

令和 2 年 5 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11644

研究課題名(和文)PRIPの新奇癌細胞制御機構に着目した抗腫瘍薬開発研究

研究課題名(英文)Antitumor drug development research focusing on the novel cancer cell regulation mechanism of PRIP

研究代表者

浅野 智志 (Asano, Satoshi)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：30570535

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)：細胞質分裂とは細胞が分裂する際に染色体分離に引き続き起こる細胞質が2つに分かれる現象で、細胞質分裂異常は癌の発生と関わりがあるとされている。細胞質分裂時にPhosphatidylinositol-4,5-bisphosphate [PI(4,5)P2]は分裂溝に集積し、Rho A (Rho-type GTPaseの一つ)に依存した分裂溝の陥入に必須の分子である。本研究において、我々はPRIPがPI(4,5)P2の分裂溝への集積と安定維持に必要であり、PI(4,5)P2下流のRhoA-signaling依存的な細胞質分裂の進行に不可欠な分子であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、我々が見出し、癌細胞の増殖や転移抑制効果を確認したPRIPの分子機能に着目して、抗腫瘍薬開発を目指す基礎研究である。今回新たにPRIPが細胞質分裂にも関わっていることを明らかにした。正常細胞の細胞質分裂異常によって多核化が起こると、染色体が多倍体化するが、これは癌化の一因であると考えられている。本研究によってPRIPが細胞質分裂の正常化に寄与すること、そのメカニズムが明らかになったことで、癌化や癌の増悪化を抑制するPRIPをターゲットとした抗腫瘍薬の開発に繋がる意義深い研究になったと考える。

研究成果の概要(英文)：Cytokinesis is the last step of cell division that physically separates the daughter cells. Cytokinesis failure contributes to the development of pathologies such as cancer. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate [PI(4,5)P2] accumulates at the cleavage furrow and is involved in Rho-type GTPase RhoA-dependent furrow ingression during cytokinesis. Here, we showed that PRIP is required for the localization of PI(4,5)P2 to the cleavage furrow. PRIP knockdown caused abnormal cytokinesis such as a furrow regression and cytokinesis delay. Fluorescence microscopy analysis confirmed weak localization of RhoA and phosphorylated myosin II regulatory light chain (MRLC), which upregulates myosin II motor activity for furrow ingression, in cleavage furrow in HeLa cells reduced PRIP. These results suggest that PRIP is required for stable maintenance of PI(4,5)P2 in the cleavage furrow, which is a prerequisite for the RhoA signaling-dependent progression of cytokinesis.

研究分野：細胞生物学、歯科薬理学

キーワード：細胞分裂 細胞質分裂 RhoA OCRL1 PI(4,5)P2 ミオシンII

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の 80% 以上は口腔粘膜から発生する扁平上皮癌である。ある種の舌扁平上皮癌細胞では、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の恒常的な活性化が認められ、PI(3,4,5)P₃の増加に伴い、アポトーシス耐性機構、細胞増殖機構、細胞移動や転移機構の亢進が発癌や癌の増悪化の一因であることが明らかになっている。

最近、我々は、PLC-related catalytically inactive protein (PRIP)が Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)- PI(3,4,5)P₃代謝経路を調節して、抗腫瘍効果を導くことを見出した。PRIP ノックアウト線維芽細胞(PRIP-KO MEF)と野生型細胞を比較すると、PRIP 欠失により PI(3,4,5)P₃の量が顕著に増大する。一方、乳癌細胞(MCF-7 や BT-549; PI3K の変異や PTEN の欠失で PI(3,4,5)P₃が過剰に発現)に PRIP を強制発現すると、PI(3,4,5)P₃の発現を抑制できることを明らかにした。

これは、PRIP が PI(4,5)P₂に結合して PI3K による PI(4,5)P₂ PI(3,4,5)P₃代謝を負に制御することに起因する。実際に、PRIP のプレクストリン相同領域 (PH ドメイン; PI(4,5)P₂ 結合部位)を細胞に発現させることで PI3K シグナリング経路を制御できた。一方、PH ドメインを欠失させた PRIP PH の導入では PI3K シグナリング経路は変化しなかった。

2. 研究の目的

ある種の扁平上皮癌細胞では、PI3K の恒常的な活性化による PI(4,5)P₂代謝の促進によって、細胞膜 PI(3,4,5)P₃の過剰な増加とその基質である PI(4,5)P₂の減少が確認させている。正常な細胞質分裂には PI(4,5)P₂の分裂溝への集積を必要とする。正常細胞の細胞質分裂異常によって多核化が起こると、染色体が多倍体化するが、これは癌化の一因になると考えられている。つまり細胞内の PI(4,5)P₂代謝の亢進は細胞質分裂異常に伴った癌化を誘導する可能性がある。

最近、我々は、PLC-related catalytically inactive protein (PRIP) が新規の細胞膜 PI(3,4,5)P₃代謝調節タンパク質であることを見出した。PRIP は PI(4,5)P₂に結合して PI3K による PI(4,5)P₂代謝を抑制する。つまり PRIP 存在下では、PI(4,5)P₂代謝の亢進が抑制され細胞質分裂が正常化する可能性が考えられた。

本研究では、PRIP 発現細胞と未発現細胞で、PI(4,5)P₂代謝とその下流の細胞質分裂に関わるシグナル伝達経路の活性化を比較しながら細胞質分裂異常と PRIP の関係性を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

細胞は PI(3,4,5)P₃-Akt 経路の活性化している乳癌細胞 MCF-7 (PI3K が恒常的に活性化しており、そのため PI(3,4,5)P₃産生が亢進している細胞)と分裂研究でよく使用されており、情報が蓄積されている HeLa 細胞、プラスミドベクターの導入のし易さから HEK293 細胞を用いた。細胞質分裂の様子は BZ-9000(キーエンス)と顕微鏡に装備されている専用チャンバー(温度と CO₂濃度を調節できる)を用いて経時的に観察した。PRIP や PRIP ミュータントを発現させるためのプラスミドベクターはリポフェクション法もしくはエレクトロポレーションによって導入した。また、細胞に選択薬剤 G418 を用い、PRIP や PLC 1-PH (PI(4,5)P₂のプロープ)を安定発現する単一細胞株を樹立した。分裂溝 PI(4,5)P₂のターンオーバーは共焦点レーザー顕微鏡 FV10i を用いた光褪色後蛍光回復法 (FRAP) によって解析した。PLC 1 や OCRL1 と PI(4,5)P₂間の相互作用は PI(4,5)P₂リボソームを用いた in vitro co-sedimentation assay によって調べた。

4. 研究成果

正常な細胞質分裂には、分裂溝に適切な量の PI(4,5)P₂の集積が必要である。分裂溝 PI(4,5)P₂に RhoA が直接結合し、その後 RhoA-ROCK 依存的に分裂溝のミオシン II 調節軽鎖がリン酸化され、ミオシン II 活性が増大する。活性化したミオシン II が原動力となり収縮環が収縮することで細胞質が 2 つに分かれる。

PRIP をノックダウンした細胞では、細胞質分裂異常や分裂の遅れが観察された。この時、分裂溝に集積する PI(4,5)P₂が減少し、RhoA やミオシン II 調節軽鎖の分裂溝への集積量も減少していた。この PRIP ノックダウン細胞に擬似リン酸化型ミオシン II 調節軽鎖を導入すると分裂速度が回復した。これらの結果は PRIP が RhoA-ROCK を介したミオシン II 調節軽鎖のリン酸化を調節することで、分裂速度を制御していることを示唆している。さらに分裂溝 PI(4,5)P₂のターンオーバーを FRAP によって調べたところ、PRIP をノックダウンした細胞では分裂溝 PI(4,5)P₂の入れ替わりが顕著になっていることがわかった。これは PRIP の減少によって PI(4,5)P₂の代謝回転が亢進したことを示しており、この結果は PRIP が分裂溝の PI(4,5)P₂の安定維持に貢献していることを示唆している。Lowe oculocerebrorenal syndrome protein 1 (OCRL1, inositol polyphosphate 5-phosphatase)は、分裂溝の陥入終了時の PI(4,5)P₂代謝に関わる酵素の一つである。OCRL1 の過剰発現は分裂溝の PI(4,5)P₂量を減少させ、分裂異常を誘発させたが、PRIP を共発現させると、この OCRL1 による PI(4,5)P₂代謝の亢進は抑制され、分裂異常も軽減した。しかしながら、PI(4,5)P₂に結合できない PRIP ミュータントを共発現させた場合は、PI(4,5)P₂代謝と分裂異常の軽減効果が弱まった。これは PRIP が分裂溝の PI(4,5)P₂代謝を制御するためには PI(4,5)P₂への結合が必要であることを示している。In vitro co-sedimentation assay の結果、PRIP が OCRL1 と PI(4,5)P₂の相互作用を抑制することがわかった。さらに OCRL1 と PI(4,5)P₂

の相互作用を抑制する濃度で、PRIPはRhoAとPI(4,5)P₂の相互作用に影響を与えないことがわかった。これはPRIPが特定のタンパク質のPI(4,5)P₂への結合を選択的に阻害することを示唆しており、このPRIPの特性によって、PI(4,5)P₂が仲介する細胞質分裂に不可欠なシグナルが一定値に維持されているものと思われる。本研究によってPRIPが細胞質分裂の正常化に寄与することと、そのメカニズムが明らかになったことで、癌化や癌の増悪化を抑制するPRIPをターゲットとした抗腫瘍薬の開発に繋がる意義深い研究になったと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamawaki, Y., Yoshioka, N., Nozaki, K., Ito, H., Oda, K., Harada, K., Shirawachi, S., Asano, S., Aizawa, H., Yamawaki, S., Kanematsu, T., Akagi, H.	4. 巻 1680
2. 論文標題 Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Res	6. 最初と最後の頁 13-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2017.12.004	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 Asano, S., Taniguchi, Y., Yamawaki, Y., Gao, J., Harada, K., Takeuchi, H., Hirata, M., Kanematsu, T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Suppression of cell migration by phospholipase C-related catalytically inactive protein-dependent modulation of PI3K signalling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 5408-5421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI 10.1038/s41598-017-05908-7	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 Hayashiuchi, M., Kitayama, T., Morita, K., Yamawaki, Y., Oue, K., Yoshinaka, T., Asano, S., Harada, K., Kang, Y., Hirata, M., Irifune, M., Okada, M., Kanematsu, T.	4. 巻 31
2. 論文標題 General anesthetic actions on GABAA receptors in vivo are reduced in phospholipase C-related catalytically inactive protein knockout mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of anesthesia	6. 最初と最後の頁 531-538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00540-017-2350-2	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 Oue, Kana., Yamawaki, Yosuke., Asano, Satoshi., Mizokami, Akiko., Hirata, Masato., Irifune, Masahiro., Kanematsu, Takashi	4. 巻 59
2. 論文標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein-knockout mice exhibit uncoupling protein 1 upregulation in adipose tissues following chronic cold exposure	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 108-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2017.04.001	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 Yamawaki, Y., Oue, K., Shirawachi, S., Asano, S., Harada, K., Kanematsu, T.	4. 巻 53
2. 論文標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein can regulate obesity, a state of peripheral inflammation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 18-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdsr.2016.06.001	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 Yamawaki, Y., Yoshioka, N., Nozaki, K., Ito, H., Oda, K., Harada, K., Shirawachi, S., Asano, S., Aizawa, H., Yamawaki, S., Kanematsu, T., Akagi, H.	4. 巻 1680
2. 論文標題 Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain research	6. 最初と最後の頁 13-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2017.12.004	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 Asano Satoshi, Ikura Yasuka, Nishimoto Mitsuki, Yamawaki Yosuke, Hamao Kozue, Kamijo Keiju, Hirata Masato, Kanematsu Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein regulates cytokinesis by protecting phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate from metabolism in the cleavage furrow	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12729-12742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-49156-3	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 Kanematsu Takashi, Oue Kana, Okumura Toshiya, Harada Kae, Yamawaki Yosuke, Asano Satoshi, Mizokami Akiko, Irifune Masahiro, Hirata Masato	4. 巻 61
2. 論文標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein: A novel signaling molecule for modulating fat metabolism and energy expenditure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 65-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2019.04.002	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 Yamawaki Yosuke, Shirawachi Satomi, Mizokami Akiko, Nozaki Kanako, Ito Hikaru, Asano Satoshi, Oue Kana, Aizawa Hidenori, Yamawaki Shigeto, Hirata Masato, Kanematsu Takashi	4. 巻 131
2. 論文標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein regulates lipopolysaccharide-induced hypothalamic inflammation-mediated anorexia in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104563-104572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2019.104563	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 Furukawa T, Nikaido Y, Shimoyama S, Ogata Y, Kushikata T, Hirota K, Kanematsu T, Hirata M, Ueno S	4. 巻 33
2. 論文標題 Phospholipase C-related inactive protein type-1 deficiency affects anesthetic electroencephalogram activity induced by propofol and etomidate in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 531-542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Sano Tomomi, Sanada Taiki, Sotomaru Yusuke, Shinjo Takanori, Iwashita Misaki, Yamashita Akiko, Fukuda Takao, Sanui Terukazu, Asano Tomoichiro, Kanematsu Takashi, Nishimura Fusanori	4. 巻 16
2. 論文標題 Ccr7 null mice are protected against diet-induced obesity via Ucp1 upregulation and enhanced energy expenditure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrition & Metabolism	6. 最初と最後の頁 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12986-019-0372-5	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 Nakatsu Yusuke, Matsunaga Yasuka, Yamamoto Takeshi, Ueda Koji, Inoue Masa-ki, Mizuno Yu, Nakanishi Mikako, Sano Tomomi, Yamawaki Yosuke, Kushiya Akifumi et al.	4. 巻 26
2. 論文標題 Prolyl Isomerase Pin1 Suppresses Thermogenic Programs in Adipocytes by Promoting Degradation of Transcriptional Co-activator PRDM16	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3221-3230.e3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.02.066	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18件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yasuka Ikura, Asano Satoshi, Kanematsu Takashi
2. 発表標題 PRIP protects PI(4,5)P2 from its metabolic enzyme and contributes to completion of cytokinesis
3. 学会等名 7th Hiroshima Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Kanematsu, Kana Oue, Yosuke Yamawaki, Satoshi Asano
2. 発表標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein regulates fat metabolism and energy expenditure
3. 学会等名 7th European Congress on Obesity and Eating Disorder, New Emerging Drifts and Tactic to Challenge Obesity and Eating Disorder
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Asano, Takashi Kanematsu
2. 発表標題 PI(4,5)P2 metabolism regulator PRIP controls the metastatic potential in breast cancer cells
3. 学会等名 第59回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuka Maetani, Satoshi Asano, Masahiro Irifune, Takashi Kanematsu
2. 発表標題 PRIP modulates AKT-GSK3 signaling and regulates cell cycle progression
3. 学会等名 第51回広島大学歯学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Kanematsu, Satoshi Asano, Yosuke Yamawaki, Satoru Kusaka
2. 発表標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein regulates phosphatidylinositol metabolism and modulates cancer cell migration
3. 学会等名 8th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Asano, Yuka Maetani, Yasuka Ikura, Takashi Kanematsu
2. 発表標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein enhances cisplatin-induced apoptosis
3. 学会等名 8th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅野智志
2. 発表標題 新奇イノシトールリン脂質代謝調節タンパク質による乳がん細胞転移の制御機構の解明研究
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 兼松隆, 大植香菜, 坂田修三, 山脇洋輔, 浅野智志
2. 発表標題 白色・褐色脂肪細胞の機能を制御しエネルギー代謝を調節する新しい分子基盤
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前谷有香, 浅野智志, 兼松隆
2. 発表標題 PRIPの過剰発現で乳癌細胞の腫瘍増殖は抑制される
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Kanematsu, Satoshi Asano
2. 発表標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein, a phosphatidylinositol metabolism regulator, controls the metastatic potential in breast cancer cells
3. 学会等名 The 8th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅野智志
2. 発表標題 スフィンゴリピッド代謝酵素に着目した細胞質分裂を制御する新規タンパク質の探索研究
3. 学会等名 歯科基礎医学会 平成30年度定時社員総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Asano, Takashi Kanematsu
2. 発表標題 Expression of phospholipase C-related catalytically inactive protein suppresses cancerous metastasis
3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuka Maetani, Satoshi Asano, Masahiro Irifune, Takashi Kanematsu
2. 発表標題 Over expression of PRIP in MCF-7 cells, a breast cancer cell line, enhances cisplatin induced apoptosis
3. 学会等名 第50回広島大学歯学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoshi Asano, Takashi Kanematsu
2. 発表標題 Regulation of cytokinesis by phospholipase C-related catalytically inactive protein, as a sequestrant of PI(4,5)P2 in the cleavage furrow
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大植香菜, 山脇洋輔, 浅野智志, 入船正浩, 兼松隆
2. 発表標題 The mechanism of phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP)-mediated energy metabolism by α -adrenergic stimulation in brown adipocytes
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoshi Asano, Takashi Kanematsu
2. 発表標題 PRIP regulates talin1 dimerization by binding to its dimerization domain, and controls fibronectin/integrin-mediated cell adhesion
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅野智志、兼松隆
2. 発表標題 細胞接着に関与する新規タンパク質の発見と機能解析
3. 学会等名 第14回 細胞運動研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅野 智志、兼松 隆
2. 発表標題 Regulation of cell adhesion by phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP); PRIP directly promotes talin1 dimerization
3. 学会等名 第103回広島大学歯学会総会
4. 発表年 2019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
研究 分 担 者	兼松 隆 (Kanematsu Takashi) (10264053)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	