

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03206

研究課題名(和文)新規リゾリン脂質の機能解明とその作用標的の探索

研究課題名(英文)A study of novel lysophospholipids and exploration of their targets

研究代表者

長谷川 純矢 (Hasegawa, Junya)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：00533788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画では3年間にわたり、申請者らが見出した新規リン脂質LysoPIPsの生理的、病態生理的機能の解析を実施してきた。これまで、LysoPIPsを生成するホスホリパーゼAを幾つか見出すことができた。また、市販されていないLysoPIPsの作製方法を考案し、現在純度の高いLysoPIPsを精製することに成功している。この精製したLysoPIPsを用いて共同研究者とともに、LysoPIPsの一つであるLysoPIP3をリガンドとするGタンパク質共役型受容体(GPCR)約250種類のスクリーニングを実施した。その結果、2つの受容体に高い反応性を示すことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出した新規脂質LysoPIP3は、ヒト肝がんで上昇する実験事実から、がんで上昇し、がん細胞の増殖や悪性化に寄与していることが推測された。LysoPIP3の生成機構(ホスホリパーゼA)、そしてLysoPIP3が応答する受容体Aを見出していることから、これらの分子が新しいがん治療薬の標的になることが考えられる。特に本研究で見出した受容体Aは、内在性のリガンドが未知のオーファン受容体である。本研究を進めることで、LysoPIP3を真のリガンドとして提示でき、極めて学術的に意義がある。そして、膵臓がん患者で発現レベルが高い受容体Aの拮抗薬は、新規のがん治療薬として非常に期待できる。

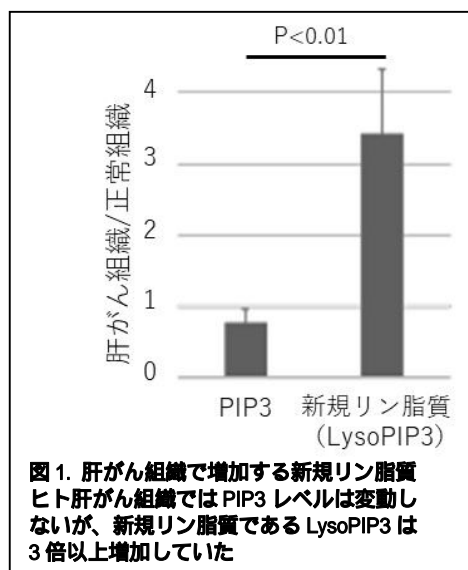
研究成果の概要(英文)：For three years, we have been analyzing the physiological and pathophysiological functions of the novel phospholipids "LysoPIPs" which were discovered by the applicants in this research project. We have found several phospholipases A that produce LysoPIPs. We have also devised a method for the preparation of LysoPIPs that is not commercially available, and have now succeeded in purifying LysoPIPs with high purity. Using the purified LysoPIPs, my collaborators screened about 250 G protein-coupled receptors (GPCRs) whose ligands are LysoPIP3, one of the LysoPIPs. As a result, we found that two receptors showed high reactivity.

研究分野：脂質生物学

キーワード：リゾリン脂質 イノシトールリン脂質 GPCR すい臓がん

1. 研究開始当初の背景

ホスホイノシタイド (PIPs) は、親水性部分にイノシトール環を、疎水性部分に脂肪酸を持つ細胞膜リン脂質の総称である。3, 4, 5 位のイノシトール環が各々リン酸化されることで 7 種の PIPs が生成し、それぞれ異なった細胞内の局在を示す。例えば、ホスファチジルイノシトール 4, 5-二リン酸 (PI(4,5)P₂) は細胞膜に、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P) はゴルジ体に局在する。各々のオルガネラ膜に局在した PIPs は、各 PIPs 特異的な結合タンパク質をリクルートし、アクチン骨格、細胞内膜輸送及びシグナル伝達などを制御する。PIP_s の中でもホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-三リン酸 (PIP₃) は、原癌遺伝子産物 Akt 等の増殖に関わる標的タンパク質を介してがんの悪性化に関与することが知られている。しかし、実際にがん組織で PIP_s の測定を行った報告はなく、がんにおける PIP_s 代謝異常の実態は不明である。申請者の所属研究室では最近、**これまで生体試料で測定不可能と言われていた PIP_s 7 種類全てにおいて定量的に測定する技術を開発した**。そこで、本方法によりヒト肝がん検体中の PIP_s 量を測定したところ、予想外にも PIP₃ が低下する一方で、**特徴的な構造を持つ新規の脂質が増加している**ことを発見した(図 1)。この脂質は親水基に PIP₃ と同様のイノシトール三リン酸を持つが、PIP₃ が脂肪酸を 2 つ持つのに対して 1 つしか持たない。**Lyso 型のリン脂質であることから LysoPIP₃ と名付けた**(図 2)。本脂質は所属研究室が発見した未公表の脂質であり、がんが増加すること以外は何も分かっていない。興味深いことに、がん抑制遺伝子 PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10) の欠損マウスで発生する前立腺がん組織や、がん遺伝子 PIK3CA を過剰発現させた細胞株でも、LysoPIP₃ が蓄積していることを見出している。このことから、LysoPIP₃ がいわば『がん脂質』とも呼べるがんの発生や悪性化に重要な役割を果たしている脂質ではないかと想定された。そうであるならば、その生成機構や下流の分子は新しいがんの治療標的となる可能性がある。さらに申請者は、イノシトール環にリン酸基を 1 つもしくは 2 つ持つ Lyso 型のリン脂質も見出した。それらは LysoPIP₃ よりリン酸基が 2 つもしくは 1 つ少ないことから、**LysoPIP**、**LysoPIP₂** と名付けた。LysoPIP、LysoPIP₂ に関して現在明らかになっているのは、生体組織、細胞に存在することのみである。そこで、LysoPIP_s の生理的機能及び LysoPIP₃ のがん発生・悪性化機構を解明する本申請課題を起案した。

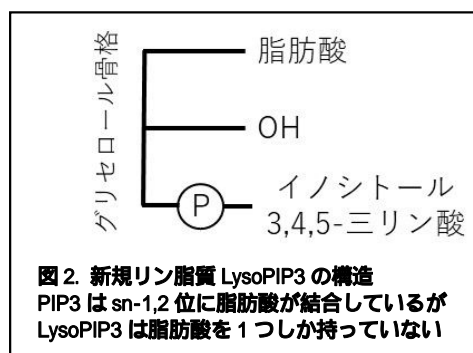


2. 研究の目的

上述のように LysoPIP₃ を含む LysoPIP_s は発見されたばかりの新規リン脂質である。ヒト肝がんでは PIP₃ の増加が見られない代わりに LysoPIP₃ が増加している(図 1)。PIP₃ 分解酵素 PTEN 欠損マウスで発生する前立腺がん、および PIP₃ 生成酵素である PI3 キナーゼ (PIK3CA) 過剰発現細胞株でも増加することから、**LysoPIP₃ はがん悪性化を促進する脂質である**という仮定を立てている。そこで本研究では、

- (1) LysoPIP_s (特に LysoPIP₃) の生成機構
- (2) LysoPIP₃ が関与するがん細胞特性
- (3) LysoPIP₃ のがん悪性化分子機構
- (4) LysoPIP、LysoPIP₂ の生理的、病態生理的役割の解明

を明らかにすることで、「がん脂質」としての LysoPIP₃ の役割を明確にし、脂質が関わる細胞のがん化・悪性化の分子機構の一端を解明すること、さらに LysoPIP、LysoPIP₂ の生体内での機能解明にも着手し、**新規リン脂質 LysoPIP_s の包括的な理解を深める**ことを目的とした。



3. 研究の方法

本研究計画では、申請者らが見出した新規リン脂質 LysoPIPs の生理的、病態生理的機能の解析を実施した。

(a) リゾホスファチジン酸やリゾホスファチジルコリンなどのリゾリン脂質はホスホリパーゼ A (PLA) により、脂肪酸部分が加水分解されてリゾリン脂質になることから、LysoPIPs も PLA により生成されることが予想された。PLA は現在十数種類の PLA1 及び約 30 種類の PLA2 の計 50 種類近くが報告されているが、これまでに PIPs を基質にする PLA は同定されていない。そこで全ての PLA を個々に細胞株に過剰発現させ、LysoPIP、LysoPIP2、LysoPIP3 各々のレベルの上昇を指標としたスクリーニングを行った。

また、PLA 以外の生成経路として、PIPs のリン酸化酵素により LysoPI や LysoPIP などリン酸化される経路が考えられる。所属研究室では、ほとんどの PIPs のリン酸化酵素のプラスミドを保有しているため、それらのリコンビナントタンパク質を作製し、*in vitro* リン酸化アッセイにより、LysoPI、LysoPIP や LysoPIP2 から LysoPIPs への変換反応が起こるか検討した。

(b) (a) で同定した LysoPIPs の生成酵素 (PLA や PIPs リン酸化酵素) の過剰発現やノックダウンによる LysoPIPs レベルの人為的な変動実験により、細胞内 LysoPIPs の変動に伴う増殖能や運動能など各種細胞応答を検証した。

(c) PIPs はその標的タンパク質をリクルートすることで、シグナル伝達を駆動することが知られている。したがって、LysoPIPs が細胞応答を示すには、同様に LysoPIPs 特異的な結合タンパク質を介していることが想定された。 LysoPIPs は所属研究室で発見された新規リン脂質であるため、標品としての LysoPIPs は市販されていない。混合物のない純度の高い LysoPIPs がないと、結合タンパク質の網羅的な解析を含む諸々の実験に支障が生じる。そこで申請者は、ジアシル型のリン脂質をリゾリン脂質に変換する既存の方法 ([Science 349, 974-977, 2015](#)) を基に改変し、簡便かつ効率的に PIPs を LysoPIPs へ変換する方法を構築することとした。条件検討の結果、トリスを基本としたバッファーに界面活性剤を少量とハチ毒由来の PLA2、市販されている各種 PIPs を添加し 37 度で約 3 時間反応させることにより 高効率で LysoPIPs を作製することに成功した。 実際に質量分析で解析したところ、LysoPIP 及び LysoPIP2 に関してはほぼ 100% の効率で変換できたが、LysoPIP3 の変換効率は 80% 程度で、未反応の PIP3 が 20% 混在していた。しかし、逆相カラムを用いて PIP3 を除くことで、高純度の LysoPIP3 を分取可能であることが分かった。以上から、申請者は世界に先駆けて、高純度の LysoPIPs を作製する方法を構築し、精製度の高い LysoPIPs を入手したと言える。これは LysoPIPs の研究を進めるにあたり、必要条件であり、以下に示す実験計画に使用するのに欠かせない。

(d) 多くのリゾリン脂質は細胞外で作用することが知られており、その作用標的は **G タンパク質共役受容体 (GPCR)** である。予備検討で細胞培養液中やマウス血液中でも LysoPIPs が相当量存在することが分かっており、LysoPIPs が細胞外で作用する可能性は高い。そこで、LysoPIPs の細胞外の作用標的を探索する目的で、研究分担者 ([東北大学・井上飛鳥准教授](#)) が開発した網羅的な GPCR のスクリーニングを行った ([Nat. Methods. 9, 1021-1029, 2012](#); [Cell. 177, 1933-1947, 2019](#))。本方法は、ヒト遺伝子にコードされているほぼ全ての GPCR (約 280 種類) のリガンドを高感度で同定できる画期的なアッセイ系である。全ての GPCR に共役可能な G タンパク質を遺伝子改変技術により作出し、GPCR がリガンドなどにより刺激されると、その下流である G タンパク質並びに TACE と呼ばれるプロテアーゼの活性化を介して、細胞膜に係留しているアルカリフォスファターゼ (AP) が細胞外に放出するという原理に基づいている。放出された AP は基質と反応させることにより簡便にプレートリーダーで検出可能なため、本アッセイは高いスループットを示す。申請者が作製した純度の高い LysoPIPs を用いて、どの GPCR に応答するか網羅的に検証した。

4. 研究成果

研究方法(a)で見出した LysoPIP3 を合成する PLA の一つ、PLA-X をドキシサイクリン (DOX) で発現誘導可能な前立腺がん細胞株を構築した。この細胞株を DOX で誘導後、細胞内・細胞外

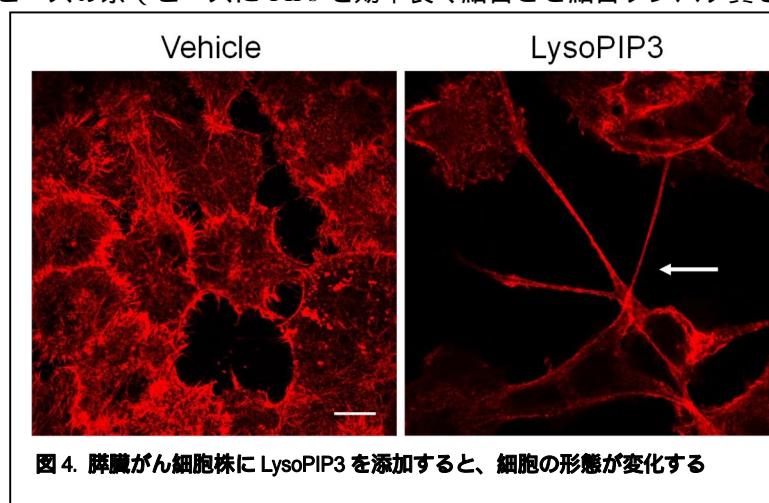
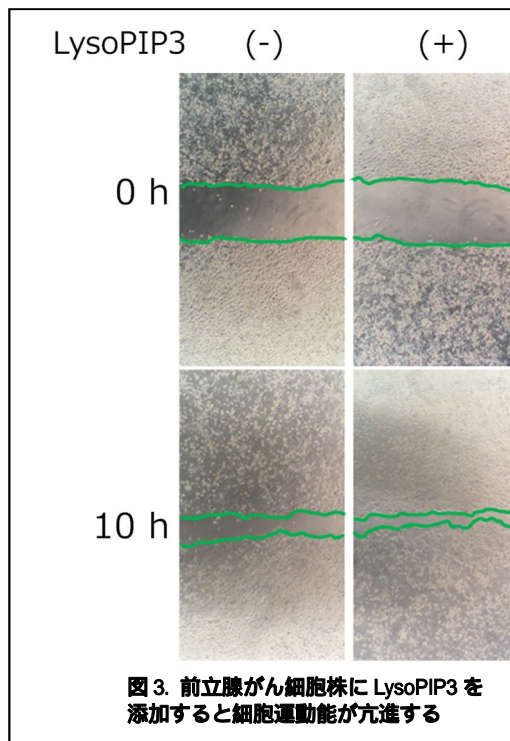
の LysoPIP3 レベルの上昇が認められた。さらに、細胞の運動能を検討したところ、コントロール細胞と比べ、運動能の亢進が認められた。また、申請者が作製した LysoPIP3 を前立腺がん細胞株の添加したところ、同様に運動能が亢進していた(図3)。現在、見出した PLA のノックアウト細胞も作製しており、今後各種 PLA と LysoPIPs との関連を明確にしていきたい。

研究分担者(東北大学)が開発した GPCR のスクリーニング系で、約 250 種類の GPCR において、LysoPIP3 に応答する受容体を探索した。その結果、2 つの受容体が LysoPIP3 に応答することを見出した。このスクリーニングに用いた発現プラスミド等を分担者より分与してもらい、所属研究室(東京医科歯科大学)でも同様のアッセイ系を構築した。スクリーニング時と同様、LysoPIP3 は上記 2 つの GPCR に濃度依存的に応答することがわかり、再現が確認できた。そのうちの 1 つである受容体 A は、膵臓がん細胞で発現が高く、そして mRNA の発現と膵臓がん患者の予後不良が関連していたことから、本研究ではさらに受容体 A に着目して実験を進めた。

膵臓がん細胞株である PANC-1(受容体 A が高発現)に、LysoPIP3 を添加したところ、形質膜の伸長および形態の変化が認められた(図4)。この形態変化は、受容体 A の発現レベルの低い他の膵臓がん細胞株では認められなかったため、受容体 A を介した応答であることが示唆された。さらに、LysoPIP3 を処理した PANC-1 では、カドヘリン等の接着因子の発現が低下していた。これらのことから、LysoPIP3 は受容体 A を介して、膵臓がん細胞株の上皮間葉転換を引き起こし、がん細胞の運動能や浸潤能を亢進していることが強く示唆された。現在は、受容体 A のノックアウト細胞の作製、受容体 A が発現していない細胞株に恒常的に受容体 A を発現させるなどで、LysoPIP3 と受容体 A の詳細な分子メカニズムの解明を行っていく。

また、細胞内の LysoPIPs の作用標的の探索は、申請書の実験計画には記載していたものの、まだ実施していない。シリカビーズの系(ビーズに PIPs を効率良く結合させ結合タンパク質を網羅的に解析する方法は [Nature, 427, 139-141, 2004](#) の論文を基に本研究室ですでに確立済)を用いて行うが、作製した LysoPIPs をシリカビーズに付加する検討がうまくいっておらず、現在改良中である。今後、改良した実験系で、各々の LysoPIPs 特異的な結合タンパク質を、ショットガンプロテオミクスにより同定する。LysoPIP3 に関しては、LysoPIP3 レベルの高いがん細胞からの抽出液を用いて、がん細胞特有の結合タンパク質を見出す予定である。

本研究期間では、LysoPIP3 を合成する経路や LysoPIP3 の作用標的(受容体 2 つ)を見出し、膵臓がんとの関連を示唆するデータが得られた。詳細な分子機構解明をすることで、新たな膵臓がん治療の作用標的を提示できるかもしれない。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanemaru Kaori, Shimozawa Makoto, Kitamata Manabu, Furuishi Rikuto, Kayano Hinako, Sukawa Yui, Chiba Yuuki, Fukuyama Takatsugu, Hasegawa Junya, Nakanishi Hiroki, Kishimoto Takuma, Tsujita Kazuya, Tanaka Kazuma, Itoh Toshiki, Sasaki Junko, Sasaki Takehiko, Fukami Kiyoko, Nakamura Yoshikazu	4. 巻 13
2. 論文標題 Plasma membrane phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate is critical for determination of epithelial characteristics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30061-9	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 Kawasaki Asami, Sakai Akiko, Nakanishi Hiroki, Hasegawa Junya, Taguchi Tomohiko, Sasaki Junko, Arai Hiroyuki, Sasaki Takehiko, Igarashi Michihiro, Nakatsu Fubito	4. 巻 221
2. 論文標題 PI4P/PS countertransport by ORP10 at ER-endosome membrane contact sites regulates endosome fission	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202103141	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 Hasegawa Junya, Uchida Yasunori, Mukai Kojiro, Lee Shoken, Matsudaira Tatsuyuki, Taguchi Tomohiko	4. 巻 9
2. 論文標題 A Role of Phosphatidylserine in the Function of Recycling Endosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.783857	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 Morioka Shin, Nakanishi Hiroki, Yamamoto Toshiyoshi, Hasegawa Junya, Tokuda Emi, Hikita Tomoya, Sakihara Tomoko, Kugii Yuuki, Oneyama Chitose, Yamazaki Masakazu, Suzuki Akira, Sasaki Junko, Sasaki Takehiko	4. 巻 13
2. 論文標題 A mass spectrometric method for in-depth profiling of phosphoinositide regioisomers and their disease-associated regulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27648-z	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 Hasegawa Junya, Tokuda Emi, Yao Yao, Sasaki Takehiko, Inoki Ken, Weisman Lois S.	4. 巻 33
2. 論文標題 PP2A-dependent TFEB activation is blocked by PIKfyve-induced mTORC1 activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E21-06-0309	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

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Junya Hasegawa, Lois S. Weisman, Junko Sasaki, Takehiko Sasaki
2. 発表標題 A new insights into the roles of phosphoinositides in lysosomal function
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 長谷川 純矢	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 7
3. 書名 Thr Lipid	

〔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
研究分担者	井上 飛鳥 (Inoue Asuka) (50525813)	東北大学・薬学研究科・教授 (11301)	

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
---------	---------