

令和元年6月24日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11503

研究課題名(和文)膜リン脂質代謝変調がもたらす癌増悪メカニズムの解明研究

研究課題名(英文) Study on PRIP roles in cancer cell proliferation and migration

研究代表者

兼松 隆 (Kanematsu, Takashi)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・教授

研究者番号：10264053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜のリン脂質代謝は、様々な細胞機能制御に重要な役割をもつ。本研究では、phosphatidylinositol 4,5-bisphosphatからphosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphateへのリン脂質代謝を制御する新しい分子PLC-related catalytically inactive protein (PRIP)を見出し、その分子が細胞の移動や増殖を調節することを明らかにした。さらに、PRIP過剰発現癌細胞を作製し、ヌードマウスへの移植実験から、PRIP発現によって、がん細胞の増殖や転移が抑えられることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して新たな分子(PRIP)による細胞運動や細胞増殖の制御機構を明らかにすることができた。これにより、PRIPが調節している細胞膜のリン脂質代謝機能の破綻で生じる癌病態の新しい理解に繋がり、新たな創薬標的の提案ができることを期待できる。今後は、本研究成果を新しい抗腫瘍薬開発研究に繋げていく。

研究成果の概要(英文)：The metabolic processes of PI(4,5)P<sub>2</sub> into PI(3,4,5)P<sub>3</sub> and the subsequent PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-mediated signaling are involved in cell migration and proliferation. Dysfunctions in the control of this pathway can cause human cancer cell migration and metastatic growth. Here we investigated whether phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP), a PI(4,5)P<sub>2</sub>-binding protein, regulates cancer cell activity. PRIP expression inhibited cancer cell growth and migration in vitro and metastasis development in vivo. Overexpression of PRIP pleckstrin homology domain, a PI(4,5)P<sub>2</sub> binding motif, in cells significantly suppressed cell migration. PI(3,4,5)P<sub>3</sub> production was decreased in Prip-overexpressing cells. The association between PI3K and PI(4,5)P<sub>2</sub> was significantly inhibited by recombinant PRIP in vitro. Collectively, PRIP regulates the PI(4,5)P<sub>2</sub> metabolism, and the suppressor activity of PRIP in PI(4,5)P<sub>2</sub> metabolism regulates the tumor growth and migration.

研究分野：薬理学

キーワード：癌 細胞浸潤 細胞増殖 リン脂質代謝 PRIP PI3K PI(3,4,5)P<sub>3</sub> AKT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞運動は生命活動の根幹をなし、癌細胞の浸潤・転移、皮膚の創傷治癒、免疫担当細胞の移動などに必須である。細胞運動は、細胞膜と細胞骨格系の連動によって時空間的に制御されており、その制御には細胞膜のリン脂質代謝が深く関与している。

我々は、イノシトールリン脂質結合性タンパク質である PLC-related catalytically inactive protein (PRIP) を見出した。この分子は、phospholipase C- $\delta$ 1 (PLC- $\delta$ 1) と相同性が高いが、PLC 酵素活性 (PLC-related catalytically inactive protein (PRIP) phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PI(4,5)P<sub>2</sub>]の加水分解活性) を持たないという特徴を持つ。そこで、この分子の機能を解析して、PRIP がリン脂質代謝系を制御する可能性を見出した。

細胞は、細胞膜のリン脂質である PI(4,5)P<sub>2</sub> が、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) によって PI(3,4,5)P<sub>3</sub> に代謝され、細胞膜に phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate [PI(3,4,5)P<sub>3</sub>]が増加することで、その下流のシグナル分子が活性化され、細胞は遊走する。すなわち、リン脂質代謝[PI(4,5)P<sub>2</sub>→PI(3,4,5)P<sub>3</sub>]が過剰になり暴走を始めると、細胞は異常な遊走を起こすことになる。制御を失った遊走はがん細胞の浸潤転移機構に深く関わっている。

国立がん研究センターの横田博士らは、ヒト肺癌の中で最も予後不良で悪性度が高く、急速に増大・進展しリンパ行性・血行性に他臓器に転移する小細胞肺癌の高頻度にホモ接合的に遺伝子欠失領域 (2q33) を解析して、その領域に新規分子である PRIP 遺伝子がコードされていることを報告している [Hum Mol Genet, 1995]。しかしながら、PRIP 分子発現とがん細胞の浸潤転移機構との関わりは解析が行われていなかった。

### 2. 研究の目的

我々は、イノシトールリン脂質結合性タンパク質 PRIP が、リン脂質代謝系を制御して細胞運動を調節する可能性を見出したことから本研究を行った。細胞膜に埋込まれているイノシトールリン脂質は、細胞内の重要なシグナルを生み出す細胞膜上でのプラットフォームとなり、様々な細胞現象を調節している。本研究では、PRIP が仲介する膜リン脂質代謝の制御機構を解析して、細胞運動調節機構を明らかにする。さらに、肺癌細胞株で報告された癌細胞における PRIP 欠失との関係、癌の浸潤転移に PRIP がどのように関わるかを明らかにする。本研究から、細胞運動の新たな分子機構を明らかにできれば、その破綻で生じる癌病態の理解に繋がり、新たな創薬標的の提案による抗腫瘍薬開発研究に寄与すると期待できる。

### 3. 研究の方法

1. platelet-derived growth factor (PDGF)等の細胞遊走・増殖因子で *Prip* 欠損マウス胎児線維芽細胞 (*Prip*-KO MEF) を刺激し、細胞遊走能や増殖能を野生型 (wild-type) MEF と比較し、PRIP を介した細胞遊走の分子基盤をリン脂質代謝制御機構との関係を検討する。

2. PRIP 遺伝子を過剰発現させたり、遺伝子が欠失している癌細胞株を用いて、PRIP 遺伝子全長や変異体を遺伝子導入した恒常発現株を作製し、肺癌細胞の癌活性 (増殖・転移能) を *in vitro* や *in vivo* 解析を用いて検討する。

### 4. 研究成果

1-1. *Prip*-KO MEF は、wild-type MEF と比較して遊走能が高いことを認め、*Prip*-KO MEF では、膜リン脂質代謝が変調しており PI(3,4,5)P<sub>3</sub> が顕著に増加することを明らかにした (図 1a)。

1-2. *Prip*-KO MEF の遊走能が亢進するメカニズムを検討したところ、PI(3,4,5)P<sub>3</sub> の産生酵素である (PI3K) (p110) の遺伝子サイレンシングによって wild-type レベルまで *Prip*-KO MEF の遊走能が抑制できることなどから (図 1b)、PRIP が欠失すると PI3K PI(3,4,5)P<sub>3</sub> AKT シグナルが亢進することを示した。

図 1

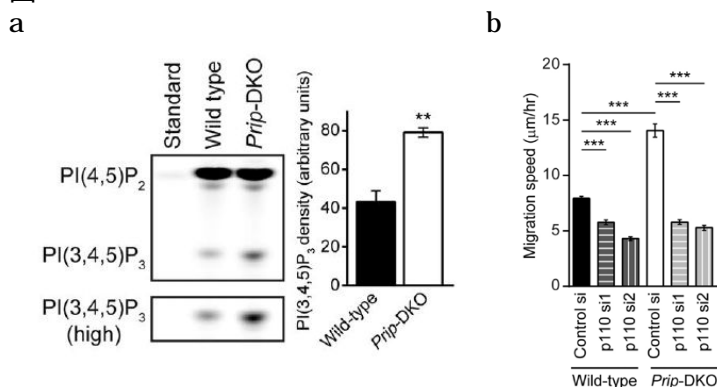


図 1 a: *Prip*-KO MEF の PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 量の亢進 b: PI3K ノックダウンによる MEF の細胞移動能抑制 (Sci. Rep., 2017)より改変

1-3. PRIP 分子の分子標的を明らかにするために、PRIP のプレックストリン相同領域 (PH ドメイン) の PI(4,5)P<sub>2</sub> への結合が PI3K の基質認識に及ぼす影響を検討した。まず、PRIP の PH ドメインは、PI(3,4,5)P<sub>3</sub> ではなく PI(4,5)P<sub>2</sub> への結合親和性が高いこと (図 2a)、また、PI3K の基質認識を競合的に拮抗することを示した (図 2b)。

図 2

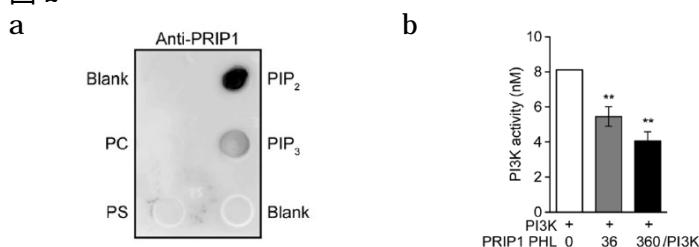


図 2 a: PRIP のリン脂質認識 b: PRIP の PI3K 基質認識に与える影響 (Sci. Rep., 2017) より改変

1-4. さらに、*Prip*-KO MEF は細胞増殖能が高いことを見出し、細胞周期に対する影響を検討した。その結果、*Prip*-KO MEF の GSK3β のリン酸化が亢進するなど PRIP が G1 期の細胞周期の調節に関わることを明らかにした。

2-1. MEF 細胞の結果を基に、癌細胞株を用いて PRIP の細胞の癌化プロセスにおける機能を検討した。各種ヒト肺がん細胞株を入手し PRIP 発現と細胞移動能について検討したところ、癌細胞の移動能は、PRIP の欠失によく相関することが明らかとなった。

2-2. 乳がん細胞株を用いて PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 産生の亢進を検討したところ、PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 産生が亢進し、その下流で AKT のリン酸化が亢進することを明らかにした。

2-3. 乳がん細胞株に PRIP 遺伝子変異体を遺伝子導入した実験結果から、PRIP の PI(3,4,5)P<sub>3</sub> AKT シグナルの制御には、PRIP 分子内のプレックストリン相同領域 [PI(4,5)P<sub>2</sub> 結合領域] が重要であることを明らかにした (図 3)。

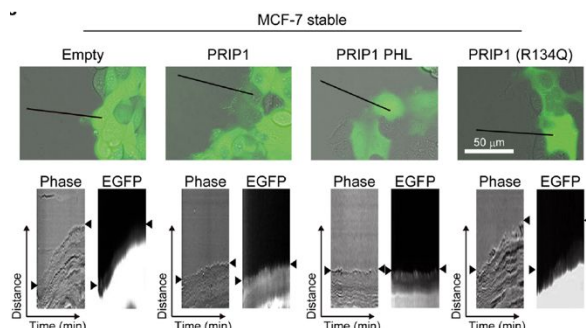


図 3 各種 PRIP 変異体と移動端の葉状仮足伸長制御 (Sci. Rep., 2017) より改変

2-4. ノードマウスへの PRIP 過剰発現癌細胞の移植モデル実験から、PRIP 発現が癌細胞転移を抑制することを示した。

2-5. ノードマウスへの PRIP 過剰発現癌細胞の移植モデル実験から、PRIP 発現が癌細胞増殖を抑制することを示した。

<引用文献>

Asano S., Taniguchi Y., Yamawaki Y., Gao J., Harada K., Takeuchi H., Hirata M., Kanematsu T. (2017) : Sci. Rep., 7(1) : 5408.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Kanematsu T, Oue K, Okumura T, Harada K, Yamawaki Y, Asano S, Mizokami A, Irifune M, Hirata M. (2019): Phospholipase C-related catalytically inactive protein: A novel signaling molecule for modulating fat metabolism and energy expenditure. J Oral Biosci, in press. 査読有. doi: 10.1016/j.job.2019.04.002
2. Nakatsu Y, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Ueda K, Inoue M, Mizuno Y, Nakanishi M, Sano T, Yamawaki Y, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Ryo A, Ono H, Minamino T,

- Takahashi S, Ohno H, Yoneda M, Takahashi K, Ishihara H, Katagiri H, Nishimura F, Kanematsu T, Yamada T, Asano T. (2019): Prolyl isomerase Pin1 suppresses thermogenic programs in adipocytes by promoting degradation of transcriptional co-activator PRDM16. *Cell Rep.*, 26 : 3221–3230. 査読有. doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.066.
3. Fujita T, Kumagai G, Liu X, Wada K., Tanaka T, Kudo H, Asari T, Fukutoku T, Sasaki A, Nitobe Y, Nikaido Y, Furukawa KI, Hirata M., Kanematsu T, Ueno S, Ishibashi Y. (2018): Poor motor-function recovery after spinal cord injury in anxiety-model mice with phospholipase C-related catalytically inactive protein type 1 knockout. *J. Neurotrauma*, 35(12) : 1379 - 1386. 査読有. doi: 10.1089/neu.2017.5492
4. Yamawaki Y, Yoshioka N, Nozaki K, Ito H, Oda K, Harada K, Shirawachi S, Asano S, Aizawa H, Yamawaki S, Kanematsu T, Akagi H. (2018): Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice. *Brain Res.*, 1680 : 13 - 38. 査読有. doi: 10.1016/j.brainres.2017.12.004.
5. Asano S, Taniguchi Y, Yamawaki Y, Gao J, Harada K, Takeuchi H, Hirata M, Kanematsu T. (2017): Suppression of cell migration by phospholipase C-related catalytically inactive protein-dependent modulation of PI3K signalling. *Sci. Rep.*, 7(1) : 5408. 査読有. doi: 10.1038/s41598-017-05908-7.
6. Nikaido Y, Furukawa T, Shimoyama S, Yamada J, Migita K, Koga K, Kushikata T, Hirota K, Kanematsu T, Hirata M, Ueno S. (2017): Propofol anesthesia is reduced in phospholipase C-related inactive protein type-1 knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 361(3) : 367 - 374. 査読有. doi: 10.1124/jpet.116.239145.
7. 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 GABA<sub>A</sub> receptors in vivo are reduced in phospholipase C-related catalytically inactive protein knockout mice. *J. Anesth.*, 31(4) : 531 - 538. 査読有. doi: 10.1007/s00540-017-2350-2.
8. 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. *J. Oral Biosci.*, 59(2) : 108 - 112. 査読有. doi: 10.1016/j.job.2017.04.001
9. Sano T, Nagayasu S, Suzuki S, Iwashita M, Yamashita A, Shinjo T, Sanui T, Kushiya A, Kanematsu T, Asano T, Nishimura F. (2017): Epicatechin downregulates adipose tissue CCL19 expression and thereby ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 27(3) : 249–259. 査読有. doi: 10.1016/j.numecd.2016.11.008.
10. Yamawaki Y, Oue K, Shirawachi S, Asano S, Harada K, Kanematsu T. Phospholipase C-related catalytically inactive protein can regulate obesity, a state of peripheral inflammation. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 53(1) : 18 - 24 . 査読有. doi: 10.1016/j.jdsr.2016.06.001

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Kanematsu T, Asano S : Phospholipase C-related catalytically inactive protein modulates cytokinesis progression : The 92th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, (Osaka) March 14–16, 2019.
2. Ikura Y, Asano S, Kanematsu T : PRIP protects PI(4,5)P<sub>2</sub> from its metabolic enzyme and contributes to completion of cytokinesis : The 7th Hiroshima Conference, (Hiroshima) March 29–30, 2018.
3. Asano S, Kanematsu T : PI(4,5)P<sub>2</sub> metabolism regulator PRIP controls the metastatic potential in breast cancer cells : The 59th Chu-shikoku Branch Meeting of the Japanese Biochemical Society, (Yonago) May 26–27, 2018
4. Maetani Y, Asano S, Irifune M, Kanematsu T : PRIP modulates AKT-GSK3 $\beta$  signaling and regulates cell cycle progression : The 51th Annual Meeting of the Hiroshima University Dental Society, (Hiroshima) June, 2018
5. Kanematsu T, Asano S, Yamawaki Y, Kusaka S : Phospholipase C-related catalytically inactive protein regulates phosphatidylinositol metabolism and modulates cancer cell migration : The 8th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, (Kyoto) July1–6, 2018 2018
6. Asano S, Maetani Y, Ikura Y, Kanematsu T : Phospholipase C-related catalytically inactive protein enhances cisplatin-induced apoptosis: The 8th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (Kyoto) July1–6, 2018 2018
7. Maetani Y, Asano S, Kanematsu T : Expression of PRIP in breast cancer cells downregulates tumor growth : The 60th Annual Meetings of Japanese Association for Oral

Biology, (Fukuoka) September, 5–7, 2018

8. Kanematsu T, Oue K, Yamawaki Y, Asano S : Phospholipase C-related catalytically inactive protein regulates fat metabolism and energy expenditure : Obesity-2018, (Amsterdam) April 12-13, 2018

9. Kanematsu T, Oue K, Sakata S, Yamawaki Y, Asano S : A new molecular mechanism that regulates energy expenditure by regulating the function of white and brown adipocytes : The 60th Annual Meetings of Japanese Association for Oral Biology, (Fukuoka) September, 5–7, 2018

10. Kanematsu T, Asano S : Phospholipase C-related catalytically inactive protein, a phosphatidylinositol metabolism regulator, controls the metastatic potential in breast cancer cells : The 8th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology, (Fukuoka) October 14–16, 2018

11. Asano S, Kanematsu T : Expression of phospholipase C-related catalytically inactive protein suppresses cancerous metastasis : 第 90 回日本薬理学会年会, (Nagasaki) Marc, 15-17, 2017

12. Maetani Y, Asano S, Irifune M, Kanematsu T : Over expression of PRIP in MCF-7 cells, a breast cancer cell line, enhances cisplatin induced apoptosis : 第 50 回広島大学歯学会, (Hiroshima) June, 2017

13. Asano S, Kanematsu T : Regulation of cytokinesis by phospholipase C-related catalytically inactive protein, as a sequestrant of PI(4,5)P<sub>2</sub> in the cleavage furrow : 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, (Matsumoto) September, 16–18, 2017

14. Asano S, Kanematsu T : Suppression of PI3K-dependent breast cancer cell migration by PRIP : GAP (Global Academic Program) related meeting, (Hiroshima), June 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

○取得状況(計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名 : 浅野 智志

ローマ字氏名 : ASANO SATOSHI

所属研究機関名 : 広島大学

部局名 : 大学院医歯薬保健学研究院科

職名 : 助教

研究者番号(8桁) : 3 0 5 7 0 5 3 5

研究分担者氏名：山脇 洋輔

ローマ字氏名：YAMAWAKI YOSUKE

所属研究機関名：広島大学

部局名：大学院医歯薬保健学研究院科

職名：助教

研究者番号(8桁): 90584061

(2)研究協力者

研究協力者氏名：前谷 有香

ローマ字氏名：Maetani Yuka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。