

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07146

研究課題名（和文）卵巣がんにおけるリン酸エクスポーターXPR1の機能解析

研究課題名（英文）Study of the Phosphate Exporter XPR1 function in Ovarian Cancer

研究代表者

林 寛敦（Hayashi, Tomoatsu）

東京大学・定量生命科学研究所・特任助教

研究者番号：30583215

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）：本研究では、卵巣明細胞がん細胞においてXPR1の発現を抑制すると顕著に増殖が抑制されること、さらには、XPR1の発現を恒常的に抑制したがん細胞を免疫不全マウスに移植すると、造腫瘍能の低下が認められることを見出し、論文として報告した。また、XPR1の阻害による細胞死誘導の分子機構の解明を進め、XPR1を阻害すると細胞内のリン量が増加して酸化ストレスが亢進すること、NFκBシグナルが活性化することを明らかにした。さらに、XPR1の発現を抑制した時のメタボローム解析を行い、酸化ストレス応答に重要な特定のシグナル伝達経路の代謝産物が有意に増加することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣がんは、欧米においては80%近くが漿液性卵巣がんなのに対して、日本を含む東アジア圏では卵巣明細胞がんが約30%と高い割合を占める。また、卵巣明細胞がんは、腫瘍内の不均一性が高く化学療法に対しても抵抗性を有する。私たちはリンの排出を制御するXPR1が卵巣明細胞がんに対して有用な治療標的分子であることを報告した。また、XPR1は卵巣がんをはじめ様々ながんで発現が亢進しており、卵巣がんのみならず様々ながんにおける有望な治療標的分子となる可能性がある。引き続き、XPR1の機能解析および創薬研究を進めることで、卵巣明細胞がんの発がん機構の分子基盤の解明および画期的な新薬の創製が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we reported in a paper (Akasu-Nagayoshi et al., Cancer Sci, 2022) that suppression of XPR1 expression in ovarian clear cell carcinoma (OCCC) cells significantly inhibits their proliferation. Furthermore, we found that OCCC cells with constitutively suppressed XPR1 expression exhibit a marked reduction in tumorigenicity when transplanted into immunodeficient mice. In addition, we investigated the molecular mechanism of cell death induction by XPR1 inhibition and revealed that inhibiting XPR1 increases intracellular phosphorus levels, enhances oxidative stress, and activates the NFκB signaling pathway. Moreover, we conducted a metabolomic analysis upon suppression of XPR1 expression in OCCC cells and found a significant increase in the metabolites of specific signaling pathways important for oxidative stress response.

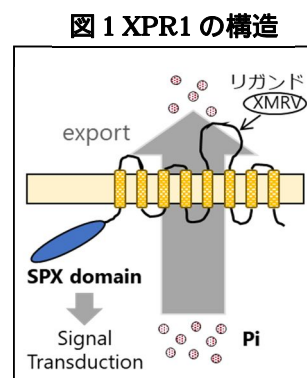
研究分野：腫瘍生物学

キーワード：XPR1 Phosphate transporter 卵巣がん 卵巣明細胞がん Apoptosis

1. 研究開始当初の背景

XPR1 (Xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1)は全長 696 アミノ酸からなる 8 回膜貫通タンパク質で、リン酸の排出を制御しており(図 1) XPR1 のゲノム変異は、リン酸排出異常によるリン酸カルシウムの蓄積によって原発性家族性脳石灰化症の原因となることが報告されている (Nat Genet. 47: 579-581, 2015)。リガンドとしては XMRV (Xenotropic murine leukemia virus-related virus) が報告されているが、ヒトの内在性リガンドは不明である。XPR1 の N 末に存在する SPX (SYG1/Pho81/XPR1)ドメインが下流シグナルの伝達やリン酸の排出における中心的な役割を担っている (Science. 352: 986-990, 2016)。がんに関連した XPR1 の機能としては、リガンド刺激によって SPX ドメインに 3 量体 G タンパク質が結合して cAMP を介したシグナル伝達経路 (cAMP-PKA) を制御していること (J Virol. 86: 1661-1669, 2012)、制御機構は不明であるが NF- κ B シグナルを制御すること (J Exp Clin Cancer Res. 8: 167, 2019) が報告されている。

生体におけるリンの恒常性の維持機構については、FGF23 (Nat Rev Endocrinol. 8: 276-286, 2012) や Klotho (Curr Opin Nephrol Hypertens. 21: 362-368, 2012) といった重要な因子が見いだされ、血中のリン濃度の増大によって慢性炎症や個体老化が誘導されることが明らかにされているが、この血中リン濃度の制御はリン酸のトランスポーターの中でも SLC34 ファミリーやリン酸インポーターである SLC20A1、SLC20A2 を中心に研究されており、リン酸エクスポーター XPR1 の役割については明確でない。本研究では、XPR1 の機能解析を足掛かりに、「リンの恒常性とがん」という新たな視点からがんの分子基盤を理解しようとする中で、新しいがん治療戦略の発見につながることを期待される。



2. 研究の目的

卵巣明細胞がんは多様性に富み治療抵抗性が高いため予後不良である。そのため、新たな治療方法の開発が求められている。私たちは卵巣明細胞がん細胞株に対する Cas9 スクリーニングにより、リン酸トランスポーター XPR1 が、正常卵巣上皮細胞の増殖には必要ないが、がん細胞の増殖には必須であることを見出した。XPR1 は、リガンド依存的に下流のシグナル伝達経路を調節し様々な生理機能を制御するだけでなく、ヒトで唯一のリン酸エクスポーターであることからリンの恒常性の維持にも寄与していると考えられる。リンは生体で必須の栄養素である一方で、血中のリン濃度の増加は慢性炎症や早期老化といった表現型に寄与することが知られている。しかし、これまでに増殖、転移や浸潤といったがんの特性とリンの恒常性との関連性に着目した研究はなされていない。そこで本研究では、がんにおける XPR1 の機能を明らかにすることで、リンの恒常性維持のがんにおける生理的機能およびその意義を解明する足掛かりを得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) XPR1 の下流シグナルの探索

XPR1 の下流シグナルを同定するために、卵巣明細胞がん細胞株 (OVI5E、TOV21G、ES2、JHOC5) において XPR1 の発現を抑制した時の遺伝子発現変動を RNA-seq によって解析する。RNA-seq のデータ量は 2,000 万リード/sample で取得し、発現変動遺伝子は edgeR を用いて Likelihood Ratio Test (LRT) にて検出する。また、GSEA を行い、シグナル伝達経路の変動を確認する。

また、XPR1 はリンの排出を制御すると考えられるため、卵巣明細胞がん細胞株において XPR1 の発現を抑制した時の細胞内のリン量を測定する。リンの測定には Malachite Green Phosphate Assay Kit (R&D systems) を用いる。

さらに、卵巣明細胞がん細胞株 (OVI5E) で XPR1 の発現を抑制した時の細胞内の代謝物の変動を質量分析法によって解析し、XPR1 の下流シグナルを推定する。

(2) 卵巣がん以外のがん種における XPR1 の治療標的分子としての可能性の探索

TCGA および GTEx のデータを用いて正常組織と比べてがん組織において XPR1 の発現が高いがん腫を同定する。さらに、様々ながん腫の細胞株を用いて XPR1 の発現を抑

制した時のがん細胞の増殖の変化を検討する。増殖アッセイには、Cell Titer Glo (Promega)を用いる。

4. 研究成果

(1) XPR1 の下流シグナルの探索

卵巣明細胞がん細胞株 (OVISE、TOV21G、ES2、JHOC5) において XPR1 の発現を抑制した時の遺伝子発現変動を RNA-seq によって解析したところ、いずれの細胞においても p53 経路が活性化していることが明らかになった。また、酸化ストレスに応答する遺伝子の発現の増加が観察された。このことから、XPR1 の発現を抑制すると p53 依存的なアポトーシスの誘導と細胞内における酸化ストレスの上昇が示唆された (図 2)。さらに詳細な解析をしたところ、XPR1 は p53 依存的な細胞死誘導のみならず、p53 非依存的にも細胞死を誘導することが明らかになった。

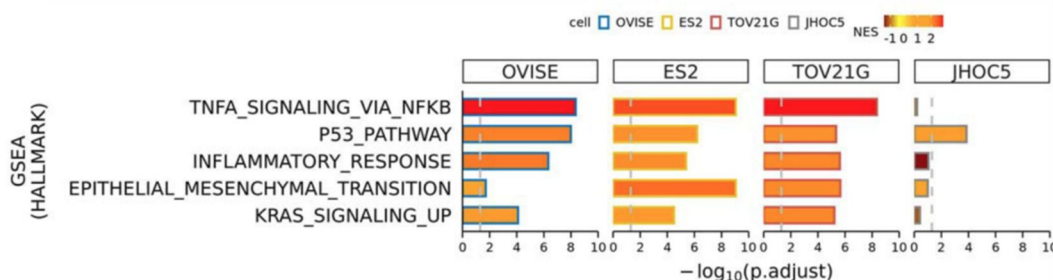


図2 RNA-seq解析によるXPR1の下流シグナルの推定

卵巣癌明細胞がん細胞においてXPR1の発現を抑制した時のGSEAの結果 (siXPR1/siControl)

卵巣明細胞がん細胞株 (OVISE、ES2) において XPR1 の発現を抑制した時の細胞内リン量を測定したところ、OVISE 細胞、ES2 細胞いずれにおいても XPR1 の発現を抑制すると細胞内リン量が増加することが明らかになった (図 3)。

また、XPR1 の発現を抑制した OVISE 細胞をメタローム解析に供したところ、酸化ストレスに応答するシグナル伝達経路の代謝産物が有意に増加していることが明らかになった。

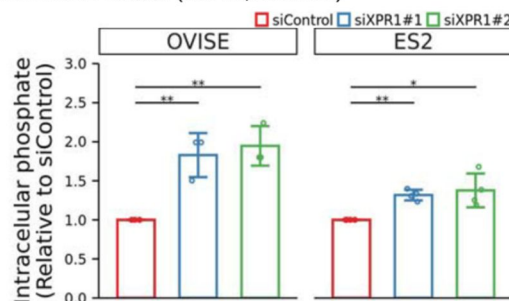


図3 XPR1の発現を抑制した時の細胞内リン量の変化
卵巣癌明細胞がん細胞 (OVISE細胞、ES2細胞) においてXPR1の発現を抑制した時の細胞内リン量をMalachite Green assayにて測定した。

(2) 卵巣がん以外のがん腫における XPR1 の治療標的分子としての可能性の探索

XPR1 のがん組織と正常組織における発現量をがん腫ごとに比較した。データは、UCSC Xena (<https://Xena.ucsc.edu/>) のTCGA-GTEX dataset を用いた。その結果、卵巣がんのみならず肺がん (上皮がん、扁平上皮) や膵がんなどの多くのがん腫で XPR1 の発現が亢進していることが明らかになった (図 4)。

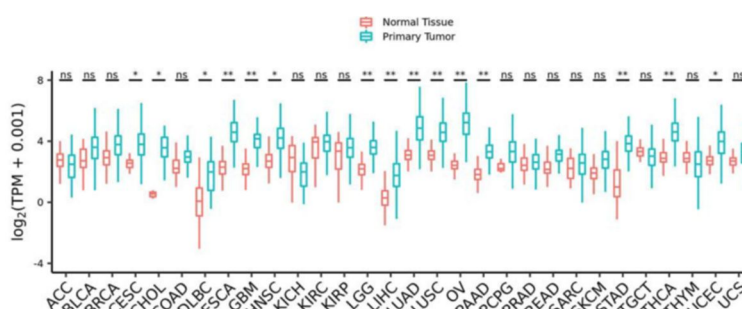


図4 がん組織とその正常組織におけるXPR1の発現量
UCSCのXenaが提供するTCGA-GTEX datasetを用いて解析した

さらに、いくつかのがん腫のがん培養細胞において XPR1 の発現を抑制した時の増殖抑制効果を確認したところ、卵巣明細胞がんに加えて、子宮頸がん (Hela)、腎がん (786O)、肺がん (H1299)、膵がん (PK1) において有意な増殖抑制効果が認められた。

上記の結果から、XPR1 は卵巣がんのみならず肺がん、膵がんなど幅広いがん腫において新規の治療標的分子となることが示唆された。今後、XPR1 に対する抗体医薬品などの創薬研究を進めることで、画期的な新薬の創出につながるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Taniue Kenzui, Oda Takeaki, Hayashi Tomoatsu, Kamoshida Yuki, Takeda Yasuko, Sugawara Anzu, Shimoura Yuki, Negishi Lumi, Nagashima Takeshi, Okada-Hatakeyama Mariko, Kawamura Yoshifumi, Goshima Naoki, Akimitsu Nobuyoshi, Akiyama Tetsu	4. 巻 2
2. 論文標題 LncRNA ZNNT1 induces p53 degradation by interfering with the interaction between p53 and the SART3-USP15 complex	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 gad220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgad220	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 Kawabata Ayako, Hayashi Tomoatsu, Akasu-Nagayoshi Yoko, Yamada Ai, Shimizu Naomi, Yokota Naoko, Nakato Ryuichiro, Shirahige Katsuhiko, Okamoto Aikou, Akiyama Tetsu	4. 巻 44
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 Screening for Identification of Genes Required for the Growth of Ovarian Clear Cell Carcinoma Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1587 ~ 1596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cimb44040108	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 Akasu Nagayoshi Yoko, Hayashi Tomoatsu, Kawabata Ayako, Shimizu Naomi, Yamada Ai, Yokota Naoko, Nakato Ryuichiro, Shirahige Katsuhiko, Okamoto Aikou, Akiyama Tetsu	4. 巻 113
2. 論文標題 PHOSPHATE exporter XPR1/SLC53A1 is required for the tumorigenicity of epithelial ovarian cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2034 ~ 2043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15358	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 Matsuura Ken, Kobayashi Shizuka, Konno Kohtarou, Yamasaki Miwako, Horiuchi Takahiro, Senda Takao, Hayashi Tomoatsu, (他11名), Manabe Toshiya, Akiyama Tetsu	4. 巻 42
2. 論文標題 SIPA1L1/SPAR1 Interacts with the Neurabin Family of Proteins and is Involved in GPCR Signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2448 ~ 2473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0569-21.2022	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 Cona Brandon, Hayashi Tomoatsu, Yamada Ai, Shimizu Naomi, Yokota Naoko, Nakato Ryuichiro, Shirahige Katsuhiko, Akiyama Tetsu	4. 巻 12
2. 論文標題 The splicing factor DHX38/PRP16 is required for ovarian clear cell carcinoma tumorigenesis, as revealed by a CRISPR Cas9 screen	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 582 ~ 593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13358	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 Nakajima Natsu, Hayashi Tomoatsu, Fujiki Katsunori, Shirahige Katsuhiko, Akiyama Tetsu, Akutsu Tatsuya, Nakato Ryuichiro	4. 巻 49
2. 論文標題 Codependency and mutual exclusivity for gene community detection from sparse single-cell transcriptome data	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e104 ~ e104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab601	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 -

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tomoatsu Hayashi, Yoko Akasu-Nagayoshi, Ayako Kawabata, Aikou Okamoto and Tetsu Akiyama.
2. 発表標題 Identification and analysis of genes required for the growth of ovarian cancer cells by CRISPR/Cas9 screening
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 寛敦
2. 発表標題 CRISPR/Cas9スクリーニングによる卵巣明細胞がんに対する新規治療的分子の同定
3. 学会等名 第21回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 寛敦、川畑 絢子、藤木 克則、中戸 隆一郎、白髭 克彦、岡本 愛光、秋山 徹
2. 発表標題 1細胞発現解析による卵巣がんの多様性の理解
3. 学会等名 第4回がん三次元培養研究会
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
---------	---------