

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24590129
研究課題名(和文) リゾホスファチジン酸受容体のシグナル異常とがん

研究課題名(英文) Abnormal LPA receptor signaling in cancer

研究代表者

福嶋 伸之 (FUKUSHIMA, Nobuyuki)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：10254161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：リゾホスファチジン酸(LPA)は多様な生理活性を示す脂質メディエーターであり、その作用はLPA受容体(LPA1～LPA6)を介して生じる。これまでLPAシグナルががん発生・増殖・進展に関与していることが示唆されており、がん治療の新規標的と考えられている。本研究では、がん組織で発現しているLPA1変異体が異常な細胞内分布を示すこと、その情報伝達も破綻していることを見いだした。また、卵巣がん細胞におけるLPAの作用を検討したところ、LPAシグナルの結果と思われていたがん細胞に対する作用の一部が、その構成成分である脂肪酸に由来するという、新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Lysophosphatidic acid (LPA) is a lysolipid mediator that exerts various physiological actions. The effects of LPA are mediated through at least six types of LPA receptors, including LPA1-LPA6. Involvement of LPA receptor-mediated signaling in cancer growth has been so far suggested. The present study demonstrated that LPA receptor mutants observed in cancer tissues showed abnormal cellular distribution and intracellular signaling. Further analysis for LPA signaling in a certain type of ovarian cancer cell line revealed that the effects of LPA signaling were partly attributed to a fatty acid liberated from LPA.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リゾホスファチジン酸 がん 変異体 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

リゾホスファチジン酸 (LPA) は多様な生理活性を示す脂質メディエーターであり、その作用は G タンパク質共役型受容体である LPA 受容体 (LPA₁~LPA₆) を介して生じる。これまで LPA シグナルががん発生・増殖・進展に関与していることが示唆されており、特に卵巣がんにおける LPA シグナルの役割が注目されてきた。種々の検討より、LPA シグナル経路はがん治療の新規標的と考えられている。しかしながら、LPA シグナルのどのような変動ががんを引き起こすのか、がん悪性を誘発するのかなど不明な点が多い。研究開始当初、われわれはラット肺がんおよび肝臓がんにおいて LPA₁ の 7 番め膜貫通ドメイン内に位置するコドン 295、308、310、311 のいずれかにアミノ酸変異が高頻度に生じていることを見だしていた。これらの LPA₁ 変異体は野生型とは異なる情報伝達を示す可能性が考えられ、その全容解明には未だ至っていなかった。さらに、LPA₁ の C 末端に存在する PDZ 結合ドメイン (SerValVal) を欠損させた人工変異体 LPA₁ が恒常的活性化型となり、がん原性を獲得することも報告したが、LPA₁ と相互作用する PDZ タンパク質の分子実体ならびにメカニズムも明らかではなかった。これらに加えて、LPA の卵巣がん細胞の生存に対する作用の詳細も不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、4 種類の LPA₁ 変異体について、代表的な LPA₁ の情報伝達および細胞応答を調べそれぞれのプロフィールを明らかにすること、LPA₁ C 末端と相互作用する PDZ タンパク質の同定と新規情報伝達経路の解明することを目的として実験を行った。また、LPA の細胞生存作用を検討

した。

3. 研究の方法

LPA₁ 変異体発現細胞株の樹立

変異体作成キットを用いて各 LPA₁ 変異体 (F295S、P308S、I310T、Y311T) 遺伝子を含むレトロウイルス用プラスミドを作成した。これをウイルス産生細胞に導入し、産生されたウイルスをラット神経系細胞 B103 あるいはラットヘパトーマ RH7777 に感染させた。プラスミドに含まれる GFP 遺伝子に由来する GFP の発現を指標として単一の細胞からなるコロニーを増殖させ、クローン細胞として樹立した。また、非クローン細胞の集団は感染後、そのまま使用した。

cAMP 測定

48 穴プレートに LPA 受容体発現 RH7777 細胞を播種した。翌日、無血清培地に交換しさらに 1 日培養した。細胞を LPA 存在下あるいは非存在下でフォルスコリンで刺激し、20 分後に細胞抽出液を作成した。cAMP 量は cAMP-Glo アッセイキットを用いて測定した。

Ca 動員測定

ポリリジンコートした底面透過型 24 穴プレートに LPA 受容体発現 RH7777 細胞を播種した。翌日、無血清培地に交換しさらに 1 日培養した。Fura2-AM を 1 時間負荷し、LPA 添加 5 分前から Power Scan H1 を用いて蛍光強度の変化を測定した。

細胞骨格変化の評価

ポリリジンコートした 24 穴プレートに LPA 受容体発現 B103 細胞を播種した。翌日、無血清培地に交換しさらに 1 日培養した。LPA を 15 分間添加して細胞を固定し、神経突起が退縮した細胞の全細胞に

対する割合を求めた。非クローン細胞集団を用いた場合は、免疫染色により発現細胞を同定した。

免疫蛍光染色

受容体発現細胞の同定には、抗 DYKDDDDK 抗体を用いた。続いてビオチン標識抗マウス IgG 抗体、Alexa546-ストレプトアビジンと反応させた。小胞体マーカー KDEL との二重染色では、引き続き抗 KDEL 抗体、Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体と反応させた。

LPA₁C 末端と相互作用する分子の精製

LPA₁ 発現 B103 細胞および LPA₁ 発現 B103 細胞から抽出液を調製し、抗 DYKDDDDK 抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行った。それぞれの細胞抽出液から得られた結合画分を電気泳動し、銀染色を行った。LPA₁ 発現細胞において特異的に見られるバンドのタンパク質解析を行った。

細胞数測定

卵巣がん HNOA 細胞を 48 ウェルプレートに蒔き、翌日無血清培地に交換した。さらに 1 日後、LPA あるいは脂質を添加し培養を続けた。細胞数の測定には細胞数測定試薬 SF を用いた。

LPA 分解活性の測定

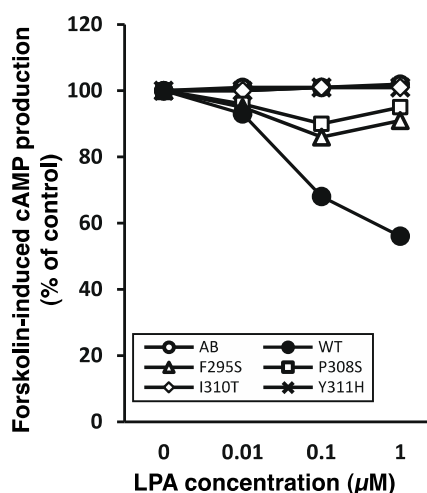
卵巣がん HNOA 細胞に [³H]-LPA を添加し、1 時間後に培養上清を回収した。Bligh & Dyer 方により脂質成分を抽出し、TLC により脂肪酸画分の放射活性を測定した。

4. 研究成果

LPA₁ 変異体の機能解析

LPA₁ 変異体の細胞内情報伝達を調べた。野生型 LPA₁ 発現 RH7777 細胞において、LPA は

フォルスコリンによる cAMP 産生を最大 50% 程度まで抑制し、その EC₅₀ は約 60nM であった (図)。これに対して F295S、P308S 発現細胞では LPA による cAMP 産生の抑制は 10% 程度であり EC₅₀ 値はいずれも約 30nM であった。一方で I310T ならびに Y311H は LPA 刺激による cAMP 産生抑制は示さなかった。これらのことから、F295S および P308S は G_i の活性化能力が低下し、I310T と Y311H では G_i の活性化能力が失われている可能性が考えられた。



続いて、細胞内 Ca 動員作用を調べた。野生型 LPA₁ では 100nM の LPA により顕著な Ca 動員作用が認められたが、いずれの変異体も野生型と比較して非常に弱い Ca 動員作用しか認められなかった。最後に、B103 細胞の突起退縮反応を指標に G_{12/13} 活性化作用を調べた。野生型 LPA₁ は LPA 濃度に依存した突起退縮作用を示し、EC₅₀ 値は約 30nM であった。F295S、P308S 発現細胞も野生型よりも弱いながらも突起退縮を示し、EC₅₀ 値はそれぞれ 50 および 300nM であった。一方、I310T 発現細胞では野生型と同等の活性化が認められたが、特に低濃度の LPA に反応性を示し、EC₅₀ 値も約 10nM であった。これらのことから、LPA₁ 変異体と G タンパク質との関連に異常が生じていると考えられる。しかしながら、各変異体を発現させた細胞において、LPA₁ 変異体は無刺激の条件下で

は細胞全体に均一に分布しており、LPA 刺激により細胞内への取り込みが行われた。このことは、各 LPA₁ 変異体は LPA 刺激に対して反応性を維持していること、細胞内への取込みには G タンパク質を必要としない可能性が示唆している。

野生型 LPA₁ および F295S は細胞全体に分布していた。LPA₁ と小胞体タンパク質の二重染色を行ったところ、小胞体は細胞辺縁部分にはみられなかった。一方、P308S、I310T、Y311T の細胞内分布は野生型 LPA₁ と異なり、細胞辺縁部分における分布が認められず、小胞体の分布とよく一致していた。これらのことから、P308S、I310T、Y311T は細胞膜への移行や発現に異常が生じていることが示された。

LPA₁C 末端結合分子の同定

LPA₁C 末端結合分子を精製し、アミノ酸分析を行ったところ、14-3-3 であることが分かった。しかしながら、免疫沈降により 14-3-3 が LPA₁ と結合しているかどうかを調べたが、LPA₁C 末端欠損体においても結合が見られたことから、LPA₁C 末端との特異的結合とは考えられなかった。むしろ、電気泳動において C 末端欠損体と結合する分子が複数認められた。このことは、LPA₁C 末端欠損体とこれらの分子との相互作用が細胞の恒常的活性化に関わっている可能性を示唆している。

LPA から切断された脂肪酸の細胞生存作用 HNOA 卵巣がん細胞を無血清下で培養すると細胞死が生じる。この条件下で LPA を添加すると細胞死抑制作用が認められた。LPA シグナルによる細胞死抑制メカニズムを検討する一環として種々の脂肪酸を構成成分とする LPA を用いたところ、オレイン酸含有 LPA のみならず、中鎖脂肪酸を持つ LPA も同等の作用を示した。オレイン酸含有リ

ゾホスファチジルコリン (LPC) やリゾホスファチジルセリンも同様の細胞死抑制作用を示したが、パルミチン酸含有 LPA や LPC は無効であった。リゾリン脂質の構成成分である脂肪酸が作用を引き起こす可能性を検討するため、^{[3]H}-LPA を細胞に添加し、^{[3]H}-オレイン酸が産生されるかどうかを調べた。予想通り、細胞外において LPA を分解するリパーゼ活性の存在が認められた。続いて、脂肪酸が細胞死抑制作用を示すかどうかを検討したところ、オレイン酸や中鎖脂肪酸に LPA と同程度の細胞死抑制作用が観察された。これらのことから、LPA から産生された脂肪酸が細胞機能に影響を及ぼすという、新たな LPA シグナルの役割が示された。

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4件)

1. Tsujiuchi T, Araki M, Hirane M, Dong Y, Fukushima N. Lysophosphatidic acid receptors in cancer pathobiology. *Histol Histopathol*. 査読有 2014 29, 313-21. http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_29/29_3/29_3_313.htm
2. Tsujiuchi T, Hirane M, Dong Y, Fukushima N. Diverse effects of LPA receptors on cell motile activities of cancer cells. *J Recept Signal Transduct Res*. 査読有 2014 34, 149-53. doi: 10.3109/10799893.2013.876042.
3. Kuwata S, Ohkubo K, Kumamoto S, Yamaguchi N, Izuka N, Murota K, Tsujiuchi T, Iwamori M, Fukushima N.

Extracellular lipid metabolism influences the survival of ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 2013 439, 280-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.041.

4. Kitayoshi M, Kato K, Tanabe E, Yoshikawa K, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T. Enhancement of endothelial cell migration by constitutively active LPA(1)-expressing tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 2012 422, 339-43. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.012.

[学会発表](計6件)

1. 福嶋伸之、田中亚以子、辻内俊文、岩森正男 多価不飽和脂肪酸は活性酸素産生と MAP キナーゼ経路活性化を介して卵巣がん細胞死を引き起こす日本生化学会 第 87 回大会、京都府・京都市 2014.10.18
2. 福嶋伸之 脂肪酸によるがん細胞成長の調節 日本脂質生化学会、第 56 回、大阪府・東大阪市 2014.6.7
3. 石井章一、辻内俊文、福嶋伸之 LPA1 の変異は小胞体への蓄積と情報伝達の異常を生じる日本生化学会 第 86 回大会、神奈川県・横浜市 2013.9.11
4. 福嶋伸之、辻内俊文、岩森正男 脂肪酸による卵巣がん細胞 HNOA の細胞死抑制機構日本生化学会 第 86 回大会、神奈川県・横浜市 2013.9.11
5. 石井 章一、辻内 俊文、福嶋 伸之 ラットがん組織から見出された LPA1 変異

体の機能解析日本生化学会 第 85 回大会、福岡県・福岡市 2012.12.16

6. 福嶋 伸之、大久保 慶、桑田 聖平、辻内 俊文、岩森 正男 卵巣がん細胞の生存および増殖に対する種々の脂肪酸の作用日本生化学会 第 85 回大会、福岡県・福岡市 2012.12.16

[図書](計1件)

1. Fukushima N. Neural effects of LPA signaling. *Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biochemistry.* Jerold Chun, Timothy Hla, Sarah Spiegel, Wouter Moolenaar (Eds.) 2013 ISBN-10: 0470569050, Wiley 総ページ数 793 18 章 399-418

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.life.kindai.ac.jp/~nfukushima/Welcome.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

福嶋 伸之 (FUKUSHIMA Nobuyuki)
近畿大学・理工学部・准教授
研究者番号: 10254161

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

辻内 俊文 (TSUJIUCHI Toshifumi)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号：10254492