

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04693

研究課題名(和文) 脂質代謝の変調に起因するミエロイド系細胞の機能異常と病態

研究課題名(英文) Myeloid cell dysfunction and the pathogenesis of ovarian hypertrophy.

研究代表者

佐々木 純子 (Sasaki, Junko)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30333371

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)：本研究では、複数のイノシトールリン脂質代謝酵素をミエロイド系細胞特異的に欠損したマウス(cDKOマウス)を用いて、脂質代謝異常と病態、特に卵巣肥大との関連について解析した。その結果、cDKO卵巣ではPIP3が異常蓄積し、Aktの活性化を介して卵巣肥大が生じること、cDKOマクロファージの機能異常が関与すること、さらに通常のマクロファージとは異なる未知の細胞が卵巣肥大に関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study we analyzed the relationship between aberrant lipid metabolism and the pathogenesis of ovarian hypertrophy using myeloid cell-specific phosphoinositide metabolizing enzymes-deficient mice (cDKO mice). We found that ovarian hypertrophy in cDKO mouse was induced by a high PIP3 level and Akt hyperactivation, and not only conventional myeloid cells but also uncharacterized cells contributed to the disease pathogenesis.

研究分野：脂質生化学

キーワード：細胞内シグナル伝達 イノシトールリン脂質

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣は卵子の発生、成熟を司る臓器であり、卵巣周期に応じて組織リモデリングを繰り返している。多数の一次卵胞が成熟過程に入るものの、成熟できる卵胞はヒトでは1個、マウスでは10個程度であり、残りの卵胞は卵胞閉鎖の過程を経て変性・除去される。成熟卵胞が排卵へと至ると、卵胞に残った顆粒膜細胞層は黄体化し、受精した際の妊娠成立に向けて準備する。しかし受精が不成立の場合には、黄体は黄体退縮と呼ばれる機構により除去される。卵巣の恒常性維持には、これらの不要な卵胞や黄体は速やかに除去される必要があり、マクロファージはこの過程において中心的な役割を果たすと考えられている。さらに薬剤によるミエロイド系細胞の除去実験から、マクロファージは卵胞閉鎖や黄体退縮のみならず、黄体形成や維持など卵巣周期の多くの局面で機能することが示唆されている。しかしながら単に全てのミエロイド系細胞を除去する実験系では、卵巣におけるミエロイド系細胞の機能の一端を理解するに止まる。ミエロイド系細胞の観点から卵巣機能を解析するには、ミエロイド系細胞の機能異常に起因する病態発症モデルが有用であるが、これまでそのようなモデル動物は存在しなかった。

我々はこれまでに、細胞膜リン脂質の一種であり、細胞内シグナル伝達分子であるホスファチジルイノシトール (PIPs) の生理機能解析を行ってきた。その過程で、ミエロイド系細胞特異的に複数のPIPs代謝酵素を欠損させると、卵巣が顕著に肥大することを見出した。そこでこのマウス (cDKOマウス) を用いて解析を進めれば、ミエロイド系細胞の機能異常による卵巣肥大発症機構を解明できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

cDKOマウスの病態解析を行い、ミエロイド系細胞の機能異常による卵巣肥大発症機構を解明する。

## 3. 研究の方法

- (1) cDKOマウスの病態解析。
- (2) cDKOマクロファージの性状解析。
- (3) Creリコンビナーゼ発現細胞の解析。
- (4) 分子メカニズム解析。

## 4. 研究成果

(1) cDKO雌マウスの卵巣切片 (1~6か月齢) を継時的に作製し、組織化学的解析を行った。その結果、1か月齢のcDKO卵巣には一次卵胞や二次卵胞が認められるものの、その後徐々に正常な卵胞は消失していくことを見出した。そして生後3~4月に

は、卵胞内部に間質部の細胞が侵入・増殖 (Ki67陽性細胞が増える) し、卵巣が肥大化することが判明した。また1および3か月齢マウスを用いて血中の性腺刺激ホルモンレベルを測定したところ、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモンともにコントロールマウスとcDKOマウスでは差が認められなかったことから、cDKO卵胞の発達異常は性腺刺激ホルモンの分泌異常に起因しないと考えられた。Ki67陽性細胞の周囲には、F4/80陽性のマクロファージが多数存在し、卵巣肥大にマクロファージの関与が推察された。

(2) チオグリコレ誘導性腹腔マクロファージを用いて解析した。コントロールマウスおよびcDKOマウスよりマクロファージを調製し、食食能およびリポポリサッカライド添加によるサイトカイン産生をELISA法で検出した。その結果、cDKOマクロファージの食食能は亢進するものの、リポポリサッカライドに対する応答は低下することを見出した。さらに生殖器に異常の認められないcDKO雄マウスを用いて、マウス黒色腫細胞株を用いた担がんマウスモデルを作製したところ、コントロールマウスを比較してcDKOマウスでは、移植がん細胞の増殖が亢進した。これらの結果から、cDKOマクロファージの機能異常が卵巣肥大に関与する可能性が示唆された。

(3) 本研究ではミエロイド系細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するマウスを使用しているが、別種のミエロイド系細胞特異的Creマウスを用いた場合は、表現型が再現されないことが判明した。そこで抗Cre抗体やレポーターマウスを用いて、Creリコンビナーゼ発現細胞の特定を行ったところ、ミエロイド系細胞におけるCreリコンビナーゼの発現が確認された。加えて、非常に低頻度ではあるが、F4/80陰性のCreリコンビナーゼ発現細胞が存在することを見出した。骨髓キメラマウスや卵巣移植の実験から、この細胞が卵巣肥大に深く関与することが示唆された。

(4) cDKO卵巣におけるPIPsの動態を質量分析法にて解析した。その結果、PI,PIP1,PIP2量はコントロールと同程度であったが、PIP3量はコントロールの30倍以上であった。PIP3のターゲット分子としては多数存在するものの、癌化に関与する分子としては原癌遺伝子産物であるAktが良く知られている。そこで抗リン酸化Akt抗体を用いた免疫組織染色によりAktの活性化を調べたところ、cDKO卵巣ではAktが活性化していることが確認された。実際にcDKOにおける卵巣肥大がAktの活性化により導かれているのかを明らかにするために、Akt1欠損cDKOマウス、

もしくはAkt2欠損cDKOマウスを  
製したところ、いずれのマウス  
においても卵巣肥大は抑制され  
た。以上より、cDKO卵巣の肥  
大は、PIP3の蓄積とAktの活  
性化により生じることが明らか  
となった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Malek M, Kielkowska A, Chessa T, Anderson K E, Barneda D, Pir P, Nakanishi H, Eguchi S, Koizumi A, Sasaki J, Juvin V, Kiselev VY, Niewczas I, Gray A, Valayer A, Spensberger D, Imbert, M, Felisbino S, Habuchi T, Beinke S, Cosulich S, Le Novere N, Sasaki T, Clark J, Hawkins PT, Stephens LR. PTEN Regulates PI(3,4)P<sub>2</sub> Signaling Downstream of Class I PI3K. *Mol. Cell*, 68(3), 566-580, (2017), 査読有, doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.024.

Kimura H, Matsuyama Y, Araki S, Koizumi A, Kariya Y, Takasuga S, Eguchi S, Nakanishi H, Sasaki J, Sasaki T. The effect and possible clinical efficacy of in vivo inhibition of neutrophil extracellular traps by blockade of PI3K-gamma on the pathogenesis of microscopic polyangiitis. *Mod. Rheumatol.*, 28(3), 530-541, (2017), 査読有, doi: 10.1080/14397595.2017.1367116.

Shindou H, Koso H, Sasaki J, Nakanishi H, Sagara H, Nakagawa KM, Takahashi Y, Hishikawa D, Iizuka-Hishikawa Y, Tokumasu F, Noguchi H, Watanabe S, Sasaki T, Shimizu T. The effect and possible clinical efficacy of in vivo inhibition of neutrophil extracellular traps by blockade of PI3K-gamma on the pathogenesis of microscopic polyangiitis. *J. Biol. Chem.*,

292(29), 12054-12064, (2017), 査読有, doi: 10.1074/jbc.M117.790568.

Iizuka-Hishikawa Y, Hishikawa D, Sasaki J, Takubo K, Goto M, Nagata K, Nakanishi H, Shindou H, Okamura T, Ito C, Toshimori K, Sasaki T, Shimizu T. Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 tunes the membrane status of germ cells by incorporating docosahexaenoic acid during spermatogenesis. *J. Biol. Chem.*, 292(29), 12065-12076, (2017), 査読有, doi: 10.1074/jbc.M117.791277.

Morioka S, Nigorikawa K, Okada E, Tanaka Y, Kasuu Y, Yamada M, Kofuji S, Takasuga S, Nakanishi H, Sasaki T, Hazeki K. TMEM55a localizes to macrophage phagosomes to downregulate phagocytosis. *J. Cell Sci.*, 131(5), 213272, (2017), 査読有, doi: 10.1242/jcs.213272.

Kimura H, Eguchi S, Sasaki J, Kuba K, Nakanishi H, Takasuga S, Yamazaki M, Goto A, Watanabe H, Itoh H, Imai Y, Suzuki A, Mizushima N, Sasaki T. Vps34 regulates myofibril proteostasis to prevent hypertrophic cardiomyopathy. *JCI Insight*, 12, 2(1), e89462, (2017), 査読有, doi: 10.1172/jci.insight.89462.

Matsumoto J, Nakanishi H, Kunii Y, Sugiura Y, Yuki D, Wada A, Hino M, Niwa S, Kondo T, Waki M, Hayasaka T, Masaki N, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto S, Sato S, Sasaki T, Setou M, Yabe H. Decreased 16:0/20:4-phosphatidylinositol level in the post-mortem prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *Scientific Reports*, 7, 45050-45060, (2017), 査読有, doi: 10.1038/srep45050.  
Abe F, Kitadate A, Ikeda S, Yamashita

J, Nakanishi H, Takahashi N, Asaka C, Teshima K, Miyagaki T, Sugaya M, Tagawa H. Histone deacetylase inhibitors inhibit metastasis by restoring a tumor suppressive microRNA-150 in advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Oncotarget*, 8, 7572-7585, (2017), 査読有, doi: 10.18632/oncotarget.13810.

Morioka S, Nigorikawa K, Sasaki J, Hazeki K, Kasuu Y, Sasaki T, Hazeki O. Myeloid cell-specific inositol polyphosphate-4-phosphatase type I knockout mice impair bacteria clearance in a murine peritonitis model. *Innate Immun.*, 22(6), 444-51, (2016), 査読有, doi: 10.1177/1753425916652714.

Kofuji S, Kimura H, Nakanishi H, Nanjo H, Takasuga S, Liu H, Eguchi S, Nakamura R, Itoh R, Ueno N, Asanuma K, Huang M, Koizumi A, Habuchi T, Yamazaki M, Suzuki A, Sasaki J, Sasaki T. INPP4B is a PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase that can act as a tumor suppressor. *Cancer Discov.*, 5(7), 730-739, (2015), 査読有, doi: 10.1158/2159-8290.

Chew CL, Lunardi A, Gulluni F, Ruan DT, Chen M, Salmena L, Nishino M, Papa A, Ng C, Fung J, Clohessy JG, Sasaki J, Sasaki T, Bronson RT, Hirsch E, Pandolfi PP, In vivo role of INPP4B in tumor and metastasis suppression through regulation of PI3K/AKT signaling at endosomes. *Cancer Discov.*, 5(7), 740-751, (2015), 査読有, doi: 10.1158/2159-8290.

Nigorikawa K, Hazeki K, Sasaki J, Omori Y, Miyake M, Morioka S, Guo Y,

Sasaki T, Hazeki O. Inositol Polyphosphate-4- Phosphatase Type I Negatively Regulates Phagocytosis via Dephosphorylation of Phagosomal PtdIns(3,4)P2. *PLoS One*, 10(11), e0142091, (2015), 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0142091.

Ip LR, Poulgiannis G, Viciano FC, Sasaki J, Kofuji S, Spanswick VJ, Hochhauser D, Hartley JA, Sasaki T, Gewinner CA. Loss of INPP4B causes a DNA repair defect through loss of BRCA1, ATM and ATR and can be targeted with PARP inhibitor treatment. *Oncotarget*, 6(12), 10548-10562, (2015), 査読有, doi: 10.18632/oncotarget.3307

〔学会発表〕(計 8 件)

Takehiko Sasaki, Hiroki Nakanishi, Satoshi Eguchi and Junko Sasaki, INPP4B is a tumor suppressor in the context of PTEN insufficiency by modulating the levels of PI3K lipid products, International Symposium on Imaging Frontier 2017, 2017年7月8日-7月9日, 東京

佐々木純子、中西広樹、刈屋佑美、江口賢史、佐々木雄彦、イノシトールリン脂質クオリティとシグナル伝達, 第69回日本細胞生物学会大会, 2017年6月13-15日, 仙台

佐々木純子, 性転換とリン脂質代謝, リポクオリティ領域若手研究発表会, 2017年5月25-26日, 横浜

Takehiko Sasaki, Hiroki Nakanishi, Satoshi Eguchi, Masaki Ishikawa, Akira Suzuki, Junko Sasaki, A method for studying quality of phosphoinositides, 第39回日本分子生物学会, 2016年11月30日-12月2日, 横浜

Junko Sasaki, Satoshi Kofuji, Hirotaka

Kimura, Hiroki Nakanishi, Shunsuke Takasuga, Takehiko Sasaki, INPP4B suppresses thyroid tumorigenesis by dephosphorylating PI(3,4,5)P3, Colloquium on Emerging Metabolomics, July 25-27, 2016, Las Vegas, USA

中西広樹、江口賢史、石川将己、鈴木聡、佐々木純子、佐々木雄彦、ホスホイノシタイトの新しい解析方法, 第38回日本分子生物学会年会・第88回生化学会大会合同大会, 2015年12月1-4日, 神戸

木村洋貴、江口賢史、久場敬司、今井由美子、高須賀俊輔、伊藤玲悦、中村亮太郎、中西広樹、石川将己、佐々木純子、山崎正和、佐々木雄彦、心肥大におけるホスホイノシタイト代謝酵素 Vps34 のタンパク質分解機構の役割, 第38回日本分子生物学会年会・第88回生化学会大会合同大会, 2015年12月1-4日, 神戸

中西広樹、小藤智史、江口賢史、中村亮太郎、石川将己、高須賀俊輔、佐々木純子、佐々木雄彦、イノシトールリン脂質研究の新しい方法論の提示, 第14回生命科学研究会, 2015年6月26-27日, 神奈川

〔図書〕(計 2件)

Junko Sasaki, Takehiko Sasaki, Regulation of Chronic Inflammation by Control of Macrophage Activation and Polarization, Chronic Inflammation, (2016), 97-107, Springer

中西広樹, 最先端リポドミクスで膜リン脂質を測定する, 生体の科学, 67, 193-197, (2016), 医学書院

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称: ホスホイノシタイト分離測定法の開発  
発明者: 中西広樹, 佐々木雄彦, 佐々木純子, 江口賢史, 中西貴代  
権利者: 国立大学法人秋田大学, ALTe

種類: 特許  
番号: 特願 2017- 51354  
出願年月日: 平成 29 年 3 月 16 日  
国内外の別: 国内

名称: 新規リン脂質およびその利用  
発明者: 佐々木雄彦, 中西広樹, 石川将己, 上野紀子, 江口賢史, 佐々木純子  
権利者: 国立大学法人秋田大学, ALTe  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-144177  
出願年月日: 平成 28 年 7 月 22 日  
国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.med.akita-u.ac.jp/~bisei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
佐々木 純子 (SASAKI JUNKO)  
秋田大学大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 30333371

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
中西 広樹 (NAKANISHI HIROKI)  
秋田大学大学生体情報研究センター・助教  
研究者番号: 10466740

(4) 研究協力者  
( )