

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22482

研究課題名(和文) 能動的オートファジーによる細胞内代謝リモデリングを介した細胞増殖機構

研究課題名(英文) Active autophagy that promotes cell proliferation via intracellular metabolic remodeling

研究代表者

山口 憲孝 (Yamaguchi, Noritaka)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：80399469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、細胞の飢餓応答の際にタンパク質などの構成成分を分解し栄養素のリサイクルを行う現象として広く知られている。我々は、炎症性サイトカインIL-1の刺激によって、細胞のオートファジーが誘導されることを見出した。IL-1刺激によって活性化する遺伝子発現誘導因子NF- κ Bを阻害するとオートファジーが抑制されたことから、NF- κ B標的遺伝子がオートファジーに関与すると考え解析を行った。その結果、飢餓応答非依存的にオートファジーを誘導する新規因子SIAIFを発見した。この遺伝子は、能動的にオートファジーを誘導して細胞内代謝リモデリングを導き細胞増殖を促進することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって発見された新規オートファジー誘導因子は、がん細胞において高く発現しており、がん細胞の増殖を促進することが明らかとなった。従って、この因子を阻害することにより、がん細胞の増殖性を低下させ、がん組織を退縮させることができると期待される。すなわち、本研究成果はがんの新しい治療法開発につながる可能性があり、社会に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is widely accepted as a phenomenon that promotes degradation of intracellular proteins and organelles upon starvation stimulation. However, we have found that an inflammatory cytokine IL-1 induces autophagy independently of starvation. Because IL-1 activates the transcription factor NF- κ B, we screened NF- κ B target genes involved in starvation-independent autophagy. We identified a novel autophagy-inducing factor and named this factor as SIAIF (Starvation-independent autophagy-inducing factor). We found that SIAIF-mediated active autophagy promotes cell proliferation via inducing intracellular metabolic remodeling.

研究分野：分子生物学

キーワード：シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、細胞の飢餓応答の際にタンパク質や脂質などの細胞内構成成分を分解し栄養素のリサイクリングを誘導する現象として広く知られている。また、オートファジーは細胞内の不要なタンパク質や損傷したオルガネラの除去にも関与している。このように、オートファジーは細胞が様々なストレスに曝された際に、生存のための防御システムとして働くという考えが支配的であった。

2. 研究の目的

我々は、炎症性サイトカイン Interleukin-1 α および β (以下、両者を合わせて IL-1 と表す) の刺激によって、ストレス非依存的に細胞のオートファジーが誘導されることを見出した。IL-1 刺激によって活性化する転写因子 Nuclear factor- κ B (NF- κ B) を阻害するとオートファジーが抑制されること、オートファジーの誘導に刺激後 48~72 時間ほど必要なことがわかり、NF- κ B の標的遺伝子がオートファジーに関与していることが示された。このことから、本研究では、ストレス非依存的オートファジーを誘導する NF- κ B 標的遺伝子の同定と機能解析を目的とした。

3. 研究の方法

まず、RNA-seq 解析によって IL-1 刺激にて発現誘導される NF- κ B 標的遺伝子を解析し、その中からオートファジーに関わる遺伝子の RNAi スクリーニングを行った。RNAi によってオートファジーが抑制される遺伝子を選択し、さらに単独の強制発現によりオートファジーが誘導されるかどうかを評価し、新規オートファジー誘導因子を特定した。

特定した新規因子について、顕微鏡観察による細胞内局在や相互作用分子の解析により分子機能を調べた。また、強制発現によりオートファジーを誘導し、増殖性や運動性等の細胞の表現型を調べた。

4. 研究成果

RNA-seq 解析と RNAi スクリーニングによって新規オートファジー誘導遺伝子を同定し SIAIF (Starvation-independent autophagy-inducing factor) と命名した。SIAIF は、機能についてほとんど報告がなく、新規性の高い遺伝子として解析を進めた。まず、過剰発現系により細胞内局在を観察すると、ミトコンドリアに局在することがわかった。過剰発現後に免疫沈降を行い、ミトコンドリア成分との相互作用を解析した結果、ミトコンドリア電子伝達系と相互作用する可能性が高いことがわかった。

SIAIF を細胞に安定発現させると、興味深いことに、栄養が十分な培地にて培養してもオートファジーが誘導されることがわかった。この時、細胞の増殖性を解析すると、SIAIF 安定発現細胞では増殖速度が上昇していた。オートファジーと細胞増殖との関連を解析するために、約 200 種類の細胞内代謝物をメタボローム解析によって測定し、細胞内代謝変化について調べた。その結果、グルタミン以外のアミノ酸量が増加し、さらにグルタミンから代謝される核酸前駆体やポリアミンの量も増加していた。このことから、SIAIF は、NF- κ B 下流で発現上昇して飢餓応答とは無関係にオートファジーを誘導し、細胞内構成因子を積極的にリサイクリングして特にグルタミン代謝を活性化し細胞増殖を促進することが示された。

次に、がんと SIAIF との関連について解析した。その結果、多くのヒトがん細胞株で SIAIF が高発現することがわかった。がん細胞株における SIAIF を RNAi によって発現抑制すると、細胞増殖が顕著に抑制された。また、SIAIF を発現抑制してがん細胞のメタボローム解析を行った

ところ、細胞内グルタミンが増加する一方で核酸前駆体やポリアミンが低下することがわかった。このことから、SIAIF はがん細胞において高発現し細胞内代謝リモデリングを誘導して増殖を促進する機能をもつことが明らかとなった。

我々は SIAIF を NF- κ B 標的遺伝子として同定したため、がん細胞においても NF- κ B が SIAIF 発現に関与するかどうかを解析した。がん細胞では、高頻度に活性化変異をもつがん遺伝子 Ras の下流で NF- κ B が活性化することが知られている。そこで、SIAIF が高発現するヒトがん細胞株の特徴を調べると、確かにほとんどが Ras 変異をもつことがわかった。正常細胞に変異型 Ras を導入して形質転換させると、SIAIF の発現が上昇することがわかった。この時、NF- κ B 阻害剤を処理すると SIAIF 発現が低下したため、Ras 下流においても NF- κ B が SIAIF を誘導し、オートファジーと細胞増殖を活性化させることが示された。

以上より、本研究では、NF- κ B 下流で飢餓非依存的に能動的にオートファジーを誘導する因子として SIAIF を新規に同定し、SIAIF がミトコンドリアに局在して細胞内代謝リモデリングを誘導し細胞増殖を促進すること、SIAIF は炎症刺激のみならず特に Ras の下流で高発現しがん細胞の増殖を促進することが明らかとなった。SIAIF は、がんの新たな治療標的分子になると期待される。また、現在 SIAIF ノックアウトマウスの作製を進めており、SIAIF の生理機能や病態との関連について詳細な解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Hori Naoto, Okada Kazuyuki, Takakura Yuki, Takano Hiroyuki, Yamaguchi Naoto, Yamaguchi Noritaka	4. 巻 295
2. 論文標題 Vestigial-like family member 3 (VGLL3), a cofactor for TEAD transcription factors, promotes cancer cell proliferation by activating the Hippo pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 8798 ~ 8807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.012781	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 Yamaguchi Noritaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Multiple Roles of Vestigial-Like Family Members in Tumor Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 1266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2020.01266	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 Suzuki Ko, Honda Takuya, Akatsu Aki, Yamaguchi Noritaka, Yamaguchi Naoto	4. 巻 75
2. 論文標題 The promoting role of lysosome-localized c-Src in autophagosome-lysosome fusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 109774 ~ 109774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2020.109774	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 Yuki Ryuzaburo, Hagino Mari, Ueno Sachi, Kuga Takahisa, Saito Youhei, Fukumoto Yasunori, Yamaguchi Noritaka, Yamaguchi Naoto, Nakayama Yuji	4. 巻 25
2. 論文標題 The tyrosine kinase v Src modifies cytotoxicities of anticancer drugs targeting cell division	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 1677 ~ 1687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.16270	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 Morii Mariko, Kubota Sho, Hasegawa Chizu, Takeda Yumi, Kometani Shiori, Enomoto Kyoko, Suzuki Takayuki, Yanase Sayuri, Sato Rika, Akatsu Aki, Hirata Kensuke, Honda Takuya, Kuga Takahisa, Tomonaga Takeshi, Nakayama Yuji, Yamaguchi Noritaka, Yamaguchi Naoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Src-mediated tyrosine phosphorylation of PRC1 and kinastrin/SKAP on the mitotic spindle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82189-1	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 Takakura Yuki, Hori Naoto, Terada Natsumi, Machida Moeka, Yamaguchi Naoto, Takano Hiroyuki, Yamaguchi Noritaka	4. 巻 35
2. 論文標題 VGLL3 activates inflammatory responses by inducing interleukin 1 secretion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202100679RR	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 Hori Naoto, Takakura Yuki, Sugino Ayumi, Iwasawa Shuto, Nomizo Kota, Yamaguchi Naoto, Takano Hiroyuki, Yamaguchi Noritaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Vestigial like family member 3 stimulates cell motility by inducing high mobility group AT hook 2 expression in cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	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) 10.1111/jcmm.17279	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 Kawamura Tomohiro, Takehara Yuki, Hori Naoto, Takakura Yuki, Yamaguchi Naoto, Takano Hiroyuki, and Yamaguchi Noritaka	4. 巻 -
2. 論文標題 VGLL3 increases the dependency of cancer cells on de novo nucleotide synthesis through GART expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	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) 10.1002/jcb.30251	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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口憲孝, 山口直人, 高野博之.
2. 発表標題 上皮間葉転換誘導因子による炎症応答とその役割.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀直人, 高倉勇気, 町田萌香, 寺田菜摘, 野溝航太, 梶山瞭, 高野博之, 山口憲孝
2. 発表標題 自己免疫疾患関連因子VGLL3によるNF- κ B経路活性化
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀直人, 高倉勇気, 町田萌香, 寺田菜摘, 野溝航太, 梶山瞭, 高野博之, 山口憲孝
2. 発表標題 自己免疫疾患関連因子VGLL3による炎症誘導機構の解析
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川島志織, 高倉勇気, 町田萌香, 堀直人, 荒木拓郎, 寺田菜摘, 高野博之, 山口憲孝
2. 発表標題 変異Rasによるミトコンドリア電子伝達系複合体IVタンパク質を介した細胞増殖亢進機構の解析
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田菜摘, 高倉勇氣, 町田萌香, 堀直人, 荒木拓郎, 川村友博, 川島志織, 高野博之, 山口憲孝
2. 発表標題 NF- B経路活性化によるオートファジー制御機構の解析
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀直人, 高倉勇氣, 町田萌香, 寺田菜摘, 野溝航太, 梶山瞭, 高野博之, 山口憲孝
2. 発表標題 VGLL3による細胞死非依存的なIL-1 分泌を介した炎症誘導
3. 学会等名 第142回日本薬学会年会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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