

機関番号：11401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700861

研究課題名 (和文) 細胞増殖と癌の発生・進展における PIK3C3 の役割

研究課題名 (英文) The role of PIK3C3 in cell proliferation and tumor development

研究代表者

江口 賢史 (EGUCHI SATOSHI)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70457117

研究成果の概要 (和文)：生体内において PI3P を産生すると考えられている PIK3C3 の生理的意義さらに発がんに対する寄与は全く明らかになっていない。我々はこれらを明らかにするためにノックアウトマウスを作製した。PIK3C3 欠損細胞を用いた解析から PIK3C3 欠損により細胞増殖が顕著に抑制され、PI3P の産生が低下すること、加えて、飢餓条件下で誘導されるオートファジーに PIK3C3 が必須であることが明らかになった。また、ノックアウトマウスの解析から免疫細胞で Pten 欠損に起因する発がんに対して PIK3C3 欠損が抑制的に働くことを見出した。

研究成果の概要 (英文)：The role of PIK3C3 in cell proliferation and tumor development remains unclear. We generated knockout mice to analyze the physiological functions of PIK3C3. The deletion of PIK3C3 significantly suppressed cell proliferation and reduced the production of PI3P. In addition, PIK3C3 is necessary for starvation-induced autophagy. In adult mice, the ablation of PIK3C3 suppressed tumor development caused by Pten deletion in immune systems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：遺伝学、分子生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：イノシトールリン脂質、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

・PIs と発癌について：ホスファチジルイノシトール (PIs) のイノシトール環水酸基が、可逆的なリン酸化を受ける結果、8 種類のPIs が細胞膜に生成される。癌遺伝子産物に結合した脂質キナーゼとして発見されたクラスI phosphoinositide 3-kinase (PI3K) は、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 [PI(4,5)P₂] をリン酸化し、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：以下PIP₃] を生成する。癌抑制遺伝子産物PTENはPIP₃の3位脱リン酸化酵素である。PIP₃は原癌遺伝子産物Aktを直接活性化することが明らかになっている。細胞内 PIP₃ レベルの上昇はAktの活性化を導き、増殖・生存の促進性シグナルとなる。実際に様々な癌で、遺伝子変異や発現量の変化によって、PI3K活性が上昇することやPTENの活性

が低下することが明らかになっている。現在、PIsの中でその生理機能及び癌への関与が最もよく理解されているのが、このPIP₃である。

・**ホスファチジルイノシトール3リン酸 (PI3P)** : PIP₃と癌に関するこれまでの研究の中で、我々が気に留めている実験事実がある。それは、Src homology region 2-containing inositol phosphatase (SHIP) などのPIP₃の5位脱リン酸化酵素の欠損は、PTEN (3位脱リン酸化酵素) 欠損の場合と同様に細胞内PIP₃レベルの上昇を導くにもかかわらず、癌には至らないことである。この現象の説明として一つ考えられるのは、PIP₃に加えてPI3Pの脱リン酸化も、PTENによる癌抑制の機構となっている可能性である。実際に申請者は試験管内での脱リン酸化反応実験で、PTENがPI3Pをも基質とすること、SHIP等のPIP₃の5位脱リン酸化酵素はPI3Pを分解しないことを確認している。これまでの多くの研究では、PTEN欠失による癌はPIP₃分解活性の低下にのみ帰され、PI3P代謝異常と癌についての詳細な解析はなされていない。我々は、PI3P代謝は癌の発生や悪性化にどのように関わるのかという疑問を持った。

・**PI3P生成酵素PIK3C3** : PI3Pの生成は、クラスIII PI3K (PIK3C3) により触媒される。ホスファチジルイノシトールのみを基質とするこの酵素は、酵母からヒトまで幅広い生物種に存在する。PIK3C3は癌抑制遺伝子産物Beclin-1との複合体を形成して存在する。PIK3C3によるPI3Pの生成は、mTOR (mammalian target of rapamycin) の活性化を導くことが報告されている。豊富な栄養条件下にある細胞で活性化されるmTORは、蛋白質合成、細胞増殖、成長を正に制御しており、mTORの阻害剤は抗腫瘍効果をもつ。このような知見に基づけば、PIK3C3はmTORを介して、癌促進的に働くという仮説を立てることができる。一方、PIK3C3とBeclin-1はいずれも、酵母でのオートファジー誘導に必要な分子である。オートファジーが癌細胞の増殖・生存、癌の発生・進展に正負いずれの寄与をしているかについては諸説あり、本研究で理解したい問題の一つであるが、Beclin-1が癌抑制遺伝子産物であることを考えると、PIK3C3によるPI3P産生はオートファジーを介して癌抑制的に働くという仮説を立てることができる。このように、PIK3C3及びPI3Pが細胞外環境に呼応した増殖・生存の制御に密接にかかわることを示唆する興味深い知見が存在する。しかしながら、上記のように癌との関連を間接的に表す断片的な知見を考察するのみでは、背馳した結論が導かれてしまう現状である。癌の発生や悪性化におけるPIK3C3及びPI3Pの役割を、より直接的に解析する上で有用な方法の一つは、PIK3C3遺伝子欠損マウスの利

用であるが、PIK3C3欠損マウスについての報告は皆無である。申請者はPIK3C3を全身性に欠損するマウスを作製したが、これは胎生致死であった。このため、PIK3C3と癌について個体レベルで解析は未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

PIsは、タンパク質の局在や活性の制御因子で、細胞増殖、アポトーシス、細胞運動などを制御する。これら細胞応答の異常は「がん」と深く関わる。ホスファチジルイノシトール3リン酸 (PI3P) はオートファジー、栄養シグナル伝達、小胞輸送など、上記細胞応答を支える素過程に関与するPIs分子種であるが、がんの発生や悪性化におけるこの脂質の役割は不明である。我々はPI3P生成酵素であるPIK3C3の遺伝子をCreリコンビナーゼの作用により欠損する遺伝子改変マウスを独自に樹立した。本研究ではこの独自のツールを用いて、細胞レベルでの実験によってPIK3C3が増殖・生存の制御において果たす役割を理解し、マウス個体レベルの実験によって発癌と浸潤・転移におけるPIK3C3の寄与を明らかにする事が目的である。

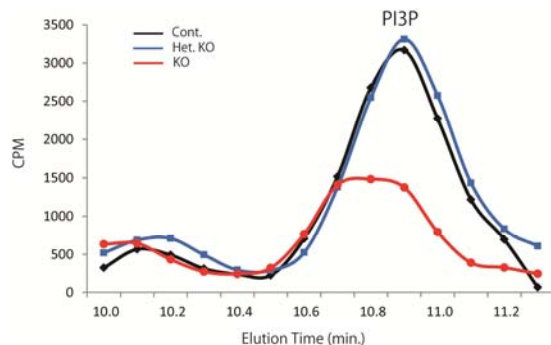
3. 研究の方法

我々はCre-loxPシステムを利用したPIK3C3欠損マウスを既に作製している。前立腺癌は60歳以上の男性の癌死において2番目に高い原因であり、PTENならびにBeclin-1の発現低下が高率に認められる癌である。PTEN欠損マウスとPIK3C3変異マウスとを交配し、前立腺癌と浸潤・転移において、PIK3C3の活性消失(遺伝子欠損)が与える影響を明らかにする。

4. 研究成果

まず、PIK3C3欠損MEFを作製し、以下の新しい知見を得た。

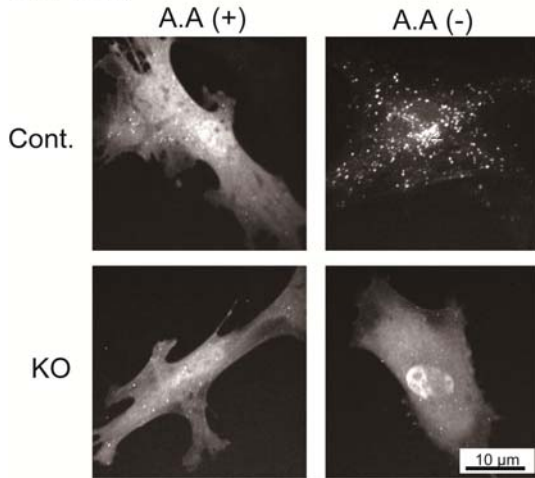
(1) PIK3C3欠損MEFを作製し、脂質生化学的な解析からPIK3C3が細胞内でPI3P産生酵素として機能している事を明らかにした。



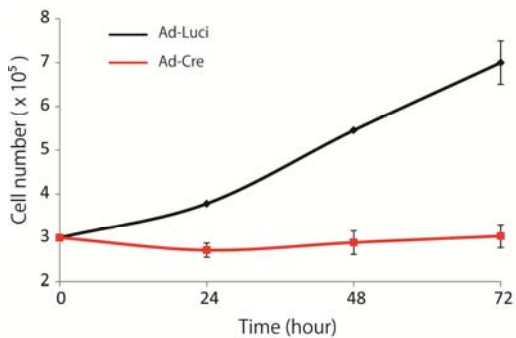
(2) PI3Pが関与するオートファジー誘導の

機能解析では電子顕微鏡を用いたオートファゴソーム形成や、蛍光顕微鏡を用いた GFP-LC3 凝集の解析結果からオートファジーに PIK3C3 が必須であることを明らかにした。

GFP-LC3



(3) PIK3C3欠損により顕著に細胞増殖を抑制することが明らかとなった。



PIK3C3 欠損が前立腺発癌と浸潤・転移を抑制するかどうかの解析をするために PTEN 欠損由来の前立腺癌モデルである PB-Cre4-PTEN^{flox/flox} のマウスに PIK3C3^{flox/flox} をかけ合わせたマウスを作製した。このマウスは MEF の結果から癌が抑制され、生存曲線が改善されると予期された。しかしながら、予想に反して、このマウスは PTEN 単独欠損マウスと比較して生存率に有意な差は認められなかった。このマウスの前立腺のサザンブロットやウェスタンブロットの結果から 2 重欠損を PB-Cre4 で引き起こす際に、効率が悪く欠損しきれていない遺伝子およびタンパク質が散見された。PIK3C3 はヘテロ欠損では PI3P 産生も低下せず、細胞増殖に対する影響もないことを見出している。このことから PTEN はヘテロ欠損でも癌を引き起こすことが知られているが、PIK3C3 はヘテロ欠損では表現型を呈さないことから癌に対して影響がなかったと考えられる。現在は、効率良く 2 重欠損を引き

起こす事が確認できた免疫細胞での癌モデルを用いて PIK3C3 の癌に対する影響を解析している。その結果、PTEN 欠損由来の発癌が有意に抑制されることを見出しており、その機序について解析中である。

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 1 件)

(1) Sasaki J, Kofuji S, Itoh R, Momiyama T, Takayama K, Murakami H, Chida S, Tsuya Y, Takasuga S, Eguchi S, Asanuma K, Horie Y, Miura K, Davies EM, Mitchell C, Yamazaki M, Hirai H, Takenawa T, Suzuki A, Sasaki T.

The PtdIns(3,4)P₂ phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death

Nature 465, 497-501. (2010)

査読有り

[学会発表] (計 3 件)

(1) 江口賢史、佐々木純子、伊藤玲悦

浅沼研、佐々木雄彦

クラス 3 ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼの免疫系での役割

第 9 回北東北血液研究会

2011 年 5 月 14 日、秋田市

(2) 江口賢史、佐々木純子、小藤智史、

佐々木雄彦

PIK3C3 の生理的意義の解析

第 4 回グローバル GCOE 若手研究者シンポジウム

2010 年 11 月 16 日、秋田市

(3) 佐々木雄彦、佐々木純子、高須賀俊輔、

江口賢史、小藤智史

ホスホイノシチド代謝酵素と生理機能

第 87 回日本生理学会大会

2010 年 5 月 21 日、盛岡市

6. 研究組織

(1)研究代表者

江口賢史 (EGUCHI SATOSHI)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70457117

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：