

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 が存在することが明らかにした。(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) autotaxin は、生理活性脂質 LPA の産生を介し、浸潤・転移能を示す。autotaxin は LPA 受容体 LPA1 を介し、細胞の運動性を促進する。また、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) セラミド代謝酵素グルコシルセラミド合成酵素 (GCS) またはスフィンゴミエリン合成酵素 (SMS) 活性を抑制することで抗ガン剤感受性を白血病細胞において回復し得た。(5) PICT-1 が PTEN の機能発現に必須の因子であり、PICT-1 の機能損失や PTEN の C 末端領域変異がこの相互作用を阻害し、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

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、受容体発現などの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。LPA₃ 選択的アゴニスト 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、LPA 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、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、SMS 1 のノックアウトマウスの作成や SMS 1 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行きたい。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：

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（PIP3）を介する細胞内シグナルの恒常的な活性化を惹起し、それに起因する細胞増殖の活性化などを介して正常細胞から腫瘍細胞への形質転換を誘導する。子宮内膜腫で見いだされる PTEN 遺伝子の

変異の大部分は C 末端領域の約 50 アミノ酸からなる領域（C-tail）を欠失する PTEN 遺伝子産物を産生するが、この領域の欠失による機能損失メカニズムには不明な点が多い。本研究では、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、C-tail 欠失によるこの相互作用の阻害が PTEN タンパク質の不安定化からその機能損失を導くことを明らかにした。さらにヒト腫瘍病変においてこの PICT-1 による PTEN 制御系の異常が認められることを見いだした。

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。