

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07289

研究課題名（和文）プロテインキナーゼCシグナリングによるがん細胞の細胞死回避機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the cell death evasion mechanism of cancer cells regulated by protein kinase c signaling

研究代表者

梶本 武利 (Kajimoto, Taketoshi)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：00509953

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、癌細胞のアポトーシス抵抗性におけるスフィンゴシン1-リン酸（S1P）-非典型プロテインキナーゼC（aPKC）シグナリング制御の全容解明に向け、S1P-aPKCの下流シグナルおよびストレスとの関係を明らかにし、さらにS1P-aPKC活性化機構の構造学的分子メカニズムの解明を目指した。その結果、S1PによるaPKC活性化の新たな分子メカニズムとしてaPKCの翻訳後修飾の関与を見出し、またS1P-aPKCシグナリングの下流で働くアポトーシス関連分子として転写因子Xを同定し、さらにS1P-aPKCシグナリングによる癌細胞のアポトーシス抵抗性に関与する新たな飢餓ストレスの同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のポイントは、S1PによるaPKC活性化の分子メカニズムとして、翻訳後修飾の関与という全く新たな構造学的知見を見出した点である。本研究の成果により、アポトーシスのブレーキ役としてのS1P-aPKCシグナリングを分子レベルで制御する、新たながん治療法開発の実現に向けて新たな道筋が示された。今後は、S1P-aPKCシグナリングが転写因子Xを活性化しアポトーシスを抑制するシグナル伝達の全容解明を目指すとともに、リード化合物の創出を目指した分子標的創薬の研究を平行して推進する。

研究成果の概要（英文）：In this study, for elucidating the full extent of sphingosine 1-phosphate (S1P)-atypical protein kinase C (aPKC) signaling regulation in apoptosis resistance in cancer cells, we aimed to elucidate the downstream signals of S1P-aPKC and its relation with stress, and also clarify the structural and molecular mechanism of S1P-aPKC activation. As a result, we have got successful to find a post-translational modification of aPKC as a new molecular mechanism for S1P-induced aPKC activation and identify transcriptional factor X as an apoptosis-related molecule that acts downstream of S1P-aPKC signaling, and further identify a new starvation stress-related molecule involved in apoptosis resistance of cancer cells by S1P-aPKC signaling.

研究分野：シグナル伝達

キーワード：プロテインキナーゼC スフィンゴシン1-リン酸

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は様々な方法で死を回避する能力を獲得しており、多くの細胞が死に至るストレス環境下でも生き続けることができる。これまでの多くの抗がん剤はアポトーシスなどの細胞死を誘導するものが一般的だが、がん細胞が持つアポトーシス回避のメカニズムは多様なため、全てのがん細胞を細胞死へ導くことは難しく治療抵抗性の一因となっている。がん細胞が死を回避するブレーキ役を制御できれば、選択的で副作用の少ない分子標的薬の開発につながることから、細胞死回避のメカニズムを明らかにする研究が注目されている。

研究代表者は最近、がん細胞がアポトーシスを回避するブレーキ役となるタンパク質の同定に成功した(図1)。具体的には、がん細胞の生存に関わることが知られている細胞内シグナルタンパク質である非典型プロテインキナーゼC (aPKC) に着目し、がん細胞のアポトーシスにおける役割を検討した結果、がん細胞における aPKC の恒常的な活性化が飢餓ストレス環境下におけるアポトーシスのブレーキ役として働くことが明らかとなった。またさらにはがん細胞における aPKC の恒常的な活性化のトリガーとなる因子を探索したところ、同じくがん細胞の生存に関わることが知られている生理活性脂質スフィンゴシン1-リン酸 (S1P) が aPKC を直接活性化することを見出した。多くのがん細胞では細胞内での S1P 産生が亢進していることから、研究代表者は、がん細胞は S1P の濃度を高く保つことで aPKC の恒常的な活性化状態を形成し、aPKC の下流シグナルを働かせ続けることでアポトーシスに対する抵抗性を獲得する、という新たな細胞死抵抗性モデルを提唱した。この成果は、がん細胞の S1P-aPKC シグナリングを制御することができれば、がん細胞をアポトーシスへ導く新規分子標的抗がん剤の開発につながることを示唆している(図1)。

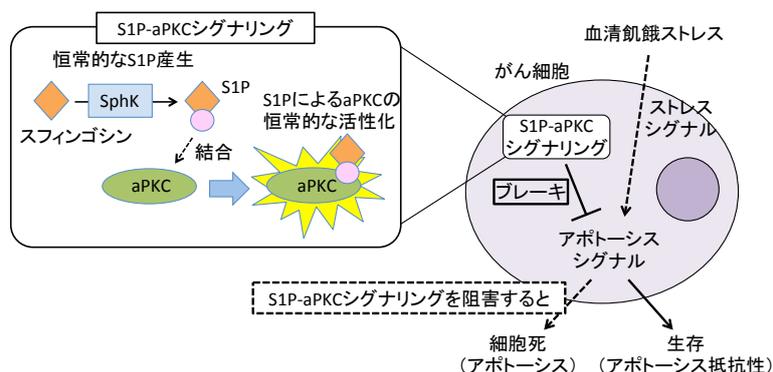


図1: S1P-aPKC シグナルによるがん細胞のアポトーシス抵抗性

2. 研究の目的

本研究課題では、アポトーシスのブレーキ役を制御する新たながん治療法の開発と社会実装に向けて、がん細胞のアポトーシス抵抗性における S1P-aPKC シグナリングの役割の詳細として S1P-aPKC の下流シグナルおよびストレスとの関係を明らかにし、さらに S1P による aPKC 活性化の分子メカニズムを構造ベース創薬に資するレベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本課題研究期間では、上記目的の達成に向け、以下の個別課題について探究した。

課題1: S1P による aPKC 活性化の分子メカニズムの解明と高解像度の立体構造情報の取得

S1P がどのようにして aPKC にアプローチし、どのような分子立体構造が S1P による aPKC の活性化に重要か、を明確にする。

課題2: がん細胞のアポトーシス抵抗性における S1P-aPKC の下流シグナルの解明

S1P による aPKC の恒常的な活性化がどのような下流シグナルを動かしアポトーシスにブ

レーキをかけるのか、つまり aPKC のターゲット基質の探索および同定を中心に研究を進める。

課題 3 : S1P-aPKC シグナリングの飢餓ストレスシグナルにおける役割の解明

がん細胞のアポトーシス抵抗性において、S1P-aPKC シグナリングがどのようなストレスシグナルに関与し、またストレスシグナル経路のどの分子に作用するのか、細胞レベルおよび *in vivo* レベルで解明する。

4. 研究成果

(1) S1P による aPKC 活性化と aPKC の翻訳後修飾との関係性を解明

S1P による aPKC の活性化において、aPKC のどのような立体構造が重要かを明らかにするために、aPKC の翻訳後修飾が S1P による aPKC の活性化に与える影響を検討した。なお、本成果は現在発表準備中の状況であるため、翻訳後修飾の詳細については割愛する。

まず、aPKC の翻訳後修飾が S1P の aPKC へのアプローチに影響を与えるか、*in silico* ドッキングシミュレーションの系を用いて立体構造学的な検証を行った。翻訳後修飾を持つ aPKC と持たない aPKC の立体構造モデルを準備し、AutoDock (タンパク質-リガンドドッキングシミュレーションソフトウェア) 上で S1P とのドッキングシミュレーションを行ったところ、翻訳後修飾を持つ aPKC は翻訳後修飾を持たない aPKC に比べて、S1P との結合力が減弱するという予測結果となった (図 2A)。そこで次に、*in silico* ドッキングシミュレーションの予測結果を実際の分子で実証するために、S1P と aPKC との結合を *in vitro* で検出するタンパク質-脂質オーバーレイアッセイ法 (PLO アッセイ法) を用いて、翻訳後修飾の S1P-aPKC 相互作用への影響を検討した。具体的には、aPKC 遺伝子のコンストラクトを HeLa 細胞にトランスフェクションし、翻訳後修飾を阻害する薬剤を処置した後、aPKC タンパク質を回収し、*in vitro* PLO アッセイにより S1P との結合能を比較した。その結果、翻訳後修飾を減弱させた aPKC の方が、より強く S1P と相互作用することが明らかとなった (図 2B)。さらに、翻訳後修飾が aPKC の活性化に与える影響を調べるために、研究代表者が過去の研究課題において開発し所有する aPKC 活性化レポーター (aCKAR) を用いて、細胞レベルでの検討を行った。aCKAR は、緑色蛍光タンパク質を用いた蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer) の原理による aPKC 選択的活性化検出レポーター (aCKAR: atypical PKC activity reporter) であり、aPKC の生細胞内での働き (キナーゼ活性) をリアルタイムに可視化する。aCKAR を発現させた HeLa 細胞に、翻訳後修飾阻害剤を前処置することで翻訳後修飾を減弱させ、aPKC の定常活性を aPKC 阻害剤 PZ09 処置後の aPKC 活性減少により検出した。aPKC 活性減少の程度が大きいほど定常活性が高いことを

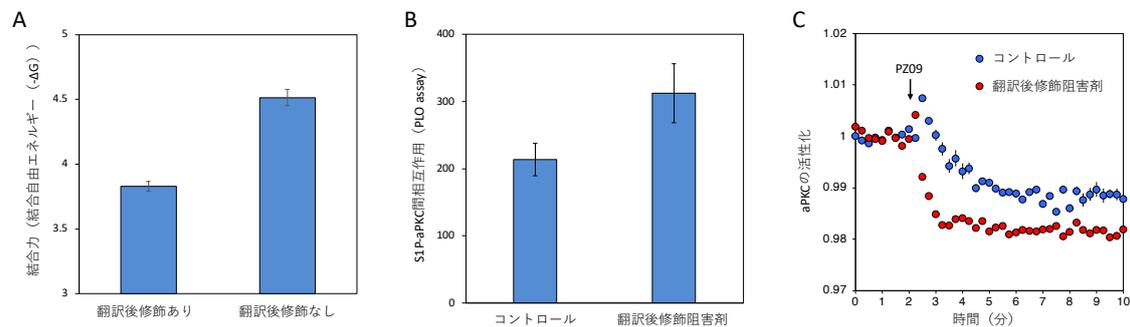


図 2 : S1P による aPKC 活性化における aPKC 翻訳後修飾の影響

- In *in silico* ドッキングシミュレーションにより、S1P と aPKC (翻訳後修飾あり) または aPKC (翻訳後修飾なし) 間の相互作用について結合自由エネルギーを計算
- aPKC を発現させた HeLa 細胞に翻訳後修飾阻害剤を処置し、aPKC を回収精製後、Protein-Lipid Overlay (PLO) Assay により S1P との結合能を測定
- aCAKR 発現 HeLa 細胞に翻訳後修飾阻害剤を処置し、ライブセル FRET イメージング下で aPKC 阻害剤 PZ09 を処置し、aPKC の定常活性を測定、縦軸 : C/Y FRET ratio

意味している。結果、翻訳後修飾を減弱させると aPKC の定常活性が有意に上昇することが明らかとなった (図 2C)。

以上の結果から、翻訳後修飾は、構造学的に S1P-aPKC の相互作用を阻害することで、S1P による aPKC の活性化を抑制する効果を持つことが示唆された。この成果は、翻訳後修飾の構造学的な制御により、S1P-aPKC シグナリングの制御が可能になることを示した点で重要である。

(2) S1P-aPKC シグナリングの制御を受けるアポトーシス関連タンパク質を同定

S1P-aPKC シグナリングの恒常的な活性化がアポトーシスにブレーキをかけるメカニズムの全容解明に向けて、S1P-aPKC 活性化の下流で働くシグナル分子の同定を試みた。なお、本成果は現在発表準備中の状況であるため、同定した転写因子の名称については、転写因子 X と略す。

本課題では、S1P-aPKC シグナリングの下流シグナルの内、最下流のシグナル分子から同定する戦略で研究を進めた。最下流のシグナル分子としては、アポトーシスを誘導あるいは抑制する転写因子が考えられるため、まず、S1P-aPKC シグナリングの下流で働くアポトーシス関連転写因子の探索を行った。その結果、転写因子 X が有望な下流シグナル分子として同定された。転写因子 X が S1P-aPKC シグナリングの下流で働くことを確認するために、転写因子 X の核移行を活性化の指標として検証を行った。具体的には、GFP を融合した転写因子 X のコンストラクトを作製し、HeLa 細胞に遺伝子導入により発現させ、S1P を産生する酵素であるスフィンゴシンキナーゼ (SphK) の阻害剤 SKI-II および aPKC の阻害剤 PZ09 の効果を検討した。その結果、SphK の阻害では約 50% の、また aPKC 阻害では 100% 近く、転写因子 X の核への移行、つまり転写因子 X の活性化が観察された (図 3A, B)。また、2 種類の aPKC (PKC ζ 、PKC ι) の内、PKC ζ に選択的な siRNA による PKC ζ 遺伝子ノックダウンの効果を検討したところ、PKC ζ のノックダウンでは、約 60% の転写因子 X の核移行が観察され、さらに外来 PKC ζ 遺伝子の発現による転写因子 X 活性化の抑制効果が観察された (図 3C)。

以上の結果から、S1P-aPKC シグナリングが下流シグナルにおいてアポトーシスに関連する転写因子の中で転写因子 X を強く活性化することが明らかとなった。この成果は、がん細

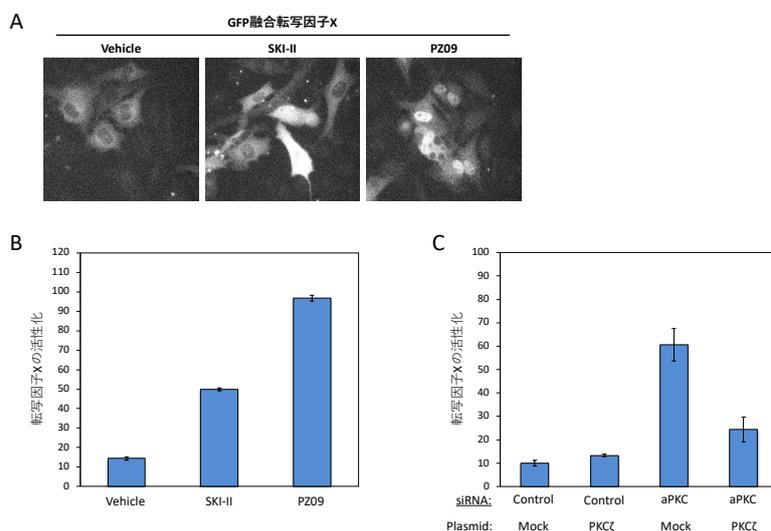


図 3：転写因子 X の活性化に対する S1P-aPKC シグナリングの関与

- HeLa 細胞に GFP 融合転写因子 X を発現させ、SphK 阻害剤 SKI-II および aPKC 阻害剤 PZ09 を処置し、細胞を固定後、共焦点レーザー顕微鏡で転写因子 X の核移行を観察
- (A) の定量結果、GFP 融合転写因子 X が核へ移行した細胞の割合を定量、縦軸：%
- HeLa 細胞に GFP 融合転写因子 X を発現させ、control siRNA、aPKC siRNA、Mock plasmid、PKC ζ plasmid をそれぞれ遺伝子導入し、細胞を固定後、共焦点レーザー顕微鏡で転写因子 X の核移行を観察し、(B) と同様に定量

胞の S1P-aPKC シグナリングによるアポトーシ回避メカニズムの全容を解明する上で大きな進展である。今後は、S1P-aPKC シグナリングの活性化から転写因子 X の活性化へ至るシグナル伝達経路について、さらなる詳細な検討が必要である。

(3) S1P-aPKC シグナリングが働くストレスシグナルを同定

がん細胞をアポトーシへ誘導するストレスシグナルは複数知られている。本課題では S1P-aPKC シグナリングが関与するストレスシグナルの同定を試みた。なお、本成果は現在発表準備中の状況であるため、同定したストレスシグナルの詳細は割愛する。

まず、aCKAR イメージングの手法を用いて、様々な飢餓ストレス刺激を行い、aPKC の定常活性を測定した。その結果、数種の飢餓ストレスが、aPKC の定常活性を有意に上昇させることが明らかとなった (図 4 A, B)。また、様々な飢餓ストレスによる癌細胞のアポトーシ誘導を試みたところ、やはり数種の飢餓ストレス刺激において癌細胞はアポトーシ抵抗性を示した。これらの飢餓ストレスは、aPKC の定常活性を上昇させたものと一致した。さらに、飢餓ストレスによる癌細胞のアポトーシ誘導における aPKC 阻害剤 PZ09 の効果を検討したところ、アポトーシ抵抗性を示す癌細胞が、aPKC の活性阻害によりアポトーシを起こすことが示された (図 4 C)。

本課題の結果から、癌細胞のアポトーシ抵抗性において aPKC が関与する飢餓ストレスが数種明らかとなった。この成果は、同定した飢餓ストレスと転写因子 X との関係性をもとに、がん細胞の S1P-aPKC シグナリングによるアポトーシ回避メカニズムの全容解明に向けた解析が可能となる点で重要である。

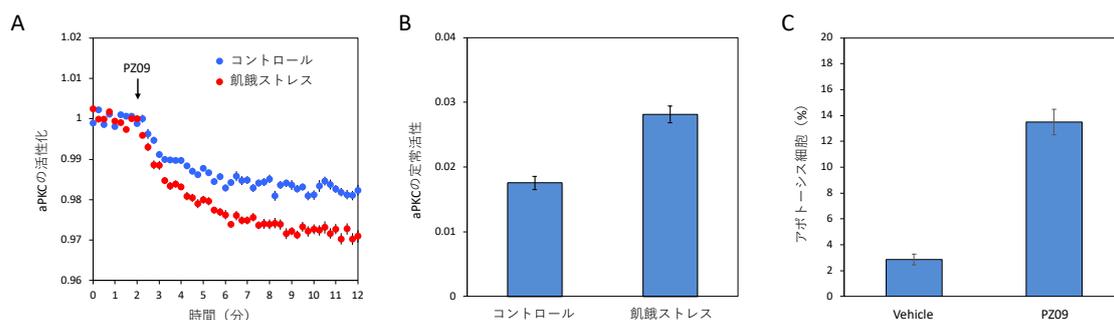


図 4： 飢餓ストレス下でのアポトーシ抵抗性における aPKC 活性の役割

- aCKAR 発現 HeLa 細胞に飢餓ストレス処置を行い、ライブセル FRET イメージング下で aPKC 阻害剤 PZ09 を処置し、aPKC の定常活性を測定、縦軸：C/Y FRET ratio
- (A) の定量結果、10-12min/1-2min 比
- HeLa 細胞に飢餓ストレス処置を行い、さらに aPKC 阻害剤 PZ09 処置を行い、細胞を回収・固定後、アポトーシアッセイキットによりアポトーシ細胞を検出し、アポトーシ細胞の割合を定量

本研究課題を通して、S1P による aPKC 活性化の分子構造レベルのメカニズムとして、aPKC の翻訳後修飾の関与を見出し、また S1P-aPKC シグナリングの下流で働くアポトーシ関連シグナル伝達分子として転写因子 X を同定し、さらに S1P-aPKC シグナリングによるアポトーシ抵抗性に関係する新たな飢餓ストレスシグナルを同定した。本研究の成果により、アポトーシのブレーキ役としての S1P-aPKC シグナリングを分子レベルで制御する新たながん治療法開発への道筋が示された。今後は、本研究成果を応用した、アポトーシのブレーキを外す新たなタイプの抗がん剤の構造ベース創薬の実現へ向けて、S1P-aPKC シグナリングが転写因子 X を活性化しアポトーシを抑制するシグナル伝達の全容解明を目指すとともに、リード化合物の創出を目指した分子標的創薬の研究を平行して推進する。

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 T. Okada, S. Nishida, L. Zhang, N.N. Mohamed, T. Wang, T. Ijuin, T. Kajimoto, S. Nakamura	4. 巻 24
2. 論文標題 Constitutive activation of S1P receptors at the trans-Golgi network is required for surface transport carrier formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.103351	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
1. 著者名 Narasaki Soshi, Noguchi Soma, Urabe Tomoaki, Harada Kana, Hide Izumi, Tanaka Shigeru, Yanase Yuhki, Kajimoto Taketoshi, Uchida Kazue, Tsutsumi Yasuo M., Sakai Norio	4. 巻 955
2. 論文標題 Identification of protein kinase C domains involved in its translocation induced by propofol	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 175806 ~ 175806
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2023.175806	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 Noguchi Soma, Kajimoto Taketoshi, Kumamoto Takuya, Shingai Masashi, Narasaki Soshi, Urabe Tomoaki, Imamura Serika, Harada Kana, Hide Izumi, Tanaka Sigeru, Yanase Yuhki, Nakamura Shun-ichi, Tsutsumi Yasuo M., Sakai Norio	4. 巻 14
2. 論文標題 Features and mechanisms of propofol-induced protein kinase C (PKC) translocation and activation in living cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1284586 ~ 1284586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2023.1284586	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 Nishida Susumu, Matovelo Shubi Ambwene, Kajimoto Taketoshi, Nakamura Shun ichi, Okada Taro	4. 巻 29
2. 論文標題 Extracellular α -synuclein impairs sphingosine 1-phosphate receptor type 3 (S1PR3)-regulated lysosomal delivery of cathepsin D in HeLa cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 207 ~ 216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13093	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 梶本 武利
2. 発表標題 プロテインキナーゼC活性イメージングが明らかにするアポトーシス抵抗性の新たな分子メカニズム
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（シンポジウム）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梶本 武利
2. 発表標題 スフィンゴシン1-リン酸シグナリングによる エクソソーム積荷ローディング
3. 学会等名 第二回数理AIと生物医学の両方を理解できる若手の会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kajimoto Taketoshi
2. 発表標題 A novel molecular mechanism of evasion of apoptotic cell death regulated by S1P-atypical PKC signaling
3. 学会等名 The 41st Sapporo International Cancer Symposium（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梶本 武利、キャリマン アリシャ、トバイアス アイリーン、岡田 太郎、パイロ ケイラ、ヴァン アンジェラ、マキャモン アンドリュー、中村 俊一、ニュートン アレキサンドラ
2. 発表標題 S1P-aPKCシグナルが制御するアポトーシス抵抗性の新たな分子メカニズム
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023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		
米国	University of California San Diego		