

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07497

研究課題名(和文)細胞内のギャップ結合タンパクが惹起するストレス適応応答 その分子機構の解明

研究課題名(英文) Intracellular connexin-induced adaptive stress-response pathway &#8211; Its molecular bases

研究代表者

大森 泰文 (Omori, Yasufumi)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90323138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、ゴルジ体のConnexin(Cx)が増加するとがん幹細胞(CSC)が増加するとともに、小胞体(ER)ストレス応答タンパクGRP78の発現が高まることを見出した。GRP78の転写因子であるATF6は、不活化型としてER膜に局在し、ゴルジ体に移動して活性化される。本研究で、ゴルジ体のCxが不活化型ATF6と結合し、その結果ATF6の活性化が亢進することが明らかとなった。さらにGRP78の強発現により適応応答が高まり、CSC画分が増加することも確認された。これらの結果により、ゴルジ体Cxにより、ATF6の活性化を介してGRP78の増加が生じ、CSCが増加することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コネキシン(Cx)は細胞膜でギャップ結合(GJ)を形成し、細胞間コミュニケーションを高めることで腫瘍の発生を抑制しているが、腫瘍細胞においてはCxが細胞内に局在する傾向にある。また、細胞は様々なストレスに対して、適応応答によってこれを乗り越える仕組みを有している。今回の研究で、ゴルジ体に局在するCxがストレス適応応答を惹起すること、その結果がん幹細胞(CSC)が増加することが示された。CSCは腫瘍の基になる細胞であり、がん治療の標的とされている。したがって、今回の研究成果から、Cxの局在を制御し正常化することで、CSCの量を減少させることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have previously found that an excessive amount of intra-Golgi connexin (Cx) expands cancer stem cell (CSC) population and elevates the expression level of GRP78, which plays a pivotal role in endoplasmic reticulum (ER) stress response. ATF6, which functions as a transcription factor for GRP78 gene, is usually localised on ER membrane in an inactive form and is converted to an active form by specific proteases after translocating into Golgi apparatus. In our present study, we revealed that intra-Golgi Cx was bound to an inactive form of ATF6 to facilitate a protease-mediated activation of ATF6. Transfection of a construct coding constitutively-active ATF6 transactivated GRP78 gene and successfully expanded CSC population. Taken together, our study indicates that intra-Golgi Cx induces an ER stress response by enhancing activation of ATF6 and transcription of GRP78 and finally contributes to proliferation and survival of CSCs.

研究分野：実験病理学

キーワード：コネキシン ギャップ結合 がん幹細胞 小胞体ストレス ATF6 ストレス応答 細胞内輸送

1. 研究開始当初の背景

- **ギャップ結合(GJ)構成因子としてのコネキシン(Cx)タンパク**・・・GJは隣り合う2つの細胞間に形成されたチャンネルであり、これを介して細胞は分子量1000以下の水溶性物質を隣の細胞と交換し、細胞社会の恒常性の維持に寄与している。Cxタンパクは脊椎動物GJの唯一の構成因子であり、ほ乳類では分子量の異なる20の分子種が知られており、Cxファミリーが形成されている。GJががん抑制的に機能することは良く知られており、私たちが様々な方法でこれを証明してきた [1, 2]。

- **細胞内に局在するCxタンパクとその機能**・・・数多くの腫瘍において、GJの減弱もしくは消失が腫瘍のhallmarkの1つとなっているが、この時しばしばCxタンパクは細胞膜から細胞内に局在の場を変えている。興味深いことに、細胞内に局在するCxの量が、腫瘍の進展や悪性度の上昇とともに増加していくことが様々ながん種で報告されている。このことから、細胞内のCxはGJとしてはloss-of-functionではあるものの、GJとは逆に腫瘍の進展に寄与するような細胞内Cx固有の機能を有していることが示唆される。私たちはゴルジ体膜もしくはゴルジ体基質に局在するCx32の量が増すにつれ、がん幹細胞の自己複製が促進され、それと同時に細胞運動能が高まり転移結節が形成されることを報告した [3, 4]。さらに最近、遺伝子操作でCx26の局在を変化させると、細胞膜でGJを形成する際には造腫瘍能が抑制される一方、ゴルジ体に局在する時には逆に造腫瘍能が高まることを明確に示した [5]。したがって、細胞内のCxタンパクにはGJとは異なる機能があるということは確実だと思われる [6]。従来よりこのような私たちの知見は懐疑的に捉えられてきたが、少しずつ [7]や [8]などの総説にも引用されるようになっていく。

- **「問い」**・・・私たちや他のグループの研究によって、細胞内のCxタンパクがGJとは異なる機能を有することが証明された。それではどのような分子機構によりこの機能がもたらされているのか。また、この細胞内Cx固有の機能は腫瘍において見出されたものであるが、生理的条件下ではいかなる機能を発揮するのか。これらが「問い」として残っている。

2. 研究の目的

私たちが見出したゴルジ体に局在するCxタンパク固有の機能、すなわちがん幹細胞の分裂時に対称分裂を選択する頻度を高め自己複製を促進する機能とがんの進展を促進する機能の基盤をなす分子機構を解明することが、本研究の目的である。私たちは、ゴルジ体に局在するCx32の量が増加すると、活性化型ATF6αが著明に増加することを見出した。ATF6αは不活性化型として小胞体(ER)膜に局在しているが、ゴルジ体に移動して2種のプロテアーゼ、S1PとS2Pにより断片化されることで活性化する。活性化型ATF6αは核内転写因子として機能し、ERストレス応答タンパクで分子シャペロンとして知られるGRP78の転写を活性化する。これを裏付けるようにゴルジ体に局在するCx32の量が増加する際には、GRP78の発現も高まっている。細胞はERストレスに対して破壊的応答(細胞死)もしくは適応応答を示すが、GRP78は適応応答を担うタンパクで、細胞の生存や増殖に寄与している。これらの事実は、ゴルジ体Cxタンパクの量が増えることにより、たとえERストレスがない状況であってもATF6αの活性化が生じ、細胞の生存や増殖が高まる可能性を示唆している。そこで、ゴルジ体Cxタンパクによる「ストレス無き適応応答」の惹起を作業仮説とする。

3. 研究の方法

がん幹細胞(CSC)の新規マーカーCD98hcの同定・・・先に私たちは、Cx26がゴルジ体に局在する時に造腫瘍能が高まることを明確に示した [5]。すでに私たちはゴルジ体に局在するCxには、CSCの自己複製を促進する機能があることを見出している [4]。ゴルジ体に局在するCxが放射線ストレス応答とCSC自己複製の両方に関与する可能性を探るため、放射線耐性とCSCを1つのマーカーで検出できるかどうかを検討した。いくつかの細胞株で放射線耐性株を作製し、耐性獲得後にCD98hc陽性画分がどのように変化するかフローサイトメーターで解析した。さらに、陽性画分と陰性画分をそれぞれ免疫不全マウスに異種移植し、CD98hc陽性画分のみが造腫瘍能を有するかどうかを検討した。

ゴルジ体に局在するCxの機能は、活性化型ATF6αによって再現されるか・・・私たちは、ゴルジ体に局在するCxがATF6αを活性化することでストレス適応応答を惹起し、CSCの自己複製を促進するものと予想している。そこで構成的活性化型ATF6αを発現するウイルスベクターを作製し様々な細胞に導入し、活性化型ATF6αによりCSC画分が増加するかどうかを検討した。

パネキシン(Panx)はゴルジ体に局在し得るのか・・・Cx関連タンパクであるPanxは細胞膜上でchannelを形成するが、ER膜上でもchannelを形成し得ることが他のグループにより明らかにされた。そこで、ERストレスの有無により、Panxの局在に変化があるかどうか、免疫蛍光法で検討した。

ゴルジ体におけるCxタンパクの量体状態の検討・・・ゴルジ体に局在するCxタンパクがい

かなるフォームで存在しているのか、6量体を形成しチャンネルのフォームで局在しているのか、単量体で浮遊しているのか等を知るために、透過電顕による観察、および免疫電顕による確認を行った。

Cx タンパクと S1P や S2P もしくは ATF6 α との相互作用の検討・・・ゴルジ体に局在する Cx タンパクが、S1P や S2P プロテアーゼと相互作用し、ATF6 α の活性化（断片化）を促進している可能性を探るために、免疫沈降法で両者の結合を検討した。

Cx タンパクのゴルジ体における局在の詳細な検討・・・Cx の局在がゴルジ体なのか小胞体ゴルジ体中間区画(ERGIC)なのかを決定するために超解像顕微鏡を用いて検討した。ERGIC のマーカーとして ERGIC-53 抗体や COP1 抗体を、ゴルジ体マーカーとして GM130 抗体や 58K ゴルジタンパク抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、Cx との共局在を観察した。

Cx タンパクがゴルジ体に貯留することによる遺伝子発現の変化・・・Cx がゴルジ体に局在する細胞と、細胞膜に GJ を形成する細胞とで発現量の異なる mRNA を DNA マクロアレイチップで網羅的定量的に解析した。

4. 研究成果

がん幹細胞(CSC)の新規マーカーCD98hc の同定・・・いくつかの細胞株で放射線耐性株を作製したところ、耐性獲得後に CD98hc 陽性画分が著明に増加していた。同時に、CD98hc 陽性画分ではゴルジ体に局在する Cx の量が増加していた。さらに陽性画分と陰性画分を免疫不全マウスに移植したところ、陽性画分を移植されたマウスはすべて腫瘍を形成したが、陰性画分を移植されたマウスでは腫瘍の形成はみられなかった。

ゴルジ体に局在する Cx の機能は、活性化型 ATF6 α によって再現されるか・・・構成的活性化型 ATF6 α を発現するウイルスベクターを作製し様々な細胞に導入したところ、Cx の多寡や局在部位の如何に関わらず、CSC 画分が増加することが分かった。したがって、ゴルジ体に局在する Cx の増加に伴って増加する活性化型 ATF6 α は CSC 画分を増加させる機能を有していることが明らかとなった。

パネキシン(Panx)はゴルジ体に局在し得るのか・・・免疫蛍光法で Panx の局在を検討したところ、Panx は細胞膜上に局在するだけでなく、ゴルジ体においても染色シグナルを確認することができた。しかしながら、そのシグナルは非常に弱く、細胞膜への輸送途上にゴルジ体でプロセッシングされている Panx と解釈することもできる。ER ストレスの付加によりそのシグナルが増強する傾向を呈したが、有意差はなかった。今後、より鋭敏な検出系により確証を得る必要がある。

ゴルジ体における Cx タンパクの量体状態の検討・・・細胞膜への輸送が行われず Cx32 がゴルジ体に貯留しているヒト HuH7 肝細胞癌細胞や、ゴルジ体停留シグナルを付加した変異 Cx26 タンパクを過剰発現させたヒト FaDu 下咽頭癌細胞においては、Cx32 や Cx26 は 6 量体を形成しておらず、おそらく単量体で存在していることが示唆された。一方、Cx43 の細胞膜への輸送が正しくなされる IAR20 細胞においては、Cx43 の一部がゴルジ体において 6 量体を形成していることが分かった。

Cx タンパクと S1P や S2P もしくは ATF6 α との相互作用の検討・・・ゴルジ体停留シグナルを付加した変異 Cx26 タンパクを過剰発現させた FaDu 細胞においては、変異 Cx26 が完全長 ATF6 α 、すなわち不活化型 ATF6 α と共沈することが確認された。一方、変異 Cx26 と S1P および S2P との結合は確認できなかった。おそらく、ゴルジ体に局在する Cx26 は不活化型の ATF6 α と結合し、S1P や S2P による ATF6 α の断片化を受けやすくしている可能性が示唆された。

Cx タンパクのゴルジ体における局在の詳細な検討・・・超解像顕微鏡を用いた観察により、HuH7 細胞においては Cx32 が、FaDu 細胞においては変異型 Cx26 が、GM130 や 58K ゴルジタンパクと共局在を呈した。したがって、ゴルジ野に過剰に貯留する Cx は、ゴルジ体に局在しており、ERGIC には局在していないことが分かった。

Cx タンパクがゴルジ体に貯留することによる遺伝子発現の変化・・・網羅的遺伝子発現解析を施行したところ、Cx がゴルジ体に局在する細胞で著明に増加している mRNA としてヒットしたのが、Rin3 と DENND2 の mRNA であった。これらの mRNA は、それぞれ Rab5 と Rab9 の GEF (guanine-nucleotide exchange factor) をコードし、対応する Rab タンパクを活性化する機能を有する。Rab5 は膜タンパクのエンドサイトーシスに関与しており、Rab9 はエンドソームからトランスゴルジネットワークへの逆行輸送に関与している。この結果より、Cx のゴルジ体への貯留は、細胞膜に順行輸送された Cx が機能的 GJ を形成することなく直ちに細胞内に、さらにはゴルジ体へと引き戻された結果である可能性が示唆された。

< 引用文献 >

- [1] Mutat. Res. (2001) 477: 191–196.
- [2] Cancer Sci. (2003) 94: 501–507.
- [3] Int. J. Cancer (2007) 121: 536–546.
- [4] Int. J. Cancer (2011) 128: 51–62.
- [5] Int. J. Mol. Sci. (2018) 19: e2134.
- [6] J. Membr. Biol. (2007) 218: 73–77.

- [7] Nat. Rev. Cancer (2010) 10: 435-441.
- [8] Nat. Rev. Cancer (2016) 16: 775-788.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Suzuki H, Kawasaki Y, Miura M, Hatakeyama H, Shiina K, Suzuki S, Yamada T, Suzuki M, Omori Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic factors and can be markers of sensitivity to chemoradiotherapy in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian Pacific Journal of Cancer Prevention	6. 最初と最後の頁 1271-1278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.31557/APJCP.2022.23.4.1271	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 Kawasaki Y, Omori Y, Suzuki S, Yamada T	4. 巻 -
2. 論文標題 CD98hc as a marker of radiotherapy-resistant cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Medical Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5114/aoms.2020.92872	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 Kawasaki Y, Omori Y, Suzuki S, Yamada T	4. 巻 15
2. 論文標題 The investigation of salvage endoscopic laryngopharyngeal surgery after chemoradiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Videosurgery and Other Miniinvasive Techniques	6. 最初と最後の頁 511-518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5114/wiitm.2020.94518	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 大森泰文	4. 巻 69
2. 論文標題 がん組織の幹細胞 治療標的としての課題	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 秋田県医師会雑誌	6. 最初と最後の頁 18-25
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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kawasaki Y, Suzuki H, Omori Y.
2. 発表標題 The LAT1 is a marker and regulator of head and neck squamous cell carcinoma radiosensitivity
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Omori Y.
2. 発表標題 Biological significance of intraGolgi-accumulation of connexin protein
3. 学会等名 International Colloquium on Gap Junctions and Cancer (online) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suzuki M, Yamamoto Y, Nishijima A, Shibata H, Omori Y
2. 発表標題 Curcumin analog G0-Y030 diminishes cancer stem cell population by inhibiting interaction of HSP70 with its substrates
3. 学会等名 Annual Meeting 2020 of The American Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawasaki Y, Omori Y
2. 発表標題 In HNSCC, CD98hc is a marker of cancer stem cells and LAT1 inhibitor is a novel therapeutic method
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Suzuki M, Yamamoto Y, Shibata H, Omori Y
2. 発表標題 Curcumin analog G0-Y030 diminishes cancer stem cell (CSC) population by inhibiting binding of HSP70/40 to its substrate
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木麻弥, 山本洋平, 西島亜紀, 大森泰文
2. 発表標題 クルクミン類縁体G0-Y030はHSP70と基質との結合を阻害することでがん幹細胞画分を減少させる
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawasaki Y and Omori Y
2. 発表標題 CD98hc is a candidate of cancer stem cell markers in HNSCC
3. 学会等名 2nd International Conference on Stem Cells and Regenerative Medicine (Keynote Forum) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木麻弥, 山本洋平, 西島亜紀, 大森泰文
2. 発表標題 クルクミン類縁体によるがん幹細胞画分の減少はHSP70/40の機能阻害を介している
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki M, Yamamoto Y, Shibata H, Omori Y
2. 発表標題 A curcumin analog diminishes cancer stem cell population by inhibiting the function of HSP70/40
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawasaki Y and Omori Y
2. 発表標題 LAT1 is a new treatment target for radio-resistant patients in HNSCC
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
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	山本 洋平 (Yamamoto Yohei) (70400512)	秋田大学・医学部附属病院・助教 (11401)	
研究 分担者	西島 亜紀 (Nishijima Aki) (40566105)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	

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
---------	---------