

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460341

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

研究課題名(英文)Role of sphingosine 1-phosphate signaling on tumor metastasis

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は最近様々な生理機能や癌の転移に関与する細胞外小胞エクソソームへの積荷ソーティング機構におけるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)シグナリングの重要性を見出した。本研究では、癌転移に関わる積荷のエクソソームへのソーティングにおけるS1Pシグナリングの役割を明らかにすることを目的とした。結果、受容体型チロシンキナーゼc-Metや一部のmiRNAのエクソソームへのソーティングにS1Pシグナリングが関与することが明らかとなった。現在癌転移との関係解明に向けてin vivoレベルでの研究を継続しており、本研究課題の達成によりS1Pシグナリングをターゲットとする癌転移抑制剤開発への発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are small membrane-bound vesicles released from a variety of physiological cells or tumor cells and include much functional proteins and RNAs as cargo. Recently we discovered new mechanism of Sphingosine 1-phosphate (S1P) signaling-regulated cargo sorting into exosomes. However the role of S1P signaling on sorting of cargoes that relates to tumor metastasis such as c-Met or miRNA into exosomes is still unclear. Here, we found S1P-signaling also plays a critical role in exosomal sorting of these tumor metastasis-related cargoes. Now we continue to try some in vitro study to figure out the importance of S1P signaling-induced exosomal cargo sorting on tumor metastasis. If completing this study we would expect that S1P signaling becomes innovative drug target for tumor metastasis.

研究分野：医歯薬学 基礎医学 薬理学一般

キーワード：生理活性物質 シグナル伝達 エクソソーム スフィンゴシン1-リン酸 スフィンゴシンキナーゼ 癌

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴシン1-リン酸 (S1P) はセラミドの代謝産物であるスフィンゴシンがスフィンゴシンキナーゼ (SphK; SphK 1 および SphK 2 の2種のサブタイプが存在) によってリン酸化されることで細胞内において産生され、細胞外へ放出された後、生理活性物質として細胞膜上に存在する G タンパク質共役型受容体ファミリーである S1P 受容体に作用することで、細胞運動、細胞増殖、細胞接着、神経伝達物質放出など様々な細胞応答に参与することが知られている (図1)。

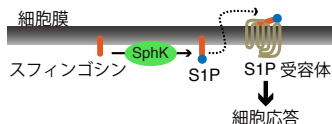


図1: S1Pの作用メカニズム

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50nm~100nmの微小膜小胞であるエクソソームを放出しており、このエクソソームが、液性因子として生体内を循環・拡散しエクソソームに含まれる積荷が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、癌細胞の転移を促進することが知られている。この癌転移に関わるエクソソームの積荷としては、現在までに受容体型チロシンキナーゼである c-Met や各種 microRNA (miRNA) などが報告されている。これらの報告は、原発巣の癌細胞における c-Met や miRNA のエクソソームへのソーティングを抑制できれば、癌転移を抑える新たな治療が可能になることを示唆している。

機能性タンパク質などの積荷のエクソソームへのソーティングメカニズムについてはこれまで全く明らかにされていなかったが、最近我々は、スフィンゴシンキナーゼ2によって産生されるスフィンゴシン1-リン酸が機能性タンパク質のエクソソームへのソーティングにおいて重要な働きを担うことを明らかにした。具体的には、SphK2によるS1Pの産生および生理活性物質S1PによるS1P受容体の活性化のメカニズムが、細胞膜

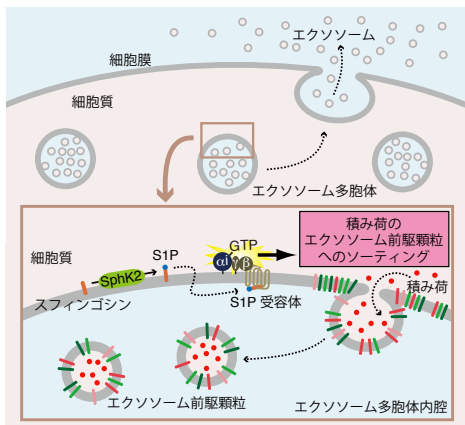


図2: S1Pによる積荷のエクソソームへのソーティング機構

上のみならず細胞内膜系の後期エンドソームの一種であるエクソソーム多胞体上においても細胞膜とは独立して働いていること、またこの独立したS1Pシグナリングの恒常的な活性化が、積荷タンパク質のエクソソーム前駆顆粒へのソーティングを促進することを明らかにした (図2)。実際、エクソソーム多胞体上でのS1P産生を引き起こすSphK2やS1P受容体などのS1Pシグナリングに関与する分子の働きを抑えることにより、積荷のエクソソーム前駆顆粒へのソーティングが減少し、結果積荷のないエクソソームが放出されることが示された。この結果は、S1Pシグナリングによるエクソソームへの積荷ソーティング機構が癌転移を促進する積荷 (c-Met や miRNA など) においても適用されるという仮説が成り立つならば、SphK2 など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、癌転移の抑制が可能になることを示唆している (図3)。

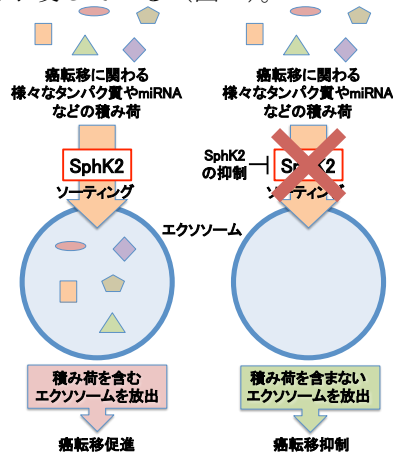


図3: S1Pシグナリングの制御による癌転移抑制

2. 研究の目的

本研究では、S1Pシグナリングによるエクソソームへの積荷ソーティング機構が癌転移を促進する積荷 (c-Met や miRNA など) においても適用されることを細胞レベルおよび動物レベルで明らかにすることで、癌転移におけるS1Pシグナリングの役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

課題1、2の順に計画的に研究を進める。
課題1: S1Pシグナリングによりエクソソームへソーティングされる癌転移関連物質の同定

課題1では転移性癌細胞株から放出されるエクソソーム中の癌転移に関わる物質群について、SphK2、S1P受容体の選択的阻害剤、SphK2、S1P受容体に対するRNAi法などを用い、S1Pシグナリングによりエクソソームへのソーティングの制御を受ける癌転移関連物質の同定を行う。

課題2：エクソソームが関与する癌転移におけるS1Pシグナリングの役割の解明

課題2ではRNAi法や生体イメージング法を用いたマウス *in vivo* 実験により、課題1で同定した「S1Pシグナリングによる癌転移関連物質のエクソソームへのソーティング機構」のエクソソーム依存性癌転移における重要性を明らかにする。

4. 研究成果

平成26年度は、「課題1」である「S1Pシグナリングによりエクソソームへソーティングされる癌転移関連物質の同定」を行った。癌転移関連物質としては、癌の転移に関係するタンパク質およびmiRNAのそれぞれについて検討を行った。また評価に用いる細胞としては転移性の高い癌細胞株であるB16F10細胞などを用いた。具体的には、タンパク質やmiRNAのエクソソームへのソーティングを抑えるためにSphKやS1P受容体に対する阻害剤を処置し、細胞培養上清中のエクソソームを超遠心法により回収し、エクソソーム積荷定量法によりエクソソーム中のタンパク質またはmiRNAの密度を定量化することで、S1Pシグナリングによりエクソソームへのソーティングの制御を受ける癌転移関連物質のスクリーニングを行った。この際タンパク質については抗体を用いて内在性の候補タンパク質を、miRNAについては外来のmiRNAについて検討を行った。その結果、スクリーニングを行ったタンパク質およびmiRNAの中でc-Metを含む数種のタンパク質および数種のmiRNAがS1Pシグナリングの制御によりエクソソームへソーティングされることが明らかとなった。

平成27年度は、「課題2」である「*in vivo* 癌転移イメージングに向けたルシフェラーゼおよびshRNAの安定発現細胞の構築」を行った。まず、高転移性のマウス乳がん細胞株である4T1細胞、ヒトメラノーマ細胞株であるMeWo細胞およびマウスメラノーマ細胞株であるB16F10細胞に、ほ乳類細胞の発現プロモーター(CMV)の下流でホタルルシフェラーゼが発現するプラスミドベクターを遺伝子導入し、ホタルルシフェラーゼの安定発現細胞株をクローニングした。次にS1Pシグナリング関連分子であるスフィンゴシンキナーゼ2(SphK2)およびコントロールのshRNAプラスミドベクターを、それぞれルシフェラーゼ安定発現癌細胞株に遺伝子導入し、ルシフェラーゼとSphK2 shRNAまたはコントロールshRNAのダブル安定発現癌細胞株のクローニングを行った。SphK2の発現抑制の確認は、抗SphK2抗体によるウエスタンブロット法および外来SphK2-GFPの発現抑制効果の2通りの方法で行った。結果、マウス乳がん細胞株である4T1細胞およびヒトメラノーマ細胞株であるMeWo細胞においてルシフェラーゼを発現し、かつSphK2の発現が有意に抑制されたダブル安定発現株を得た。

平成28年度は、「課題2」の「S1Pシグナリングによるエクソソームソーティング機構の癌転移における重要性の解明」を中心に研究を進めた。具体的には、平成27年度に作製したマウス乳がん細胞株である4T1細胞のルシフェラーゼ-SphK2 shRNAダブル安定発現株を用いて、生体イメージング蛍光観察装置によるマウスにおける肺への癌転移実験を行い、SphK2ノックダウンの効果を検討することで、癌転移関連物質のS1Pシグナリングによるエクソソームソーティング機構と癌転移との関連を*in vivo*のレベルで明らかにすることを試みた。これまでに4T1細胞のルシフェラーゼ-SphK2 shRNAダブル安定発現株およびコントロール細胞株をマウス(C57BL/6J)に尾静脈注射し、一定期間飼育後ルシフェリンを尾静脈注射し、生体イメージング蛍光観察装置を用いてルシフェリンの赤色蛍光を検出する実験系の確立を進めており、目的の達成に向けて現在も継続中である。また、癌転移関連物質のS1Pシグナリングによるエクソソームソーティング機構と癌転移との関連を検討する過程で、エクソソームの積荷物質である α -シヌクレインがS1Pシグナリングに対して抑制的な制御を担うことを明らかにした(Scientific Reports 6:37810 (2016), Scientific Reports 7:44248 (2017))。

今後は癌転移関連物質のS1Pシグナリングによるエクソソームソーティング機構と癌転移との関連を、動物を用いた*in vivo*のレベルおよび臨床のレベルで明らかにし、本研究の成果を発展させ最終目標であるS1Pシグナリングをターゲットとした癌転移抑制剤のリード化合物の開発を目指して研究を進めて行く予定である。

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3件)

- (1) Hirai, C., Badawy, SM., Zhang, L., Okada, T., Kajimoto, T., Nakamura, S. Phospholipase D is Dispensable for Epidermal Growth Factor-Induced Chemotaxis. Kobe Journal of Medical Sciences 9;62(6):E162-E167 (2017) 査読有
- (2) Zhang, L., Okada, T., Badawy, SM., Hirai, C., Kajimoto, T., Nakamura, S. Extracellular α -synuclein induces sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1 uncoupled from inhibitory G-protein leaving β -arrestin signal intact. Scientific Reports 7:44248, doi:10.1038/srep44248 (2017) 査読有

- (3) Okada, T., Hirai, C., Badawy, SM., Zhang, L., Kajimoto, T., Nakamura, S. Impairment of PDGF-induced chemotaxis by extracellular α -synuclein through selective inhibition of Rac1 activation. Scientific Reports 6:37810, doi:10.1038/srep37810 (2016)
査読有

[学会発表] (計3件)

- (1) 梶本 武利、岡田 太郎、宮 聡志、張麗芳、中村 俊一
Sphingosine 1-phosphate signaling triggers exosomal protein sorting
神戸大学・ワシントン大学国際合同シンポジウム
2014年12月15日～2014年12月16日
神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- (2) 梶本 武利、中村 俊一
Role of S1P signaling on cargo loading for exosome maturation
神戸大学・ワシントン大学細胞シグナリング合同シンポジウム
2015年9月10日～2015年9月11日
ワシントン大学 (シアトル、アメリカ合衆国)
- (3) 梶本 武利、岡田 太郎、宮 聡志、張麗芳、中村 俊一
Sphingosine 1-phosphate signaling on multivesicular endosome triggers sorting of protein cargo into exosomes
2015年 アメリカ細胞生物学会年会
2015年12月12日～2015年12月16日
サンディエゴコンベンションセンター (サンディエゴ、アメリカ合衆国)

[図書] (計1件)

- (1) 梶本 武利、岡田 太郎、中村 俊一
「エキソソームの形成機構」
細胞工学 168-173
秀潤社 (2015)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/biochemistry/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
梶本 武利 (KAJIMOTO, Taketoshi)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00509953

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()