

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06623

研究課題名(和文)がん抑制遺伝子INPP4Bの抗がん機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of anticancer activity of the cancer suppressor gene INPP4B

研究代表者

高須賀 俊輔 (TAKASUGA, Shunsuke)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90375262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、細胞、組織特異的にヒトINPP4B遺伝子を発現させることの出来る遺伝子改変マウスを創出し、発がんモデルマウスである肝特異的Pten遺伝子欠損マウスと交配することで、Pten遺伝子を欠損した肝細胞特異的にINPP4Bを代償的に高発現するマウスを作製した。その結果、Pten欠損による前がん病変である脂肪肝が、INPP4Bの発現により強く抑制されることが明らかとなった。この結果はPtenの欠損により異常に蓄積したホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸がINPP4Bにより分解されることで、INPP4BがPtenの機能を代替したものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PTENは代表的ながん抑制遺伝子の一つである。我々はINPP4Bが、PTENと同じ基質を脱リン酸化することを見出し、PTENの機能をINPP4Bにより代替できる可能性に着目した。本研究において、新たに作製した条件付きINPP4B過剰発現マウスを用いることで、外来性のINPP4Bを発現が、Pten欠損による前がん病変(脂肪肝)の発症を抑制しうることがマウス個体レベルで初めて示された。この結果は、PTENの不活化により引き起こされるヒトのがんの発症や進展を、INPP4Bの人為的な活性化により抑制する可能性を示すものであり、INPP4Bを新たな創薬標的分子として提示するものである。

研究成果の概要(英文)：We generated genetically engineered mice that express the human INPP4B gene in a cell- and tissue-specific manner and crossed them with liver-specific Pten gene-deficient mice, which are carcinogenesis model mice, to create mice that compensatory express INPP4B in a cell-specific manner in liver cells lacking the Pten gene. The results showed that fatty liver, a precancerous lesion caused by Pten deficiency, was strongly suppressed by the expression of INPP4B. This result suggests that phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate, which abnormally accumulated due to Pten deficiency, is degraded by INPP4B, and that INPP4B substitutes for Pten function.

研究分野：細胞生物学

キーワード：INPP4B

## 1. 研究開始当初の背景

生体膜を構成するリン脂質の一つであるホスファチジルイノシトール(PI)には7種類のリン酸化派生体(ホスホイノシタイド(PIPs)と総称される)が存在し、細胞内情報伝達物質として重要な役割を担っている。PIPsの量は時空間的に厳密に制御されており、これらを相互に変換する代謝酵素(哺乳類ではキナーゼ20種類とホスファターゼ28種類が同定されている)の機能欠失は様々な生理機能の破綻を引き起こす。特に、細胞増殖や細胞死の制御に重要なPI(3,4,5)P<sub>3</sub>(PIP<sub>3</sub>)を脱リン酸化するPTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)は、腫瘍病変における不活性化の頻度がp53に次いで高い極めて重要ながん抑制遺伝子である。PIP<sub>3</sub>脱リン酸化活性を特異的に失う(併せ持つホスホチロシン脱リン酸化活性は残存している)PTEN変異体(G129E)の発見から、PTENのがん抑制遺伝子としての機能の大部分がPIP<sub>3</sub>脱リン酸化活性に依存することが明らかにされている。

INPP4B(inositol polyphosphate 4-phosphatase)は種々のがんで発現低下が認められるがん抑制遺伝子である。申請者らは、遺伝子改変マウスを用いて、INPP4B単独の欠失ではいずれの組織においても発がんが認められないが、PTENと共に欠失すると甲状腺がんが発症することを見出した。その分子機構としてINPP4Bが、Pten欠損により上昇したPIP<sub>3</sub>を分解すること、がん遺伝子産物Aktの活性化を抑制することを報告した(Kofuji S *et al. Cancer Discov.* 5, 730, 2015)。PI(3,4)P<sub>2</sub>を基質とする4位の脱リン酸化酵素(4-phosphatase)だと考えられてきたINPP4Bが、PIP<sub>3</sub>をも基質とする点に着目し、本報告の後、申請者はそれぞれ選択的にD-3位、D-4位、D-5位を放射性同位体標識したPIP<sub>3</sub>を用いた解析により、INPP4BがPIP<sub>3</sub>のD-5位を脱リン酸化する活性を併せ持つことを見出した(図1)。すなわち、INPP4BはPIP<sub>3</sub>→PI(3,4)P<sub>2</sub>→PI3Pというシークエンシャルな脱リン酸化活性を有することになる(図2)。一般にPIPsを基質とするホスファターゼでは、脱リン酸化活性の対象となるリン酸基の位置(D-3, D-4, D-5位)は1ヶ所に限定されており、それぞれ3-phosphatase, 4-phosphatase, 5-phosphataseと分類される。今回見出したINPP4Bが5位脱リン酸化活性と4位脱リン酸化活性を併せ持つという特徴はユニークなものである。PTEN以外にもPIP<sub>3</sub>ホスファターゼ分子は10種類存在している。それらはすべて、PIP<sub>3</sub>の5位を脱リン酸化する5-phosphataseであって、3-phosphataseであるPTENの機能を代替する例は報告されていない。申請者はその理由を、がんにおいてPIP<sub>3</sub>の主要な標的分子であるAktがPIP<sub>3</sub>に加えてPI(3,4)P<sub>2</sub>によっても活性化されるため、PIP<sub>3</sub>をPI(3,4)P<sub>2</sub>へと変換するPIP<sub>3</sub> 5-phosphataseでは、Aktの活性化を抑制できないためだと考えている(図2)。一方、PIP<sub>3</sub>のみならずPI(3,4)P<sub>2</sub>も脱リン酸化することで、Aktを活性化しないPI3Pにまで代謝するINPP4Bであれば、細胞増殖の制御においてPTENの機能を代替可能であると考えに至り、本研究課題の提案に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「PIP<sub>3</sub>のみならずPI(3,4)P<sub>2</sub>も脱リン酸化することで、Aktを活性化しないPI3Pにまで代謝するINPP4Bであれば、細胞増殖の制御においてPTENの機能を代替可能である」ことを、細胞レベル、もしくは個体レベルで示すことである。

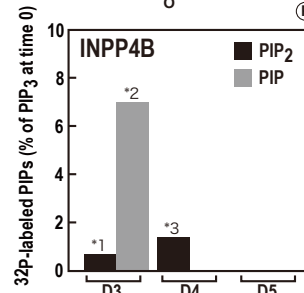
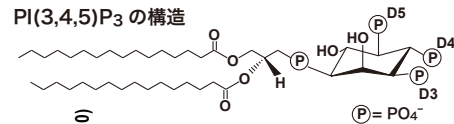


図1 INPP4BによるPIP<sub>3</sub>の脱リン酸化

それぞれD3, D4, D5位のリン酸基を放射性同位体標識したPIP<sub>3</sub>を基質として用いた。標識されたリン酸基が脱リン酸化されると検出されなくなる。

\*1=PI(3,4)P<sub>2</sub>, \*2=PI3P, \*3=PI(3,4)P<sub>2</sub>…太字が標識部位

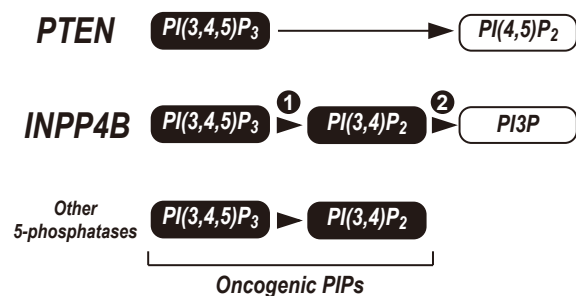


図2 INPP4Bによる脱リン酸化反応の特徴

他の5-phosphataseと異なり、INPP4Bは①、②の両反応を触媒することでPIP<sub>3</sub>をAktを活性化しないPI3Pへと代謝する

### 3. 研究の方法

細胞レベルでの検討の結果、技術的な問題もあり仮説を証明するには至らなかった。そこで、非アルコール依存性肝炎(NASH)モデルである肝特異的 PTEN 欠損マウスを用いた *in vivo*での検証を行った。本モデルでは Pten 欠損による前がん病変(脂肪肝、線維化)が顕著であり、PIP<sub>3</sub>の蓄積による Akt 経路の活性化が認められる(Horie Y *et al.* **J. Clin. Invest.** 113, 1774, 2004)。肝臓は外来遺伝子導入が容易な臓器であり、当初、アデノウイルスベクターを用いた過剰発現の系を用いて検証を行ったが、Pten 遺伝子を欠損する肝細胞の全てに INPP4B を発現させることは困難であった。そこで、Cre-loxP システムを利用した組織特異的なヒト INPP4B 過剰発現ノックインマウスを作製した(図3 相同組換え法により Rosa26 遺伝子座にヒト INPP4B, EGFP 共発現カセットを挿入する)。これにより組織特異的に PTEN を欠損させると共に、これを補う形で INPP4B を過剰発現するマウスを作製し、肝臓において INPP4B が PTEN を代替しうるかを検証した。肝特異的 Pten 欠損による発がんまでには50週以上を要するため、PTEN の欠損に依存して現れる前がん病変(脂肪肝)を指標として INPP4B の過剰発現の影響を検証した。

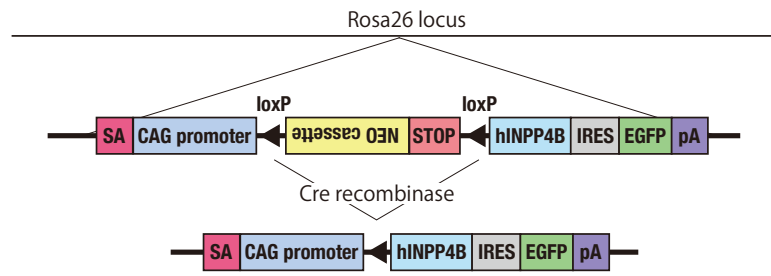


図3 組織特異的ヒト INPP4B 過剰発現ノックインマウスのコンストラクト

Cre リコンビナーゼが働いた組織、細胞でのみ、ヒト INPP4B および EGFP が過剰発現する (SA: splicing acceptor, IRES: internal ribosome entry site)

### 4. 研究成果

ES細胞を用いた相同組換え法により、条件付 hINPP4B 過剰発現ノックインマウスを樹立した。本マウスを Albumin プロモーターにより、肝細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Alb-Cre マウス、および Pten flox マウスと交配することで、肝特異的 Pten 欠損マウス、および、肝特異的 Pten 欠損、hINPP4B 過剰発現マウスを作製した。肝特異的 Pten 欠損マウスにおいては、21 週齢で顕著な脂肪肝が認められた(図4 上段左、HE 染色においても脂肪滴の部分が白く抜けており、同上段右、Sudan III による脂肪染色で激しい中性脂肪の蓄積が明らかである)。一方、hINPP4B 過剰発現マウスでは、共発現する GFP の染色、ヒト INPP4B の染色(本抗体はマウス Inpp4b には交差しない)の発現が認められ(図4 下段中央の2つのパネルにおける茶色のシグナル)、中性脂肪の蓄積が強く抑制されていることが明らかとなった(図4 下段右)。

これらの結果から、ヒト INPP4B の過剰発現によって、Pten 欠損による前がん病変を抑制できることが初めて示された。現在、長期観察を行っており、今後、発がんに対する効果を検証する予定である。

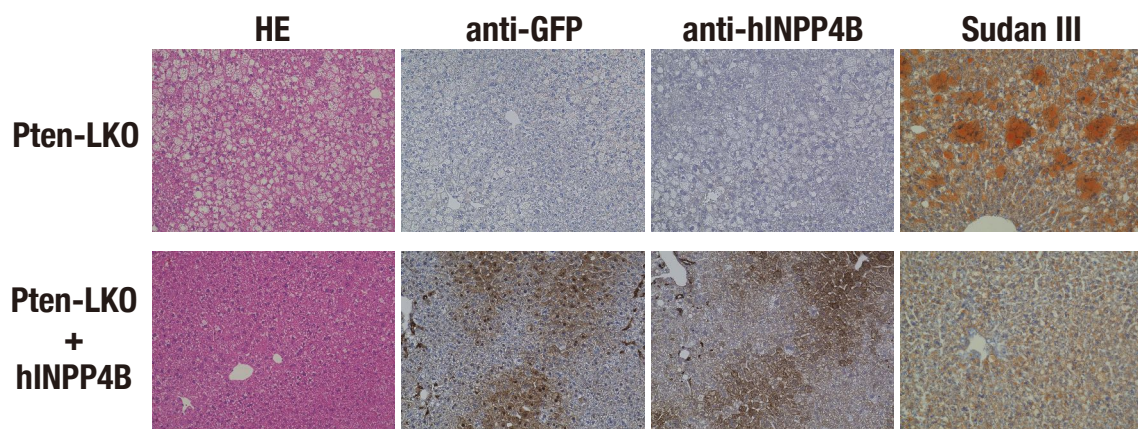


図4 肝特異的 Pten 欠損に対する hINPP4B の過剰発現の影響

Pten-LKO (Alb-Cre & Pten flox/flox) 21 週齢のメスの同腹仔

※ここで用いた抗 INPP4B 抗体は、ヒトの INPP4B のみを検出し、内在性のマウス Inpp4b とは交差しない (Pten-LKO: Alb-Cre & Pten<sup>flox/flox</sup>, HE: hematoxylin and eosin 染色, Sudan III: 中性脂肪染色)

本研究によって、INPP4B が機能的に Pten を部分的にでも代替しうることを、初めて個体レベルで示すことに成功した。今後、遺伝子変異のみならず、メチル化によるサイレンシング、PTEN を標的とする miRNA の亢進、翻訳後修飾などの様々な原因により PTEN が機能的に欠失した場合に、INPP4B を活性化することで PTEN の機能を代替し、がんの進展を抑制するという新たながん治療戦略を考えることが可能となった。これまで、チロシンキナーゼ含有型の増殖因子受容体の機能亢進による発がんに対しては、種々の分子標的薬が開発され、一定の成果を収めている。一方で、がん抑制遺伝子の機能喪失型変異に起因する発がんに対しては薬剤による有効なアプローチが提示されていない例が多い。本研究は、多岐にわたるがんで見出されている PTEN の機能低下に対して、その分子機能を代替する候補として INPP4B を提示し、その賦活化による PTEN 機能代替の可能性を示すものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ebihara Takashi, Tatematsu Megumi, Fuchimukai Akane, Yamada Toshiki, Yamagata Kenki, Takasuga Shunsuke, Yamada Takechiyo	4. 巻 70
2. 論文標題 Trained innate lymphoid cells in allergic diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 174 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2020.11.007	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 Koizumi A, Narita S, Nakanishi H, Ishikawa M, Eguchi S, Kimura H, Takasuga S, Huang M, Inoue T, Sasaki J, Yoshioka T, Habuchi T, Sasaki T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Increased fatty acyl saturation of phosphatidylinositol phosphates in prostate cancer progression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 13257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-49744-3.	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 Takemasu S, Nigorikawa K, Yamada M, Tsurumi G, Kofuji S, Takasuga S, Hazeki K.	4. 巻 166
2. 論文標題 Phosphorylation of TMEM55B by Erk/MAPK regulates lysosomal positioning.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biochem.	6. 最初と最後の頁 175-185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz026.	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 Nigorikawa K, Matsumura T, Sakamoto H, Morioka S, Kofuji S, Takasuga S, Hazeki K.	4. 巻 42
2. 論文標題 Sac1 Phosphoinositide Phosphatase Regulates Foam Cell Formation by Modulating SR-A Expression in Macrophages.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 923-928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00907.	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 Takemasu S, Ito M, Morioka S, Nigorikawa K, Kofuji S, Takasuga S, Eguchi S, Nakanishi H, Matsuoka I, Sasaki J, Sasaki T, Hazeki K.	4. 巻 24
2. 論文標題 Lysophosphatidylinositol-acyltransferase-1 is involved in cytosolic Ca <sup>2+</sup> oscillations in macrophages.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes Cells.	6. 最初と最後の頁 366-376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12681.	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 Isobe Y, Nigorikawa K, Tsurumi G, Takemasu S, Takasuga S, Kofuji S, Hazeki K.	4. 巻 165
2. 論文標題 PIKfyve accelerates phagosome acidification through activation of TRPML1 while arrests aberrant vacuolation independent of the Ca <sup>2+</sup> channel.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biochem.	6. 最初と最後の頁 75-84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy084.	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 Liggins Marc C., Flesher Jessica L., Jahid Sohail, Vasudeva Priya, Eby Victoria, Takasuga Shunsuke, Sasaki Junko, Sasaki Takehiko, Boissy Raymond E., Ganesan Anand K.	4. 巻 14
2. 論文標題 PIKfyve regulates melanosome biogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1007290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1007290	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 該当する

1. 著者名 Morioka Shin, Nigorikawa Kiyomi, Okada Eri, Tanaka Yoshimasa, Kasuu Yoshihiro, Yamada Miho, Kofuji Satoshi, Takasuga Shunsuke, Nakanishi Hiroki, Sasaki Takehiko, Hazeki Kaoru	4. 巻 131
2. 論文標題 TMEM55a localizes to macrophage phagosomes to downregulate phagocytosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs213272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.213272	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 Kimura Hirotaka, Matsuyama Yasushi, Araki Sachiko, Koizumi Atsushi, Kariya Yumi, Takasuga Shunsuke, Eguchi Satoshi, Nakanishi Hiroki, Sasaki Junko, Sasaki Takehiko	4. 巻 28
2. 論文標題 The effect and possible clinical efficacy of in vivo inhibition of neutrophil extracellular traps by blockade of PI3K-gamma on the pathogenesis of microscopic polyangiitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 530 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2017.1367116	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高須賀俊輔、海老原敬、佐々木雄彦
2. 発表標題 肝特異的ホスファチジルグリセロールリン酸ホスファターゼ遺伝子欠損によるラロン型低身長症様疾患モデルマウス
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高須賀俊輔・佐々木雄彦 (編集 = 有田誠)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 220
3. 書名 脂質クオリティ	

〔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

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