

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号： 14501  
 研究種目： 国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）  
 研究期間： 2016～2019  
 課題番号： 15KK0307  
 研究課題名（和文）スフィンゴシン1-リン酸シグナリングによる癌転移メカニズムの解明（国際共同研究強化）  
 研究課題名（英文）Clarification of the mechanism of cancer metastasis by sphingosine 1-phosphate signaling(Fostering Joint International Research)  
 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） 11,000,000円  
 渡航期間： 28ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では最終目標である新規分子標的抗癌剤の創出に向け、分子構造的アプローチのノウハウを有する研究者と国際共同研究を行うことで、スフィンゴシン1-リン酸（S1P）-プロテインキナーゼC（PKC）シグナリングの立体構造レベルでのメカニズム解明と癌増悪への関与を明らかにすることを目指した。その結果、PKCの恒常活性をS1Pが直接制御することを見出し、またin silicoシミュレーションとの融合解析によりS1P-PKC間相互作用に必須のアミノ酸を同定することに成功した。さらに恒常的なS1P-PKCシグナリングが栄養飢餓による癌細胞のアポトーシス誘導にブレーキをかける働きを持つことを示した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、癌の増悪メカニズムの中でも不明な点が多かった、癌細胞がアポトーシスを回避し生存するメカニズムとして、恒常的なS1P-PKCシグナリングによるアポトーシス抑制機構を新たに同定した。本研究成果のポイントはS1P-PKCシグナリングの作用機構を立体構造レベルで明らかにした点である。最近ではオーダメイドがん治療の実現に向けてがんの多様性に合わせた多様な治療手段の開発が求められており、本研究の成果はS1P-PKCシグナリングの抑制によりアポトーシスのブレーキを外す全く新しいタイプのがん治療法の創出に繋がる。今後は本研究成果の社会実装として新規抗癌剤の創出に向けた研究を進める。

研究成果の概要（英文）：The goal of our project is discovery of new molecular-targeted drugs against cancer. To figure out this purpose, in this project, we tried to make clear the molecular mechanism of S1P-PKCzeta signaling with three-dimensional structure level and a role of S1P-PKCzeta signaling in cancer malignancy by internationally collaborating with a researcher who has excellent technique, experience, and circumstance for studying about PKC signaling with molecular structural approach. Then we found that S1P plays a critical role on constant activation of PKCzeta in cancer cells. Also we successfully identified the critical amino acids for interaction between S1P and PKCzeta by combinational approach with in silico docking simulation technique. Finally we showed that the constant activity of S1P-PKCzeta signaling put a brake on nutrient starvation-induced apoptosis in cancer cells.

研究分野：シグナル伝達

キーワード：癌 シグナル伝達 プロテインキナーゼC スフィンゴシン1-リン酸

## 様式 F-19-2

### 1. 研究開始当初の背景

日本などで癌は死因の1位であり、特に図1に示す通り全身へ癌が転移すると（ステージ4）余命は著しく低下するため、癌撲滅に向け癌遠隔転移など癌増悪の克服が急務であった。しかし癌細胞の増悪メカニズムは不明な点が多く、この分野での基礎研究のブレークスルーが強く求められていた。癌の増悪については「エクソソーム」の関与が注目されていた。癌細胞は様々な機能性タンパク質やRNAなどを積荷として含んだ50~100nmの微小膜小胞であるエクソソームを放出しており、このエクソソームの積荷が自身や免疫系の細胞や転移先のターゲット細胞に作用することで、癌の増悪を引き起こされるという新たな仕組みが明らかになりつつあった。ただエクソソーム自身の形成機構や積荷のソーティング機構など基礎的なメカニズムは不明であった。そこで申請者らは、エクソソームの積荷ソーティングの分子メカニズムの解明に取り組み、生理活性脂質であるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)が積荷タンパク質のエクソソームへのソーティングを惹起することを世界に先駆けて明らかにした。過去の報告から癌の遠隔転移において重要な働きを持つエクソソームの機能を消失させれば、癌の増悪が大幅に抑制されることが分かっていた。これらの結果は、S1Pシグナリングの制御により癌細胞のエクソソームに積荷をソーティングさせないようにすることで、癌増悪の抑制が可能になることを示唆していた。また、申請者は上述のプロジェクトと並行してS1Pの直接のターゲット分子の探索を進めており、S1PによってプロテインキナーゼC $\zeta$ (PKC $\zeta$ )が直接活性化されることを同定していた。PKCは古くから癌との関連が報告されているシグナル分子であり、S1P-PKC $\zeta$ シグナル伝達経路によるエクソソームへの積荷ソーティング機構を明らかにすることで、S1P-PKC $\zeta$ シグナル伝達経路が新規抗癌剤の有望な標的となることが期待された。

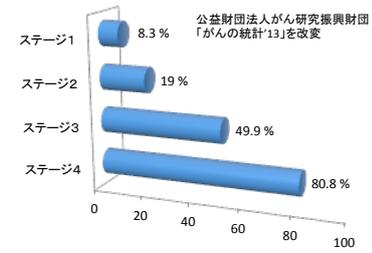
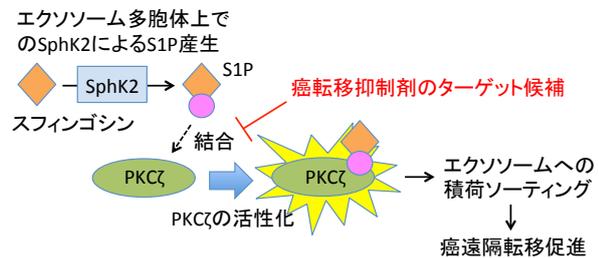


図1：ステージ別の癌による死亡率

### 2. 研究の目的

申請者らは、エクソソームへの積荷ソーティングにおけるS1P-PKC $\zeta$ シグナル伝達経路を標的とする副作用の少ない新規抗癌剤のリード化合物を開発し社会実装することを最終目標としており、この目標の早期達成にはタンパク質の立体構造情報をベースとする分子標的創薬のアプローチが必須であった。そこで本国際共同研究課題では、分子構造的なアプローチのノウハウと環境を有するPKC研究の専門家と国際共同研究を行い、S1Pによる直接の相互作用によるPKC $\zeta$ の活性化機構について、立体構造レベルでの分子メカニズムの詳細を明らかにすることを目的とした(図2)。



### 3. 研究の方法

本国際共同研究期間では、上記目的の達成に向け以下の個別課題について計画的に探究した。課題の多くは渡航先の研究室で実施し、一部を国内で行った。

#### 課題1：S1PのPKC $\zeta$ に対する相互作用領域の特定

課題1では、国際共同研究者が得意とするPKC研究およびペプチドアレイ技術のノウハウを用いて、PKC $\zeta$ 上のS1Pの直接の相互作用領域を特定する。

#### 課題2：分子構造的アプローチによるS1P-PKC $\zeta$ 相互作用の詳細解明

課題2では、国際共同研究者が得意とするPKC研究および分子構造的アプローチのノウハウを生かし、S1Pの直接の相互作用によるPKC $\zeta$ の活性化制御機構の詳細を解明する。

#### 課題3：癌の増悪および遠隔転移におけるS1P-PKC $\zeta$ シグナリングの役割の解明

課題3では、課題1で明らかにしたS1P結合領域を欠くPKC $\zeta$ 変異体を発現する癌細胞を作製し、癌転移実験によって癌の転移におけるS1P-PKC $\zeta$ 相互作用の役割を明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### (1) S1PによるPKCζの活性化を生細胞内で可視化する技術の開発

PKCζ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PKCζと選択的活性化レポーター（aCKAR: atypical PKC activity reporter）を開発した（図3）。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。①細胞内でPKCζが活性化し、②PKCζ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PKCζ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。

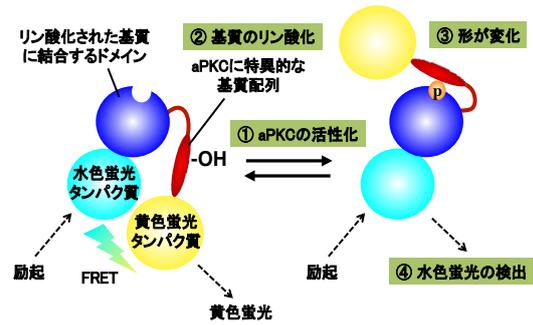
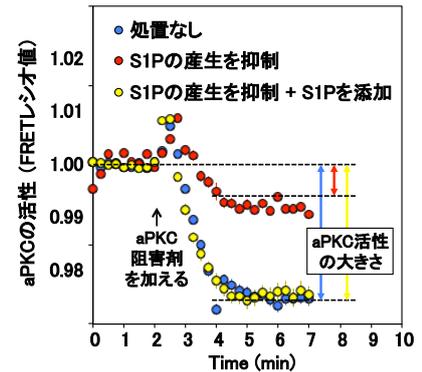


図3 PKCζ (aPKC) 選択的活性化レポーター

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

aCKARを用いて様々な癌細胞内のPKCζ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PKCζの活性化が観察された。さらにこのPKCζの恒常活性を引き起こす因子を探索したところ、スフィンゴシン1-リン酸（S1P）がPKCζに直接作用して活性化させることが分かった（図4）。

図4 S1PによるPKCζ (aPKC) の恒常的活性化  
癌細胞内のS1Pを枯渇させると、PKCζ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PKCζの恒常活性が処置なしのレベルまで回復する（赤→黄）。



##### (3) S1PのPKCζに対する相互作用の部位同定と分子メカニズムの解明

PKCζの各ドメイン領域を欠失した変異体を作製し、S1Pとの結合能をin vitroの系で検討し、またS1PによるPKCζの活性化能をin vitroのアッセイ系で検討したところ、S1PはPKCζの活性ドメインに直接相互作用し、PKCζの活性化を調節することが分かった。またS1PとPKCζの相互作用について、より詳細な分子・原子レベルでの結合および相互作用の様式を明らかにするために、PKCζの立体構造ホモロジーモデルを用いて誘導適合ドッキングシミュレーション法によるin silico解析を行った。その結果、S1PとPKCζの結合様式をオングストロームレベルで予測することに成功した（図5）。さらにaCKARを用いた細胞アッセイとの融合実験によりS1PとPKCζの相互作用に必須となるアミノ酸サイトの同定に成功した。

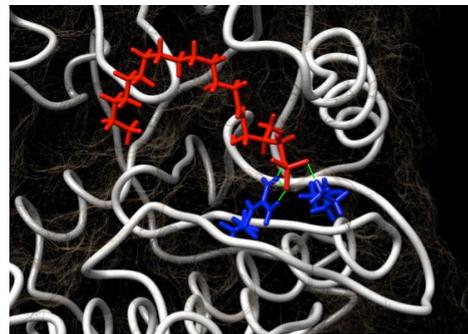


図5 S1PとaPKCの結合様式

銀：PKCζの立体構造の一部、赤：PKCζに結合するS1P、青：S1Pの結合に重要なPKCζ上のアミノ酸、緑：S1P-PKCζ間の水素結合

#### (4) 癌の増悪における S1P-PKC $\zeta$ シグナリングの役割の解明

まず癌細胞株を用いて PKC $\zeta$ の癌増悪との関係を調べたところ、PKC $\zeta$ 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-PKC $\zeta$ 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-PKC $\zeta$ シグナリングが必須の役割を担うことを明らかにした。また S1P の結合に必須のアミノ酸を変異させ S1P と PKC $\zeta$  の相互作用を阻害することにより、癌細胞をアポトーシスへと誘導することに成功した (図 6)。

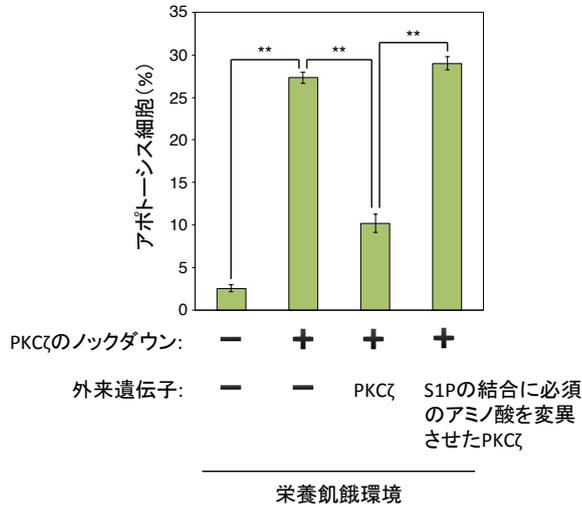


図 6 S1P-PKC $\zeta$ シグナリングによる癌細胞のアポトーシス抵抗性の制御

siRNAによるノックダウン法により癌細胞に発現するPKC $\zeta$ 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PKC $\zeta$ 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PKC $\zeta$ ではアポトーシス誘導は抑えられない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

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 Jung Hae-Yun, Fattet Laurent, Tsai Jeff H., Kajimoto Taketoshi, Chang Qiang, Newton Alexandra C., Yang Jing	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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Taketoshi Kajimoto
2. 発表標題 Regulation of protein kinase C by sphingolipids and its role in apoptosis
3. 学会等名 Kobe University-UC San Diego 3rd Collaborative Symposium, Lipid Enzymes Role in Cancer and Degenerative Diseases (招待講演) (国際学会)
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 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 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

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 アレキサンドラ
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>神戸大学ホームページ 研究ニュース  <a href="https://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2019_01_04_01.html">https://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2019_01_04_01.html</a></p> <p>カリフォルニア大学サンディエゴ校ホームページ 研究ニュース  <a href="https://ucsdhealthsciences.tumblr.com/post/181651902835/just-in-time-for-the-new-year-how-to-live-longer">https://ucsdhealthsciences.tumblr.com/post/181651902835/just-in-time-for-the-new-year-how-to-live-longer</a></p>
---

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ニュートン アレキサンドラ  (Newton Alexandra)	カリフォルニア大学サンディエゴ校・薬理学講座・教授	