

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20372

研究課題名(和文)新規分子が制御する癌細胞転移、増殖機構の解明研究

研究課題名(英文) Studied on the mechanisms of cancer metastasis and proliferation regulated by a new molecule

研究代表者

浅野 智志 (Asano, Satoshi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：30570535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ある種の癌細胞では、PI(3,4,5)P3関連経路(PI3K-Akt経路)が活性化しており、癌細胞増殖や転移能亢進の要因となっている。本研究では、PI3K-Akt経路の制御が破綻し増悪化した乳癌細胞BT-549の転移がPRIPの発現によって抑制できるか検討した。BT-549にPRIP1を導入し、ヌードマウスの側腹部乳房近傍の皮下脂肪内に移植し、in vivo リアルタイムイメージングを行った。移植後5週間すると、コントロール群はリンパ節への転移が顕著に観察されたのに対して、PRIP1を導入した細胞群はリンパ節への転移が抑制された。この結果は、PRIPが癌転移抑制に効果があることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Lamellipodia are formed at the leading edge of migrating cells, and the formation is regulated by the metabolism of PI(4,5)P<sub>2</sub>, an inositol phospholipid, into PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. Phospholipase C (PLC)-related but catalytically inactive protein (PRIP) has high homology to PLC-1 and binds to PI(4,5)P<sub>2</sub> at the pleckstrin homology (PH) domain. However, the functions of PRIP in the regulation of phosphoinositide signaling have not been determined. In this study, we examined the potential role and mechanisms of PRIP in controlling phosphoinositide metabolism and migration activity of cancer cells. PRIP overexpression in MCF-7 and BT-549 human breast cancer cells inhibited cell migration in vitro and metastasis development in vivo. PI(3,4,5)P<sub>3</sub> production was decreased in Prip-overexpressing MCF-7 and BT-549 cells. Collectively, the suppressor activity of PRIP in PI(4,5)P<sub>2</sub> metabolism regulates the tumour migration, suggesting PRIP as a promising target for protection against metastatic progression.

研究分野：細胞生物学

キーワード：乳癌細胞 転移 細胞移動 イノシトールリン脂質

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、inositol 1,4,5-trisphosphate 結合性タンパク質である PLC-related catalytically inactive protein (PRIP) を同定した (Kanematsu et al., 1992)。引き続き解析で、PRIP は PI(4,5)P<sub>2</sub> など、いくつかのイノシトールリン脂質と結合することが示された。近年、申請者は、PRIP がキネシンモータータンパク質依存的な細胞内小胞輸送に関与することを明らかにした (Asano et al., 2014)。

PRIP ノックアウトマウス胎児性線維芽細胞 (PRIP KO MEF) を用いた random migration assay によって、PRIP が細胞移動を負に調節する分子であることを示した。PRIP 全長、あるいは PRIP の PH ドメイン (PRIP PH)、PH ドメインの欠失ミュータント (PRIP ΔPH) や PI(4,5)P<sub>2</sub> と結合できない PRIP ミュータント (PRIP R134Q) を PRIP KO MEF に発現させ、その移動能を評価したところ、PRIP 全長あるいは PRIP PH を発現させた細胞は PRIP KO MEF の細胞移動が抑制され、一方、PRIP ΔPH や PRIP R134Q を発現させた細胞ではその移動性が抑制されることはなかった。この結果は PRIP が細胞移動を抑制するには PH ドメインを介した PI(4,5)P<sub>2</sub> との結合を必要とすることを示唆している。

PI(4,5)P<sub>2</sub> は細胞膜の成分である。EGFP で標識した PRIP 全長と各 PRIP ミュータントを PRIP KO MEF に発現させ、これらの局在を確認したところ、細胞移動を抑制することができた PRIP 全長と PRIP PH は細胞膜に局在し、一方、PRIP ΔPH や PRIP R134Q はほとんど細胞膜に局在していなかった。この結果は、PRIP が細胞膜近傍で細胞移動調節に働いている可能性を示唆している。

細胞が移動する時、移動端では細胞膜ラッフルリングが起こる。PRIP KO MEF では、野生型と比較して PDGF 刺激誘導性のラッフル膜形成が亢進していることが分かった。このラッフル膜形成の亢進は、PRIP KO MEF に PRIP を戻し発現させることによって野生型で観察された表現型へと回復した。

葉状仮足/ラッフル膜の形成には、細胞膜の PI(3,4,5)P<sub>3</sub> [PI(4,5)P<sub>2</sub> がリン酸化された分子] が必要である。PRIP KO MEF のイノシトールリン脂質代謝の変調を検討するために、細胞膜の PI(4,5)P<sub>2</sub> と PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 量を調べた。野生型に比べて PRIP KO MEF では PDGF 刺激によって、細胞膜 PI(4,5)P<sub>2</sub> 量はより顕著に減少し、一方、PI(3,4,5)P<sub>3</sub> は顕著に増加することが明らかとなった。これらの結果は、PRIP が細胞膜における PI(4,5)P<sub>2</sub> のリン酸化 [PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 合成] に抑制的に働き、その結果ラッフル膜の形成が阻害されることを示唆している。

PI3K の触媒サブユニットである p110α は PI(4,5)P<sub>2</sub> に結合し、これをリン酸化する。In vitro PI(4,5)P<sub>2</sub> リポソーム沈降法を用いて p110α と PI(4,5)P<sub>2</sub> の結合を PRIP が阻害するの

かどうかを検討した。リコンビナント p110α と調節サブユニット p85α を PI(4,5)P<sub>2</sub> リポソームと混ぜ合わせ、遠心によって沈降させたところ、PI3K と PI(4,5)P<sub>2</sub> は共沈降した。しかし、リコンビナント PRIP PH 存在下では、PI3K と PI(4,5)P<sub>2</sub> の結合は抑制されることがわかった。リコンビナント PI3K による PI(4,5)P<sub>2</sub> のリン酸化活性も PRIP PH によって阻害されることがわかった。総括すると、PRIP は細胞膜における PI3K と PI(4,5)P<sub>2</sub> の結合をコントロールする分子であり、PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 合成を調節し、ラッフル膜形成、細胞移動を制御していることが示唆された。

口腔癌の 80% 以上は口腔粘膜から発生する扁平上皮癌である。ある種の舌扁平上皮癌細胞では、PI3K の恒常的な活性化が認められ、増悪化の要因となっている。近年、PI3K-Akt 経路をターゲットとした様々な阻害剤が開発され、臨床応用に向けた研究が進められている。しかし、薬物の副作用、迂回機構やフィードバック効果による阻害剤の効果制限などがあり、良好な結果が得られないとの報告がある。そこで、本研究を通して、PRIP が制御する細胞膜 PI(3,4,5)P<sub>3</sub> の調節機構を明らかにし、PI3K-Akt 経路が亢進している癌細胞に応用出来れば、癌の増殖や転移を抑制する新しい治療法の開発に繋がると考える。

## 2. 研究の目的

PRIP が PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 合成を制御することで PI3K シグナルを下方調節する分子であり、また、PRIP isoform はユビキタスに細胞に発現していることから (Kanematsu et al., 2005)、様々な細胞で PRIP による PI(3,4,5)P<sub>3</sub> の量的調節系が稼働している可能性が考えられた。癌細胞の増悪化には、PI3K、Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN, PI(3,4,5)P<sub>3</sub> の脱リン酸化酵素)、Akt (PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 下流のエフェクター分子の一つ) の突然変異による PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-Akt 経路の活性化が一因であると考えられており、PRIP による PI(3,4,5)P<sub>3</sub> の産生抑制系を増強すれば癌細胞の増悪化を押さえ込めると考え、本研究ではこの仮説を検討する。

## 3. 研究の方法

細胞は PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-Akt 経路の活性化している乳癌細胞 MCF-7 (PI3K が恒常的に活性化しており、そのため PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 産生が亢進している細胞) と BT-549 (PI(3,4,5)P<sub>3</sub> の脱リン酸化酵素である PTEN の欠失によって PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 量が恒常的に増加している細胞) を用いた。細胞の移動能は Random migration assay、wound healing assay によって解析した。PRIP や PRIP のミュータントを発現させるためのプラスミドベクターはリポフェクション法もしくは

はエレクトロポレーションによって乳癌細胞(MEF-7 細胞, BT-549 細胞)に導入した。また、これらの細胞に選択薬剤 G418 を用い、PRIP を安定発現する単一細胞株を樹立した。乳癌細胞の転移能は DsRed2 を安定発現する BT-549 細胞をヌードマウスの乳房皮下脂肪組織に接種し、in vivo ライブイメージングを行うことで調べた。細胞内 PI(4,5)P<sub>2</sub>-PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 代謝は BODIPY FL-PI(4,5)P<sub>2</sub> を細胞に取り込ませ 37 で 1 時間反応させた後、脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーによって展開し、BODIPY FL-PI(4,5)P<sub>2</sub> の代謝産物を検出することで調べた。

#### 4. 研究成果

以前の研究によって、PRIP が新規の細胞膜 PI(3,4,5)P<sub>3</sub> の調節タンパク質であり、PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 依存的な細胞移動や Akt 経路のシグナリングを制御していることを見出した。ある種の癌細胞では、このような PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 関連経路 (PI3K-Akt 経路) が活性化しており、癌細胞増殖や転移能亢進の要因となっている。

本研究では、PI3K-Akt 経路の制御が破綻し増悪化した癌細胞の細胞移動と転移が PRIP の発現によって抑制できるか検討した。まず PI3K 機能亢進が確認されている乳癌細胞 MCF-7 に PRIP を導入し、PRIP を安定的に発現する MCF-7 細胞株を樹立した。MTT アッセイによって細胞増殖を調べたところ外来性の PRIP を発現させた細胞は 2%、5%FBS 存在下でコントロール細胞群と比較して細胞増殖が低下することがわかった。PI3K-Akt シグナル経路タンパク質の活性 (リン酸化) をウエスタンブロッティングによって調べたところ外来性 PRIP を発現させた MCF-7 細胞ではこの経路が抑制されていることが明らかとなった。

Random migration assay, wound healing assay によって細胞の移動能を評価したところ外来性 PRIP を発現させると MCF-7 細胞、BT-549 細胞の細胞移動が抑制されることがわかった。さらに、Wound healing assay 時の MCF-7 細胞集団の先頭細胞の細胞膜の伸張の様子を観察したところ、外来性 PRIP を発現させた細胞では細胞膜の伸張が抑制された。これらの結果は、PRIP が癌細胞の PI3K 依存的な細胞増殖と細胞移動を抑制する分子であることを示唆している。

MCF-7 細胞と BT-549 細胞の細胞内 PI(4,5)P<sub>2</sub>-PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 代謝を調べたところ外来性 PRIP を発現させた MCF-7 細胞と BT-549 細胞の PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 合成が抑制されることがわかった。これは PRIP が乳癌細胞の PI3K 活性を制御することを示唆している。

BT-549 に DsRed2-PRIP1 を導入し、PRIP1 を恒常的に発現し、かつ蛍光を発することでマウス生体内においてその局在をトレース

することのできる細胞株を樹立した。この細胞をヌードマウスの側腹部乳房近傍の皮下脂肪内に移植し、in vivo リアルタイムイメージングを行い、転移の様子を調べた。移植後 1 週間では、DsRed2 空ベクターを導入した細胞 (コントロール) と DsRed2-PRIP1 を導入した細胞はともに移植部位近傍で観察され、その蛍光強度 (細胞数に依存) は同程度であった。移植後 5 週間すると、コントロール群はリンパ節への転移が顕著に観察されたのに対して、DsRed2-PRIP1 を導入した細胞群はリンパ節への転移が抑制された。これらの結果は、PRIP による PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 合成制御が癌転移抑制に効果があることを示唆している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Oue K, Yamawaki Y, Asano S, Mizokami A, Hirata M, Irifune M, Kanematsu T. (2017) Phospholipase C-related catalytically inactive protein-knockout mice exhibit uncoupling protein 1 upregulation in adipose tissues following chronic cold exposure. *Journal of Oral Biosciences*. 59:108-112. DOI:10.1016/j.job. 2017. 04. 001 査読有
2. Hayashiuchi M, Kitayama T, Morita K, Yamawaki Y, Oue K, Yoshinaka T, Asano S, Harada K, Kang Y, Hirata M, Irifune M, Okada M, Kanematsu T. (2017) General anesthetic actions on GABAA receptors in vivo are reduced in phospholipase C-related catalytically inactive protein knockout mice. *Journal of Anesthesia*. 印刷中 DOI: 10.1007/s00540-017-2350-2 査読有
3. Oue K, Zhang J, Harada-Hada K, Asano S, Yamawaki Y, Hayashiuchi M, Furusho H, Takata T, Irifune M, Hirata M, Kanematsu T. (2016) Phospholipase C-related catalytically inactive protein is a new modulator of thermogenesis promoted by  $\beta$ -adrenergic receptors in brown adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 291:4185-4196 DOI:10.1074/jbc. M115. 705723 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. 浅野智志, 兼松隆 (2017 年 3 月 15 日) Expression of phospholipase C-related catalytically inactive protein suppresses cancerous metastasis. 第 90 回日本薬理学会年会 (長崎県・長崎市)
2. 浅野智志, 兼松隆 (2016 年 7 月 22 日) Suppression of PI3K-dependent breast cancer cell migration by PRIP. GAP (Global

Academic Program) related meeting (広島県・広島市)

3. 浅野智志、兼松隆 (2016年3月10日)  
Tumor cell migration is regulated by PRIP-mediated phosphatidylinositol turnover. 第89回日本薬理学会年会 (神奈川県・横浜市)
4. 浅野智志、兼松隆 (2015年6月27日)  
Suppression of breast cancer cell migration by PRIP, an upstream regulator of phosphoinositide 3-kinase signaling pathway. 第48回広島大学歯学会総会 (広島県・広島市)
5. 浅野智志、兼松隆 (2015年5月29日)  
PRIP分子による細胞移動の調節 PRIPは細胞膜におけるPI(3,4,5)P<sub>3</sub>合成を調節している. 第56回日本生化学会中国・四国支部例会 (島根県・松江市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

浅野 智志 (Satoshi Asano)  
広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教  
研究者番号：30570535

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

( )