

13 - 22 脂質によるがん制御に関する研究

主任研究者 国立感染症研究所 西島正弘

研究成果の要旨

(1) エキソソームのプロテオーム解析を行い、アクチンとMHC-class IIが存在することを明らかにした。(2) LPA₃ 選択的アゴニスト (T13 と XY-17) とアンタゴニスト (T14) を開発した。アンタゴニストに関しては今後の合成展開により活性を強める必要がある。(3) LPA 受容体 LPA₃ は着床に関与することが分かった。受精卵の着床過程は癌の浸潤過程との共通点が多い。よって、LPA₃ は癌の浸潤に関与する可能性がある。(4) セラミド量の制御機構として、GCS 以外のセラミド代謝酵素であるスフィンゴミエリン合成酵素 (SMS) の遺伝子クローニングとその病態的意義について検討した。(5) がん抑制因子 PTEN の制御因子 PICT-1 の機能損失が、PTEN の機能損失を介して細胞増殖能亢進などの細胞形質の変化を惹起することを見いだした。

研究者氏名および所属施設

| 研究者氏名 | 所属施設および職名 | 分担研究課題 |
|-------|---|--|
| 西島 正弘 | 国立感染症研究所 部長 | エキソソームの性状解析とがんワクチン製造への応用 |
| 井上 圭三 | 帝京大学薬学部 教授 | リゾホスファチジン酸受容体のアゴニスト、アンタゴニスト活性を有する脂質分子の探索 |
| 新井 洋由 | 東京大学大学院薬学系研究科 教授 | がん細胞の増殖・浸潤を支配するリゾホスファチジン酸の産生機構の解析 |
| 岡崎 俊朗 | *1 京都大学大学院医学研究科 講師 *2 鳥取大学医学部臨床検査医学 教授 | アポトーシス誘導脂質セラミド調節を介した抗がん剤耐性機構の解明とその克服 |
| 前濱 朝彦 | 東京都立臨床医学総合研究所 研究員 | がん抑制遺伝子 PTEN の変異による組織特異的発がんメカニズムの解明 |

*1：平成 15 年 4 月 1 日～平成 16 年 12 月 31 日

*2：平成 17 年 1 月 1 日～平成 17 年 3 月 31 日

総括研究報告

1 研究目的

がんへの形質転換に際して、脂質代謝、シグナル伝達系の変化が認められる一方、ごく最近では、がんの増殖、浸潤、転移などに LPA などの新規の脂質性メディエーターの関与が強く疑われる事態に至っている。脂質ホスファターゼ活性を有するがん抑制遺伝子 PTEN の研究は Cowden 病な

どで観察される組織特異的がん発症の解明にとって重要である。がん細胞や一部の正常細胞から放出されるエキソソームは特定の蛋白質と多量の酸性リン脂質を含んでおり、その産生機構が、注目され、がん抗原の材料としての有効利用も期待される。

本研究においては、これら新規脂質メディエーターを中心とした脂質代謝系、受容体発現などがん化における変動を組織、細胞レベルで把握し、さらには結果として誘導

される細胞機能の変化を追求するもので、代謝酵素阻害剤受容体アンタゴニストの開発、ワクチン製造への応用などを視野に入れて、がん制圧への手がかりを得ようとするものである。

2 研究成果

エキソソームの性状解析とがんワクチン製造への応用：

MVBs (multivesicular body) はエンドサイトーシス経路の初期エンドソームとリソソームの中間に存在する後期エンドソームに相当し、MVBs の内側に存在する小胞は、MVBs の境界膜が内側に budding して形成されると考えられている。エキソソームは、MVBs が形質膜と膜融合することにより、MVBs 内の小胞が細胞外に放出されたものと推定されている。B リンパ球、樹状細胞 (DC) などの抗原提示細胞は、エキソソームを分泌し、ガン抗原ペプチドを取り込ませた DC 由来のエキソソームは、キラーT 細胞を介する免疫反応を誘導し、マウスにおいて腫瘍を退縮させることが報告されている。従って、ガン抗原ペプチドを提示する DC と同様、エキソソームも、免疫抑制状態にあるガン患者に対してもペプチド特異的な T 細胞応答を引き起こし、抗腫瘍効果が期待できる。

本研究では、エキソソームの脂質分析およびプロテオーム解析を行い、それらの結果を基盤にエキソソームの形成機構を解明し、エキソソームの抗がんワクチン製造への応用を目指している。本年度はエキソソームのプロテオーム解析を行った。

EB ウィルスでトランスフォームしたヒト B 細胞株 COHS-4 の培養液を集め、純度の高いエキソソームを得、エキソソーム蛋白質を一次元電気泳動で分離し、MALDI/TOFS 質量分析器で解析を行い、アクチンと MHC-class II が存在することを明らかにした。現在、他の蛋白質の同定をさらに進めているところである。

リゾホスファチジン酸受容体のアゴニスト、アンタゴニスト活性を有する脂質分子の探索：

Lysophosphatidic acid (LPA) は細胞増殖・運動の促進、血小板凝集、平滑筋収縮など多岐に渡る生理活性を示す生理活性リン脂質である。また近年、LPA が卵巣癌患者腹水中に存在することや、血管平滑筋細胞増殖型動脈硬化を促進することなどが報告され、LPA が癌や動脈硬化などの病態に関与している可能性が指摘されている。LPA の機能は細胞膜表面に存在する LPA 特異的 G 蛋白質共役型受容体 (LPA₁, 2, 3, 4) を介し

て起こることが知られている。また、LPA は血液中で産生されることが示唆されているが、その産生機構には不明な点が多く残されていた。LPA 産生酵素や、受容体が癌や動脈硬化といった疾患のターゲットになる可能性がある。しかし、現在までのところ、LPA をターゲットとした創薬は展開されていない。本研究では、創薬を最終目標とした LPA 受容体のアゴニスト、アンタゴニストの探索を行った。平成 16 年度は、昨年度までに作製されていた LPA₃ 選択的アゴニスト T10 をさらに化学的に修飾し、T10 より強い LPA₃ アゴニストの作製を目指した。

様々な T10 の誘導体を検討した結果、T10 のリン酸部分にホスホチオール基を導入した化合物 (T13 と命名) は、LPA₃ 選択性を保持し、T10 と比較して約 10 倍の LPA₃ 活性化能を有していた。一方、fluorinated LPA アナログに関して、既存の LPA と比較して LPA₃ 受容体に関して約 10 倍の活性を示す XY-17 が確立された。XY-17 は LPA₁, LPA₂ に対しては LPA と比較して、10 分の 1 から 100 分の 1 の活性しか示さず、LPA₃ に対する選択性を示した。今後、このアゴニストを用いることにより、個体レベル、細胞レベルでの LPA₃ の機能を明らかにできるものと考えられる。

がん細胞の増殖・浸潤を支配するリゾホスファチジン酸の産生機構の解析：

近年、LPA が卵巣癌患者腹水中に存在することや、血管平滑筋細胞増殖型動脈硬化を促進することなどが報告され、LPA が癌や動脈硬化などの病態に関与している可能性が指摘されている。本研究では、これまで、(1) 血液中での LPA 産生機構を解明し、その酵素群の同定を行い、血中 LPA 産生酵素ががん細胞浸潤性促進因子 Autotaxin と同一であることを示し、LPA とがん関連を鮮明にした。さらに、(2) LPA の生物活性のうち細胞運動性の促進に着目し、産生酵素により作られた LPA がどの受容体を介して細胞運動性を促進するか検討し、LPA₁ 受容体の重要性を明らかにした。16 年度は(3) 未だ機能が不明であった第 3 の LPA 受容体 LPA₃ の機能解析を行った。

最近確立された LPA₃ ノックアウトマウスの解析を行った。LPA₃ は卵巣癌や前立腺癌で発現が高いことが報告されている受容体である。LPA₃ ノックアウトマウスは産仔数が少なく、様々な遺伝子型のマウスの交配実験から、この表現型は の遺伝子型により規定されていることが分かった。すなわち、LPA₃ ノックアウトマウス は何らかの原因で産仔数が少ないことが分か

った。LPA₃は子宮内膜特異的に発現し、また、その発現は性周期に依存的であり、受精卵が着床する時期に発現のピークを示した。LPA₃ノックアウトマウスでは、子宮での受精卵の着床が正常に起こらないことが分かった。

これまで LPA₃は生殖型の臓器に発現が高く、また、卵巣癌や前立腺癌での高発現が報告されており、生殖型において何らかの機能を持つことが予測されていた。LPA₃のノックアウトマウスの解析から、LPA₃が LPA₃を介し着床に関与していることが初めて明らかとなった。受精卵の着床過程は、受精卵が子宮内膜表面に接着し、さらにその内側に潜り込む過程であり、これまで多くの研究からがん細胞の組織への浸潤過程と類似した機構を持つことが想定されている。今回、LPA₃が着床に重要であるという結果から、LPA₃はがん細胞が浸潤する際に、ホスト側に発現し、その浸潤過程に関与する可能性が示唆された。

アポトーシス誘導脂質セラミド調節を介した抗がん剤耐性機構の解明とその克服：

これまでに我々の研究から、抗ガン剤耐性白血病細胞ではグルコシルセラミド合成酵素（GCS）が転写レベルで活性化され、抗ガン剤によるセラミドの産生が抑制されること、すなわち、抗ガン剤耐性細胞はアポトーシス誘導脂質セラミドの細胞内量を減少することで、細胞死から免れる機構を獲得することが判明した。さらに我々は、セラミド量の制御機構として、GCS以外のセラミド代謝酵素であるスフィンゴミエリン合成酵素（SMS）の細胞死ならびに増殖における意義についても検討した。その結果、(1)白血病患者から得た腫瘍細胞検体でGCSのみならずSMSの活性が、抗ガン剤耐性細胞において増強し、その結果セラミドの細胞内量が減少していることが明らかとなった。さらに、一人の白血病患者の治療前後におけるGCS、SMS活性を経時的に測定したところ、臨床的に抗ガン剤に対する感受性が低下し白血病患者数の減少が鈍化した際には、GCSかつせいが増強しセラミド量も減少することが認められた。このことは、以前に我々が報告した細胞レベルでのアドリアマイシンによる転写因子S1Pの活性化によるGCS活性の増強のメカニズムが、臨床レベルでも機能し、細胞内セラミドを減少させている可能性を示唆した。(2)SMSの分子レベルでの解析を行うために、SM合成を欠損した細胞で発現クローニング法を用い、このSMS遺伝子を単離した。新規クローニング遺伝子として、SM

S1と名付け、そのホモログをSMS2とrとした。SMS1は413アミノ酸より成り、SAMドメインと呼ばれる脂質もしくは蛋白結合部位を有する4開幕貫通型膜蛋白であることが判明した。(3)SMS1の過剰発現細胞(SM(+))とSMS1の欠損細胞(SM(-))に、GCS阻害剤であるPBPPを処理したところ、濃度依存的に細胞増殖が抑制され、細胞死を誘導した。この際、細胞内セラミド量が増強することが、実験的に確認されている。(4)FAS抗体を過剰発現したマウスWR19L・SM(-)細胞とWR19L・SM(+)細胞において、細胞死誘導を比較検討したところ、SMS1を過剰発現したSM(+)細胞で優位に細胞死が増強した。この際、細胞膜表面上でのマイクロドメイン(脂質ラフト)形成とセラミド産生がSM(-)細胞では、SM(+)細胞に比べて低下することが、細胞死誘導シグナルの伝達に影響することが示唆された。

以上のことより、セラミド代謝酵素であるSMSとGCSの活性を同時に阻害し、細胞内セラミド量を増加することで細胞死が誘導されることが明らかとなった。今後、SMS1のノックアウトマウスの作成やSMS1の阻害剤を開発し、同時にGCSとSMSを抑制する分子標的療法により細胞死誘導シグナル・セラミドを増強し、抗ガン剤に耐性となった様な白血病細胞に細胞死を誘導することが出来るかについて、細胞レベルのみならず動物レベルにおいても検討し、実際の臨床応用開発へと進めていきたい。

がん抑制遺伝子 PTEN の変異による組織特異的発がんメカニズムの解明：

癌抑制遺伝子産物 PTEN の機能損失はホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸を介する細胞内シグナルの恒常的な活性化を惹起する。我々は現在までに、PICT-1 が PTEN タンパク質に結合することによってそのターンオーバー(分解)を制御する分子であり、この相互作用の阻害は PTEN タンパク質の不安定化から機能損失を導くことを明らかにした。この知見は、PICT-1 の機能損失が (PTEN 遺伝子の変異を伴わずに) PTEN の機能損失を誘導する可能性を示している。本年度の成果は以下の通りである

(1) PICT-1 の機能損失による細胞内シグナルの変動および細胞形質の変化: PICT-1 の機能損失が細胞内シグナルおよび細胞機能に及ぼす影響を検討するために、野生型 PICT-1 および野生型 PTEN を発現する HeLa 細胞を用いて PICT-1 の発現を RNA 干渉法によって抑制した。

PICT-1 に対する特異的 siRNA を導入した HeLa 細胞では PICT-1 タンパク質の発現量減少とともに PTEN タンパク質の発現量減少 (約 75%) が観察され、またそれに伴って PIP3 下流のエフェクター分子であり細胞増殖およびアポトーシス抑制に重要な Akt の活性化、また翻訳制御因子である S6K の活性化が観察された。この条件下での細胞増殖能を XTT アッセイにより解析すると、PICT-1 をノックダウンした場合には増殖能が約 1.5 2 倍に亢進するのが観察された。さらに、足場非依存性増殖能 (軟寒天コロニー形成能) に関しても、PICT-1 のノックダウンによるコロニー形成速度の亢進が観察された。このような XTT アッセイおよび軟寒天コロニーアッセイで示された結果は、PICT-1 タンパク質の発現量の変動が細胞増殖シグナルに大きな影響を及ぼすことを示しており、特に PICT-1 のノックダウンによって足場非依存性増殖能 (コロニー形成能) の亢進が観察されたことは、PICT-1 の異常が腫瘍病変の形成に関与していることを示唆している。(2) 神経芽腫における PICT-1 および PTEN のタンパク質レベルでの発現量の相関性: 前項で示唆された可能性をさらに深く検討する目的で、実際の腫瘍病変における PICT-1 タンパク質および PTEN タンパク質の発現量の解析を行い、その相関性を検討した。なお、ここでは昨年度の研究から約 50%の頻度で PICT-1 mRNA の発現に異常が認められ、また *PTEN* 遺伝子の変異がほとんど認められない (5-7%) ヒト神経芽腫標品を用いた。ヒト神経芽腫 8 検体からタンパク質標品を調製し、PICT-1 タンパク質および PTEN タンパク質の発現量をウエスタンブロッティングにより解析したところ、PICT-1 の発現量が極めて低い標品においては PTEN タンパク質の発現量も低いことが観察され、両分子の発現には正の相関性が認められた。この結果は PICT-1 による PTEN 分解制御系の異常、すなわち PICT-1 の機能損失に伴う PTEN の機能損失 (発現量の低下) が本腫瘍病変の一因となっている可能性を示唆するものである。

本研究から PICT-1 が (ある種の) 腫瘍病変の形成に責任因子の一つとして関与している可能性が示唆され、今後の遺伝学的解析を通じて、PICT-1 が新たな腫瘍マーカー因子として、また癌抑制因子としての機能を有することが明らかにされていくことを期待したい。

3 倫理面への配慮

本研究は、主として動物培養細胞を用いて行うものであり、これらの研究では倫理面で問題となることは

ない。また、本研究で動物実験が必要になった時には各研究実施施設の実験動物取り扱い倫理規定に準じて研究を実施する。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Inoue, K., Arai, H., and Aoki, J., Phospholipase A1 -structures, physiological and patho-physiological roles in mammals. *Lipases and Phospholipases in Drug Development: From biochemistry to molecular pharmacology.* 23-39, Wiley-VCH Verlag GmbH 2004.
2. Ye, X., Arai, H., et al., LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in implantation and embryo spacing. *Nature*, in press
3. Shida, D., Arai, H., et al., Dual mode regulation of migration by lysophosphatidic acid in human gastric cancer cells. *Exp. Cell Res.*, 301: 168-178, 2004
4. Xu, Y., Arai, H., et al., Alkyl lysophosphatidic acid and fluoromethylene phosphonate analogs as metabolically-stabilized agonists for LPA receptors. *Bioorg Med Chem Lett.*, 14: 5323-5328, 2004
5. Inoue, T., Arai, H., et al., Type II platelet-activating factor-acetylhydrolase is essential for epithelial morphogenesis in *C. elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101: 13233-13238, 2004
6. Kitayama, Arai, H., et al., Over-expression of lysophosphatidic acid receptor-2 in human invasive ductal carcinoma, *Breast Cancer Res.*, 6: R640-R646, 2004
7. Shida, D., Arai, H., et al., Aberrant expression of lysophosphatidic acid (LPA) receptors in human colorectal cancer. *Lab. Invest.*, 84: 1352-1362, 2004
8. Tanaka, M., Arai, H., et al., Prostatic acid Phosphatase Degrades Lysophosphatidic Acid in Seminal Plasma. *FEBS Lett.*, 571: 197-204, 2004
9. Tamaruya, Y., Arai, H., et al., Identifying Specific Conformations by Using a Carbohydrate

- Scaffold: Discovery of Subtype-Selective LPA-Receptor Agonists and an Antagonist. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 43: 2834-2837, 2004
- 10.Hama, K., Arai, H., et al., Lysophosphatidic Acid and Autotaxin Stimulate Cell Motility of Neoplastic and Non-neoplastic Cells Through LPA1. *J. Biol. Chem.*, 279: 17634-17639, 2004
- 11.Yabu, T., Tomimoto, H., Taguchi, Y., Yamaoka, S., Igarashi, Y., and Okazaki, T., Thalidomide-caused vascular defect through ceramide-depleted VEGF receptors, and its restoration by sphingosine-1-phosphate. *Blood*, in press, 2005
- 12.Miyaji, M., Xiong, J. Z., Yamaoka, S., Amakawa, R., Fukuhara, S., Sato, S. B., Kobayashi, T., Domae, N., Mimori, T., Bloom, E.T., Okazaki, T., and Umehara, H., The membrane sphingomyelin is crucial for the Fas-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.*, in press, 2005
- 13.Satoi, H., Tomimoto, H., Kitano, T., Watanabe, M., Akiguchi, I., and Okazaki, T., Astroglial expression of ceramide in Alzheimer's disease brains; a role during neuronal apoptosis. *Neuroscience*, 130(3): 657-66, 2005
- 14.Ohtani, R., Tomimoto, H., Kondo, T., Wakita, H., Akiguchi, I., Shibasaki, H., and Okazaki, T., Upregulation of ceramide and its regulating mechanism in a rat model of chronic cerebral ischemia. *Brain Res.*, 1023(1): 31-40, 2004
- 15.Uchida, Y., Itoh, M., Taguchi, Y., Yamaoka, S., Umehara, H., Ichikawa, S., Hirabayashi, Y., Holleran, W., and Okazaki, T., Ceramide reduction and transcriptional up-regulation of glucosylceramide synthase through DOX-activated Sp1 in drug-resistant HL-60/ADR cells. *Cancer Res.*, 64(17):6271-9, 2004
- 16.Taguchi, Y., Kondo, T., Watanabe, M., Miyaji, M., Umehara, H., Kozutumi, Y. and Okazaki, T., Interleukin-2-induced survival of natural killer (NK) cells involving phosphatidylinositol-3 kinase-dependent reduction of ceramide through acid sphingomyelinase, sphingomyelin synthase and glucosylceramide synthase. *Blood*, 104(10): 3285-93, 2004
- 17.Yamaoka, S., Miyaji, M., Kitano, T., Umehara, H., and Okazaki, T., Expression cloning of a human cDNA restoring sphingomyelin synthesis and cell growth in sphingomyelin synthase-defective lymphoid cells. *J. Biol. Chem.*, 279: 18688-93, 2004
- 18.Umehara, H., Bloom, E. T., Okazaki, T., Nagano, Y., Yoshie, O., and Imai, T., Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 24: 34-40, 2004
- 19.Watanabe, M., Kitano, T., Kondo, T., Yabu, T., Taguchi, Y., Tashima, M., Umehara, H., Domae, N., Uchiyama, T. and Okazaki, T., Increase of nuclear ceramide through caspase-3-dependent regulation of the 'sphingomyelin (SM) cycle' in Fas-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 64: 1000-1007, 2004
- 20.Maehama, T., et al., Suppression of a phosphatidylinositol 3-kinase signal by a specific spliced variant of Drosophila PTEN. *FEBS Lett.*, 565: 43-47, 2004
- 21.Okahara, F., et al., Regulation of PTEN phosphorylation and stability by a tumor suppressor candidate protein. *J.Biol.Chem.*, 279: 45300-45303, 2004
- 22.Kumagai, K., Yasuda, S., Okemoto, K., Nishijima, M., Kobayashi, S., and Hanada, K., CERT Mediates Intermembrane Transfer of Various Molecular Species of Ceramides. *J. Biol. Chem.*, 280: 6488-6495, 2005
- 23.Ohsawa, T., Nishijima, M., and Kuge, O., Functional analysis of Chinese hamster phosphatidylserine synthase 1 through systematic alanine mutagenesis. *Biochem. J.*, 381: 853-859, 2004