

令和元年6月10日現在

機関番号：35408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K16224

研究課題名(和文)大腸癌進展を負に制御するコレステロール酸化代謝物のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of oxysterols regulating the fate of colorectal cancer cells

研究代表者

田中 亜路 (Tanaka, Arou)

安田女子大学・薬学部・講師

研究者番号：60509040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：25-ヒドロキシコレステロール(25-HC)のもつさまざまな生理活性のうち大腸がん足場非依存的細胞死をもたらす現象について研究をおこなった。阻害剤化合物ライブラリによる探索の結果、ポリアミン類合成阻害剤のDFMOとAPCHAが、25-HCによる大腸がんスフェロイド(がん細胞の3次元培養体)への細胞死誘導を阻害することを見出した。また、コレステロール合成のキー遺伝子のSREBP2がポリアミン合成阻害剤により活性化することで、25-HCの作用を阻害していることをあきらかにした。この結果は、大腸がんにおけるポリアミン代謝とコレステロール代謝の新たな結びつきを示唆する。現在、論文投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんは、食生活によって発症に大きく差のあるタイプのがんである。研究対象とした25-HCは、食品中にも糞便中にもふくまれるありふれたコレステロールの代謝産物であるが、抗大腸がん活性を実験室内で示す。今回、25-HCと同様に食品中におおく含まれるポリアミンについて、大腸がん細胞内での代謝が変動することで、25-HCの抗大腸がん活性を損なうことが判明した。コレステロール代謝とポリアミン代謝が、大腸がん細胞の中で深く関与していることが示されたのは、これが世界で初めての成果である。この成果は、大腸がんがなぜ食生活によって発症率が変化するかを説明するてがかりになるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：The oxysterol 25-hydroxycholesterol (25-HC) has diverse physiological activities, including the ability to inhibit anchorage-independent growth of colorectal cancer cells. We found that a polyamine synthesis inhibitor, DFMO, and the spermine synthesis inhibitor APCHA, prevented 25-HC-induced anoikis of colorectal cancer cells. Chemical or genetical inhibition of maturation of SREBP2, a critical regulator of cholesterol synthesis, reversed the effects of APCHA. Furthermore, APCHA induced SREBP2 maturation and upregulated its transcriptional activity, indicating that altered polyamine metabolism can increase SREBP2 activity and block 25-HC-induced apoptosis in spheroids. These results suggest that crosstalk between polyamine metabolism and cholesterol synthetic pathways via SREBP2 governs the proliferation and malignant progression of colorectal cancer cells.

研究分野：脂質代謝

キーワード：コレステロール 25-ヒドロキシコレステロール ポリアミン 大腸がん スフェロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

申請者は2013年に“p38MAPK and ROCK1 are involved in anoikis induced by anicequol or 25-hydroxycholesterol in DLD1 cells.”という論文をBBRC誌に発表した。上皮系の細胞は生存・増殖のために「足場」を必要とし、足場が失われた場合にはアポトーシスをおこす。一方、ほとんどのがん細胞ではアポトーシスを起こすことなく増殖する能力を獲得しており、この能力ががんの転移や悪性度と大きく関係している。25-HCは足場非依存性増殖をおこなう大腸がん細胞(DLD-1, HT-29)にアポトーシスを誘導する能力があることを、申請者はこの論文で発表していた。

申請者は、本研究において25-HCの標的タンパク質を同定することを本研究の主要な目的とし、その後の展開として、同定したタンパク質を足掛かりに「癌細胞の足場非依存的増殖」メカニズムの解明に向かいたいと考えていた。主要な目的である25-HCの標的タンパク質の同定については、7,25-dihydroxycholesterol ビオチンリンカー化合物を用いて行う予定であった。申請者は、大腸癌細胞株DLD-1の強制浮遊培養系を用いたスクリーニング系を確立しており、それを利用して7,25-dihydroxycholesterolもDLD-1細胞にアノイキスを誘導することを明らかにしていた(未発表)。これにより、7位の水酸基を基点にビオチンリンカーを結合した化合物を作成してこれを「釣り針」として用いることにより、25-HC誘導性のアポトーシスシグナルに關与するタンパク質を同定できる可能性が生じた。

25-HCなどのコレステロールの酸化代謝物は、代謝における有害な副産物としておおむね認識されていた。また、酸化コレステロール内の「多様性」はあまり議論されず、ひとまとめにされる傾向にあった。本研究はいわば「軽視」されてきたと言える酸化コレステロールに光を当てたものであり、得られる結果は新規性の高いものであることが期待できた。

本研究は、アノイキスのメカニズムを理解することに主要な意図を持っているが、加えてヒト生体内における25-HCの生理的意味を議論する材料となる可能性を持っている。大腸管腔内に存在する「便」には、食品由来のものに加え、胆汁酸等のコレステロール代謝産物が豊富に含まれている(mMオーダーレベル)。25-HCも、浮遊培養条件の大腸癌培養細胞株のLC50である数 $\mu\text{M}$ と同程度の濃度(2 $\mu\text{M}$ )で存在している。つまり大腸の細胞は、常時高濃度の25-HCに曝されている環境下にある。培養細胞で示した25-HCのアポトーシス誘導活性が生体内でも働いているとするならば、25-HCは大腸癌発生・転移を食い止める生体防御因子としての機能を担っている可能性がある。すなわち本研究は、脂質代謝と癌の関連性について独自の視点を持ち、また大腸癌を含めた消化管における癌について、その抑制活性をもつ機能性食品の開発への展望を持つものである。

#### 2. 研究の目的

25-HCの標的タンパク質を同定し、アポトーシス誘導メカニズムを解明する。

#### 3. 研究の方法

25-HCのビオチンリンカー結合化合物を作成し、足場非依存増殖条件で結合するタンパク質をプロテオミクスの技術を用いて同定する。また、大腸癌細胞株DLD-1の強制浮遊培養系を用いたスクリーニング系に文科省特定支援班から提供を受けたSCADS Inhibitor Kitを用いて、25-HCの機能を阻害する化合物を同定し、メカニズム解明を目指す(Screening Committee of Anticancer Drugs supported by Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas, Scientific Support Programs for Cancer Research, from The Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan)。

#### 4. 研究成果

##### 申請者の研究環境

申請者は本研究助成を獲得した年度に家政学部生活デザイン学科から家政学部管理栄養学科への移動となり、さらに獲得後3年目に薬学部薬学科に移動となった。研究環境そのものは移動により大きく改善されたが、3年の任期中に2回の初年度勤務が重なり、エフォートの達成は困難であった。そのため、1年間の任期延長を申請し、受理された。

##### 25-HCを取り巻く研究の進展

25-HCの世界的な研究は大きく進歩した。これまでも少しずつ報告がなされていたが、2017年にLiらがImmunity誌において、25-HCがジカウイルスの細胞内侵入を阻害することを報告し、一気に抗ウイルス因子としての25-HCが脚光をあびることになった。がん研究においても、2019年にOrtizらがCancer Cell誌において、がん細胞由来のエクソソームの感受性に25-HCが関与しており、25-HCの産生が低下するとがん微小環境(ニッチ)の形成が促進されることを報告した。また、2019年にPokharelらがNature communications誌に、我々と同様の方法を用いて25-HCに結合するタンパク質としてIntegrin  $\alpha 5 \beta 1$ とIntegrin  $\alpha v \beta 3$ を同定した。対象細胞がマクロファージであるため完全には競合しないが、完全に先を越されたといえる。

##### 申請者の研究成果

残念ながら、本研究期間内に、大腸がん細胞DLD-1に対してアポトーシス誘導活性をそなえたままのビオチンリンカー結合型化合物の生成に成功しなかった。現在でも引き続き検討中である。Pokharelらは、機能についてはスクリーニングをおこなわず、単純に結合活性をもつビオチンリンカー結合型化合物を用いており、戦略の単純さが結果の差を招いたと考えられた。

申請者は、研究の進行が思わしくない場合に備えて、大腸癌細胞株DLD-1の強制浮遊培養

系を用いたスクリーニング系に、文科省特定支援班から提供をうけた SCADS Inhibitor Kit を用いて、25-HC の機能を阻害する化合物を同定し、メカニズム解明を目指す方針に重点をおいた。まず、強制浮遊培養系を用いたスクリーニング系を、スフェロイドを用いたスクリーニング系にバージョンアップさせることで、データの信頼性と解析速度を増大させた。その結果、昨年度までの研究により、25-HC のアポトーシス誘導作用を阻害する分子を 5 系統 6 種類を選抜することに成功した。そのひとつとして、ポリアミン合成の律速酵素オルニチンデカルボキシラーゼの阻害剤 Difluoromethylornithine (DFMO) を選抜した。DFMO は単独での細胞死誘導効果がおおきいため、ポリアミン合成系に絞ってさらなる標的を探索したところ、ポリアミン合成系の下流に位置するスペルミン合成反応の阻害剤である N-(3-Aminopropyl)cyclohexylamine (APCHA) が、単独でのアポトーシスはほぼ誘導せず 25-HC のアポトーシス誘導作用を阻害することを発見した。さらに、このとき APCHA 処理によって、コレステロール合成の律速酵素である SREBP2 の発現量および活性化量が濃度依存的に増大していることを発見した。また、ルシフェラーゼをもちいた転写活性の測定をおこない、APCHA によって、SREBP2 が結合して転写誘導をおこなうステロイド応答配列 (SRE) が応答することを確認した。SREBP2 の活性化酵素である Site-1 プロテアーゼを阻害したところ、25-HC 誘導性アポトーシス誘導作用のポリアミン合成阻害によるレスキュー作用は消失した。すなわち、細胞内ポリアミン類の変動(スペルミン/スペルミジン比の低下)がコレステロール合成を活性化させ、25-HC の効果が相対的に減少すると考えられた。これらのことはポリアミン代謝とコレステロール代謝が協調して、癌細胞の足場非依存的増殖に影響を与えている可能性を示唆している。現在、受理にまで至っていないが、The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 誌に投稿中である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

大腸癌細胞にアノキスを誘導する酸化コレステロールのメカニズム解析

田中 亜路、守富 早織、齋藤 瞭子、木本 晶子、上原 至雅

日本農芸化学会 2017.3.20 京都

コレステロール代謝とポリアミン代謝の結節点としてのがん細胞の足場非依存的増殖機構

田中 亜路、柿本 未来、岡本 翔子、新 美都希

日本農芸化学会 2018.3.16 名古屋

がん細胞の足場非依存的増殖にポリアミン代謝とコレステロール代謝がおよぼす影響

田中 亜路、柿本 未来、奥野 世理奈、小西 恵理香、立本 青空

日本農芸化学会 2019.3.26 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。