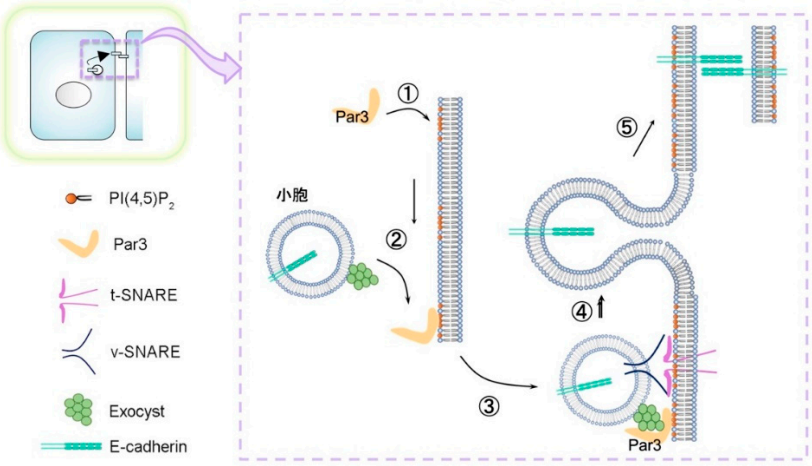
35　細胞膜脂質を標的とした上皮間葉転換関連疾患の抑制	中村　由和

【目的】上皮間葉転換は、上皮細胞が固有の特徴（上皮細胞特性）を失い、間葉細胞の性質を示す現象である。上皮間葉転換は、上皮細胞から発生した癌細胞が、運動性の高い間葉細胞の表現型を獲得し、浸潤・転移することに寄与する。また、臓器管腔の内面を覆う上皮細胞が上皮間葉転換により筋線維芽細胞へ変化し、過剰な細胞外基質を産生することや、上皮間葉転換を起こした細胞が組織常在性の線維芽細胞を活性化することは臓器の線維化につながる。以上のように上皮間葉転換は浸潤癌や臓器線維症の発症や悪化に関わるため、上皮間葉転換の分子機序を理解し、その制御を行うことは、浸潤癌や臓器線維症に対する治療戦略の開発に繋がる重要な課題である。これまでに、上皮間葉転換の制御におけるタンパク質の役割については多くの知見が蓄積されている。一方で、上皮間葉転換の制御において細胞膜脂質の果たす役割についての知見は乏しい。我々は、細胞膜脂質であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸（$PI(4,5)P_2$）が上皮細胞特性や上皮間葉転換を制御することを示唆する知見を得ていた。そこで、$PI(4,5)P_2$が上皮細胞特性を制御する機構を解明するとともに、$PI(4,5)P_2$やその下流シグナル、$PI(4,5)P_2$分解酵素を標的とした上皮間葉転換阻害の可能性を探り、上皮間葉転換関連疾患の抑制へと繋がる基盤的知見を得ることを本研究の目的とした。

【方法】上皮細胞内において $PI(4,5)P_2$に近接するタンパク質の網羅的な探索を、$PI(4,5)P_2$に特異的に結合する PLC δ 1 の PH ドメインと近接依存性ビオチン標識法を用いて実施した。また、$PI(4,5)P_2$の 5 位のリン酸基を脱リン酸化するホスファターゼである INPP5E の酵素活性ドメインに形質膜標的化 Lyn ミリストイル化配列と GFP を付加したもの（Lyn-INPP5E-GFP）をヒト表皮細胞株に安定発現させることにより形質膜の $PI(4,5)P_2$を減少させ、免疫蛍光染色による PARD3 の検出を行った。さらに、ヒト骨肉腫細胞株に GFP と融合させた $PI(4,5)P_2$合成酵素 PIP5K を安定発現させることにより形質膜の $PI(4,5)P_2$を増加させ PARD3 の検出を行った。PARD3 の exocyst 結合領域を形質膜に安定的に発現するヒト表皮細胞株を作製し、その細胞に Lyn-INPP5E-GFP を発現させ、免疫蛍光染色による細胞間接着タンパク質の検出も行った。

【結果】$PI(4,5)P_2$が上皮特性を調節するメカニズムを明らかにするために、上皮細胞内において $PI(4,5)P_2$に近接するタンパク質の網羅的な探索を実施したところ、上皮細胞の特徴である細胞間接着に関連するタンパク質が多く同定されてきた。またエキソサイトーシス制御に関わるタンパク質も得られてきた。$PI(4,5)P_2$による上皮細胞特性制御機構を解明するにあたり、$PI(4,5)P_2$結合タンパク質である PARD3 に着目し解析を行ったところ、$PI(4,5)P_2$は形質膜の PARD3 の量を制御することが強く示唆された。また、PARD3 の exocyst 結合領域を形質膜に発現させることにより、$PI(4,5)P_2$の減少による上皮細胞特性の喪失を抑制できることが示唆された。

$PI(4,5)P_2$による上皮細胞特性制御機構の仮説モデル



35. 細胞膜脂質を標的とした上皮間葉転換関連疾患の抑制

中村　由和

*東京理科大学 理工学部 応用生物科学科

Key words：上皮細胞，ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸

緒　言

上皮間葉転換は、上皮細胞が固有の特徴（上皮細胞特性）を失い、間葉細胞の性質を示す現象である。上皮間葉転換は、上皮細胞から発生した癌細胞が、運動性の高い間葉細胞の表現型を獲得し、浸潤・転移することに寄与する。また、臓器管腔の内面を覆う上皮細胞が上皮間葉転換により筋線維芽細胞へ変化し、過剰な細胞外基質を産生することや、上皮間葉転換を起こした細胞が組織常在性の線維芽細胞を活性化することは臓器の線維化につながる。以上のように上皮間葉転換は浸潤癌や臓器線維症の発症や悪化に関わるため、上皮間葉転換の分子機序を理解し、その制御を行うことは、浸潤癌や臓器線維症に対する治療戦略の開発に繋がる重要な課題である。これまでに、上皮間葉転換の制御におけるタンパク質の役割については多くの知見が蓄積されている。一方で、上皮間葉転換の制御において細胞膜脂質の果たす役割についての知見は乏しい。

我々は、細胞膜脂質であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸（$PI(4,5)P_2$）を分解する酵素ホスホリパーゼ C（PLC）の多様な生理機能を解明してきた［1〜4］。そのなかで、上皮細胞では、間葉細胞と比較して、PLC の基質である $PI(4,5)P_2$が多く存在しており、上皮細胞において $PI(4,5)P_2$を減少させた際には上皮間葉転換様の表現型が観察されることを発見した。さらに、間葉細胞である骨肉腫細胞で $PI(4,5)P_2$を増加させた際には、上皮細胞特性が獲得されるという結果も得ている。我々の得たこれらの結果は、$PI(4,5)P_2$が上皮細胞特性や上皮間葉転換を制御するという従来には無い知見であった［5］。以上のようなこれまでに得られてきた知見より、$PI(4,5)P_2$や $PI(4,5)P_2$分解酵素が上皮間葉転換関連疾患の発症や悪化に関わる可能性は高いと考えられる。そこで、$PI(4,5)P_2$が上皮性を制御する機構を解明するとともに、$PI(4,5)P_2$やその下流シグナル、$PI(4,5)P_2$分解酵素を標的とした上皮間葉転換阻害の可能性を探り、上皮間葉転換関連疾患の抑制へと繋がる基盤的知見を得ることを本研究の目的とした。

方法および結果

1. $PI(4,5)P_2$近傍タンパク質の探索

$PI(4,5)P_2$が上皮細胞特性を調節するメカニズムを明らかにするために、上皮細胞内において $PI(4,5)P_2$に近接するタンパク質の網羅的な探索を実施した。$PI(4,5)P_2$に特異的に結合する PLCδ1 のプレクストリン相同（PH）ドメインに V5 タグと大豆由来の改変型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APEX2）を融合させた遺伝子を安定発現するヒト表皮角化細胞株を確立した。この細胞を過酸化水素とビオチンフェノールで処理し、APEX2 に近接するタンパク質、つまり $PI(4,5)P_2$に特異的に結合する PLCδ1 の PH ドメインに近接するタンパク質をビオチン化し、ビオチン化されたタンパク質をストレプトアビジンビーズにより精製した。これをアミノ酸による安定同位体標識法と組み合わせることで、99 種類のタンパク質を $PI(4,5)P_2$に近傍タンパク質として同定した。同定したタンパク質には、MARCKS、ezrin、cortactin、IQGAP1 などの $PI(4,5)P_2$に結合することが既に報告されているタンパク質が含まれており、今回の方法により $PI(4,5)P_2$の近傍に存在するタンパク質が得られていることが強く示唆された。得られた $PI(4,5)P_2$の近傍タンパク質には、上皮細胞の特徴である細胞間接着に関連

*現在の所属：東京理科大学 創域理工学部 生命生物科学科

するタンパク質が多く存在することが明らかになった。また、エキソサイトーシス制御に関わるタンパク質群も$PI(4,5)P_2$の近傍タンパク質として得られてきた。

2. $PI(4,5)P_2$は形質膜の PARD3 存在量を制御する

$PI(4,5)P_2$による上皮細胞特性制御機構を解明するにあたり、$PI(4,5)P_2$結合タンパク質である PARD3 に着目した。PARD3 の発現抑制時には$PI(4,5)P_2$を減少させた際と同様に、上皮細胞特性制御において中心的な役割を果たすタンパク質である E-cadheirn の形質膜局在が抑制されることが報告されていたため、$PI(4,5)P_2$が PARD3 を介して上皮細胞特性を制御する可能性を考えた。そこで、形質膜の$PI(4,5)P_2$を減少させた際に、PARD3 の局在がどのように変化するのかを検討した。$PI(4,5)P_2$の 5 位のリン酸基を脱リン酸化するホスファターゼである INPP5E の酵素活性ドメインに形質膜標的化 Lyn ミリストイル化配列と GFP を付加したもの（Lyn-INPP5E-GFP）をヒト表皮細胞株に安定発現させることにより形質膜の$PI(4,5)P_2$を減少させ、この細胞において PARD3 の検出を行ったところ、形質膜の PARD3 が減少することが明らかになった（図 1a）。また、形質膜の$PI(4,5)P_2$量が少ないヒト骨肉腫細胞株に GFP と融合させた$PI(4,5)P_2$合成酵素 PIP5K（PIP5K-GFP）を安定発現させることにより形質膜の$PI(4,5)P_2$を増加させたところ、形質膜に PARD3 のシグナルが検出された（図 1b）。以上の結果より、$PI(4,5)P_2$は形質膜の PARD3 の量を制御することが強く示唆された。

上皮性細胞間接着タンパク質である E-cadherin の形質膜への輸送において、輸送小胞上に存在する exocyst 複合体は重要な役割を果たしており、形質膜に存在する PARD3 は exocyst 複合体に対する形質膜上の受容体として働くことが報告されている。これらのことから、$PI(4,5)P_2$は形質膜の PARD3 を増加させることで E-cadherin の形質膜への輸送を促している可能性を考えた。そこで、PARD3 の exocyst 結合領域に V5 タグと形質膜標的化 Lyn ミリストイル化配列を付加した遺伝子（Lyn-hPar3-V5）を安定的に発現するヒト表皮細胞株を作製し、その細胞に Lyn-INPP5E-GFP を発現させ、形質膜の$PI(4,5)P_2$を減少させた。その結果、Lyn-hPar3-V5 を発現するヒト表皮細胞株においては、Lyn-INPP5E-GFP を発現させた際にも、細胞間接着タンパク質の形質膜局在や、上皮様のコンパクトな形態が維持されることが明らかになった（図 2）。PARD3 の exocyst 結合領域を形質膜に発現させることにより、$PI(4,5)P_2$の減少による上皮細胞特性の喪失を抑制できることが示唆されたことから、上皮細胞特性の維持には、PARD3 の exocyst 複合体に対する形質膜上の受容体としての働きが重要であると考えられた。

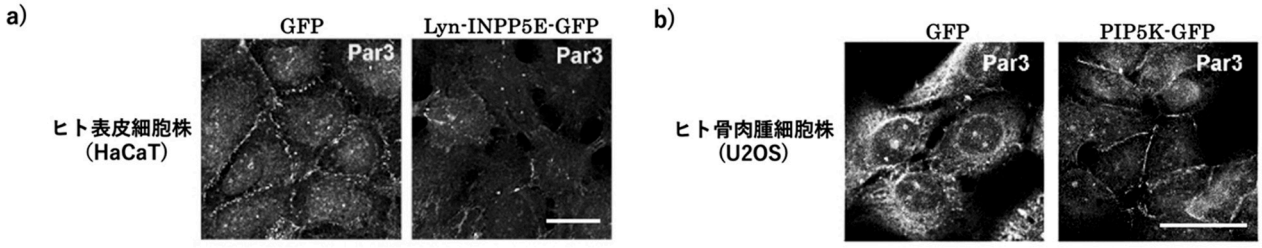


図 1. $PI(4,5)P_2$は形質膜の PARD3 の量を制御する

a）$PI(4,5)P_2$の 5 位のリン酸基を脱リン酸化するホスファターゼである INPP5E の酵素活性ドメインに形質膜標的化 Lyn ミリストイル化配列と GFP を付加したもの（Lyn-INPP5E-GFP）をヒト表皮細胞株に安定発現させ形質膜の$PI(4,5)P_2$を減少させた HaCaT 細胞における PARD3（Par3）の免疫蛍光染色。GFP のみを発現させた細胞をコントロールとして用いた。Scale bar＝20 μ m。

b）GFP と融合させた$PI(4,5)P_2$合成酵素 PIP5K（PIP5K-GFP）を安定発現させることにより形質膜の$PI(4,5)P_2$を増加させた U2OS 細胞における PARD3（Par3）の免疫蛍光染色。GFP のみを発現させた細胞をコントロールとして用いた。Scale bar＝20 μ m。

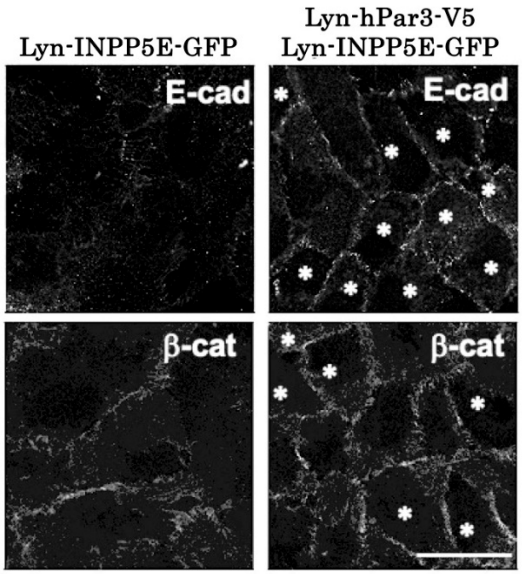


図 2. PARD3 の exocyst 結合領域を形質膜に発現させた際には $PI(4,5)P_2$ の減少による上皮細胞特性の喪失が抑制される

$PI(4,5)P_2$ の 5 位のリン酸基を脱リン酸化するホスファターゼである INPP5E の酵素活性ドメインに形質膜標的化 Lyn ミリストイル化配列と GFP を付加したもの（Lyn-INPP5E-GFP）及び、形質膜標的化 PARD3 exocyst 結合部位(Lyn-hPar3-V5)を発現させた HaCaT 細胞における E-cadherin（E-cad）、β-catenin（β-cat）の免疫蛍光染色。アスタリスクは Lyn-INPP5E-GFP 発現細胞を示す。 Scale bar＝20μm。

3. $PI(4,5)P_2$ 分解酵素の発現抑制は上皮間葉転換誘導に対して部分的な抵抗性を付与する

上皮間葉転換誘導時に、$PI(4,5)P_2$ 合成酵素 PIP5K を形質膜に発現させ $PI(4,5)P_2$ を増加させたヒト表皮角化細胞株は、上皮間葉転換誘導に対して部分的な抵抗性を示すことが明らかになっていた。そこで、$PI(4,5)P_2$ 分解酵素の発現抑制によっても $PI(4,5)P_2$ の増加や、上皮間葉転換誘導に対する抵抗性が見られるかを検討することとした。$PI(4,5)P_2$ 分解酵素である PLC のうち、表皮角化細胞に特に多く発現している PLC アイソザイムである PLCδ1 に着目し、PLCδ1 の発現抑制が形質膜の $PI(4,5)P_2$ の量や上皮間葉転換誘導に対する感受性に与える影響を調べたところ、PLCδ1 を発現抑制したヒト表皮角化細胞株では形質膜の $PI(4,5)P_2$ の量が増加し、上皮間葉転換誘導時においても上皮細胞特有のコンパクトな形態が維持されることが明らかになった。

考　察

本研究において、$PI(4,5)P_2$ が形質膜の PARD3 量を調節することで上皮細胞特性を制御していることが強く示唆された。Exocyst 複合体による輸送小胞の形質膜への融合は、$PI(4,5)P_2$ が豊富に存在する形質膜領域で起きることが知られている。また、本研究で同定した $PI(4,5)P_2$ 近傍タンパク質にはエキソサイトーシス過程にも関与する SNARE タンパク質群が含まれていた。これらのことから、$PI(4,5)P_2$ は PARD3 との相互作用することにより、PARD3 を形質膜へリクルートし、その後、PARD3 が E-cadherin などの細胞間接着タンパク質を含有する輸送小胞上の exocyst 複合体に対する形質膜上の受容体として働き、細胞間接着タンパク質の形質膜への輸送が促進され、上皮細胞特性の維持または獲得が行われる可能性が考えられる。

本研究で PLCδ1 の発現抑制により上皮間葉転換誘導に伴う上皮細胞特性の喪失を部分的に抑制できることが示唆された。そのため、PLCδ1 の酵素活性や発現を阻害する化合物は上皮間葉転換を阻害できる可能性も考え

られ、今後、そのような化合物の探索を進めることを計画している。本研究で行った PLC δ 1 の発現抑制は $PI(4,5)P_2$の量を増加させると同時に、PLC δ 1 による $PI(4,5)P_2$代謝の結果として生じるセカンドメッセンジャーであるイノシトール 1,4,5-三リン酸やジアシルグリセロールの量を減少させる可能性も考えられる。そのため、PLC δ 1 の発現抑制による上皮細胞特性喪失の部分的な抑制が $PI(4,5)P_2$量の増加によるものなのか、セカンドメッセンジャーの減少によるものなのかは、今後、慎重に検討することが必要である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京理科大学創域理工学部生命生物科学科の金丸佳織助教、東京薬科大学生命科学部の深見希代子名誉教授である。

文　献

1） Nakamura Y, Fukami K, Yu H, Takenaka K, Kataoka Y, Shirakata Y, Nishikawa S, Hashimoto K, Yoshida N, Takenawa T. Phospholipase Cdelta1 is required for skin stem cell lineage commitment. EMBO J. 2003 Jun 16;22(12):2981-91. PMID: 12805213 DOI: 10.1093/emboj/cdg302

2） Kanemaru K, Nakamura Y, Sato K, Kojima R, Takahashi S, Yamaguchi M, Ichinohe M, Kiyonari H, Shioi G, Kabashima K, Nakahigashi K, Asagiri M, Jamora C, Yamaguchi H, Fukami K. Epidermal phospholipase Cδ1 regulates granulocyte counts and systemic interleukin-17 levels in mice. Nat Commun. 2012 Jul 17;3:963. PMID: 22805570 DOI: 10.1038/ncomms1960

3） Nakamura Y, Kanemaru K, Kojima R, Hashimoto Y, Marunouchi T, Oka N, Ogura T, Tanonaka K, Fukami K. Simultaneous loss of phospholipase Cδ1 and phospholipase Cδ3 causes cardiomyocyte apoptosis and cardiomyopathy. Cell Death Dis. 2014 May 8;5(5):e1215. PMID: 24810051 DOI: 10.1038/cddis.2014.181

4） Kanemaru K, Nakamura Y, Totoki K, Fukuyama T, Shoji M, Kaneko H, Shiratori K, Yoneda A, Inoue T, Iwakura Y, Kabashima K, Fukami K. Phospholipase Cδ1 regulates p38 MAPK activity and skin barrier integrity. Cell Death Differ. 2017 Jun;24(6):1079-1090. PMID: 28430185 DOI: 10.1038/cdd.2017.56cell.2006.07.024

5） Kanemaru K, Shimozawa M, Kitamata M, Furuishi R, Kayano H, Sukawa Y, Chiba Y, Fukuyama T, Hasegawa J, Nakanishi H, Kishimoto T, Tsujita K, Tanaka K, Itoh T, Sasaki J, Sasaki T, Fukami K, Nakamura Y. Plasma membrane phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate is critical for determination of epithelial characteristics. Nat Commun. 2022 May 9;13(1):2347. PMID: 35534464 DOI: 10.1038/s41467-022-30061-9