

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02675

研究課題名(和文) 同一刺激に対するARF6-AMAP1経路依存的ケモカイン発現転換の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular basis of ARF6-AMAP1 pathway-dependent chemokine expression switch in response to the same stimulus

研究代表者

佐邊 壽孝 (Sabe, Hisataka)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・客員教授

研究者番号：40187282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間充織形質転換等に連動して細胞運動性を制御するARF6-AMAP1経路の活性制御は、異なる種類のケモカインを発現することを見出した。本研究では、『ある種の細胞は、ARF6-AMAP1経路にตอบสนองして、同一刺激に対し発現するケモカインの種類を炎症促進性から抗炎症性へと変換することができる』と仮説立て、分子的詳細と生物学的意義を明らかにすることを目的とした。我々は、抗炎症性ケモカイン発現に関わる主な転写因子を同定し、ARF6-AMAP1経路と相まって制御されること、その制御に張力応答を担う因子が関与することを見出し、本経路は微小環境張力にตอบสนองしてケモカインの種類を変換している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、EMT癌細胞におけるケモカイン発現はIFN γ などの刺激のみに制御されるのではなく、同一細胞が同一刺激に対して、炎症促進性と抗炎症性のケモカイン発現を仕分けることを見出した。その機序として、幾つかの転写因子の核内移行や核内存在量・活性は、IFN γ 刺激とARF6-AMAP1経路の活性化・不活性化とが相まって制御されている可能性を示した。これらの知見は、EMTを起こしていない上皮細胞などでは、刺激にตอบสนองして炎症促進的ケモカインを発現することがdefault状態であることが推察され、未知の細胞可塑性や遺伝子発現制御の新しい概念を提供し、生物学・医学の発展に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The regulation of the activity of the ARF6-AMAP1 pathway, which controls cell motility in conjunction with epithelial-mesenchymal transition (EMT) and other processes, was found to induce the expression of different types of chemokines. This study aimed to hypothesize that certain cells can switch the types of chemokines expressed in response to the ARF6-AMAP1 pathway from pro-inflammatory to anti-inflammatory in nature upon exposure to the same stimulus, and to elucidate the molecular details and biological significance. We identified key transcription factors responsible for inducing anti-inflammatory chemokines, which are controlled in conjunction with the ARF6-AMAP1 pathway and involve factors responsive to mechanical tension. Our findings suggest that ARF6-AMAP1 pathway may convert the types of chemokines in response to microenvironmental mechanical tension.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ARF6 AMAP1 癌悪性度進展 癌免疫回避 ケモカイン 癌微小環境 腫瘍浸潤細胞

1. 研究開始当初の背景

私達は一貫して、ARF-GTPase を解析の軸として細胞接着・運動や癌細胞の浸潤・転移、悪性度進展に関する研究を行ってきた。これまでに、上皮間充織形質転換 (EMT) 等に連動して細胞運動性・接着性を制御する『ARF6-AMAP1 経路』を明らかにしている。癌の悪性度進展や治療抵抗性の根本の一端はその免疫回避に起因する。これまでに、膀胱癌細胞を用いた解析から、ARF6-AMAP1 経路が膀胱癌の免疫回避に大きく関与することを示す結果を得た (PNAS 2019, 116: 17450)。ARF6-AMAP1 経路はインテグリンのリサイクリングと細胞表面発現を促進することを見出していたが (J. Cell Biol. 2012, 197: 983)、PD-L1 でも同様であった (PNAS 2019, 116: 17450)。しかし、免疫回避には様々な要因が関与することは分かっており、PD-L1 制御だけで本経路による癌免疫回避促進を説明出来るとは思われなかった。研究を進めたところ、EMT を起こし ARF6-AMAP1 経路を高発現する癌細胞では、本経路の活性化・不活性化に応答して異なった種類のケモカイン類を発現することを見出した。ケモカインには多くの種類があるが、分類の一つとして『炎症促進性』と『抗炎症性』とに大別できる。炎症促進性サイトカインは免疫監視を促進し、抗炎症性サイトカインは免疫抑制や免疫回避を促進する。解析を進めたところ、EMT を起こした癌細胞が、インターフェロンガンマ (IFN γ) 刺激に対し、ARF6-AMAP1 経路不活性化時には主に炎症促進性ケモカインを発現し、ARF6-AMAP1 経路を活性化すると炎症促進性ケモカイン発現は抑制され、抗炎症性ケモカインを多く発現するようになることを見出した。これらのことから、ARF6-AMAP1 経路とケモカイン発現制御に関する分子的詳細を解析することにより、ケモカイン発現制御に関する新しい概念を見出すことが出来るのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究では、『ある種の細胞は、ARF6-AMAP1 経路活性化に応答して、IFN γ など同一刺激に対し発現するケモカインの種類を炎症促進性から抗炎症性へと変換することができる』と仮説立て、分子的詳細と生物学的意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、マウスKPC癌細胞 (Cancer Cell 2005, 7:469) とヒト癌細胞MIAPaCa-2を用いて解析を行う。KPC細胞は遺伝的背景が明確であり (LSL-Kras(G12D/+); LSL-Trp53(R172H/+)); Pdx-1-Cre)、ARF6とAMAP1を高発現し浸潤や免疫回避に用いていることを明らかにしている (PNAS 2019,116:17450)。サイトカイン刺激としてはIFN γ を用いた。ARF6活性化には血小板由来増殖因子 (PDGF) を用い、shAMAP1 plasmidを発現させることによってARF6-AMAP1経路阻害とした。これらは既に論文報告している (PNAS 2019,116:17450)。条件を揃えるため、shAMAP1細胞に対してもIFN γ とPDGF両方で刺激を行い、解析を行った。

4. 研究成果

(1) ARF6-AMAP1 経路活性時に抗炎症性サイトカインを発現させる分子機構の解析

KPC 細胞を用いた RNA-seq 解析より、shAMAP1 を導入した KPC 細胞において、幾つかの抗炎症性サイトカインをコードする mRNA 群の発現が著しく減少していることを見出した (10 倍以上の変化を示すものもあった)。これらの細胞を 24 時間 starvation した後、IFN γ +PDGF で刺激し、その後、細胞核を粗精製し、質量分析を行い、各転写因子の核内存在量をリスト化した。その結果、特定の転写因子 X が親細胞において刺激応答性に抗炎症性サイトカインを発現させる主な転写因子の一つであるこ

とを見出した。転写因子 X は、ARF6-AMAP1 経路の活性化に応じて核に移行することを確認した。引き続き、細胞による周囲環境 stiffness 感知が遺伝子発現制御に関与することから、細胞力学制御との関連を検討した。ARF6-AMAP1 経路はインテグリンやカドヘリン動態を制御することから、stiffness 感知の一要素でもある。その結果、stiffness 感知の制御において中心的役割を担う因子が ARF6-AMAP1 経路及び転写因子 X と関連していることを見出した。現在、細胞接着や stiffness に応答した ARF6-AMAP1 経路とケモカイン発現制御との関連の解析を進めている。

- (2) ARF6-AMAP1 経路不活性時に炎症促進性サイトカインを発現させる分子機構の解析
- KPC 細胞を用いた RNA-seq 解析より、shAMAP1 を導入した KPC 細胞において、炎症促進性サイトカインをコードする mRNA 群の発現が上昇していることを見出した（抗炎症性サイトカインと同じく、発現する炎症促進性サイトカインも複数種であった）。まず、関与する転写因子の同定を試みた。刺激応答性であり AMAP1 あるなしに相関して核内存在量が有意に変化するものを検討し、候補因子 X 及び Y を見出した。特に、候補因子 Y は炎症促進性サイトカインのプロモータ領域に予測される結合サイトがあることが分かった。また、候補因子 Y は、近隣 enhancer と遠位 enhancer との活性の制御を介して遺伝子発現を調節し、周囲環境リモデリングすることが示されている。さらに、興味深いことに、stiffness 感知の制御において中心的役割を担う因子と候補因子 Y が相互作用していることも報告されている。現在、ARF6-AMAP1 経路及び候補因子 Y がどのような機序を介して核に移行し、ケモカイン発現制御に関与しているのか、また細胞接着や stiffness に応答した ARF6-AMAP1 経路とケモカイン発現制御との関連の解析を進めている。

- (3) ARF6-AMAP1 経路活性に応答したサイトカイン転換の分子機構の解明

ARF6-AMAP1 経路の活性化・不活性化に応答して、同一細胞が二律背反的なサイトカイン類の発現をどのように仕分けるのかに関し、ARF6-AMAP1 経路の活性化に応じて候補因子 X および Y が、stiffness 感知に関与する因子と連携して核移行していることを見出した。このことは、ARF6-AMAP1 経路は微小環境張力に応答してケモカインの種類を変換している可能性を示唆している。さらなる分子的詳細に関し、細胞内動態を中心に解析を進めている。必要に応じて、候補因子 X 及び Y に結合する因子を網羅的に解析するために、質量分析およびシングルセル RNA シークエンス解析による遺伝子発現プロファイル解析の準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Sabe Hisataka	4. 巻 21
2. 論文標題 KRAS, MYC, and ARF6: inseparable relationships cooperatively promote cancer malignancy and immune evasion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12964-023-01130-3	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 Shirakawa Ryosuke, Nakajima Takayuki, Yoshimura Aya, Kawahara Yukako, Orito Chieko, Yamane Miwako, Handa Haruka, Takada Shingo, Furihata Takaaki, Fukushima Arata, Ishimori Naoki, Nakagawa Masao, Yokota Isao, Sabe Hisataka, Hashino Satoshi, Kinugawa Shintaro, Yokota Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Enhanced mitochondrial oxidative metabolism in peripheral blood mononuclear cells is associated with fatty liver in obese young adults	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-32549-w	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 Takada Shingo, Maekawa Satoshi, Furihata Takaaki, Kakutani Naoya, Setoyama Daiki, Ueda Koji, Nambu Hideo, Hagiwara Hikaru, Handa Haruka, Fumoto Yoshizuki, Hata Soichiro, Masunaga Tomoka, Fukushima Arata, Yokota Takashi, Kang Dongchon, Kinugawa Shintaro, Sabe Hisataka	4. 巻 119
2. 論文標題 Succinyl-CoA-based energy metabolism dysfunction in chronic heart failure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2203628119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2203628119	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 Takada Shingo, Sabe Hisataka, Kinugawa Shintaro	4. 巻 322
2. 論文標題 Treatments for skeletal muscle abnormalities in heart failure: sodium-glucose transporter 2 and ketone bodies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H117 ~ H128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpheart.00100.2021	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 Takada Shingo, Kinugawa Shintaro, Handa Haruka, Yokota Takashi, Sabe Hisataka	4. 巻 12
2. 論文標題 Cross-disease communication between cancer and heart failure provides a rational approach to prevention and treatment of both diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 1006322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2022.1006322	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 Horikawa Mei, Sabe Hisataka, Onodera Yasuhito	4. 巻 582
2. 論文標題 Strategies for all-at-once and stepwise selection of cells with multiple genetic manipulations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 93 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.10.016	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 Hashimoto Ari, Handa Haruka, Hata Soichiro, Tsutaho Akio, Yoshida Takao, Hirano Satoshi, Hashimoto Shigeru, Sabe Hisataka	4. 巻 19
2. 論文標題 Inhibition of mutant KRAS-driven overexpression of ARF6 and MYC by an eIF4A inhibitor drug improves the effects of anti-PD-1 immunotherapy for pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12964-021-00733-y	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 Horikawa Mei, Sabe Hisataka, Onodera Yasuhito	4. 巻 15
2. 論文標題 Dual roles of AMAP1 in the transcriptional regulation and intracellular trafficking of carbonic anhydrase IX	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101258 ~ 101258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2021.101258	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 Parajuli Gyanu, Tekguc Murat, Wing James B., Hashimoto Ari, Okuzaki Daisuke, Hirata Takeshi, Sasaki Atsushi, Itokazu Takahide, Handa Haruka, Sugino Hirokazu, Nishikawa Yoshihiro, Metwally Hozaifa, Kodama Yuzo, Tanaka Shinya, Sabe Hisataka, Yamashita Toshihide, Sakaguchi Shimon, Kishimoto Tadimitsu, Hashimoto Shigeru	4. 巻 9
2. 論文標題 Arid5a Promotes Immune Evasion by Augmenting Tryptophan Metabolism and Chemokine Expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 862 ~ 876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-21-0014	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13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ari Hashimoto, Haruka Handa, Soichiro Hata, Daisuke Okuzaki, Yoshizuki Fumoto, Akio Tsutaho, Yoshihiro Nishikawa, Yuzo Kodama, Satoshi Hirano, Shigeru Hashimoto, and Hisataka Sabe
2. 発表標題 ARF6-AMAP1 pathway is linked to induction of immunosuppressive chemokine expression for favor immune evasion
3. 学会等名 第82回日本癌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 半田悠, 小野寺康仁, 高田真吾, 横田卓, 佐邊壽孝
2. 発表標題 上皮間葉転換におけるミトコンドリア機能制御機構
3. 学会等名 第22回ミトコンドリア学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 半田悠, 小野寺康仁, 高田真吾, 横田卓, 佐邊壽孝
2. 発表標題 上皮間葉転換におけるmi toNEETの働き
3. 学会等名 第96回日本生化学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 半田悠, 佐邊壽孝
2. 発表標題 上皮間葉転換における酸化的リン酸化の制御機構
3. 学会等名 第13回シグナルネットワーク研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Soichiro Hata, Ari Hashimoto, Haruka Handa, Akio Tsutaho, Takao Yoshida, Yasuhito Onodera, Satoshi Hirano, Masahiro Sonoshita, Shigeru Hashimoto, and Hisataka Sabe
2. 発表標題 Arf6, the evolutionarily oldest G protein, is at the core of driving malignancy and immune evasion of pancreatic cancer cells
3. 学会等名 The 7th JCA-AACR Special Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsukasa Oikawa, Junya Hasegawa, Naomi Ohnishi, Yasuhito Onodera, Ari Hashimoto, Junko Sasaki, Takehiko Sasaki, Koji Ueda and Hisataka Sabe
2. 発表標題 p53 は核脂質を調節しヒストンH3.1の核内侵入に影響を与える
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 半田 悠、佐邊 壽孝、高田 真吾
2. 発表標題 上皮間葉転換(EMT)でミトコンドリア機能や動態はどう関わっているのか
3. 学会等名 第95回日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsukasa Oikawa, Junya Hasegawa, Naomi Ohnishi, Yasuhito Onodera, Ari Hashimoto, Junko Sasaki, Takehiko Sasaki, Koji Ueda and Hisataka Sabe
2. 発表標題 p53 modulates nuclear lipid composition and affects the nuclear entry of histone H3.1
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshizuki Fumoto, Shingo Takada, Yasuhito Onodera, Kyogo Kawaguchi, Shigetsugu Hatakeyama, Hisataka Sabe, Tsukasa Oikawa
2. 発表標題 Macroscopic order formation in myoblast populations driven by intracellular molecular dynamics
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruka Handa, Shingo Takada, Yasuhito Onodera, Yoshizuki Fumoto, Tsukasa Oikawa, Ari Hashimoto, Takashi Yokota, Soichiro Hata, and Hisataka Sabe
2. 発表標題 Mitochondria after epithelial-mesenchymal transition (EMT) ~ their function and dynamics ~
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shingo Takada, Shintaro Kinugawa, Hisataka Sabe
2. 発表標題 Mitochondrial metabolic reprogramming in infarction-associated failing hearts
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ari Hashimoto, Haruka Handa, Soichiro Hata, Akio Tsutaho, Takao Yoshida, Satoshi Hirano, Shigeru Hashimoto, and Hisataka Sabe
2. 発表標題 Blocking the ARF6-AMAP1 pathway cooperatively improves anti-PD-1 immunotherapy for pancreatic cancer
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 Shigeru Hashimoto, Ari Hashimoto, Shotaro Furukawa, Akio Tsutaho, Yasuhito Onnoder, Yutaro Otsuka, Haruka Handa, Tsukasa Oikawa, Soichiro Hata, Akira Fukao, Yusuke Mizukami, Masaaki Murakami, Toshinobu Fujiwara, Satoshi Hirano, and Hisataka Sabe
2. 発表標題 Pancreatic KRAS/TP53 mutations promote ARF6-based immune evasion via activating mRNA translation and protein prenylation
3. 学会等名 第7回北大部局横断シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 心不全の病態の評価のための方法、バイオマーカー、候補化合物の評価方法、医薬品組成物及び心不全の治療剤	発明者 高田真吾、前川聡、横田卓、白川亮介、佐邊壽孝	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許第7430916号	取得年 2024年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------