

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：16201

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2019～2021

課題番号：18KK0445

研究課題名（和文）Pin1-Akt関連因子による細胞膜リン脂質動態制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanism for Pin1-Akt related factors in phospholipid dynamics of cellular membrane.

研究代表者

水津 太（Suizu, Futoshi）

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：90431379

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：プロリル異性化酵素Pin1が、生体膜リン脂質動態制御の一つとしてオートファゴソーム形成時に観察されるLC3顆粒や初期エンドソームの形成に重要な役割を果たす事が明らかになった。Pin1が、Clathrin依存性のエンドサイトーシス制御因子HIP1Rと協調して、がん免疫の標的因子であるPD-L1と核酸トランスポーターのENT1をリソソーム依存的に分解することを明らかにした。これらPin1によるがん関連主要因子の分解制御は、腫瘍細胞のみならずがん微小環境における癌支持組織を形成するがん関連線維芽細胞（CAF）にも影響を与え、CAFを介した治療・薬剤抵抗性に対する効果が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Pin1は、様々ながん腫において強発現しており、細胞周期制御因子や炎症制御プロセスに重要な役割を果たすプロリル異性化酵素である。現在までにPin1は、数十種のがん遺伝子産物の発現誘導や活性化、さらには、がん抑制遺伝子の発現抑制や不活性化のプロセスに関わる事が明らかになっており、癌治療標的因子として注目されている。今回の共同研究において、Pin1阻害剤、がん免疫活性化PD-L1抗体、抗がん剤Gemcitabineの併用により細胞レベル、自然発生腫瘍マウスモデルで副作用を低減しかつ劇的な抗がん作用相乗効果がみられたことから、今後本ストラテジーによる臨床応用への展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Prolyl isomerase Pin1 has been shown to play an important role in the formation of early endosomes and LC3 puncta which observed during autophagosome formation as one of the regulation of plasma membrane phospholipid dynamics.

Pin1 cooperates with the clathrin-dependent endocytosis regulator HIP1R to lysosome-dependently degrade PD-L1 which is a target factor of cancer immunity and ENT1 which is a nucleic acid transporter. Regulation of the degradation of major cancer-related factors by Pin1 affects not only tumor cells, but also cancer-related fibroblasts (CAFs) that form cancer-supporting stroma tissues in the cancer microenvironment, and treatment and treatment with CAF which is affecting drug resistance of tumor.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Pin1 リソソーム タンパク分解 HIP1R 腫瘍

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

原癌遺伝子産物 Akt とプロリン異性化酵素 Pin1 の制御破綻は、癌やアルツハイマー病発症の原因となる。(Suizu, *Lu Mol Cell Biol* 2006; Liou, *Lu Nature* 2003; Kondo, *Lu Nature* 2015; Manning *Cell* 2017) (1-4) 我々はこれまでに、Akt と Pin1 が細胞性一次繊毛やオートファジー制御に主要な役割を担う知見を得た。(図1) 一次繊毛やオートファジー制御には、鍵因子である生体膜リン脂質 (PIP s、図1) の時空間的動態制御が必須である。Pin1-Akt シグナル伝達の破綻は PIP s 制御に異常をきたすことから(5-8)、本研究では PIP s 動態制御に重要な Pin1-Akt 関連因子の同定を行い、その分子メカニズム解明を目指す。PIP s 動態制御に関わる因子の機能解明により、PIP s 動態制御不全によって惹起される繊毛病、癌、アルツハイマー病、自己免疫疾患などの様々な疾患の診断・予防や治療法開発を目指す。(図1、2、7)

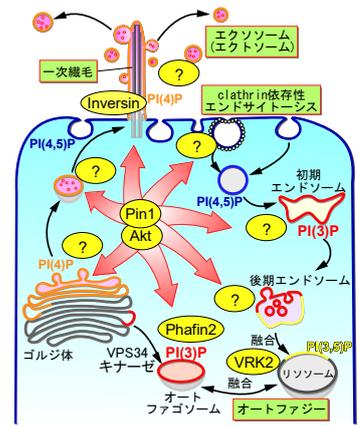


図1. 細胞内 Pin1-Akt シグナル伝達が関与する細胞膜リン脂質動態制御

2. 研究の目的

様々な生体膜リン脂質 (PIP s) 動態制御における Pin1-Akt シグナル伝達の生物機能を解明する。Pin1 と Akt は脳神経細胞のオートファジー活性維持と細胞生存に必須な因子でありその破綻はアルツハイマー様の病態を示す。(Liou, *Lu Nature* 2003; Liu, *Lu Nature* 2014; Kondo, *Lu Nature* 2015) (2, 4, 9) 興味深いことにその病態は、細胞マイクロセンサーである細胞性一次繊毛の機能異常が原因とされる繊毛病 (ciliopathy) の病態と酷似している。さらに、Pin1 が clathrin 依存的なエンドサイトーシスや一次繊毛形成を正の制御する知見を得ていることから (図1、未発表)、Pin1-Akt 関連因子は、生体膜リン脂質を介した細胞機能制御を司るシグナル伝達の重要な分子群であることが強く示唆される。しかしながら、それら因子の同定および、機能解析は未だされておらず、本知見が未熟段階であることもあり、その詳細は明らかになっていない。本研究では、Pin1-Akt 関連因子による細胞膜動態の全貌を明らかにすることを目的とし、それら因子の構造・発現・機能破綻が惹起する様々な疾病の原因究明と治療法開発を目指す。(図2)

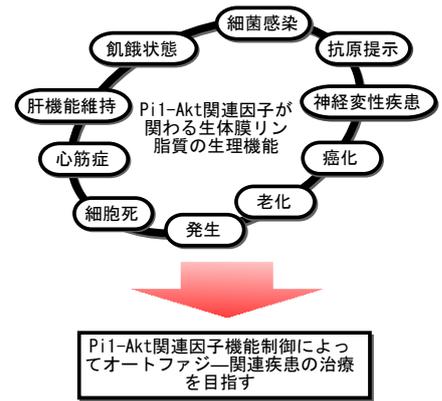


図2. オートファジーの生理機能と疾患

3. 研究の方法

- ①SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) 法を用いた Pin1-Akt 両タンパク発現によって発現誘導される膜関連タンパク分子の単離同定を行う。(図3)
- ②現在までに生体膜リン脂質 PI (3)P 特異認識性 RNA アプタマーの開発に成功しており、細胞レベル、モデルマウスでのイメージングによる PI (3)P 動態追跡をする。(図4) (10)
- ③複数の Pin1-Akt 関連因子の検索を行い、がん関連因子に注目した機能解析を行う。

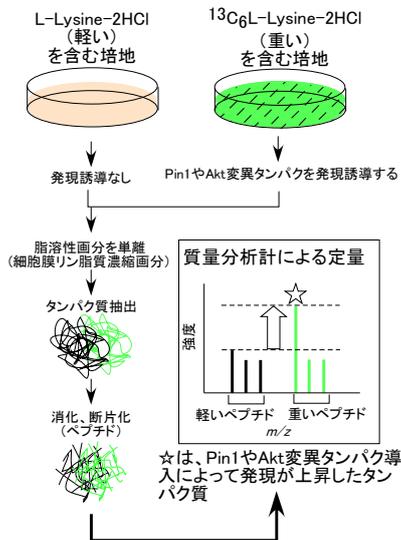
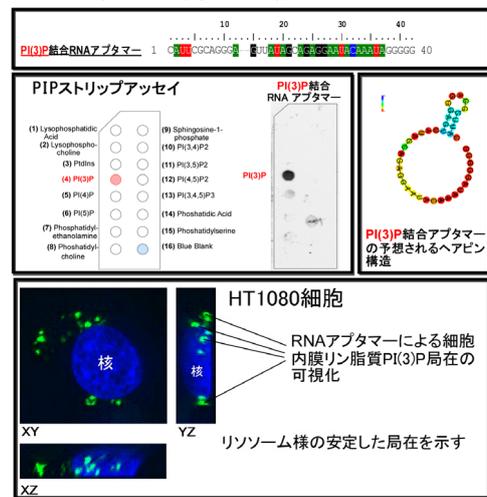


図3. SILAC 法による Pin1-Akt 関連因子同定

図4 膜リン脂質PI (3)P結合性RNAアプタマー



#### 4. 研究成果

Pin1 は、様々ながん腫において高発現しており、細胞周期制御因子の Cyclin D や炎症制御因子 NFκB などの制御プロセスに重要な役割を果たすプロリン異性化酵素である。(11) 現在までに Pin1 は、数十種のがん遺伝子産物の発現誘導や活性化、さらには、がん抑制遺伝子の発現抑制や不活性化のプロセスに関わる事が明らかになっており、癌治療標的因子として注目されている。今回米国ハーバード大学医学部連携ベスイスラエルデコネス医療センターの Kun Ping Lu 博士と九州大学医学部の肥川和寛博士らとの共同研究により、膀胱癌における新規治療法の開発に向けた研究を行った。

- ① SILAC 法による Pin1-Akt シグナル伝達の癌関連または膜動態関連因子の網羅的解析は、現在いくつかの候補因子が見つかり再現性を含めて発現や機能解析を進めている。
- ② Pin1 が、生体膜リン脂質動態制御の一つとしてオートファゴソーム形成時に観察される LC3 顆粒や初期エンドソームの形成に重要な役割を果たす事が明らかになった。(図 5)
- ③ Pin1 が、Clathrin 依存性のエンドサイトーシス制御因子 HIP1R と協調して、がん免疫の標的因子である PD-L1 と核酸トランスポーターの ENT1 の分解を誘導することを明らかにした。両者のタンパク分解は Pin1 発現量依存的にリソソームを介して分解されることが明らかとなった。これら Pin1 によるがん関連主要因子の分解制御は、腫瘍細胞のみならずがん微小環境における癌支持組織を形成するがん関連線維芽細胞 (CAF) にも影響を与え、CAF を介した治療・薬剤抵抗性に対する効果が観察された。以上の知見を踏まえ Pin1 阻害剤、PD-L1 抗体、Gemcitabine の併用により細胞レベルおよび PDX および自然発生膀胱癌マウスモデルでの劇的な抗がん作用相乗効果がみられた。(Koikawa, Kibe, Suizu et al. Cell 2021) (12)

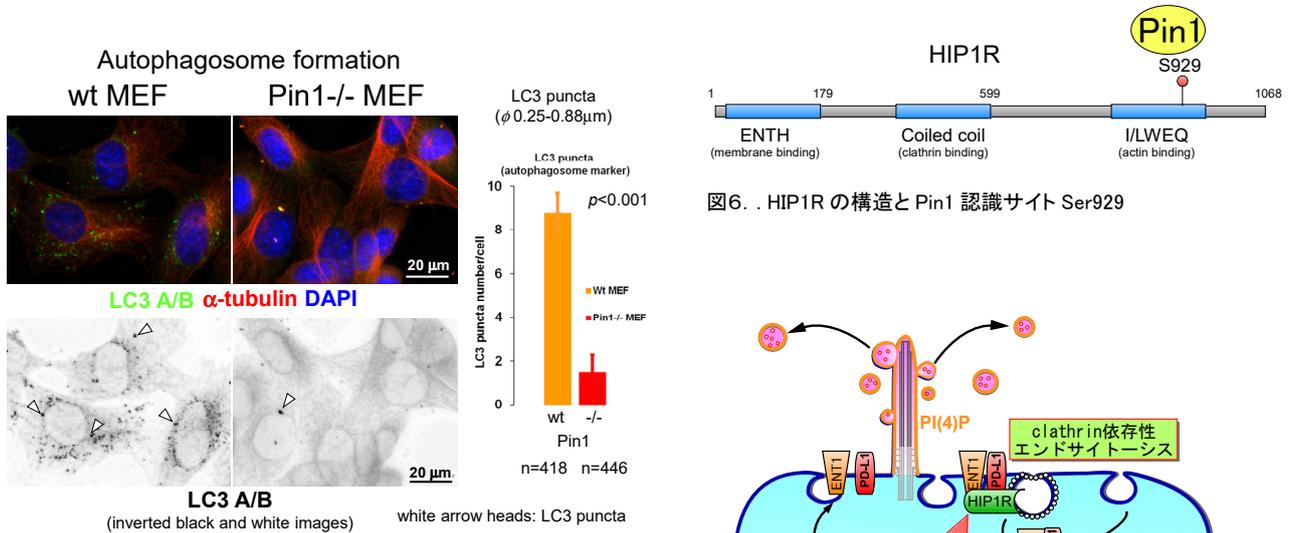


図5. Pin1 の欠失はオートファゴソーム形成能を失う

1. P. J. Lu, G. Wulf, X. Z. Zhou, P. Davies, K. P. Lu, The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* **399**, 784-788 (1999).
2. Y. C. Liou *et al.*, Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature* **424**, 556-561 (2003).
3. F. Suizu, A. Ryo, G. Wulf, J. Lim, K. P. Lu, Pin1 regulates centrosome duplication, and its overexpression induces centrosome amplification, chromosome instability, and oncogenesis. *Mol Cell Biol* **26**, 1463-1479 (2006).
4. A. Kondo *et al.*, Antibody against early driver of neurodegeneration cis P-tau blocks

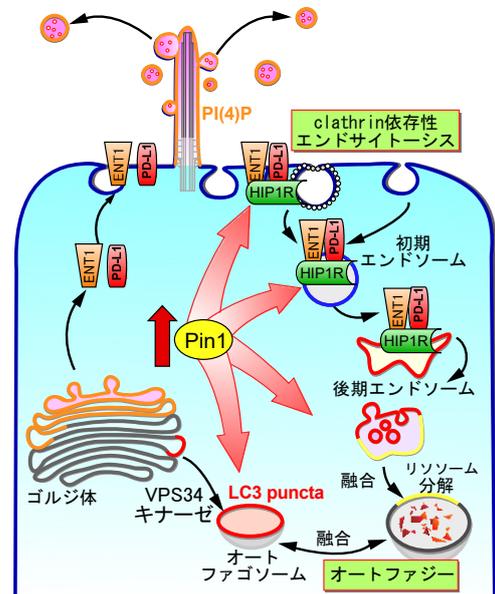


図7. 細胞内 Pin1-Akt シグナル伝達が関与する細胞膜リン脂質動態制御

- brain injury and tauopathy. *Nature* **523**, 431-436 (2015).
5. W. J. Keune *et al.*, Regulation of phosphatidylinositol-5-phosphate signaling by Pin1 determines sensitivity to oxidative stress. *Sci Signal* **5**, ra86 (2012).
  6. M. Scrima *et al.*, Signaling networks associated with AKT activation in non-small cell lung cancer (NSCLC): new insights on the role of phosphatidylinositol-3 kinase. *PLoS One* **7**, e30427 (2012).
  7. W. J. Keune, D. R. Jones, N. Divecha, PtdIns5P and Pin1 in oxidative stress signaling. *Adv Biol Regul* **53**, 179-189 (2013).
  8. M. J. Eramo, C. A. Mitchell, Regulation of PtdIns(3,4,5)P3/Akt signalling by inositol polyphosphate 5-phosphatases. *Biochem Soc Trans* **44**, 240-252 (2016).
  9. P. Liu *et al.*, Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. *Nature* **508**, 541-545 (2014).
  10. T. Donia *et al.*, Identification of RNA aptamer which specifically interacts with PtdIns(3)P. *Biochem Biophys Res Commun* **517**, 146-154 (2019).
  11. X. Z. Zhou, K. P. Lu, The isomerase PIN1 controls numerous cancer-driving pathways and is a unique drug target. *Nat Rev Cancer* **16**, 463-478 (2016).
  12. K. Koikawa *et al.*, Targeting Pin1 renders pancreatic cancer eradicable by synergizing with immunochemotherapy. *Cell* **184**, 4753-4771 e4727 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazuhiro Koikawa, Shin Kibe, Futoshi Suizu, Nobufumi Sekino, Nami Kim, Theresa D Manz, Benika J Pinch, Dipikaa Akshinthala, Ana Verma, Giorgio Gaglia, Yutaka Nezu, Masafumi Nakamura, Nathanael S Gray, Xiao Zhen Zhou, Kun Ping Lu et al.	4. 巻 184(18)
2. 論文標題 Targeting Pin1 renders pancreatic cancer eradicable by synergizing with immunochemotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 4753-4771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cell.2021.07.020	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

〔学会発表〕 計0件

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ルー クンピン  (Lu Kun Ping)	ハーバード大学医学部・Beth Israel Deaconess Medical Center・Professor	

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	Beth Israel Deaconess Medical Center		