

「イノシトールリン脂質代謝を介した発がん・がん悪性化の時空間制御」

神戸大学大学院医学研究科 伊集院 壮

要旨

一般的に細胞のがん化とその悪性化にはPI3 キナーゼシグナルの亢進と Akt シグナルの活性化が起こっている。加えて、がんの微小環境の変化が周辺の細胞のがん化や悪性化を促進することが最近明らかとなった。従って、がん組織では時空間的に非常に精緻かつ複雑なシグナル伝達制御が行われていることが想像される。従って、がん細胞のシグナル伝達を全体的に理解するためには、それぞれのステージにおける、時間的・空間的な制御を考慮に入れる必要がある。そこで、本研究ではホスホイノシチド代謝酵素による脂質シグナルの時空間的な制御ががん細胞に起こる特有な現象 (EMT による浸潤転移能の増加、炎症シグナル、アポトーシスの抑制、小胞体ストレス、Warburg 効果) を解析し、新しいホスホイノシチドを介したがんシグナルの制御メカニズムを明らかにすることを目的とし本研究を行った。乳がん細胞におけるホスホイノシチド、中でもホスファチジルイノシトール-4-リン酸 (PI(4)P) の動態に着目した。その結果、①ゴルジ体の PI(4)P は、乳がん細胞の運動能をコントロールすること、これががん細胞の幹細胞マーカーである、CD44 の発現を介していることを明らかにした。さらに、②細胞膜近傍の ER-PM contact site での PI(4)P 産生が、がん細胞のカルシウム動態などのホメオスタシスを制御していることを明らかにした。この性質は、骨格筋での運動と非常によく相関する現象であった。今後は、その分子レベルでの解析を行い、新しいがんマーカーとしてのホスホイノシチドの役割を明らかにする予定である。

1 研究の背景と目的

一般的に細胞のがん化とその悪性化にはPI3 キナーゼシグナルの亢進と Akt シグナルの活性化が起こっている。加えて、がんの微小環境の変化が周辺の細胞のがん化や悪性化を促進することが最近明らかとなった。従って、がん組織では時空間的に非常に精緻かつ複雑なシグナル伝達制御が行われていることが想像される。ショウジョウバエでは、モザイクを作製することによって、このような条件を考慮に入れることが可能である。しかし、現在、哺乳細胞でそのような系を確立するには至っていない。従って、がん細胞のシグナル伝達を全体的に理解するためには、それぞれのステージにおける、時間的・空間的な制御を考慮に入れる必要がある。そこで、本研究ではホスホイノシチド代謝酵素による脂質シグナルの時空間的な制御ががん細胞に起こる特有な現象 (EMT による浸潤転移能の増加、炎症シグナル、アポトーシスの

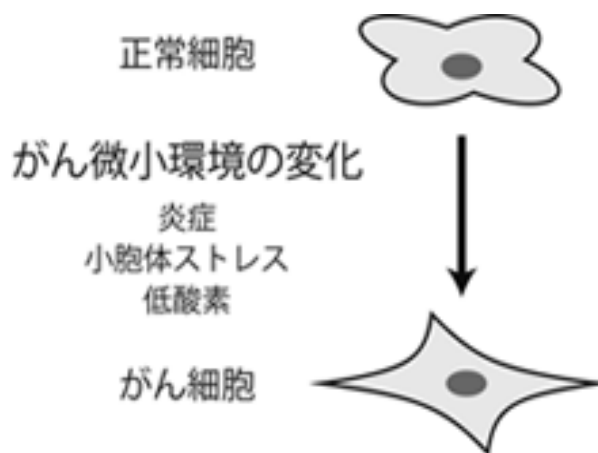


図1 微小環境の変化は正常細胞のがん化を促す

抑制、小胞体ストレス、Warburg 効果) を解析し、新しいホスホイノシチドを介したがんシグナルの制御メカニズムを明らかにすることを目的とする (図1)。

また、近年がん幹細胞の存在が注目され、がん表面マーカーの発現ががん幹細胞の性質の維持および細胞遊走・浸潤などに影響を与えることが明らかになってきた。例えば、乳がん細胞は予後因子や予測因子診断の結果、病型によって Basal, Luminal-like, Claudin-low などに分類されるが、この病型は CD44 や CD24 など複数の乳がん細胞の表面マーカーの発現と相関しており、術後の治療方針の材料となる。例えば HER2 関連因子を高発現している乳がん細胞には、抗 HER2 療法が有効であるが、乳がんの 15~20% を占める basal 型の患者は術後の予後が悪い傾向にあり化学療法しか有効な手段はない。この病型と予後はがん細胞の幹細胞としての性質と相関することが分っている。現在のところ、ホスホイノシチドによるがん幹細胞マーカーの発現制御は報告が少なく、またそのメカニズムも明らかになっていない。

一方、小胞体ストレス応答は細胞の恒常性維持に不可欠な機能である。細胞は異常たんぱく質の蓄積や、カルシウム欠乏など細胞にとって異常な状況 (小胞体ストレス) になると、小胞体ストレス応答を亢進させて正常な状態に復活させる。しかし、小胞体ストレス応答の異常な上昇は細胞のアポトーシスを誘導する。がん細胞では小胞体ストレスに対する寛容性を獲得し、細胞死を起さなくなっている。これががん細胞の過増殖や悪性化の原因となっている。従って、小胞体ストレスへの細胞の感受性を上昇させることは、がん細胞の細胞死を誘導しがんの増殖抑制につながる。小胞体ストレス応答にメカニズムは大部分が明らかになっており、乳がん細胞では小胞体ストレス応答因子 XBP1 の発現が病型と相関している。しかし、ホスホイノシチドによる小胞体ストレス応答の直接的な制御の存在は知られていない。

本研究では、がん細胞におけるホスホイノシチドホスファターゼの発現を制御することによって、がん細胞が幹細胞としての性質を獲得しその病型を変化させるかどうか検討を行い、新しいがん治療戦略を開発することを目的とする (図2)。

2 研究方法・研究内容

イノシトールリン脂質代謝酵素は約 100 種類存在し、それぞれが非相補的な役割を担っている。がんで異常が見つかった分子も複数存在しているが、ノックアウトマウスの結果から、細胞運動を制御するもの、増殖を制御するものなど特徴的な表現型が認められている。従って、細胞のがん化には複数のイノシトールリン脂質代謝酵素が関与していることが示唆される。同じ酵素活性を持つものでも、全く異なる表現型を示すものもある。本研究では、この特徴を利用して、乳がん細胞ががん化能を獲得する仕組みを

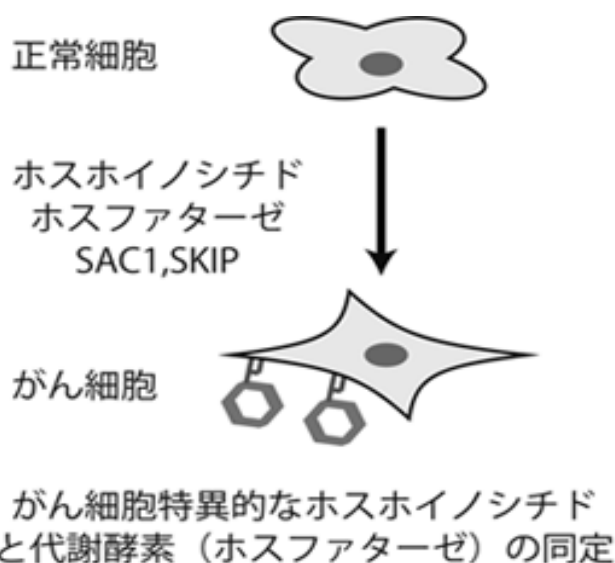


図2 ホスホイノシチドを標的とするがんマーカー探索と治療戦略

ホスホイノシチド代謝酵素とホスホイノシチドとの細胞内時空間制御から解き明かす。本課題では、がん抑制遺伝子 PTEN、細胞運動を制御する SHIP2 や Akt を特異的に不活性化化する SKIP や PIPP などの PIP3 ホスファターゼおよび SAC1、INPP4A、INPP4B などの 4-ホスファターゼを研究材料として用い、局所的なホスホイノシチドの変化による乳がん細胞の性質の変化を明らかにすることにした。具体的には低運動能を持つ Luminal-like 型乳がん細胞である MCF7 細胞や SK-BR-3 細胞、高運動能を持つ Basal 型の MDA-MB-231 や T47D 細胞に、様々なイノシトールリン脂質代謝酵素を発現させたり、siRNA 導入による発現抑制を行ったりすることによって、上記で挙げた病型マーカーである CD44, CD24, HER2, XBP1 の発現の変化を検討した。さらにホスホイノシチドの動態を検討することによってがん細胞の性質変化におけるホスホイノシチドの、新しい機能の解明を行った。

3 研究成果

私はさまざまな乳がん細胞を用いて、病的分類とイノシトールリン脂質代謝酵素分子発現の関連の検討を行った。その結果、PIPP と SAC1 ホスファターゼが、運動能の高い乳がん細胞で高い発現を示すことが明らかとなった(徳田、伊集院ら *Cancer Res.* 2014)。一方で、PI(4)P を産生する PI キナーゼの発現の減少も認められた。これはホスホイノシチドの代謝が乳がんの病態と関連している可能性を示唆している。そこで、これらの細胞を用いて、ホスファチジルイノシトール代謝酵素が①小胞体ストレス応答、②細胞接着および細胞運動、③がん幹細胞マーカー発現に及ぼす影響を検討した。その結果、PI(4,5)P₂ の 5-ホスファターゼである SKIP や PIPP が小胞体ストレス応答およびアポトーシス依存的な細胞死をコントロールしていることが明らかとなった。SKIP や PIPP の過剰発現によって、小胞体ストレス応答の指標となる分子シャペロン GRP78 や CHOP そして乳がんの病型マーカーである XBP1 の発現低下が認められた。一方、これらの分子を siRNA によって発現抑制を行うと小胞体ストレス応答の抑制が認められた。この小胞体ストレス応答の変化は 5-ホスファターゼ活性依存的であった。また、小胞体ストレスを SERCA 阻害剤である Thapsigargin 処理によって誘導すると SKIP および PIPP の細胞内局在の変化と、その部分での PI(3,4)P₂ の産生が認められた。従って、乳がん細胞における小胞体ストレス依存的な PI(3,4)P₂ 産生が SKIP によって制御を受けていることが明らかとなった。また、SAC1 ホスファターゼの発現抑制によって、細胞運動に必要な focal adhesion の形成が認められた。これはホスホイノシチドの代謝変化を介して、乳がん細胞のタイプの変換が起こっていることを示唆している。具体的には basal type のがん治療の新しい標的に、これらホスホイノシチドホスファターゼが有望であるということである(図3)。本研究の結果はさらに、ホスホイノシチド自身も新しい乳がんの病態の指標となる可能性を示している。これらのホスファターゼの産物として共通な PI(3,4)P₂ や PI(4)P など 4 位にリン酸基を有するホスホイノシチドの局在が乳がん細胞によって異なることも明らかにした。加えて、カルシウム流入および小胞体ストレス応答は骨格筋の機能維持において、非常に重要である。カルシウム流入は筋肉の収縮運動に必要であり、また高脂肪や高血糖による小胞体ストレスの亢進は筋肉のエネルギー源となるインスリン依存的なグルコース代謝の低下につながり、その結果 2 型糖尿病のリスクが増大する。骨格筋におけるインスリン抵抗性惹起のメカニズムは、乳がん細胞の悪性化のメカニズムと共通点が多い。1 つ目は小胞体ストレス応答による制御を受けていること、2 つ目はカルシウム動態により制御されるアクチン細胞骨格の再構成をとまなうこと、3 つ目は糖代謝をはじめとする代謝機構の顕著な変化をとまなうことである。従って、がん細胞における PI(4)P の影響の検討において、骨格筋細胞における研究の結果を応用することができる。私は骨格筋細胞において

SKIP が PI(4)P の産生を介して、カルシウム動態、特に小胞体内腔のカルシウム濃度をコントロールしていることを明らかにした。これは PI(4)P が細胞外からのカルシウム流入を促進していることを示唆している。SKIP 欠損による小胞体内腔のカルシウム欠乏は小胞体ストレスとなるため、小胞体ストレス応答を惹起し糖代謝能を低下させると同時に、筋肉の収縮運動の亢進を引き起こす。これはがん細胞における運動能の獲得・悪性化と類似した現象であり、細胞内の局所的な PI(4)P の変化が細胞の性質の大きな変化につながることを支持している。今後は PI(4)P 量の定量化を目指すとともに、局所的な PI(4)P 産生メカニズムを明らかにして、新しいがん治療ターゲットとしての可能性を探索する予定である。

4 生活や産業への貢献および波及効果

国内外でがん研究は目覚ましい進展を遂げており、県内でもがん治療の研究に取り組む組織が多い。これまでも、がん治療を目指す多くの研究が行われ、我々は遺伝子診断によりがんのリスクを知ることも可能となった。本研究はリン脂質代謝を介したシグナル伝達を時空間的に理解し、新しいがん治療および診断指標の同定を目指したものである。その結果、微量なイノシトールリン脂質である PI(3,4)P₂ や PI(4)P が、がん細胞で著しく変化していることを明らかにした。また、これらの脂質代謝を司る酵素群の発現の有意な変化も明らかにした。これらは、これらの微量成分ががん細胞の性質を変化させるのに十分であることを示唆している。今度、これら微量成分の質量分析装置を用いた検出法の開発、および動物実験によるこれらリン脂質・リン脂質代謝酵素のがん化における機能解析を通して、これらが新しいがんのバイオマーカーや治療標的の候補となりうることを証明していきたいと考えている。本研究は生化学的・細胞生物学的な裏付けを十分にともなっていることからがん治療への応用戦略を練りやすく、十分に今後の臨床応用が期待できるものと考えている。今回の貴協会からの助成の結果、まったく新しいホスホイノシチドのがん化における機能を明らかにすることができた。これらのホスファターゼがどのように時空間的な活性化を受けているのかなどの分子機構の解明は今後の課題であるが、今後はホスホイノシチドを可視化・定量化する方法を開発し、乳がん細胞におけるプロファイリングを行い、がん治療への応用に向けた研究を行っていく予定である。

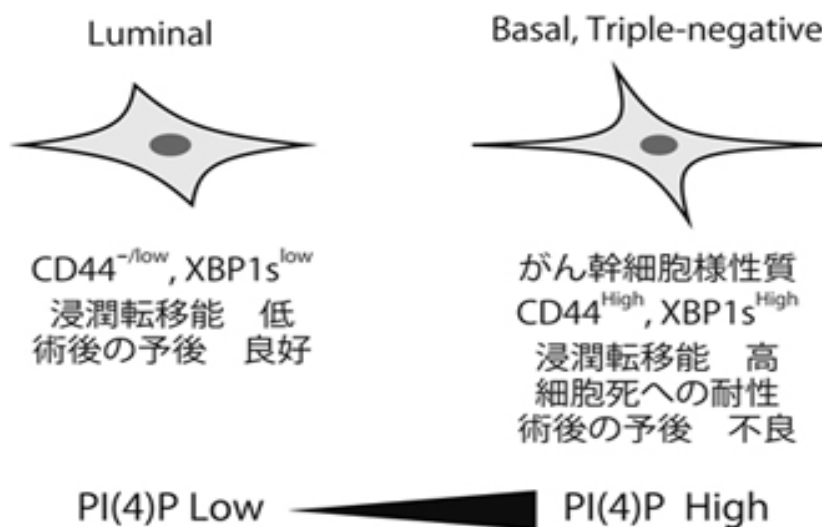


図3 乳がん細胞の病型と PI(4)P