

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08594

研究課題名(和文) S1Pシグナリングによる癌炎症環境における悪玉エクソソーム成熟機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of the mechanism of S1P-signaling-induced exosome maturation on tumor-promoting inflammation

研究代表者

梶本 武利 (Kajimoto, Taketoshi)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：00509953

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)：本研究では、癌の転移前炎症におけるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)シグナリングによる悪玉エクソソーム成熟機構の詳細を分子レベルで明らかにし、癌の増悪を分子レベルで制御する新たな治療法開発への道筋を示すことを目指した。その結果、S1Pシグナリングの下流ターゲットとしてプロテインキナーゼC(aPKC)を見出し、さらにS1P-aPKCシグナリングの分子機構が癌増悪や癌遠隔転移において重要な役割を担う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

本研究のポイントは、これまでよく分かっていなかったエクソソームが関わる癌の増悪・遠隔転移の分子メカニズムについて、S1P-aPKCシグナリングという全く新たなキープレーヤーを見出した点である。また本研究の成果により、癌の増悪や遠隔転移に対して、S1P-aPKCシグナリングを分子レベルで制御する新たな治療法開発への道筋が示された。今後は、本研究成果を応用した新たながん治療法の実現へ向けて、S1P-aPKCシグナリングのさらに詳細な分子メカニズムの解明とリード化合物の創出を目指した分子標的創薬の研究を平行して進める。

研究成果の概要(英文)：The goal of our project is discovery of a key molecular mechanism to develop new therapy against cancer. To figure out this purpose, in this project, we tried to make clear the detailed molecular mechanism of sphingosine 1-phosphate (S1P) signaling-induced exosome maturation on tumor-promoting inflammation. Then we discover that protein kinase c (aPKC) is constantly activating downstream of constant S1P signaling in cancer cells. Moreover we found that the S1P-aPKC signaling plays a critical role on tumor progression and tumor metastasis.

研究分野：シグナル伝達

キーワード：スフィンゴシン1-リン酸

## 1. 研究開始当初の背景

国内において癌は死因の第1位であり、特に図1に示す通り全身へ癌が転移（ステージ4）すると余命は著しく低下することが知られていた。そのため、癌の撲滅に向けて癌の転移を抑える薬の開発が強く求められていた。

癌遠隔転移の分野では、「エクソソーム」をターゲットとする新たな癌の診断法・治療法が開発が世界レベルで急速に進められていた。また最新の研究成果として、転移候補先の転移前炎症環境におけるエクソソーム積荷タンパク質の重要性

が注目されていた。これは原発巣からの作用により遠く離れた転移前の臓器に免疫系の細胞が集まり、炎症環境中のいずれかの細胞が S100 や HSP70 などの炎症関連積荷タンパク質を含んだ悪玉エクソソームを放出し周囲細胞に作用することで、癌細胞が転移しやすい炎症環境としての土壌を事前に形成するというものであり、実際に炎症関連積荷タンパク質の機能を阻害することで遠隔転移が抑えられることが示されていた。ただ、炎症環境中のどの細胞がどのようなメカニズムで悪玉エクソソームを放出するのか、その詳細は全く明らかになっていなかった。そこで、癌炎症環境中における悪玉エクソソームの成熟機構の詳細を明らかにすることができれば、エクソソームによる炎症環境形成を制御し、結果として癌の遠隔転移を抑制する新たな治療法が開発が可能になると考えられた。

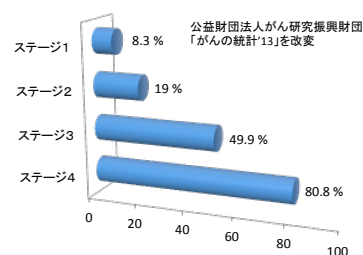


図1：ステージ別の癌による死亡率

## 2. 研究の目的

申請者は、図2に示すスフィンゴシンキナーゼ2 (SphK2) によるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) の産生およびS1PによるS1P受容体の活性化のメカニズムが、細胞内膜系の多胞体エンドソーム上で恒常的に働いていること、そして多胞体エンドソーム上でSphK2によって産生されるS1Pが、上記HSP70を含む各種機能性タンパク質のエクソソーム前駆顆粒へのソーティングを惹起することを明らかにしていた(図3)。また、S1P産生を引き起こすSphK2やS1P受容体などのS1Pシグナリングに関与する分子の働きを抑えることにより、積荷を含まないエクソソームの作製にも成功していた。これらの結果は、S1Pシグナリングを制御することにより悪玉エクソソームを善玉エクソソームへと変化させ、転移前炎症を抑制し、癌遠隔転移を克服できる可能性を示していた。

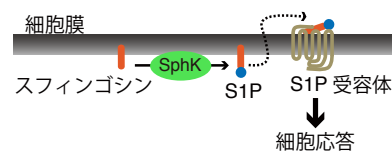


図2 S1Pの作用メカニズム

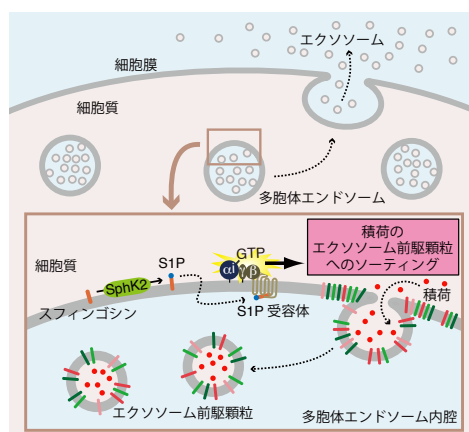


図3 S1Pシグナリングによるエクソソームへの積荷ソーティング機構

そこで本研究課題では、癌の転移候補先臓器の転移前炎症環境におけるS1Pシグナリングによる悪玉エクソソーム成熟機構の詳細を分子レベルで明らかにし、癌の増悪を分子レベルで制御する新たな治療法開発への道筋をつけることを目的としている。

### 3. 研究の方法

本課題研究期間では、上記目的の達成に向け、以下の個別課題について探究した。

#### 課題1：細胞内局所でのS1Pイメージング技術の開発

生体細胞内局所でのS1P動態のリアルタイムイメージングを行うために、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の原理を用いたS1Pセンサーの開発を行う。

#### 課題2：転移前炎症領域におけるエクソソーム積荷ソーティング亢進細胞の同定

多胞体エンドソーム上でのS1Pシグナリング活性すなわちS1P産生を指標として、転移前炎症領域におけるエクソソーム積荷ソーティング亢進細胞の同定を行う。

#### 課題3：転移前炎症領域における悪玉エクソソーム成熟機構と炎症増悪・転移促進との関係解明

課題2で同定したエクソソーム積荷ソーティング亢進細胞におけるS1Pシグナリングによる悪玉エクソソーム成熟と転移前炎症の増悪および癌遠隔転移との関係を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) 生細胞内でのS1P動態を可視化する技術の開発

生体細胞内局所でのS1P動態のリアルタイムイメージングを行うための、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の原理を用いたS1Pセンサーの開発を行った(図4)。FRETによるS1PセンサーはS1P結合ドメインをシアン蛍光タンパク質(CFP)及び黄色蛍光タンパク質(YFP)でサンドイッチした構造とした。既知のS1P結合ドメインを数種類用意し、遺伝子組換え技術によりS1Pセンサーのプロトタイプを構築し、蛍光光度計を用いてS1P検出能力の評価を行ったところ、S1Pに対して有意な応答を示すS1Pセンサーが得られた。さらにこのS1Pセンサーを培養細胞に遺伝子導入し、細胞内でのS1P応答性についてFRET蛍光イメージング顕微鏡システムを用いて検討したところ、S1P添加によるS1PセンサーのFRET変化が観察された。S1P産生の細胞内での動態を観察した例はなく、今回世界に先駆けて細胞内でのS1P動態のイメージングに成功したことは画期的である。ただ今回開発したS1PセンサーのS1Pに対する応答性は弱く、引き続きより鋭敏なS1Pセンサーの構築へ向けた研究開発が必要である。

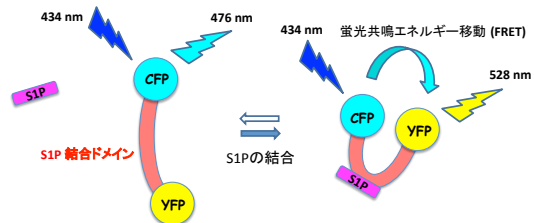


図4 FRET原理を用いたS1Pセンサー

#### (2) S1Pの新たな標的タンパク質の同定

上記S1Pセンサーの改良に向けた新たなS1P結合ドメインの探索を行い、新たなS1P結合タンパク質としてプロテインキナーゼC(aPKC)を同定した。放射性同位体を用いたin vitroキナーゼ活性測定により、S1PによるaPKCの直接的活性化を検討したところ、S1Pの前駆体であるスフィンゴシンでは活性化されず、S1Pによってのみ活性化されることが示された(図5)。この結果はS1Pが選択的にaPKCを認識し活性化することを示しており、S1Pセンサーの新たな候補となると同時に、S1Pシグナリングの新たな下流シグナルを見出して点で重要である。

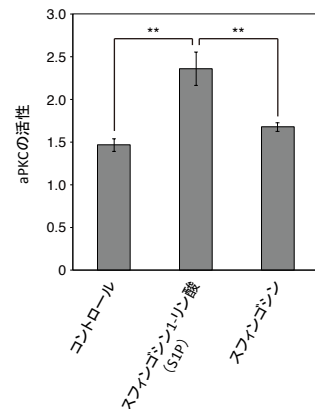


図5 S1Pの直接作用によるaPKCの選択的活性化

(3) S1PによるaPKCの活性化を生細胞内で可視化する技術の開発

aPKCの生細胞内での働き(キナーゼ活性)をリアルタイムに可視化するために、緑色蛍光タンパク質を用いた蛍光共鳴エネルギー移動(FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer)の原理によるaPKC選択的活性化検出レポーター(aCKAR: atypical PKC activity reporter)を開発した(図6)。aCKARは、緑色蛍光タンパク質の改変型である水色蛍光タンパク質と黄色蛍光タンパク質間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)現象を用いた1分子FRETレポーターである。

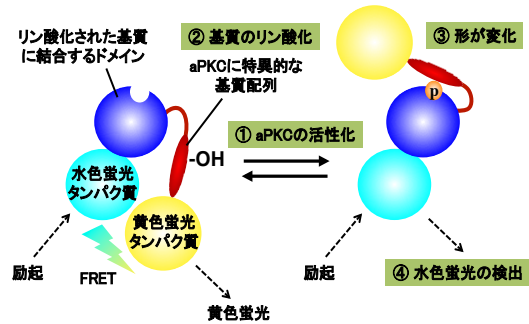


図6 aPKC 選択的活性化検出レポーター

① 細胞内でaPKCが活性化し、② aPKCに特異的な基質配列(赤色部分)がリン酸化(P)を受けると、③ リン酸化された基質配列が青色の部分に結合して形が大きく変化し、④ 結果FRET現象が起こらなくなるため蛍光が黄色から水色に変わる。このようにして色の変化によりaPKCの活性化状態を生きた細胞の中でモニターすることができる。

(4) aCKARを用いた癌細胞内でのS1PによるaPKCの恒常的活性化の発見

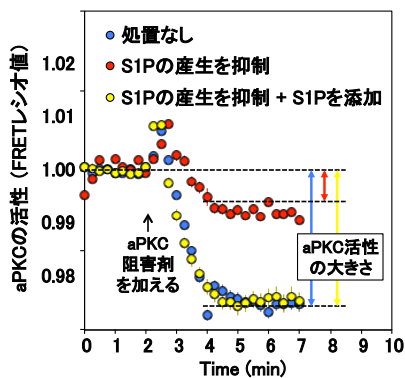


図7 S1PによるaPKCの恒常的活性化

癌細胞内のS1Pを枯渇させると、aPKCの恒常活性が約70%抑えられる(青→赤)。さらに細胞内にS1Pを添加するとaPKCの恒常活性が処置なしのレベルまで回復する(赤→黄)。

aCKARを用いて様々な癌細胞内のaPKC活性を検討したところ、多くの癌細胞種において比較的高いレベルの恒常的なaPKCの活性化が観察された。さらにこのaPKCの恒常活性を引き起こす因子を探索したところ、S1PがaPKCに作用して活性化させることが明らかとなった(図7)。この結果は、生細胞内においてもS1Pが下流シグナルとしてaPKCを選択的に認識し、活性化することを示した点で重要である。

(5) S1PによるaPKC活性化と癌増悪との関係の解明

癌細胞株を用いてaPKCの癌増悪との関係を調べたところ、aPKCが癌細胞のアポトーシスを抑制する働きがあることを見出した。さらにS1P-aPKCシグナリングとアポトーシスとの関係を検討したところ、栄養飢餓環境下でアポトーシス抵抗性を示す癌細胞においてS1P-aPKCシグナリングが必須の役割を担うことを明らかにした(図8)。

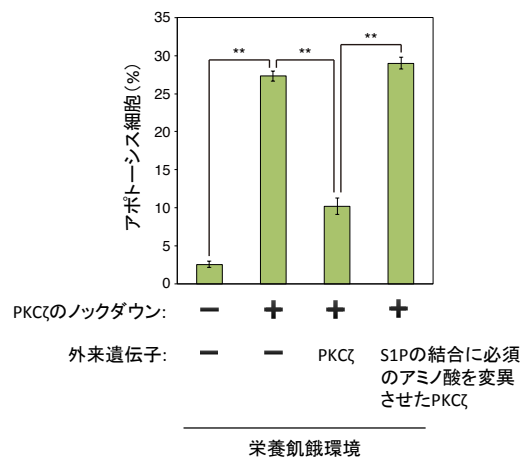


図8 S1P-aPKCシグナリングによる癌細胞のアポトーシス抵抗性の制御

siRNAによるノックダウン法により癌細胞に発現するaPKCの量を減少させると、癌細胞はアポトーシスを起こす。ここに野生型のaPKCを発現させるとアポトーシスの誘導は抑えられるが、S1Pの結合に必須のアミノ酸を変異させたaPKCではアポトーシス誘導は抑えられない。

S1P-aPKC シグナリングと癌増悪との関係を模式図にまとめると図9の様になる。癌細胞ではS1Pが恒常的に産生されており、その結果としてS1PのターゲットであるaPKCの恒常的な活性化が形成され、このS1P-aPKCシグナリングの高い恒常活性が癌細胞のアポトーシス抵抗性を正に制御する。この結果は、S1Pの恒常的な産生を引き起こすSphKの恒常的な活性化が癌増悪の律速となることを示した点で重要である。

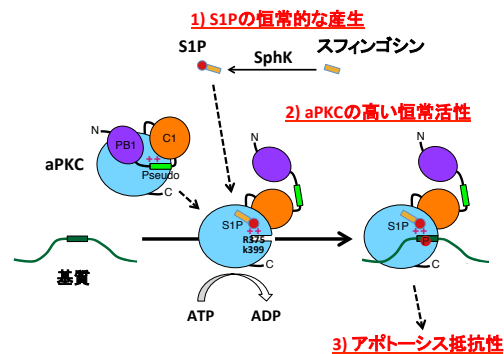


図9 癌細胞のアポトーシス抵抗性形成に関わるS1PによるaPKC活性化機構

#### (6) エクソソーム内へのエクソソーム積荷タンパク質ソーティングとS1P-aPKCシグナリングとの関係の解明

癌細胞において、エクソソーム積荷タンパク質のエクソソーム内へのソーティングにおけるS1P-aPKCシグナリング阻害の影響を検討したところ、S1P-aPKCシグナリングの阻害によりエクソソームの成熟が抑えられることが明らかとなった。この結果は、癌の増悪や遠隔転移のトリガーとなる悪玉エクソソームの成熟には、S1P-aPKCシグナリングが重要な役割を担うことを示唆しており、S1Pシグナリングによる悪玉エクソソーム成熟機構の詳細を分子レベルで解明した点で重要である。

本研究課題を通して、S1Pの下流ターゲットとしてaPKCを見出し、さらにS1P-aPKCシグナリングの分子機構が癌増悪(アポトーシス抵抗性)や癌遠隔転移(悪玉エクソソーム成熟促進)において重要な役割を担うことを明らかにした。本研究の成果により、癌の増悪や遠隔転移に対して、S1P-aPKCシグナリングを分子レベルで制御する、新たな治療法開発への道筋が示された。今後は、本研究成果を応用した新たながん治療法の実現へ向けて、S1P-aPKCシグナリングのさらに詳細な分子メカニズムの解明とリード化合物の創出を目指した分子標的創薬の研究を平行して推進していくことが必要不可欠である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Jung HY, Fattet L, Tsai JH, Kajimoto T, Chang Q, Newton AC, Yang J	4. 巻 21
2. 論文標題 Apical-basal polarity inhibits epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis by PAR-complex-mediated SNA11 degradation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 359 - 371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-019-0291-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kajimoto Taketoshi, Caliman Alisha D., Tobias Irene S., Okada Taro, Pilo Caila A., Van An-Angela N., Andrew McCammon J., Nakamura Shun-ichi, Newton Alexandra C.	4. 巻 12
2. 論文標題 Activation of atypical protein kinase C by sphingosine 1-phosphate revealed by an aPKC-specific activity reporter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaat6662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aat6662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kajimoto Taketoshi, Nakamura Shun-ichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Quantitative Analysis of Cargo Density in Single-Extracellular Vesicles by Imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bio-Protocol	6. 最初と最後の頁 3111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Badawy Shaymaa Mohamed Mohamed, Okada Taro, Kajimoto Taketoshi, Hirase Mitsuhiro, Matovelo Shubi Ambwene, Nakamura Shunsuke, Yoshida Daisuke, Ijuin Takeshi, Nakamura Shun-ichi	4. 巻 293
2. 論文標題 Extracellular $\alpha$ -synuclein drives sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1 out of lipid rafts, leading to impaired inhibitory G-protein signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 8208 ~ 8216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.001986	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nesma Nabil Ibrahiml Mohamed	4. 巻 63
2. 論文標題 Essential Role of Sphingosine Kinase 2 in the Regulation of Cargo Contents in the Exosomes from K562 Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kobe Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 E123-E129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirai, C., Badawy, S.M.M., Zhang, L., Okada, T., Kajimoto, T., Nakamura, S.	4. 巻 62
2. 論文標題 Phospholipase D is Dispensable for Epidermal Growth Factor-Induced Chemotaxis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Kobe Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 E162-E167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Badawy, S.M.M., Okada, T., Kajimoto, T., Ijuin, T., Nakamura, S.	4. 巻 7
2. 論文標題 DHHC5-mediated palmitoylation of S1P receptor subtype 1 determines G-protein coupling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-16457-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kajimoto, T., Mohamed, N.N.I., Badawy, S.M.M., Matovelo, S.A., Hirase, M., Nakamura, S., Yoshida, D., Okada, T., Ijuin, T., Nakamura, S.	4. 巻 293
2. 論文標題 Involvement of G subunits of Gi protein coupled with S1P receptor on multivesicular endosomes in F-actin formation and cargo sorting into exosomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 245-253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.808733	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 梶本 武利
2. 発表標題 プロテインキナーゼC活性イメージングが明らかにするアポトーシス抵抗性の新たな分子メカニズム
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kajimoto, T., Caliman, A.D., Tobias, I.S., Okada, T., Pilo, C.A., Van, A.A., McCammon J.A., Nakamura, S., Newton, A.C.
2. 発表標題 非典型プロテインキナーゼCのスフィンゴシン-1リン酸による新規活性化メカニズム
3. 学会等名 第71回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶本 武利
2. 発表標題 キナーゼ活性イメージングとドッキングシミュレーションの融合によるPKCシグナリング研究の新たな展開
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶本 武利、キャリマン アリシャ、トバイアス アイリーン、岡田 太郎、パイロ ケイラ、ヴァン アンジェラ、マキャモン アンドリュー、中村 俊一、ニュートン アレクサンドラ
2. 発表標題 新規プロテインキナーゼC活性化レポーターにより明らかとなるアポトーシス回避の分子メカニズム
3. 学会等名 第60回 日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Taketoshi Kajimoto
2. 発表標題 New departure in the research of protein kinase C signaling with a combination of live-cell imaging of kinase activity and in silico docking simulation
3. 学会等名 Kobe University-UC San Diego Joint Symposium on Life Science, Computational Science, and Structural Engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taketoshi Kajimoto, Alisha D. Caliman, Irene S. Tobias, Taro Okada, J. Andrew McCammon, Shun-ichi Nakamura, Alexandra C. Newton
2. 発表標題 Atypical Protein Kinase C-specific Activity Reporter Reveals Novel Activation Mechanism of Atypical Protein Kinase C by Sphingosine 1-phosphate
3. 学会等名 Experimental Biology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶本 武利、モハメド ネスマ、バダウィー シャイマー、マトペロ シュビー、平瀬 光寛、中村 俊介、吉田 大亮、岡田 太郎、伊集院 壮、中村 俊一
2. 発表標題 エクソソームへの積荷ソーティングにおけるRhoファミリー低分子量Gタンパク質の役割
3. 学会等名 第133回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶本 武利、モハメド ネスマ、バダウィー シャイマー、マトペロ シュビー、平瀬 光寛、中村 俊介、吉田 大亮、岡田 太郎、伊集院 壮、中村 俊一
2. 発表標題 エクソソームへの積荷ソーティングにおける三量体Gタンパク質 サブユニットシグナリングの役割
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taketoshi Kajimoto, Alisha D. Caliman, Irene S. Tobias, Taro Okada, J. Andrew McCammon, Shun-ichi Nakamura, Alexandra C. Newton
2. 発表標題 非典型プロテインキナーゼC特異的活性化レポーターにより明らかとなる非典型プロテインキナーゼCの新規活性化メカニズム
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of California San Diego		