

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23701036

研究課題名（和文） 甲状腺濾胞癌の発症におけるリン脂質代謝酵素の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of phospholipid metabolic enzymes in thyroid tumors

研究代表者

小藤 智史 (KOFUJI SATOSHI)

秋田大学・大学院医学系研究科・教育系補佐員

研究者番号：00508153

研究成果の概要（和文）：イノシトールリン脂質は生体膜を構成する重要な脂質の一つであり、全8種類存在する。その存在量は少ないがシグナル分子として機能し、各々の分子種の生成と分解の破綻は重篤な疾患等を引き起こすため、鋭意研究が進められている。本研究では、このイノシトールリン脂質のうちの一つの分子種に対してその分解酵素を欠損するマウスを作製することにより、その生理的意義について検討を行った。その結果、甲状腺癌の発症におけるリン脂質代謝酵素の役割について新たな知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Phosphatidylinositols are one of the important lipids composed of cell membranes, and there are eight species. Their abundance is very little, but they function as a signal molecule, and the dysfunction of the production or degradation of each species causes critical diseases, so they have been extensively researched. In this study, we analyzed the physiological roles by creating knockout mice for their enzymes. We found that the enzymes had an important role in thyroid tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：リン脂質

1. 研究開始当初の背景

イノシトールリン脂質 (PIPs) はイノシトール環の 3, 4, 5 位水酸基が可逆的なリン酸化を受ける結果、生体膜に生ずる 8 種類のリン脂質群の総称である。多様な細胞外シグナル分子による細胞生理応答惹起を仲介する細胞内シグナル分子として、PIPs は重要な役割を果たす。例えば、ホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-三リン酸 [PI(3, 4, 5)P₃] はチロシンキナーゼ型受容体や G 蛋白質共役型受容体の刺激により細胞内に生じ、生存、増殖、運動など様々な細胞応答を制御している。また、ホスファチジルイノシトール 4, 5-二リン

酸 [PI(4, 5)P₂] は外部刺激に応じて細胞骨格の制御や細胞外からの物質の取り込み制御に関与する。そして、これらイノシトールリン脂質のリン酸化、脱リン酸化を担う代謝酵素の欠失は癌、免疫不全、糖代謝異常をはじめとする様々な疾患を引き起こすことが報告されている。よって、PIPs のシグナル分子としての機能、及びその代謝酵素の機能を探ることは、基本的な細胞機能の解明のみならず、疾患治療を考える上でも重要な研究であると考えられる。本研究において着目するリン脂質 PI(3, 4)P₂ 及びその代謝酵素は、生理的な役割が不明であり、今後の解析が期待されて

いるのが現状であった。

2. 研究の目的

PI(3,4)P₂ は、刺激を受けていない状態の細胞ではその存在量のごくわずかであるが、増殖因子などの刺激に応じて一過的に上昇する。これは生体機能調節に重要な多くの細胞内セカンドメッセンジャーがもつ特性であり、PI(3,4)P₂ を介したシグナル伝達経路の存在を想起させる。しかし、PI(3,4)P₂ の生理機能は未だ不明である。

本研究の目的は、これまでPI(3,4,5)P₃ の分解物として考えられてきたPI(3,4)P₂ について、その生理的意義を探索することにある。

3. 研究の方法

細胞内では、PI(3,4)P₂ レベルの上昇に先立ちPI(3,4,5)P₃ レベルが上昇し、その後PI(3,4,5)P₃ レベルの減少に伴いPI(3,4)P₂ レベルが上昇することから、PI(3,4,5)P₃ の5位脱リン酸化反応が主な生成経路であると考えられている(図1)。生成経路の遮断はPI(3,4)P₂ の機能解明に有効であるが、この反応を触媒する10種類の酵素を全て阻害/発現抑制することは困難である。そこで、分解経路の遮断という戦略を採った。哺乳類にはinositol polyphosphate phosphatase 4A (INPP4A) と inositol polyphosphate phosphatase 4B (INPP4B) という二種類のPI(3,4)P₂ 分解酵素(4位脱リン酸化酵素)が存在する(図1)が、生成酵素の多様性に比して極めてシンプルである。そこで、これら二種類のPI(3,4)P₂ 分解酵素のノックアウトマウスを作製し、PI(3,4)P₂ の分解異常により引き起こされる表現型を探ることで、高次生理機能を解明したいと考えた。

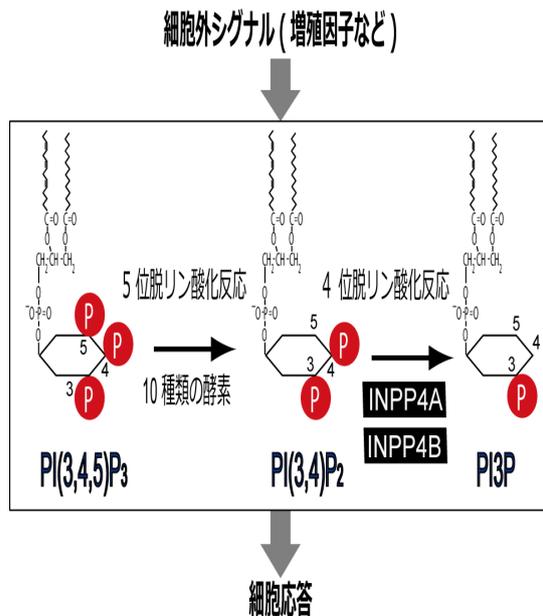


図1 細胞内セカンドメッセンジャーとしてのPI(3,4,5)P₃及びPI(3,4)P₂の役割

(1) ノックアウトマウスの作製と解析

マウスにおいてPI(3,4)P₂ 分解酵素の生理機能を探るために、これらのノックアウトマウスを作製した。ノックアウトマウスの作製の際には、全身で欠損させた場合の致死性を考慮して組織特異的に遺伝子を欠損させることができるように設計した。作製したノックアウトマウスは全身性と組織特異的な欠損と双方用意し、また、後述のように他のイノシトールリン脂質代謝酵素のノックアウトマウスとの二重欠損マウスの作製を行った。作製したマウスを用いて、免疫組織染色やウエスタンブロット法などにより解析を行った。

(2) 細胞の移植実験

ヒトにおいてINPP4Bは癌との関連が示唆されているので、発癌に関して検討を加えた。癌が発症する際には、細胞自律的な面と非自律的な面の両側面が考えられるので、細胞非自律的な場合を考え、癌細胞の移植実験を行い、そのどちらの側面なのかについて検討を加えた。

(3) 培養細胞を用いた検討

マウスの個体レベルで見られた表現型を分子レベルで詳細に解析するために目的の分子を発現する細胞を選定し、siRNAを用いて発現抑制を行うことにより、下流因子の活性化、細胞内局在、刺激時の応答の変化などに着目して検討を行った。

4. 研究成果

(1) INPP4B欠損マウスの表現型の解析

初めにINPP4Bのホスファターゼ活性部位を条件付に欠損させるマウスを作製し、全身において欠損させたが、メンデルの法則に従った出生を示し、また、野生型と比較してその生育に遜色は見られなかった。このことは、INPP4Bのホスファターゼ活性そのものは、マウスの個体発生、定常状態におけるマウスの生育に大きな影響を及ぼさないことを示唆している。また、INPP4B欠損マウスに癌細胞の移植実験を行った所、その生育に差は見られなかったため、INPP4Bは細胞非自律的な癌の発症には関与していない事が明らかとなった。

(2) 二重欠損マウスの作製と解析

INPP4B欠損マウスの表現型が一見してみられるものではなかったため、INPP4Bが関与する生理機能を探るにあたり、次に私は各々の分子種の下流のシグナル分子に着目した。PI(3,4)P₂とPI(3,4,5)P₃は、ともに生存のシグナルを伝達するAkt/PKBの活性化に寄与すると考えられている。そこで、

PI(3,4)P₂ を分解する酵素である INPP4B と PI(3,4,5)P₃ を分解する酵素の間に遺伝学的相互作用が存在するのではないかと考え、両者を欠損させたマウスを作製した。その結果、作製した二重欠損マウスは甲状腺に濾胞癌を発症し、短命であるという独自の知見を得た(図 2)。さらに、種々の検討の結果、甲状腺濾胞細胞が産生するサイログロブリン陽性細胞が肺において確認されたことから、この濾胞癌が肺へ血行性転移を起こすことを見出した(図 3)。次に、分子レベルでこの

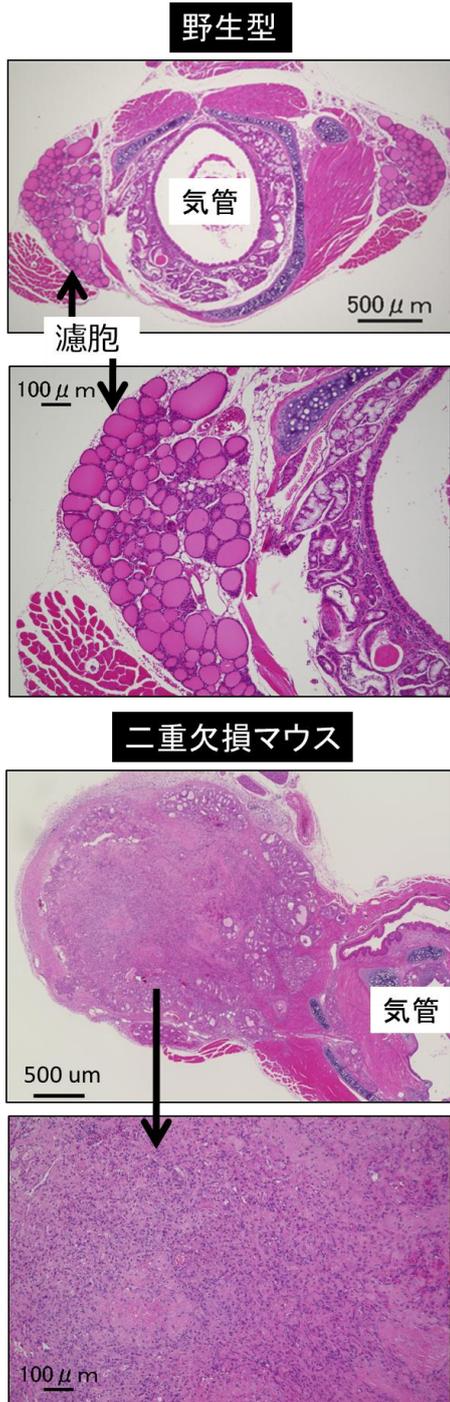


図 2 二重欠損マウスでは甲状腺濾胞癌を発症する

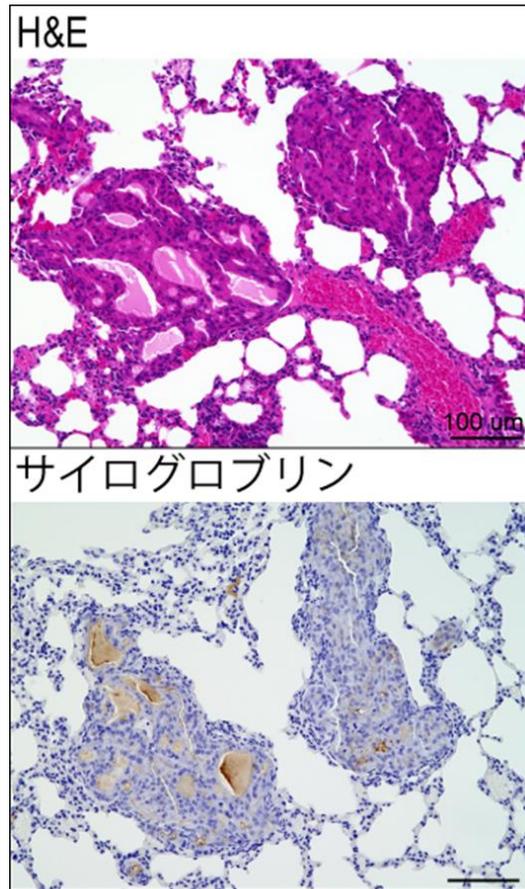


図 3 二重欠損マウスで発症した甲状腺濾胞癌は肺へ転移する

甲状腺濾胞癌の発症メカニズムを調べるために、種々のシグナル伝達経路についてウエスタンブロット法を用いて検証した。その結果、二重欠損マウスでは、Akt/PKB の下流のシグナルが過剰に伝達されていることが明らかとなった。

ごく最近、悪性度の高い basal-like タイプのヒト乳癌において、INPP4B locus (4q31.21) のヘテロ接合性の消失が高率であることが報告された。INPP4B が新規の癌抑制遺伝子であることを示唆する報告である。このことから、上記の甲状腺濾胞癌の表現型は、非常に意義深いものである。

以上のことから、マウスにおいて INPP4B はその単独欠損では癌を発症させないこと、PI(3,4,5)P₃ を分解する酵素との二重欠損により甲状腺濾胞癌を発症すること、INPP4B 欠損による発癌には Akt/PKB のシグナル伝達経路が重要な役割を有していることが明らかとなった。

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) Takasuga S, Horie Y, Sasaki J, Sun-Wada GH, Kawamura N, Iizuka R, Mizuno K, Eguchi S, Kofuji S, Kimura H, Yamazaki M, Horie C, Odanaga E, Sato Y, Chida S, Kontani K, Harada A, Katada T, Suzuki A, Wada Y, Ohnishi H, Sasaki T.

Critical roles of type III phosphatidylinositol phosphate kinase in murine embryonic visceral endoderm and adult intestine. Proc Natl Acad Sci U S A.、査読有、2013、110(5):1726-31. doi: 10.1073/pnas.1213212110

(2) Chida S, Itoh R, Kofuji S, Eguchi S, Takasuga S, Sasaki J, Sasaki T Shp1 deletion enhances ROS production and decreases survival of the S.aureus infected mice. Akita Journal of Medicine、査読有、2012、39(3/4): 95-101

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~bisei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小藤 智史 (KOFUJI SATOSHI)

秋田大学・大学院医学系研究科・教育系補佐員

研究者番号 : 00508153