

平成21年 6月15日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590061

研究課題名（和文） 生理活性リゾリン脂質の産生バランス制御とがん細胞浸潤転移の関係

研究課題名（英文） Regulation of synthetic balance of bioactive lysophospholipids and its relevance to tumor cell invasion

研究代表者

小林 哲幸（KOBAYASHI TETSUYUKI）

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・教授

研究者番号：50178323

研究成果の概要：

細胞増殖やがん細胞の浸潤に深く関わっている脂質分子として、リゾホスファチジン酸（LPA）と環状ホスファチジン酸（cPA）が知られている。本研究では、これら分子を生体内で合成する酵素（オートタキシン）とその活性調節機構について解析し、熱に安定なオートタキシン活性阻害因子と、熱に不安定な阻害因子が血清中に存在することを新たに見出した。さらに、中皮細胞由来のオートタキシンによって合成されたLPAがマトリックスメタロプロテアーゼを誘導し、細胞外マトリックス分解に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：脂質生化学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：リン脂質、生理活性脂質、癌、質量分析、浸潤、転移

1. 研究開始当初の背景

リゾホスファチジン酸（LPA）はグリセロール骨格の *sn*-1 位あるいは *sn*-2 位に脂肪酸を持ち、*sn*-3 位にリン酸基を有する最も単純な構造を持つリゾリン脂質である。その生理活性は、微量で細胞増殖の促進、がん細胞の浸潤促進、神経栄養因子作用、アクチンストレスファイバーの形成など、多様な生理作用を示し、多機能性脂質メディエーターとして生体内で機能しているということが明らかになっている。

一方、環状ホスファチジン酸（cPA）は、グリセロール骨格の *sn*-1 位に脂肪酸を持ち、*sn*-2 位と *sn*-3 位にリン酸が環状エステル結合したユニーク

な構造をもつ、LPA 類似体である。また、cPA は構造同様、その生理活性においても神経栄養因子作用やアクチンストレスファイバーの形成など、LPA と類似した作用を示すことが明らかとなっている。しかし、細胞増殖やがんの浸潤に対しては抑制的に働き、LPA とは相反する作用を示す。

LPA の生合成については、すでにいくつかの可能性が考えられていたが、cPA については長年その生合成経路が不明であった。しかし、近年、当研究室において血清中のリゾホスファチジルコリン（LPC）を基質とし、リゾホスホリパーゼ D (lyso PLD) 活性を持つオートタキシン (autotaxin, ATX) により生合成されるということが明らかになった。更に興味

深いことに、生成された cPA は同一の酵素、ATX の働きにより LPA へと変換されることも証明された。細胞増殖や、がん細胞の浸潤に対して相反する作用を示す LPA と cPA が、このように同一の酵素によって生成されることから、生体内中の何らかの因子が、ATX 活性の調節を行っている可能性が考えられるが詳細は不明である。

2. 研究の目的

ATX の活性調節について解明し、cPA、LPA の生成・分解といった一連の代謝機構を明らかにすることは、がんなどの病気や哺乳類の発生、発達を理解する上でたいへん意義深い。そこで、本研究では生体内中の ATX 活性調節因子の存在の有無、同定、性状解析を行った。

また、がん細胞の運動性や浸潤能に LPA や cPA がどのように関わっているかを解明することを目的に、本研究では LPA によって誘導されたがん細胞の浸潤について、*in vitro* 浸潤アッセイ系を用いて、宿主細胞の基底膜の分解という観点から解析した。

3. 研究の方法

(1) ATX 活性調節に関する実験

① ATX 活性測定 1

基質には、合成した 1-NBD-LPC と卵黄由来 LPC の混合物 (1:99) を用いた。test compounds (5~25 μ l) を、Buffer (20nmol LPC、0.1M Tris-HCl (pH 8.5)、140mM NaCl、2.5mM CaCl₂、1.0mM MgCl₂、0.7 μ M CoCl₂、0.1% BSA) に加えた (total volume 0.1ml)。ボルテックスミキサーにより溶液をよく混ぜ合わせた後、37°C で 2 時間反応させ、反応終了時に 0.35 倍容の 0.1M クエン酸を加えて溶液を酸性にした。そして、反応液の 5.4 倍容のクロロホルム/メタノール混液 (2:1) で脂質を抽出した。再度、5.4 倍容のクロロホルム/メタノール混液 (2:1) で脂質を抽出し、それらの抽出溶液を窒素ガスにより濃縮・乾固させた。得られた脂質を少量のクロロホルム/メタノール混液 (2:1) に溶かし、Silica Gel 60 F thin layer chromatography plates (TLC) にスポットした。その後、プレートを、展開溶媒：クロロホルム/メタノール/酢酸/1% 二亜硫酸ナトリウム (100:40:12:5) で脂質を分離し、LAS3000 (富士フィルム) の pro モード (460nm) で測定し、定量分析を行った。

② ATX 活性測定 2

基質には FS-3 (echelon) を用いた。FS-3 は干渉し合う 2 つの蛍光発色団をもつ物質であり、lysoPLD の働きにより蛍光発色団同士が離れることで発色する。この原理を用い、ATX 活性を以下の方法により測定した。なお、酵素源には FBS より精製した ATX を用いた。96 穴プレート (平底、コーティングなし) の

各ウェルに、精製 ATX を 5 μ l、10 μ M FS-3 試薬を 8 μ l、1% fatty acid free BSA (Sigma) を 2 μ l、Buffer (50mM Tris-HCl、140mM NaCl、5mM KCl、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、pH8.0) を 65 μ l、test compound を 20 μ l 加えた。ボルテックスミキサーにより溶液をよく混ぜ合わせた後、37°C でインキュベーションし、0~3 時間後の蛍光強度を LAS3000 (富士フィルム) の lite モード (460nm) で測定した。データは、コントロールの ATX 活性の変動に応じて規準化し、% で表示した。

(2) がん細胞浸潤に関わる実験

① 細胞培養

300g (8 週齢) のオスのドンリューラット (日本生物材料) を無菌的に開腹し、それから得た腸間膜を、37°C で 15 分間、0.25% トリプシン処理し、150 μ m のステンレスメッシュで濾過、遠心して中皮細胞を回収した。2 倍量のイーグル MEM アミノ酸ビタミン培地 (ニッスイ) を添加したイーグル MEM1 (ニッスイ) に、10% FBS を加えたメEDIUM で、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。一週間培養してコンフルエントまで育った単層の中皮細胞を、浸潤アッセイに用いた。

② *in vitro* 浸潤アッセイ

コンフルエントになるまで培養した中皮細胞層に、1-oleoyl lysophosphatidic acid (SIGMA) 存在下で MM1 細胞を重層し、さらに必要に応じて MMP のブロードインヒビターである GM6001 (CHEMICON) または、MMP-2 Inhibitor I (CALBIOCHEM)、MMP-9 Inhibitor I (CALBIOCHEM) をそれぞれ添加した。37°C、5% CO₂ の条件下で 20 時間培養したのち、10% ホルマリンで固定して、位相差顕微鏡下で、浸潤した MM1 細胞のコロニーをカウントした。

② マトリックスプロテアーゼ活性の測定 (ゼラチンザイモグラフィ)

コンフルエントになるまで培養した中皮細胞は、LPA で処理する 5 時間以上前に、無血清メEDIUM に置き換えた。中皮細胞または MM1 細胞を LPA で 20 時間処理した後、コンディションメEDIUM を回収し、サンプルバッファー (0.5M Tris-HCl : pH6.8、Glycerol、10% SDS、0.1% Bromophenol Blue) に 1:1 で混合した。0.1% ゼラチンを含んだ 10% ポリアクリルアミドゲルに 10 μ l ずつサンプルをアプライし、電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルを 2.5% Triton-X で 30 分間洗浄した。その後、Developing Buffer (1% Triton-X、50mM Tris-HCl : pH7.4、10mM CaCl₂) で 30 分間洗浄した。Developing Buffer を置き換え、37°C で一晩インキュベーションした。インキュベーション後、0.5% Coomassie Brilliant Blue (ナカライテスク) で 30 分

間染色し、脱染液（10%メタノール、7.5%酢酸）で脱染した。ルミノ・イメージアナライザーLAS-3000（富士フィルム）を用いてDIAモード（透過白色）で検出し、解析した。

③ 中皮細胞コンディショニングメディウム中の lysoPLD 活性の測定

中皮細胞を20時間無血清状態で培養し、そのコンディショニングメディウムを回収した。回収したコンディショニングメディウムをCentri plus YM-30（MILLIPORE）、Amicon Ultra-4（MILLIPORE）の二つのカラムに順次かけて、約50倍濃縮した。コントロールとして、中皮細胞を培養していないコントロールメディウムも同様に50倍濃縮をした。

lysoPLD活性の測定には、蛍光基質であるFS-3（echelon）を使用した。

④ 中皮細胞コンディショニングメディウムから脂質の抽出、MALDI-TOF MS 検出

20時間以上無血清処理した中皮細胞のコンディショニングメディウムを回収し、脂質を抽出した。LPAをPhos-tag試薬（NARD institute. ltd.）と結合させ、MALDI-TOF MS（AXIMA-LNR/-CFR/-CFR Plus(S/W Version 2.4)、島津製作所）で検出した。Linearモード下、power 90で測定した。

4. 研究成果

(1) ATX 活性調節因子の存在

ATXを除去したウシ胎仔血清（ATX depleted FBS）（全体100 μ l中の1/50~1/5量）を用い、血清中のATX活性調節因子の有無について調べた。基質には蛍光標識した1-NBD-LPC、酵素源にはFBSより精製したATXを用いた。その結果、加えるATX depleted FBSの量が増加するほど、ATX活性が下がり、LPA、cPAの生成量が減少した。また、非熱処理のATX depleted FBSと熱処理したATX depleted FBSでは、その阻害効果が異なることがわかった。この阻害効果の差は、ATX阻害効果をもつ因子の一部が熱により失活したためだと考えられる。このことから、血清中には、熱に安定なATX阻害因子と、熱に不安定なATX阻害因子（タンパク質）が存在することが示唆された。

(2) 熱安定 ATX 活性阻害因子の同定・性状解析

① LPA による ATX 活性阻害

熱安定阻害因子の可能性として、生成物阻害を考えた。LPAは1 μ MでATXの活性を阻害し、cPA、LPAともに約60%生成量を減少させた。さらに、LPAの脂肪酸の分子種の違いにより、ATX阻害効果が異なることが分かった。

② カルバ cPA (ccPA) による ATX 活性阻害

次に、cPA類似体、ccPAがATXに与える影響につ

いて調べた。2ccPAはcPAのsn-2位のOをCに、3ccPAはcPAのsn-3位のOをCに置き換えた構造物であり、環状リン酸基が開環していくと、cPAより安定である。実験の結果、2ccPA、3ccPAともに1 μ MでATX活性を阻害し、cPA、LPAともに生成量を減少させた。さらに、2ccPAの方が3ccPAよりも阻害効果が高く、LPA同様、脂肪酸の分子種によっても阻害効果が異なることが分かった。

③ アミノ酸類による ATX 活性阻害

ATX活性はL-ヒスチジンの濃度に依存して阻害された（Fig. 1）。このL-ヒスチジンのATX活性阻害について、Lineweaver-Burkプロットを用いて解析した結果、L-ヒスチジンはATX活性を競合的に阻害（ K_i 値：1.7mM）し、約1mMで60%近くcPA、LPAの生成量を減少させた。さらに、数々のアミノ酸や類似体についても調べたところ、L-トリプトファンにも同程度のATX阻害効果があるということが判明した。

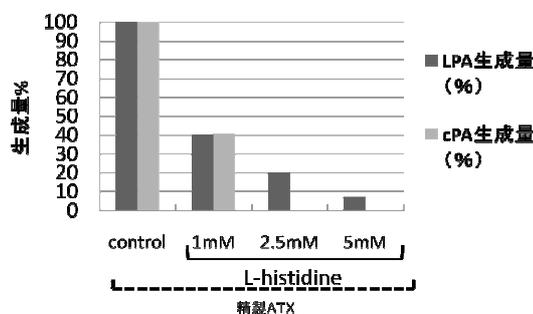


Fig. 1 L-ヒスチジンによる ATX 活性の阻害

基質：1-NBD-LPC、酵素：FBSより精製したATX。コントロールのcPA、LPA生成量に応じて規準化し、%で表示した。

今回の結果から、血清中には熱に安定なATX阻害因子と、熱に不安定なATX阻害因子が存在することが明らかとなった。熱に不安定なATX阻害因子はその性質から、おそらく何らかのタンパク質であると考えられるが実体はまだ不明である。熱安定ATX阻害因子については、生成物であるLPAなどに阻害活性があることがすでに知られていた。しかし、これまでの報告は全て、lysoPLD活性やLPA生成量の変化のみに注目し、cPA生成量の変化に着目していない。しかし、cPAの生体内での役割を考慮すると、ATX活性とcPA、LPA生成の関係を決して無視することはできない。そこで、これまでの報告をもとに、熱安定ATX阻害因子について焦点を絞り研究を進めた。その結果、LPA、ccPAは共に、cPAの生成量も減少させると判明した。複素芳香環をもつアミノ酸やその構造類似体もATX阻害効果があることが分かった。しかし、ATX活性阻害効果を示す際の濃度は、健常者の生体内濃度よりはるかに高いことから、実際に生体内で活性を調節する因子の正体とは考えにくい。よって、生体内では、複素芳香環を構造中にもち、低濃度でATXの活性を阻害している未知の因子が存在すると考えられる。

(3) LPA 誘導のがん細胞浸潤における MMP の役割

① *in vitro* 浸潤アッセイ系における MMP-2、MMP-9 阻害剤の効果

MMP-2、MMP-9 それぞれの特異的阻害剤を用いて、*in vitro* 浸潤アッセイを行った。まず、ドンリューラットの腸間膜から中皮細胞を取り出し、7 日間培養してコンフルエントな単層にした後、MM1 細胞を重層し、LPA で浸潤を誘導した。MMP 阻害剤は LPA を添加すると同時に添加した。20 時間後に細胞を固定し、浸潤した細胞数を位相差顕微鏡でカウントした。その結果、MMP-2、MMP-9 のどちらの阻害剤添加によっても、LPA で誘導された浸潤が抑制された。このことにより、LPA 依存的浸潤に MMP-2、MMP-9 活性が関与していることが示唆された。

② 中皮細胞、MM1 細胞における MMP-2、MMP-9 の発現量変化

中皮細胞、MM1 細胞それぞれにおける MMP-2、MMP-9 の mRNA 発現について、RT-PCR により検討をした。その結果、中皮細胞は MMP-2、MMP-9 両方の mRNA を発現していたが、MM1 細胞は、MMP-2 の mRNA を発現していなかった。また、中皮細胞について、LPA 処理による mRNA 発現量の変化を検討したところ、MMP-2、MMP-9 のいずれの発現量とも LPA で増加する傾向が見られた。

③ 中皮細胞、MM1 細胞のコンディションメEDIUM中の MMP-2、MMP-9 活性の検討

中皮細胞、MM1 細胞を、それぞれ無血清で LPA 添加の条件下で 20 時間培養後、そのコンディションメEDIUMを回収し、ゼラチンゼイモグラフィを行って MMP 活性を測定した。その結果、中皮細胞コンディションメEDIUMでは、pro-MMP-2、active-MMP-2、MMP-9 のタンパク質バンドが検出されたが、MM1 細胞コンディションメEDIUMではバンドは全く検出することができなかった。また、中皮細胞コンディションメEDIUMの MMP-9 については、LPA の濃度依存的に、活性が強くなる傾向が見られた。また、MMP-2 は LPA 刺激がなくても、常に高い活性があり、LPA 刺激によってその活性に大きな変化は見られなかった。以上の結果から、中皮細胞は MMP-2 の活性化に十分な量の LPA を自ら産生している可能性が考えられた。

④ 中皮細胞によるオートタキシン産生について

中皮細胞が自ら LPA を産生する機構として、ATX に着目した。ATX は多くの臓器や血液中に発現が見られ、リゾホスホリパーゼ D (lysoPLD) 活性をもち、リゾホスファチジ

ルコリンを基質として LPA を生合成する酵素である。また、lysoPLD による LPA の生合成は、cPA によって抑えられることが知られている。

まず、中皮細胞の ATX mRNA について RT-PCR を行ったところ、中皮細胞は ATX を発現していることがわかった。また、中皮細胞のコンディションメEDIUM中には、PLD 活性が検出された (Fig. 2)。このことから、中皮細胞が自ら LPA を産生しているという可能性が支持された。一方、cPA のメEDIUMへの添加によって、MMP-2、MMP-9 の活性化や mRNA 発現レベルは抑制されなかった。

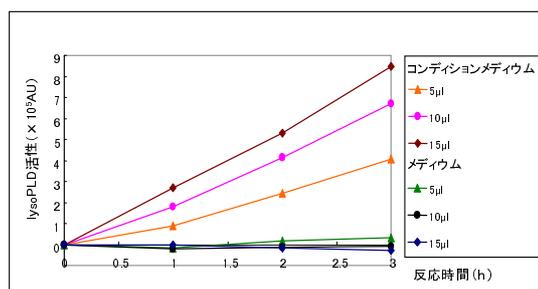


Fig. 2 中皮細胞コンディションメEDIUMの lysoPLD 活性の測定

本研究では、リゾリン脂質メEDIUMの LPA や cPA はがん細胞の運動性に影響を与えるだけでなく、MMP を介した細胞外マトリックスの分解や ATX による LPA の産生に影響を与えているのではないかとこの視点で研究を行った。その結果、MMP 阻害剤によって浸潤が抑えられたことから、この *in vitro* 浸潤アッセイ系において、MMP が浸潤に関与していることが強く示唆された。また、LPA によって中皮細胞の MMP-2、MMP-9 の mRNA 発現レベルが上昇し、活性化も促進されるということが観察された。

通常、浸潤の研究には細胞外マトリックスをコーティングした人工的な膜を通り抜けたがん細胞を観察する実験系が用いられるが、その方法に比べて、中皮細胞を用いる今回のアッセイ系は、がん細胞と正常細胞の相互作用を見ることができ、*in vivo* 状態をより良く反映している。本研究により、中皮細胞の細胞外マトリックス分解に LPA で誘導された MMP が重要な役割を果たしていることが示された。この研究成果は、がん細胞の浸潤抑制を目指して今後さらに研究していく上で、意義深い。

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 2 件)

- ① Hiroyasu Sato (他19名)、Tetsuyuki Kobayashi(13番目): Analyses of Group III Secreted Phospholipase A2 Transgenic Mice Reveals Potential Participation of This Enzyme in Plasma Lipoprotein Modification, Macrophage Foam Cell Formation, and Atherosclerosis. *J. Biol. Chem.*, 283 (48): 33483-33497, 2008 (査読有り)
- ② 相星淳一、小池薫、小林哲幸、大友康裕、山本保博: 出血性ショックに続発する多臓器不全のメカニズムー腸間膜リンパ液に対する保存血および代用血液の影響ー 日本腹部救急医学会雑誌、27 (1): 51-57, 2007 (査読有り)

〔学会発表〕(計 8 件)

- ① 磯貝有紀、佐藤弘泰、山本圭、武富芳隆、池田和貴、田口良、工藤一郎、小林哲幸、村上誠: 分泌性ホスホリパーゼA2 (sPLA2) の生活習慣病との関連 (ポスター、口頭)、日本薬学会第129年会、2009年3月26-28日、国立京都国際会館ほか
- ② 磯貝有紀、佐藤弘泰、山本圭、武富芳隆、池田和貴、田口良、工藤一郎、小林哲幸、村上誠: 分泌性ホスホリパーゼA2 (sPLA2) の生活習慣病との関連 (ポスター)、BMB2008 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9-12日、神戸ポートアイランド
- ③ 小林哲幸: ラット出血性ショックモデルにおける腸間膜リンパ液の脂質メタボローム解析、第7回ホスファチジルセリン研究会 (特別講演)、京海洋大学品川キャンパス7号館リエゾンセンター1階多目的交流研修会、2008年11月14日
- ④ 小林哲幸: ラット出血性ショックモデルにおける腸間膜リンパ液の脂質メタボローム解析、第3回メタボロームシンポジウム (シンポジウム講演)、慶應義塾大学先端生命科学研究所 (山形県鶴岡市)、2008年10月30-11月1日
- ⑤ 小林哲幸、小川かおり、橋本由佳、相星淳一: ラット出血性ショックモデルにおける腸間膜リンパ液の脂質メタボローム解析 (ポスター)、第33回日本医用マスメクトル学会年会 (東京大学医学部教育研究棟14階)、2008年9月25, 26日
- ⑥ 佐藤弘泰、武富芳隆、山本圭、磯貝有紀、三木寿美、石田由起雄、石井嘉晴、小林哲

幸、原俊太郎、工藤一郎、村上誠: III型分泌性ホスホリパーゼA₂の生体内機能の解析、第50回日本脂質生化学会 (北海道大学) 2008年6月5, 6日

- ⑦ 磯貝有紀、山本圭、佐藤弘泰、武富芳隆、池田和貴、田口良、小林哲幸、村上誠: III型分泌性ホスホリパーゼA2 (sPLA2) の生活習慣病との関連 (口頭、ポスター)、BMB2007 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月11-15日、パシフィコ横浜
- ⑧ 小川かおり、相星淳一、小池薫、増野智彦、山本保博、小林哲幸: ラット出血性ショックモデルにおける腸間膜リンパ液の脂質メタボローム解析、第49回日本脂質生化学会 (北海道大学)、2007年6月5, 6日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 哲幸 (KOBAYASHI TETSUYUKI)
お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・教授
研究者番号: 50178323

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

相星 淳一 (AIBOSHI JYUNICHI)
東京医科歯科大学・医学部・講師
研究者番号: 50256913