんど増加しなくなる。このとき、細胞の増殖や生死がどのようにになっているのか (pH 8.0 で見られる特徴的な細胞死が部分的に起こっているのか) についても調べる。これらの解析を進めることによって、がん細胞の示すユニークな pH 応答特性の原因となる分子機構を明らかにしてゆく。

4. 研究成果

(1) PRL 高発現細胞の弱アルカリ環境での細胞死が、実際にどのように起こっているのかを明らかにするため、PRL を発現誘導した後の細胞を生きた状態で観察を続けて、どのような変化が起こるかを調べた。その結果、細胞は PRL を発現誘導して弱アルカリの pH 8.0 に移してしばらくすると、分裂期に入って染色体が凝縮した状態で非常に長期間持続していることが分かった。その後、細胞によっては染色体の分配や細胞質分裂が途中まで進行するケースも見られたが、多くの場合はそのまま細胞表面からブレップを出して、さらに染色体が凝縮して死んでいる様子が観察された。分裂期のメタフェーズにおいて凝縮した染色体を整列させるプロセスに異常があると考えられたので、細胞を固定して紡錘体などを蛍光染色して詳細に解析した。その結果、通常はメタフェーズで培養皿の底面に対してほぼ並行に配置される紡錘極体が弱アルカリ条件においた PRL 高発現細胞では傾いていることが分かった。この実験結果から、PRL 高発現細胞を弱アルカリ条件においたときにメタフェーズでの染色体整列に異常をき

たしており、それが長時間にわたって解消されないために細胞が死んでしまうのではないかと考えられた。

(2) 生理的な状況に近い pH 7.5 で PRL 高発現細胞の染色体分配の進行を解析したところ、pH 8.0 で見られたのと同様の染色体整列異常が観察された。さらに M 期の状態について解析を進めたところ、anaphase で染色体が両極に別れた際にその中間地点に染色体が取り残される lagging chromosome が見られた。染色体の分配に異常が生じていることが示唆されたので、細胞を pH 7.5 で培養を続けたところ、染色体数の異常な細胞の割合が顕著に増加していることも明らかになった。その一方で、pH 6.5 で細胞を培養したときにはこのような異常は観察されなかった。これらの実験結果は PRL 高発現が細胞分裂プロセスの進行に影響しており、弱アルカリ環境では細胞死を起こすこと、また pH 7.5 では細胞は死滅しないが、染色体数の異常が生じることを示唆している。染色体数の異常は悪性化したがん細胞の顕著な特徴としてよく知られており、PRL によるがん悪性化進展の新たな分子機構と考えることができる。

(3) PRL はマグネシウムイオントランスポーター CNNM に直接結合して機能阻害することがよく知られている。PRL 高発現による細胞分裂進行異常が CNNM の機能阻害によるものか調べるため、培養細胞で内在性 CNNM をノックダウンして効果を検討した。その結果、PRL 高発現時と同様に紡錘体の配置の異常や染色体分配の異常が起こっていることが分かった。さらに、培養細胞だけでなく生体内での重要性を検証するため、以前の研究で作出していた CNNM 遺伝子欠損マウスの腸上皮細胞での分裂期での様子を観察した。その結果、培養細胞で見られたのと同様に、野生型マウスよりも紡錘体に傾きが生じており、染色体の分裂も不十分になっていることが分かった。これらの結果から、PRL 高発現による細胞分裂の異常は、PRL の結合標的分子である CNNM の機能阻害の結果として起こっていることが示唆された。この CNNM 遺伝子をノックアウトしたマウスの以前の私たちの研究から、CNNM の機能不全は腸でのがん悪性化を引き起こすことがわかっている。CNNM の機能不全ががん悪性化を引き起こす根本的な仕組みとして、本研究で見つけた分裂期での異常が想定され、生体内でのその裏付けなど今後の研究の課題と考えられる。

(4) PRL の高発現によって CNNM が機能阻害されると、細胞内に Mg^{2+} が過剰に蓄積する。細胞内の Mg^{2+} の多くはエネルギー物質の ATP と複合体を作って存在していることがよく知られている。実際にこのとき、 Mg^{2+} 量の増加に伴って ATP の量が顕著に増加していることを確認した。また、エネルギー状態に応じて敏感に活性制御を受けるエネルギーセンサー分子 AMP キナーゼの働きに顕著な異常が生じていることを見つけた。AMP キナーゼは細胞分裂に必須の役割を果たすことが知られ、特に分裂期においてはリン酸化型の AMP キナーゼが分裂装置のさまざまな場所に局在して機能していることが知られる。PRL 高発現細胞でリン酸化型(活性化型)AMP キナーゼの局在を解析したところ、凝縮した染色体と微小管を連結するキネトコア部でのリン酸化 AMP キナーゼのシグナルが特異的に減弱していることが分かった。一方で、他の分裂装置への局在には影響していないことも分かった。キネトコアでの機能異常は染色体の整列や分配に大きな影響を与えることが考えられる。この AMP キナーゼの活性化不全が PRL 高発現による分裂異常の原因であるかどうかを検討するため、AMP キナーゼを人為的に活性化できる薬剤を用いてその効果を検討したところ、明確なレスキュー効果を示すことが明らかとなった。これらの実験結果を総合すると、PRL 高発現によって Mg^{2+} 排出トランスポーターの機能不全が起こり、細胞内に Mg^{2+} が過剰に蓄積した結果 ATP 量が増加して、AMP キナーゼの活性化が十分に起こらなくなったことが細胞分裂異常の原因となっている可能性が考えられる。キネトコア以外の分裂装置でのリン酸化型 AMP キナーゼのシグナルに異常が見られなかったことを考えると、AMP キナーゼの活性調節は細胞内での局所特異的に起こっていることが予想され、細胞のマクロなエネルギー状態がどのように影響を及ぼしているのか非常に興味深く、本研究の成果は細胞生物学の他の分野にも波及してゆくものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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, 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 Okumura Shintaro, Konishi Yusuke, Narukawa Megumi, Sugiura Yuki, Yoshimoto Shin, Arai Yuriko, Sato Shintaro, Yoshida Yasuo, Tsuji Shunya, Uemura Ken, Wakita Masahiro, Matsudaira Tatsuyuki, Matsumoto Tomonori, Kawamoto Shimpei, Takahashi Akiko, Itatani Yoshiro, Miki Hiroaki ら	4. 巻 12
2. 論文標題 Gut bacteria identified in colorectal cancer patients promote tumourigenesis via butyrate secretion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25965-x	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 Hashizume Osamu, Kawabe Tomofumi, Funato Yosuke, Miki Hiroaki	4. 巻 509
2. 論文標題 Intestinal Mg ²⁺ accumulation induced by cnm mutations decreases the body size by suppressing TORC2 signaling in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 59 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2024.02.007	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13件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三木 裕明、船戸 洋佑
2. 発表標題 活性硫黄の化学修飾による発がん因子PRLの機能制御
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroaki Miki, Yosuke Funato
2. 発表標題 Regulation of oncogenic protein PRL by diverse chemical modifications of its active cysteine
3. 学会等名 Redox Week in Sendai 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三木 裕明
2. 発表標題 マグネシウム調節の分子病態生化学
3. 学会等名 SBCセミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sweksha Lohani, 船戸 洋佑, 穠枝 佑紀, 石谷 太, 三木 裕明
2. 発表標題 A novel role of PRL in regulating epithelial cell density by inducing apoptosis at confluence
3. 学会等名 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』
4. 発表年 2021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、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 Yosuke Funato, Osamu Hashizume, Daisuke Yamazaki, Hiroaki Miki
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 三木 裕明、船戸 洋佑
2. 発表標題 発がん因子PRLの活性中心システイン硫黄原子の化学修飾による機能制御
3. 学会等名 レドックスR&D戦略委員会 春のシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎 大輔、三木 裕明
2. 発表標題 大腸がん浸潤・転移に関するがん細胞の探索
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋爪 脩、川邊 智史、船戸 洋佑、三木 裕明
2. 発表標題 cnnm変異により線虫のボディサイズが縮小する仕組みの解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三木 裕明、船戸 洋佑、橋爪 脩
2. 発表標題 マグネシウムイオントランスポーターCNNMのがん悪性化進展における役割
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 船戸 洋佑、三木 裕明
2. 発表標題 がん細胞の酸性環境適応におけるlysosomal exocytosisの重要性とその制御
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河村 小雪, 船戸 洋佑, 三木 裕明
2. 発表標題 PRL発現極小化による細胞内Mg ²⁺ の減少はNF- B経路活性化を介したアポトーシスを誘導する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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		