

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790220

研究課題名(和文)オートファジーにおけるクロライドイオンの新規制御機構の解明とがん治療への応用

研究課題名(英文)The regulation of cytosolic chloride ion concentration which regulates autophagy system via regulation of lysosome acidity is a new target for cancer therapy

研究代表者

細木 誠之 (HOSOGI, SHIGEKUNI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30433254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーシステムの分解過程において重要な細胞内小器官であるリソソームのpHが細胞内クロライドイオンにより制御されることを線維芽細胞及び癌細胞にて明らかとした。いずれの細胞において細胞内クロライドイオンが低下した時にリソソームのpHが上昇し、分解障害を導くことを明らかとした。このように癌細胞、線維芽細胞においてリソソームのpH制御にクロライドイオンが重要である事を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a catabolic process degrading cell components mediated through lysosomal machineries. Lysosome is, therefore, a key organelle in autophagy degrading various compounds. The digesting activity of lysosomal enzymes depends on intra-lysosomal acidity. we clarified roles of cytosolic chloride ion in regulation of lysosomal acidity; cation intra-lysosomal pH and autophagy function in human cancer cell lines and mouse embryonic fibroblast cells. The lowered [Cl⁻]_c primarily causes dysfunction of autophagy via dysfunction of lysosome induced by disturbance of intra-lysosomal acidification.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：クロライドイオン オートファジー リソソーム

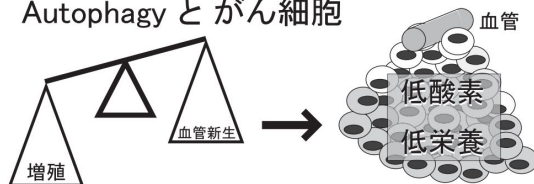
研究開始当初の背景

(1) オートファジーは自己成分の分解・再利用を行うため全真核生物が備える重要な細胞内大規模分解システムである。がんが増大する過程において、増殖能と血管新生のバランスが重要である。一般的には、増殖能がより亢進しており、がん細胞周囲の微小環境は、低酸素・低栄養状態であるといわれている(図1A)。この環境に順応して増殖するために、がん細胞は正常細胞に比べて、より活性化されたオートファジー機構が認められる。この機構は、がんの浸潤・転移および薬剤耐性化機構にも重要であることが知られている。

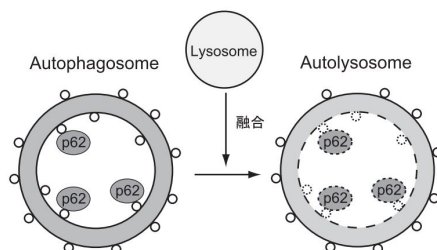
(図1)

A)

Autophagy とがん細胞



B)



(2) オートファジーにおける分解過程において、細胞内の各種タンパク、核酸、脂質を分解する小器官であるリソソームが密接にかかわっている。リソソーム内には多くの分解酵素が含まれており、その酵素の多くは酸性条件下においてより強い酵素活性を有する事が知られている。オートファジーの分解過程において、不要となったタンパク質をオートファゴソームと呼ばれる小胞に凝集し、その後オートファゴソームとリソソームが融合し、オートリソソームと呼ばれる小胞になり、各種タンパクが分解される。このオートリソソームへ成熟する過程において、オートファゴソームとpHの低下した成熟リソソーム(pH低下度がリソソームの成熟度の指標となっている)(図1B)との融合が重要なポイントである。このリソソームの酸性化の障害によりオートファジーに障害が引き起こされる事が明らかとなっている。

(3) リソソームのpH制御において、V-type ATPaseと呼ばれるプロトンポンプが一般的にプロトンの取り込みを担っているが、プロトンのみの取り込みではリソソーム内が電氣的にポジティブチャージを生じ、プロトンの取り込みに障害をもたらすことが知られ

ている。そのためカウンターアニオンとしてクロライドイオンの取り込みが重要であると知られているが、このリソソームのpH制御におけるクロライドイオンの重要性は十分に明らかになっていない。

このクロライドイオンの重要性を明らかにすることと、クロライドイオン輸送に関わるイオン輸送体を明らかにすることが、癌の新たな治療標的となりうると考える。

研究の目的

オートファジー機構への細胞内クロライドイオンによる制御機構は全く不明である。これらの制御を解明することで細胞内クロライドイオン濃度制御機構がリソソームの機能維持、オートファジー機能維持において重要な役割を果たしていることを明らかにする。

研究の方法

(1) 正常細胞(マウス由来線維芽細胞)におけるオートファジー機構の観察を行うために共焦点顕微鏡下にLC3による免疫染色によりオートファゴソームの形成を評価する。次に共焦点顕微鏡下にリソソーム内pHをリソソーム内pH感受性色素であるLysosensorを用いて測定する。その後細胞外クロライドを低下させた培地を用いて、細胞内クロライドを低下させたときのリソソーム内pHの変化を測定する。

(2) 癌細胞株である胃癌細胞株(MKN28)、肺癌細胞株(A549)を用い、リソソーム内のpHを上記と同様にリソソーム内pH感受性色素であるLysosensorを用いて測定する。さらに細胞外クロライドを低下させた培地下に48時間培養し、細胞内クロライドを低下させたときの細胞内クロライド濃度の測定をクロライドイオン濃度測定試薬であるMQAEを用いて行う。細胞内クロライドを低下させたときのリソソーム内pHの変化を共焦点顕微鏡下に測定する。

(3) 次に細胞外クロライドを低下させた培地下に48時間培養し、細胞内クロライドを低下させたときのオートファジー機能への及ぼす影響を明らかにする。オートファゴソームの膜タンパクであるLC3とp62はタンパク凝集に関わり、オートファジー過程において最終的にオートリソソームにおいて分解されるため、オートファジーにおける分解障害のマーカーとなる。このタンパク量をウエスタンブロットにて評価し分解障害の有無を確認する。またリソソ

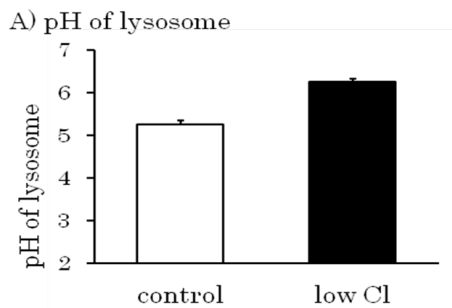
ームとオートファゴゾームの融合障害の有無につきリソソーム膜タンパクである LAMP 1 とオートファゴゾーム膜タンパクである p 6 2 の二重染色により評価する。

(4) 細胞膜表面のクロライドイオン輸送体の阻害によるリソソーム pH に及ぼす影響を検討するために、クロライドイオン取り込みに関わる輸送体である NKCC の阻害剤 (プメタニド) と排出に関わる輸送体である KCC の阻害剤 (DIOA) を用いて評価する。24 時間の投与後の pH 変化を評価する。

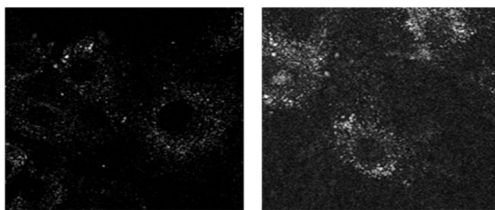
研究成果

(1) マウス由来の線維芽細胞を用いてリソソーム内 pH を測定した。リソソーム内 pH は細胞外クロライドイオン濃度低下に伴い上昇することを確認した (図 2 A)。また細胞内の LC 3 の免疫染色 (図 2 B) にてオートファゴゾームの細胞内の増加を認め、分解障害を導くことが明らかとなった。リソソームの pH 制御、および、オートファジーによる分解過程においてクロライドイオンが重要であることが明らかとなった。

(図 2)



B) 免疫染色 LC3



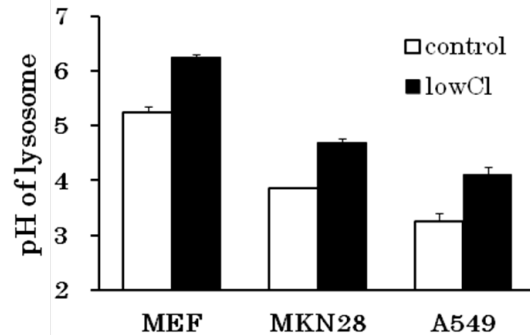
control low Cl

(2) 次に癌細胞株である胃癌細胞株 (MKN 2 8) と肺癌細胞株 (A 5 4 9) を用いて、検討を行った。いずれの細胞におけるリソソーム pH は、線維芽細胞のリソソーム pH と比して酸性である事が明らかとなった (図 3 A)。

細胞外クロライド濃度を低下させた培地により、細胞内クロライドの低下を確認したうえで、リソソーム内 pH の変化を測定

した。細胞内クロライド濃度の低下に依存してリソソーム内 pH は上昇することを明らかにした。(図 3 A)

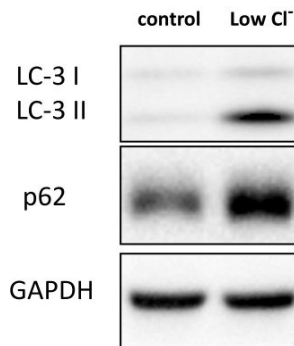
(図 3) リソソームの pH



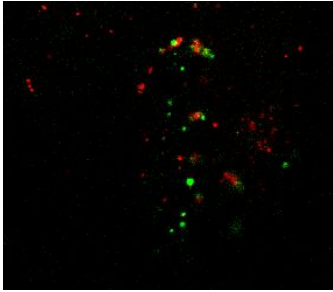
(3) MKN 2 8 細胞において、リソソーム内 pH の上昇がオートファジーに及ぼす影響について検討した。オートファジー障害マーカータンパクである LC 3 と p 6 2 をウエスタンブロットにて評価した。細胞内クロライドイオン低下より LC 3 および p 6 2 タンパクの上昇を認め、分解障害が引き起こされている事を明らかとした (図 4 A)。さらに p 6 2 の免疫染色にて細胞内に多くの発現を認めるとともに、リソソーム膜タンパクである LAMP - 1 との二重染色により、オートファゴゾームとリソソームの融合は認めるものの、リソソームの成熟障害により p 6 2 の分解が障害されていることが明らかとなった (図 4 B)。これらの結果から細胞内クロライドイオンがリソソームの pH の制御に重要であり、さらにはオートファジー機構においても重要であることが明らかとした。

(図 4)

A) ウエスタンブロット



B) 免疫染色
LAMP-1 (赤色)
p62 (緑色)



(4) さらに、細胞内への取り込みに関わるクロライドイオン輸送体である NKCC や、排出に関わる輸送体である KCC の発現を確認したうえで両者の阻害剤であるブメタニド (NKCC 阻害剤) と DIOA (KCC 阻害剤) を投与しリソソーム内 pH を測定した。両阻害剤により明らかなリソソームの pH 変化は認められず、またオートファジー関連タンパクの分解障害は認められなかった。今回クロライドチャンネルの発現の有無について明らかにできておらず、今後クロライドチャンネルが標的になり得る可能性を明らかにする必要があると考えられた。これらの研究により正常細胞においても、癌細胞においても細胞内クロライドイオンがリソソームの pH 制御に密接にかかわり、重要であるということが明らかとなった。また今後、癌特異的なクロライドイオン制御輸送体を明らかにすることが新たな癌の分子標的となり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

細木誠之、cytosolic chloride ion is a key factor in lysosomal acidification and function of autophagy in human gastric cancer cell. Journal of cellular and molecular medicine, 査読有、April 12, 2014、1-10

[学会発表] (計 2 件)

第 90 回日本生理学会
第 91 回日本生理学会

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

該当せず

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細木誠之 (Hosogi Shigekuni)

京都府立医科大学 細胞生理学 助教

研究者番号 : 30433254