

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22508

研究課題名（和文）分泌型膜リン脂質の生物活性の発見

研究課題名（英文）Extracellular diacyl phospholipids

研究代表者

佐々木 雄彦（Sasaki, Takehiko）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：50333365

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：細胞外PIP3によるマクロファージ活性化に関して、サイトカイン産生を指標として構造活性相関を明らかにした。特異的な受容体の存在を示唆する知見となった。細胞外PIP3が種々のがん細胞株に対して細胞骨格の再編成を誘起することを見出した。約50種類の培養細胞株を用いて検討したが、感受性細胞株は一部であった。乳がん細胞30株における遺伝子発現をRNA seqで解析し、PIP3感受性と相関する膜タンパク質を絞り込み、受容体候補タンパク質を得た。PIP3受容体がGTP結合タンパク質共役受容体ファミリーに属するという作業仮説を立てて、受容体スクリーニングを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PIP3が新しいホルモン/オータコイドであれば、現在の膜構成因子としてのドグマでは目が向けられていない、PIP3の新規の生理活性とその発現機構が明らかになるなど、これまで見逃されていた生体調節機構の発見につながる可能性があることから、本研究は細胞膜脂質研究をはじめ生命科学の様々な研究分野の体系や考え方の方向を大きく転換する潜在性を有すると考えている。

研究成果の概要（英文）：Structure-activity relationship of macrophage activation by extracellular PIP3 was clarified using cytokine production as an indicator. The findings suggested the existence of specific receptors.

We found that extracellular PIP3 induced cytoskeletal reorganization in various cancer cell lines. About 50 cultured cell lines were examined, but only some of them were sensitive. Gene expression in 30 breast cancer cell lines was analyzed by RNA seq, and membrane proteins that correlated with PIP3 sensitivity were narrowed down to candidate receptor proteins. We conducted receptor screening based on the working hypothesis that the PIP3 receptor belongs to the GTP-binding protein-coupled receptor family.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リン脂質

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜の主要な構成成分はジアシル型グリセロリン脂質(以下リン脂質とする)である。グリセロールの sn-1, sn-2 位の水酸基に結合した脂肪酸二分子が疎水部分となり、sn-3 位水酸基にリン酸エステル結合したヘッドグループが親水部分となる。リン脂質は水中において、疎水部分が水を避けるように集合し、親水部分が水分子との界面に連なる構造をとることができる。細胞膜の基本構造はリン脂質二重層膜で、ここに形質膜やオルガネラ膜に特異的なタンパク質が埋め込まれて、生命活動に適切な物質の取込みと放出が調節されている。

脂質二重層膜の形成は、試験管内で単一種のリン脂質のみを使うことでも再現できるが、実際の細胞膜には多様なヘッドグループをもつリン脂質が存在する。単細胞生物より多細胞生物で、よりバラエティーに富んだリン脂質が認められる。多様性の理由の一つとして、リン脂質がヘッドグループを利用してシグナル伝達に関与することが考えられる。我々が長年研究しているホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸 (PIP3) は多細胞生物にのみ存在するシグナル伝達リン脂質である。

PIP3 のヘッドグループはリン脂質の中で最も大きく、また最も強く負電荷を帯びている。PIP3 はこの特徴的なヘッドグループで様々な生体分子と結合することで細胞内シグナル伝達因子として機能する。教科書にも書かれている例として、成長因子のシグナル伝達における役割を挙げる。成長因子受容体が活性化されると形質膜に PIP3 が産生される。PIP3 は phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) や protein kinase B (PKB) などの細胞質タンパク質を形質膜へとリクルートする。PDK1 は PIP3 との結合によって活性化され、同じく PIP3 との結合によって近傍に集まった PKB を効率よくリン酸化して活性化する。そして、PKB が増殖や細胞死抵抗性を導く下流因子をリン酸化し制御するというカスケードである。PIP3 の標的はこの他にも、細胞骨格再編成や膜輸送、小胞輸送に関わるタンパク質など多岐にわたる。PIP3 生成酵素である PI3K はがんで高頻度に活性化(変異、増幅)されており、PIP3 分解酵素の PTEN はがんで高頻度に抑制(変異、欠失)されている。これらの酵素は細胞質に存在しており、PIP3 は形質膜の内葉(二重層の細胞質側の層)で生成される。

PIP3 は既知のリン脂質の中で最も負電荷に富み、よって親水性も高い両親媒性物質といえる。従来 PIP3 検出法は感度が低く、また、培養細胞の放射性同位元素による標識が必要であるため、血液や細胞培養上清などの液体検体を対象とした解析は行われていなかった。

## 2. 研究の目的

独自に開発した PIP3 測定法によって、PIP3 が血液中や細胞培養上清など細胞外にも存在することを発見した。また、ミセル状の PIP3 集合体がマクロファージを活性化することを

見出した。これらのデータは、これまで全く提唱されていない様式、すなわち細胞外で PIP3 が生理機能を発揮しうることを示している。例えば多くのがん細胞では上述のように、PIP3 の生成亢進や分解抑制が起きており、細胞膜に蓄積した PIP3 は細胞内シグナル伝達因子として、その細胞自身の増殖や細胞死抵抗性を亢進すると考えられている。PIP3 の細胞外機能という新しい発想を得れば、がん細胞から分泌された PIP3 が腫瘍内の周辺細胞（免疫細胞や線維芽細胞など）の形質にも影響を与え、免疫監視回避や転移などの現象に関わる可能性を考えることもできる。また、血流に乗って遠隔の細胞にも作用するならば、がん悪液質のような全身性の病態にも関与する可能性を考えることもできる。PIP3 が新しいホルモン/オータコイドであるという仮説の検証が本研究の目的である。

### 3 . 研究の方法

マクロファージの活性化については、マウス腹腔由来マクロファージ、RAW264.7 細胞株を用いて解析した。培養癌細胞株は乳がん、膵臓がん、前立腺がん、骨肉腫、甲状腺がん由来のヒト細胞株を用い、このほか、マウス線維芽細胞、骨髓細胞、リンパ球での検討を行った。PIP3 をリガンドとする GTP 結合タンパク質共役受容体のスクリーニングは、青木淳賢博士のご協力を得て、TGF 切断アッセイで行った。

### 4 . 研究成果

細胞外 PIP3 によるマクロファージ活性化に関して、サイトカイン産生を指標として構造活性相関を明らかにした。細胞内の PIP3 は脂肪酸としてアラキドン酸とステアリン酸を含有する分子種が最も多く存在する。しかしながら、マクロファージに最も高い活性を示したのは、脂肪酸炭化水素鎖がより短い分子種であった。一方、親水基の構造については、予測と符合して、イノシトール 4 リン酸の構造が必須であった。これらの知見は、マクロファージが細胞外 PIP3 を感知して応答するにあたり、親水基はもとより、炭化水素鎖をも認識していることを示している。細胞膜脂質二重層に非特異的に働きかける可能性を完全には排除できないが、特異的な受容体の存在を示唆する知見となった。

細胞外 PIP3 が種々のがん細胞株に対して細胞骨格の再編成を誘起することを見出した。この作用についても、PIP3 の分子種による活性の相違が確認された。約 50 種類の培養細胞株を用いて検討したが、感受性細胞株はそのほんの一部であった。上述のマクロファージでの知見もあわせて、特異的な受容体タンパク質が存在すれば、これらの知見を説明することができる。そこで乳がん細胞 30 株における遺伝子発現を RNA seq で解析し、PIP3 感受性と相関する膜タンパク質を絞り込み、受容体候補タンパク質を得た。

プロスタグランジン類、ロイコトリエン類など既知の脂質メディエーターの受容体の多くは、膜七回貫通型の GTP 結合タンパク質共役受容体( GPCR )である。PIP3 受容体も GPCR ファミリーに属するという作業仮説を立てて、受容体スクリーニングを行った。研究期間の終了までに 100 受容体以上の解析を完了した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Koizumi Atsushi, Narita Shintaro, Nakanishi Hiroki, Ishikawa Masaki, Eguchi Satoshi, Kimura Hirotaka, Takasuga Shunsuke, Huang Mingguo, Inoue Takamitsu, Sasaki Junko, Yoshioka Toshiaki, Habuchi Tomonori, Sasaki Takehiko | 4. 巻<br>9           |
| 2. 論文標題<br>Increased fatty acyl saturation of phosphatidylinositol phosphates in prostate cancer progression  | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>13257 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-019-49744-3  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Kawai Takafumi, Miyata Haruhiko, Nakanishi Hiroki, Sakata Souhei, Morioka Shin, Sasaki Junko, Watanabe Masahiko, Sakimura Kenji, Fujimoto Toyoshi, Sasaki Takehiko, Ikawa Masahito, Okamura Yasushi | 4. 巻<br>116                 |
| 2. 論文標題<br>Polarized PtdIns(4,5)P2distribution mediated by a voltage-sensing phosphatase (VSP) regulates sperm motility   | 5. 発行年<br>2019年             |
| 3. 雑誌名<br>Proceedings of the National Academy of Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>26020 ~ 26028 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1073/pnas.1916867116   | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Fujioka Yoichiro, Satoh Aya O., Horiuchi Kosui, Fujioka Mari, Tsutsumi Kaori, Sasaki Junko, Nepal Prabha, Kashiwagi Sayaka, Paudel Sarad, Nishide Shinya, Nanbo Asuka, Sasaki Takehiko, Ohba Yusuke | 4. 巻<br>44            |
| 2. 論文標題<br>A Peptide Derived from Phosphoinositide 3-kinase Inhibits Endocytosis and Influenza Virus Infection  | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Cell Structure and Function   | 6. 最初と最後の頁<br>61 ~ 74 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1247/csf.19001   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>McCormick Barry, Craig Helen E., Chu Julia Y., Carlin Leo M., Canel Marta, Wollweber Florian, Toivakka Matilda, Michael Melina, Astier Anne L., Norton Laura, Lilja Johanna, Felton Jennifer M., Sasaki Takehiko, Ivaska Johanna, Hers Ingeborg, Dransfield Ian, Rossi Adriano G., Vermeren Sonja | 4. 巻<br>203               |
| 2. 論文標題<br>A Negative Feedback Loop Regulates Integrin Inactivation and Promotes Neutrophil Recruitment to Inflammatory Sites   | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Immunology   | 6. 最初と最後の頁<br>1579 ~ 1588 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.4049/jimmunol.1900443  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する              |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Nishio Miki, Miyachi Yousuke, Otani Junji, Tane Shoji, Omori Hirofumi, Ueda Fumihito, Togashi Hideru, Sasaki Takehiko, Mak Tak Wah, Nakao Kazuwa, Fujita Yasuyuki, Nishina Hiroshi, Maehama Tomohiko, Suzuki Akira | 4. 巻<br>33                |
| 2. 論文標題<br>Hippo pathway controls cell adhesion and context dependent cell competition to influence skin engraftment efficiency  | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>The FASEB Journal  | 6. 最初と最後の頁<br>5548 ~ 5560 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1096/fj.201802005R  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する              |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Takemasu Shinya, Ito Masaaki, Morioka Shin, Nigorikawa Kiyomi, Kofuji Satoshi, Takasuga Shunsuke, Eguchi Satoshi, Nakanishi Hiroki, Matsuoka Isao, Sasaki Junko, Sasaki Takehiko, Hazeki Kaoru | 4. 巻<br>24              |
| 2. 論文標題<br>Lysophosphatidylinositol acyltransferase 1 is involved in cytosolic Ca <sup>2+</sup> oscillations in macrophages  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Genes to Cells   | 6. 最初と最後の頁<br>366 ~ 376 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/gtc.12681  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Takehiko Sasaki, Eiji Yamamoto, Toshiyoshi Yamamoto, Junko Sasaki |
| 2. 発表標題<br>Lipoquality of phosphoinositides                                  |
| 3. 学会等名<br>2nd International Conference on LipoQualit (招待講演) (国際学会)          |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Junko Sasaki, Eiji Yamamoto, Toshiyoshi Yamamoto, Takehiko Sasaki                                    |
| 2. 発表標題<br>Molecular dissection of phosphoinositides  |
| 3. 学会等名<br>The 14th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences 2019 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takehiko Sasaki, Eiji Yamamoto, Toshiyoshi Yamamoto, Junko Sasaki  |
| 2. 発表標題<br>Phosphoinositide Fingerprinting in Cancer  |
| 3. 学会等名<br>TOHOKU FORUM for CREATIVITY Thematic Program Cancer from Biology to Acceptance International Symposium (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計1件

|                             |                 |
|-----------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>新井 洋由、清水 孝雄、横山 信治 | 4. 発行年<br>2019年 |
| 2. 出版社<br>羊土社               | 5. 総ページ数<br>310 |
| 3. 書名<br>脂質解析ハンドブック         |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科歯科大学 難治疾患研究所病態生理化学分野/医歯学総合研究科脂質生物学分野  
<https://sites.google.com/view/byoutaiseirikagaku-university/home?authuser=1>

6. 研究組織

|  |                           |                       |    |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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            |                   |                |  |
|---------|--------------------|-------------------|----------------|--|
| 英国      | Babraham Institute | Univ of Cambridge | Univ of Oxford |  |
| カナダ     | Univ of Toronto    |                   |                |  |