

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591482

研究課題名（和文）核内受容体を介したリゾリン脂質の抗がん作用機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the anticancer mechanism of the lysophospholipid through the nuclear receptor

研究代表者

塚原 完 (TSUKAHARA TAMOTSU)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：00529943

研究成果の概要（和文）：核内受容体である PPAR γ は大腸癌細胞に強く発現しているが、その生理的意義付けは不明である。我々は今回 PPAR γ アンタゴニストである cPA が大腸癌細胞株の増殖制御因子として働くことを *in vitro* 試験において明らかにした。cPA は PPAR γ の活性化抑制依存的に大腸癌細胞の増殖を抑制し、さらに細胞死を誘導することを示した。この結果は、大腸癌細胞に限らず、PPAR γ が高発現している癌細胞においても cPA が効果を示すことを示唆するものであり、かつ重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：Cyclic phosphatidic acid (cPA) is a specific, high-affinity antagonist of PPAR γ ; however, the molecular mechanism by which cPA inhibits colon cancer proliferation remains to be clarified. Our report indicates that PPAR γ is expressed at considerable levels in human colon cancer cell lines. cPA suppressed cell growth and induced DNA condensation through PPAR γ inhibition. This report suggests that potential use of cPA in the development of drugs targeting colon cancer and possibly other types of cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：核内受容体、リゾリン脂質、大腸癌

1. 研究開始当初の背景

リゾリン脂質のひとつであるリゾホスファチジン酸 (LPA) は、生体内の脂質メディエーターとして重要な役割を果たしている。LPA はいくつかの生合成経路が知られているが、主にリゾホスホオリパーゼ D (ATX) により、リゾホスファチジルコリン (LPC) からコリンが除去されるルートから合成され、細胞膜表面に存在する 7 回膜貫通型受容体 (GPCR) に

よる多様なシグナリング伝達経路を介して様々な生理作用を示す。これら生理活性脂質は必要に応じて細胞の内外で産生され、ターゲット分子を標的に結合する。生体内には脂肪酸を 1 本しかもたないリン脂質が存在しており、これをリゾリン脂質と呼んでいる。通常は 2 本あるリン脂質の片方のアシル基が酵素反応により切断された脂肪酸で、多様な生理活性をもつことが報告されている。そのな

かでも、リゾホスファチジン酸(LPA)は最もよく研究されてきたリゾリン脂質である。最近、申請者はLPAアナログの1つである環状フォスファチジン酸(cPA)が核内受容体の1つであるPPAR γ に対してアンタゴニスト活性を持つことを報告した。これまでにPPAR γ の内因性アゴニストは多数見つかっているが、アンタゴニストはcPAが最初の例である。またPPAR γ は当初、脂肪細胞分化のレギュレーターとして脂質代謝系の遺伝子群の転写制御に関与する分子として発見され、その化学合成リガンド(チアゾリジン誘導体)はインスリン抵抗性改善の作用を示すことから、抗糖尿病薬として使用されるに至っている。その後、脂肪組織以外にもがん細胞に発現していることが報告され、がん発生に関与している分子であることが示唆されている。特に大腸や腸管などの消化器官に強く発現しており、生理的に重要な役割をしていると考えられている。

2. 研究の目的

リゾリン脂質が多様な疾病の共通な基盤病態となっていることが次第にあきらかになってきている。これまでの類似研究はアゴニストによる転写活性に着目したアイデアが多かったが、申請者はcPAの持つ転写活性抑制作用に注目し、これらの修飾がどのような分子機構を経て炎症を由来とする大腸発癌の病態制御に関与するのか検討してきた。核内受容体の1つであるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマ(PPAR γ)は生活習慣病に関連する疾患に極めて重要な役割を持つ分子である。その核内受容体リガンドは多彩な細胞内現象を引き起こすことが報告されており、リガンド関連疾患の病態を明らかにする事は新しい治療法の開発につながる事が期待される。申請者は生理活性リゾリン脂質の1つである環状フォスファチジン酸(cPA)がPPAR γ の活性化依存的に大腸癌細胞の増殖を制御する事を最近報告した。大腸癌細胞および患部組織にはPPAR γ が高発現している事が報告されているが、その詳細なメカニズムについては不明である。本研究では主に大腸癌に焦点を絞りながら、PPAR γ が高発現している癌細胞も含めて、生理活性リゾリン脂質と癌およびその抑制メカニズムを明らかにすることを研究目的とする。

3. 研究の方法

生理活性脂質であるcPAは微量で生物活性を示すため、その存在量もわずかである。cPAは有機合成法では製造が困難であり、酵素合成法を利用して調製する。cPAはリゾホスファチジルコリン(LPC)を前駆体基質として、ホスホリパーゼD(PLD)による

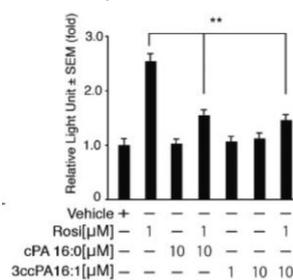
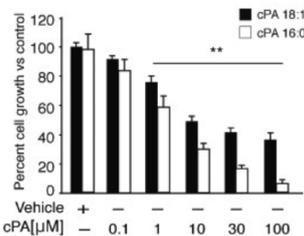
transphosphatidylaton 反応により合成する。すでにスモールスケールでの合成法は確立し、2006年に研究代表者が報告しているが、ラージスケールで合成する場合は反応中間物などの混入により、純度の低下を招く恐れがある。特に、反応中間物の1つであるLPAはCPAのアンタゴニスト活性を阻害するため除く必要がある。そこで、HPLCとLC-MSを利用した迅速な精製及び純度検定法を導入する。cPAのPPAR γ に対するアンタゴニスト活性は非常に強く、ナノモラー(nM)の低濃度で活性化を抑制する。そこでヒト由来の大腸がん細胞であり、PPAR γ 高発現株であるHT-29細胞を利用して、*in vitro*におけるcPAの細胞増殖抑制効果をMTT法、チミジン取り込み法およびFACSを使用したPropidium iodide法など複数の方法により検討しcPAの生理活性を評価するとともに、大腸癌細胞株におけるPPAR γ に特異的に結合するタンパク質を同定、cPA依存的な大腸がん細胞内のシグナル伝達機構の解明をウェスタンブロット法により解析する。これらの基礎研究を終了後、cPAの代謝分解を防ぐ技術を開発し、新たな治療戦略の構築を目指した。

4. 研究成果

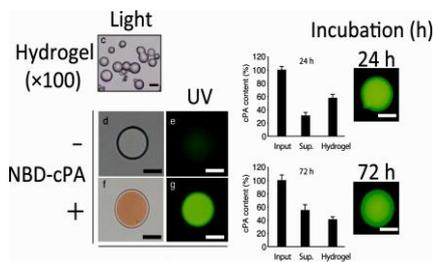
ヒト由来の大腸がん細胞であり、PPAR γ 高発現株であるHT-29細胞を利用して、*in vitro*におけるcPAの細胞増殖抑制効果をMTT法、チミジン取り込み法およびFACSを使用したPropidium iodide法など複数の方法により検討しcPAの生理活性を評価した。酵素合成法により調製したcPAはレポーター遺伝子アッセイ法により評価し、PPAR γ に対するアンタゴニスト活性を持つことを明らかにした(下図、雑誌論文#7)。さらに炎症性ケモカインの1つである

MCP-1の発現と分泌がLPA刺激依存的に亢進されることを明らかにし、cPAが有為にその作用を抑制することをつきとめた(雑誌論文#3)。

PPAR γ はマクロファージをはじめとする炎症細胞に発現しており、サイトカインの分泌調節を介して炎症反応の進展に伴って生じる発癌のプロセスに深く関与していることが明らかにされていることから、MCP-1が大腸発癌におけるキー分子であることが示唆



された。申請者は cPA による PPAR γ アンタゴニスト作用を利用した疾病治療法をこれまで検討してきたが、cPA を水溶液の状態



患部へ投与しても、濃度が希釈されるだけで、治療効果が低いことが明らかとなり、この問題を解決するために、作用部位に cPA を直接デリバリーできるシステム技術を開発することが必要となった。cPA の投与方法は複数考えられるが、これまでどれも一長一短であった。本申請では経口投与を選択したが、この方法は生体に対する侵襲が回避できる点が優れているが、体循環血液に到達する前に肝臓における初回通過効果を受ける。このため、効果にばらつきが出る可能性が予想された。我々はこの問題を緩和させるために本申請においてハイドロゲルを利用した cPA 複合体の応用を試みた。申請者は医療用ハイドロゲルを cPA へ吸収させハイドロゲル-cPA 複合体を作製した(上図、雑誌論文#4)。cPA および LPA はマイクロカプセル化技術の応用により、体内投与時に生じる加水分解を抑制しており、さらに長期徐放効果についても優れていた。今後、ハイドロゲル-cPA 複合体を *in vivo* に呈し、効果を検討する。申請者は、アゴニスト分子(LPA)による PPAR γ の活性化と、その逆に、活性化の抑制に関与するアンタゴニスト「cPA」が体内で厳密なバランスを保ちながら恒常性の維持に寄与しているのではないかと考えている(雑誌論文#2,6)。なぜなら、LPA は炎症関連大腸発癌に関連する分子として報告されており、大腸発癌プロモーターとして作用することが予想される。PPAR γ はマクロファージをはじめとする炎症細胞に発現しており、サイトカインの分泌調節を介して炎症反応の進展に伴って生じる発癌のプロセスに深く関与していることが明らかにされている。また大腸や腸管などの消化器官にも強く発現しており、大腸癌組織にも強く認められることから、炎症関連大腸発癌におけるキー分子であることが強く示唆される。本報告とこれまでの研究成果より、cPA が医療等への応用において多くの可能性を秘めている物質であることは疑いのない事実であり、大腸癌発症の予防と治療という観点からも、重要な意味を持つ分子である。今後、明らかにされる疾病特異的発現遺伝子は発癌・進展に重要な遺伝子であることが予想され、従来法の欠点を克服する新規な予防・治療法につながるものが強く

期待される。今後、これらの成果を、大腸発ガンマウス等の動物を利用した化学誘発実験などにより、効果を検討していく。

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 8 件)

1. Tamotsu Tsukahara, Hisao Haniu and Yoshikazu Matsuda PTB-Associated Splicing Factor (PSF) is a PPAR gamma-Binding Protein and Growth Regulator of Colon Cancer Cells *PLoS ONE* 8:e58749 2013 査読有り doi:10.1371/journal.pone.0058749

2. Tamotsu Tsukahara PPAR γ Networks in Cell Signaling: Update and Impact of Cyclic Phosphatidic Acid 2013:1-6 *Journal of Lipids* 査読有り <http://dx.doi.org/10.1155/2013/246597>

3. Tamotsu Tsukahara and Hisao Haniu 2012 Lysophosphatidic Acid Stimulates MCP-1 Secretion from C2C12 Myoblast *ISRN Inflammation* 2012:1-6 査読有り doi:10.5402/2012/983420

4. Tamotsu Tsukahara and Kimiko Murakami-Murofushi Release of cyclic phosphatidic acid from a gelatin-based hydrogel inhibits colon cancer cell growth and migration 2012 *Scientific Reports* 687:1-7 査読有り doi:10.1038/srep00687

5. Tamotsu Tsukahara and Hisao Haniu 2012 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Overexpression Suppresses Proliferation of Human Colon Cancer Cells *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424:524-529 査読有り <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.06.149>

6. Tamotsu Tsukahara The Role of PPAR γ in the Transcriptional Control by Agonists and Antagonists 2012 *PPAR research* 2012:1-9 査読有り doi:10.1155/2012/362361

7. Tamotsu Tsukahara, Shuwa Hanazawa, Tetsuyuki Kobayashi and Kimiko Murofushi-Murakami 2010 Cyclic Phosphatidic Acid Decreases Proliferation and Survival of Colon Cancer Cells through Inhibition of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ

Prostaglandins and Other Lipid Mediators
93:126-133 査読有り
<http://dx.doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2010.09.002>

8. Tamotsu Tsukahara, Ryoko Tsukahara, Yuko Fujiwara, Juming Yue, Yunhui Cheng, Huazhang Guo, Alyssa Bolen, Chunxiang Zhang, Louis Balazs, Fabio Re, Guangwei Du, Michael A Frohman, Daniel L. Baker, Abby.L. Parrill, Ayako Uchiyama, Tetsuyuki Kobayashi, Kimiko-Murofushi, and Gabor Tigyi 2010 Phospholipase D2-dependent inhibition of the nuclear hormone receptor PPAR γ by cyclic phosphatidic acid *Molecular Cell* 39:421-432 査読有り
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.022>

[学会発表] (計 3 件)

1. Tamotsu Tsukahara and Kimiko Murakami-Murofushi (2012) Release of Cyclic Phosphatidic Acid from a Gelatin-Based Hydrogel Inhibits Colon Cancer Cell Growth and Migration Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Japanese Biochemical Society (Dec. 15) Fukuoka, Kyushu, Japan

2. Tamotsu Tsukahara and Kimiko Murakami-Murofushi (2011) Cyclic phosphatidic acid inhibits colon cancer cell proliferation through suppression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ASBMB Annual Meeting, Washington DC, USA (April 9-13)

3. Tamotsu Tsukahara and Gabor Tigyi (2010) Phospholipase D2-dependent inhibition of the nuclear hormone receptor PPAR γ by cyclic phosphatidic acid The 83rd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (Kobe, Hyogo, Japan, Dec 7-10)

[図書] (計 1 件)

1. Ryoko Tsukahara, Tamotsu Tsukahara, Gabor Tigyi (2013) Regulation of the Nuclear Hormone Receptor PPAR γ by Endogenous Lysophosphatidic Acids. Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biochemistry (edited by Jerold Chun) John Wiley book (ISBN: 978-0-470-56905-4) 808 pages

[その他]

ホームページ等
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/864>

6. 研究組織
(1)研究代表者
塚原 完 (TSUKAHARA TAMOTSU)
信州大学・医学部・助教
研究者番号 : 00529943

(2)研究分担者
()
研究者番号 :

(3)連携研究者
()
研究者番号 :