

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460297

研究課題名(和文) WNKキナーゼによるCl⁻輸送体活性制御破綻が引き起こす癌転移メカニズムの解明研究課題名(英文) Molecular mechanisms of cancer metastasis induced by disrupting the WNK kinase mediated cytosolic Cl⁻ homeostasis

研究代表者

宮崎 裕明 (Miyazaki, Hiroaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30360027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌が発生した部位から異なる場所に移動し、再び腫瘍を形成することを転移という。現在においても、転移巣を形成した後の治療は困難を極め、癌転移の分子メカニズムの多くが未知のままである。我々は、細胞内Cl⁻が様々な細胞機能に関わっていることを明らかにしており、本研究では細胞内Cl⁻が癌転移に関与しているか検討することとした。本研究により、細胞内Cl⁻は細胞接着因子の発現や細胞接着能に影響を与えることが明らかになった。また細胞内Cl⁻濃度変化は、WNKやSrcといった細胞内シグナル経路の主要な調節因子の活性を制御することで、癌細胞の増殖、接着、運動を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A malignant tumor is a serious health problem because cancer cells can spread to distant parts of the body, so-called metastasis. Since metastasis is the most common cause of death from cancer, this process is an important therapeutic target. However, the molecular mechanisms of the metastasis are not fully understood. Our recent studies show that the cytosolic Cl⁻ plays important roles in fundamental cellular functions. Thus, we investigated the effect of cytosolic Cl⁻ concentration ([Cl⁻]_c) on the cell proliferation, the cell migration and the cell invasion in several gastrointestinal tumor cell lines. Our study indicates that cytosolic Cl⁻ is a key factor regulating expression of cell adhesion molecules, including E-cadherin and integrins and that cytosolic Cl⁻ regulates WNK and Src kinase signal cascades involved in tumor proliferation, migration and invasion. These results strongly suggest that changes of [Cl⁻]_c would play important roles in cancer development and progression.

研究分野：細胞生理学

キーワード：細胞内Cl⁻濃度 細胞増殖 細胞接着 細胞運動

1. 研究開始当初の背景

癌が発生した部位(原発巣)から異なる場所へ移動し、再び腫瘍を形成することを転移という。現在、癌細胞が原発巣にのみとどまっている早期癌においては、徐々に治癒率は改善されつつある。しかしながら癌細胞が原発巣から移動し、転移巣を形成したのちの治療は非常に困難を極める状態が続いている。したがって、原発巣からの癌細胞の転移を抑制できれば癌の治癒率を劇的に回復させることが可能となる。細胞の移動は、局所的な細胞形態の変化によって引き起こされる。すなわち、進行方向に向かっての細胞突出と逆側の細胞収縮が周期的・協調的に繰り返されることで細胞が一方向に進むことが可能になる。これらの細胞形態の変化にはイオン輸送体が重要な働きをしており、突出端の先端では $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter (NKCC) や Na^+/Cl^- cotransporter (NCC) などが機能し細胞内に Na^+ や Cl^- を取り込むことで局所的な細胞の肥大を引き起こす。逆に収縮端側では K^+ や Cl^- channel、および K^+/Cl^- cotransporter (KCC) が細胞内から K^+ 、 Cl^- を細胞外へ輸送することで局所の容積を減少させると考えられている。また、細胞が癌化する際には発現する細胞接着因子の発現変化やそれに伴った細胞運動能変化を伴うことが知られており、 Cl^- 輸送体の発現や活性変化とも密接に関わっていると考えられる。しかしながら、その詳細なメカニズムは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

これまでの科学研究費採択研究により、細胞周期進行に伴った細胞内 Cl^- 濃度の周期的な変動(Cl^- オシレーション)が細胞増殖の調節に不可欠な現象であることを明らかにした。この細胞内 Cl^- 濃度の周期的な変化には、NKCC、NCC や KCC などの Cl^- 輸送体の周期的な活性調節によって維持されている。またこれら輸送体の周期的な活性調節には、細胞内 Cl^- 濃度によって活性調節を受ける WNK (with no lysine [K]) キナーゼや Src キナーゼに代表される Cl^- 感受性細胞内シグナルカスケードが関与しており、癌細胞ではその制御メカニズムが破綻していることで細胞増殖に異常が起こる可能性が示唆されている。以上を総合的に考察すると、癌細胞における Cl^- 感受性シグナルカスケードの破綻による Cl^- 輸送体の制御破綻は、細胞の移動能や接着能の獲得といった癌細胞特有の性質獲得にも重大な影響を与えている可能性が高いと考えられた。そこで本研究では、細胞内 Cl^- 濃度が細胞の増殖だけではなく、接着能や運動能の制御にも重要な機能を持ち、癌化した細胞では細胞内 Cl^- ホメオスタシスが破綻し、癌細胞の転移能が亢進するという実験仮説の検証を行う。このように、細胞内イオン環境のホメオスタシス破綻が癌細胞の増殖のみならず、癌転移の原因にもなるという、全く新しい視点からこれまでの癌研究の概念を再構築することを

本研究の目標とした。

3. 研究の方法

本研究の実験には、大腸癌由来細胞株である HT-29 細胞を使用した。細胞内 Cl^- 濃度を変化させるため、 Cl^- を NO_3^- に置換した RPMI1640 培地 (Low Cl^- 培地) を作製した。細胞内 Cl^- 濃度の測定には、以前我々が開発した高感度セルアナライザー Cell Lab Quanta と Cl^- 感受性蛍光色素である MQAE を用いた。細胞内 Cl^- 濃度を变化させた状態でのタンパク発現や mRNA の発現量変化を確認するため、細胞を通常の RPMI1640 培地 (Normal Cl^- 培地) と Low Cl^- 培地で 48 時間培養した後、タンパクサンプルあるいは mRNA を調製した。G1 期から S 期にかけての細胞周期進行を制御する G1-S checkpoint に関わるシグナルカスケードに対する影響を検討するため、Western blotting 法により Rb タンパク (pRb, pRb(Ser780), pRb(Ser807/810)) と p21 タンパクの発現量変化およびリン酸化レベルに与える影響について検討を行った。細胞に発現している細胞接着因子の解析には Western blotting 法 (E-cadherin) および qPCR (Integrins) によりそれぞれのタンパク発現量及び mRNA 量の変化について検討を行った。細胞接着能の解析では、コラーゲン type I をコートした 96 well に細胞を播種し、2 時間 37 でインキュベーションした。その後、well を培養液で洗浄することで接着していない細胞を除去し、残った細胞を MTT assay により定量化した。また Src キナーゼシグナル経路や WNK キナーゼシグナル経路に対する影響については、WNK、OSR1/SPAK、cSrc、FAK、paxillin、ERK、STAT-3 の各発現量とリン酸化レベルを Western blotting 法により検出した。また、細胞内 Cl^- 濃度が細胞運動能に与える影響については、wound-healing assay 法により検証した。

4. 研究成果

HT-29 細胞を Low Cl^- 培地で培養したところ、Normal Cl^- 培地で培養した細胞に比べ有意に細胞増殖が抑制された。細胞周期解析を行ったところ、Low Cl^- 培地で培養を行った細胞では、Normal Cl^- 培地で培養した細胞に比べ、細胞周期の G1 期のピークが増加していたことから、細胞周期の G1 期から S 期への細胞周期進行が抑制を受けていると考えられた。細胞内 Cl^- 濃度を測定したところ Low Cl^- 培地で培養した細胞では細胞内 Cl^- 濃度が有意に減少していた。そこで、G1 期から S 期への細胞周期をコントロールしている細胞内シグナルカスケードに対する細胞内 Cl^- の影響について検討を行った。Low Cl^- 培地で培養した細胞では、G1 期から S 期への細胞周期進行を促進する Rb タンパクの脱リン酸化 (非活性化) が認められた。Rb タンパクは Cyclin E と CDK2 の複合体によりリン酸化されるが、その活性は p21 タンパクによって阻害される。

そこで細胞内 Cl⁻が p21 タンパクの発現に影響を与えるか検討を行ったところ、Low Cl⁻培地で培養した細胞では、p21 タンパクの発現亢進が認められた。従って、HT-29 細胞では細胞内 Cl⁻濃度の低下により p21 タンパクの発現を亢進させることにより細胞周期進行が抑制されたことが明らかになった。

次に、細胞内 Cl⁻が癌転移に関わる細胞接着因子の発現や細胞の細胞外基質への接着能に与える影響について検討を行った。まず、上皮細胞に特異的に発現し、細胞間接着に関与している E-cadherin の発現に与える影響について検討した。Low Cl⁻培地で培養した HT-29 細胞では、E-cadherin の発現が Normal Cl⁻培地で培養した細胞よりも有意に減少していた。また、細胞内 Cl⁻が細胞と細胞外基質との間の接着に関与している integrin の発現に与える影響についても検討を行った。その結果、コラーゲンへの結合に関わっている α 2-integrin の発現が、Low Cl⁻培地で培養した細胞で減少した。コラーゲン type I をコートしたプレートへの細胞の接着能についても評価を行ったが、Low Cl⁻培地中ではコラーゲンへの細胞接着能が有意に低下していた。以上のことから、細胞内の Cl⁻濃度が変化することによって癌細胞の細胞間接着や細胞外基質との間の接着能に大きく影響を与えることが明らかになった。

次いで、細胞内 Cl⁻濃度変化が細胞運動能に対して影響を与えるかについて wound-healing assay を用いて検討を行った。HT-29 細胞を細胞同士が接着し、単層の細胞層が形成される、いわゆる“confluent”の状態にまで培養した後、イエローチップの先端で細胞層に傷を付け、傷の回復過程を Normal Cl⁻培地中と Low Cl⁻培地中で比較した。その結果、Low Cl⁻培地中では Normal Cl⁻培地中と比較して傷の回復が有意に遅くなった。

以上の結果から細胞内 Cl⁻が癌細胞の細胞増殖、細胞接着能および細胞運動能に影響を与えることが明らかになったが、細胞内 Cl⁻濃度の変化を細胞がどのように感受しているかについても検討を行った。今回は細胞内 Cl⁻ホメオスタシスに関与すると考えられている WNK キナーゼと非受容体型チロシンキナーゼ cSrc の活性に Cl⁻が与える影響について検討した。cSrc は細胞増殖や細胞接着・運動などを制御するキーエンザイムとして機能しており、癌細胞では発現の亢進や活性化が起きており、細胞の癌化にも関与していると考えられている。まず、細胞内 Cl⁻が cSrc の活性化に与える影響について検討を行った。cSrc は自己リン酸化部位である pY416 のリン酸化によって活性化されることが知られており、細胞内 Cl⁻が pY416 のリン酸化レベルに与える影響について検討を行った。細胞内 Cl⁻が低下すると、pY416 のリン酸化レベルは有意に減少していた。また、cSrc の細胞接着に対するシグナルカスケードの下流分子である FAK や paxillin のリン酸化レベルも

減少していた。一方、cSrc の細胞増殖に対するシグナルカスケードの下流分子である ERK と STAT-3 についても検討を行った。ERK のリン酸化は細胞内 Cl⁻濃度が減少しても変化しなかった。しかし、cSrc の下流分子で ERK と同様に細胞増殖に関与する STAT-3 のリン酸化は有意に減少していた。従って、細胞内 Cl⁻は Src キナーゼの活性を制御し、Src シグナルカスケードを介して細胞増殖や細胞接着に影響を与えている可能性が強く示唆された。一方、WNK キナーゼや WNK の下流分子として知られている SPAK/OSR1 の発現に関し、Normal Cl⁻と Low Cl⁻条件下において比較を行った。WNK キナーゼおよび SPAK の発現量はどちらの Cl⁻濃度条件下においても大きな変化は認められなかった。一方、OSR1 は Low Cl⁻条件下において発現が有意に増加していた。現在、WNK キナーゼ強制発現細胞株を作製し、癌細胞の細胞増殖能、細胞接着能、および細胞運動能と WNK キナーゼ活性との相関性について引き続き検討を行っている。

以上の結果から、細胞内 Cl⁻は細胞増殖、細胞接着や細胞運動といった癌細胞に特徴的な性質に対する重要な制御因子の一つであることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

宮崎裕明、中島謙一、丸中良典

細胞内クロライドイオンによる神経突起伸長・膜形成制御メカニズムの解明

膜、査読無、40(5)、2015、266-271

Hayata, H., Miyazaki, H., Niisato, N.,

Yokoyama, N., and Marunaka, Y.

Lowered extracellular pH is involved in the pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance.

Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、445(1)、2014、170-174

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.162

Branicky, R., Miyazaki, H., Strange, K., and Schafer, W.R.

The voltage-gated anion channels encoded by *clh-3* regulate egg laying in *C. elegans* by modulating motor neuron excitability.

The Journal of Neuroscience、査読有、34(3)、2014、764-775

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3112-13.2014

Kitagawa, M., Niisato, N., Shiozaki, A., Ohta-Fujimoto, M., Hosogi, S., Miyazaki, H., Ichikawa, D., Otsuji, E., and Marunaka, Y.

A regulatory role of K⁺-Cl⁻ cotransporter in the cell cycle progression of breast cancer MDA-MB-231 cells.

Archives of Biochemistry and Biophysics、

査読有、539(1)、2013、92-98
DOI: 10.1016/j.abb.2013.06.014

〔学会発表〕(計10件)

宮崎裕明、植貴俊、田中幸恵、中山祐治、丸中良典
細胞内クロライドイオンによる Src キナーゼシグナル伝達経路を介した癌転移制御メカニズムの解明
第93回日本生理学会大会、2016年3月24日、「札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)」
宮崎裕明、田中幸恵、植貴俊、塩崎敦、市川大輔、大辻英吾、中山祐治、丸中良典
細胞内クロライドイオンによる細胞機能制御
膜シンポジウム2015、2015年11月25日、「神戸大学(兵庫県神戸市)」
宮崎裕明、田中幸恵、植貴俊、塩崎敦、市川大輔、大辻英吾、中山祐治、丸中良典
細胞内クロライドイオンによる細胞機能制御メカニズム
生理研研究会「生体ホメオスタシスのgatewayとしての上皮膜輸送マイクロホメオスタシス機構」、2015年9月16日、「生理学研究所(愛知県岡崎市)」
宮崎裕明、中島謙一、丸中良典
細胞内クロライドイオンによる神経突起伸長・膜形成制御メカニズムの解明
境界領域シンポジウム「ガス封入・イオン選択的伝導性人工膜新技术を用いた生体膜機能形態形成制御メカニズム解明研究の新展開」日本膜学会第37年会、2015年5月15日、「早稲田大学(東京都新宿区)」
宮崎裕明、丸中良典
細胞内Cl⁻による細胞接着因子発現制御を介した胃癌細胞浸潤・転移の分子制御機構
シンポジウム：消化器上皮膜機能形態学研究のフロンティア 第91回日本生理学会大会、2015年3月22日、「神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)」
Miyazaki, H., Tanaka, S., and Marunaka, Y.
Oscillatory changes in the intracellular concentration of Cl⁻ control cell cycle progression via changes in the activity of Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter in MKN28 gastric cancer cells.
The 2nd International Symposium on Epithelial Barrier and Transport、2014年11月1日、「立命館大学(滋賀県草津市)」
宮崎裕明、丸中良典
胃癌由来 MKN28 細胞における細胞内 Cl⁻ 濃度による G1-S 期細胞周期進行制御メカニズム
第91回日本生理学会大会、2014年3月18日、「鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)」

宮崎裕明、丸中良典

Na⁺-K⁺-2Cl⁻ 共輸送体 (NKCC) の周期的な発現変化に伴った細胞内 Cl⁻ 濃度変化による細胞周期進行制御
膜シンポジウム 2013、2013年11月7日、「京都府立医科大学(京都府京都市)」
Miyazaki, H., Yamada, T., Parton, A., Morrison, R., Kim, S., Beth A.H., and Strange, K.
CLC anion channel regulatory phosphorylation and conserved signal transduction domains.
Mechanobiology of Proteins and Cells、2013年9月30日、「Bar Harbor (USA)」
宮崎裕明、丸中良典
Na⁺-K⁺-2Cl⁻ 共輸送体の周期的な発現変化に伴った細胞内 Cl⁻ 濃度変化が細胞周期進行を制御する
生理研研究会「上皮膜輸送の多層的コントロールによる生体の恒常性維持機構」、2013年8月27日、「生理学研究所(愛知県岡崎市)」

〔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
<http://kpum-molecular-cell-physiology.info/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
宮崎 裕明 (MIYAZAKI, Hiroaki)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：30360027

(2)研究分担者
丸中 良典 (MARUNAKA, Yoshinori)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00127036

新里 直美 (NIISATO, Naomi)
京都学園大学・健康医療学部・教授
研究者番号：00237645

細木 誠之 (HOSOGI, Shigekuni)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：30433254