

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08618

研究課題名(和文) 脂質輸送 - 脂質代謝連関による膜ドメイン機能の制御機構とその腫瘍生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Regulation of membrane domain functions by lipid transport and lipid metabolism in cancer cells

研究代表者

山内 祥生 (Yamauchi, Yoshio)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：00444878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜ドメインはがん細胞の悪性形質発現に極めて重要な役割を果たしているが、その機能調節機構に関する知見は乏しい。本研究課題では、脂質輸送と脂質代謝の連関を明らかにするとともに、脂質代謝変化が膜ドメイン機能に与える影響を解析した。その結果、コレステロールやスフィンゴ脂質の細胞内輸送が、脂質合成や細胞膜ドメイン機能を調節していることが示され、これらの連関ががん細胞の悪性形質の発現に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞では特徴的な代謝変化がしばしば認められ、この性質はがん細胞の悪性形質に深く関与している。がん細胞における脂質合成の亢進は、このような代謝的な特徴の一つである。また、オンコジェニックシグナルの活性化において、脂質ラフトと呼ばれるコレステロールおよびスフィンゴ脂質を豊富に含む膜ドメインが重要な役割を果たしている。本研究課題では、コレステロールを中心とする脂質合成と脂質ラフト構成脂質の細胞内輸送が膜ドメイン機能を調節していることを明らかにし、がん細胞における脂質代謝の重要性の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Lipid rafts, membrane domains rich in cholesterol and sphingolipids, play diverse and important roles in malignant properties of cancer cells. However, a regulatory mechanism for functions of the membrane domains remains poorly understood. In this work, we studied mechanisms by which intracellular lipid transport and lipid metabolism cooperatively regulate functionality of lipid rafts in cancer cells. Our results showed that intracellular transport of cholesterol and sphingolipids regulates lipid biosynthesis and integrity of lipid rafts, supporting malignant properties of cancer cells.

研究分野：病態生化学

キーワード：脂質代謝 細胞内輸送 コレステロール スフィンゴ脂質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞では特徴的な代謝変化がしばしば認められ、この性質はがん細胞の悪性形質発現に重要な役割を果たしている(1)。がん細胞ではグルコースの取込みと、それに伴う解糖系の亢進が認められる。さらに、脂質合成の亢進を主とした脂質代謝の変化もがん細胞に特徴的な代謝変化であり、がん細胞の悪性形質に重要な役割を果たしている。脂質合成を制御する主要な因子として、Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP) があげられる(2)。SREBP は、コレステロールや脂肪酸の合成に関与するほぼすべての酵素遺伝子の転写を活性化する転写因子であり、ヒト腫瘍組織での活性化も認められている。また、コレステロール合成経路の上流に位置するメバロン酸経路では、タンパク質のプレニル化に必要なファルニシル基やゲルニルゲラニル基が合成される。

脂質ラフトは、コレステロール及びスフィンゴ脂質に富む膜ドメインであり、様々なシグナル関連因子やエンドサイトーシス関連因子などが局在している。脂質ラフトは、がん細胞の悪性形質発現に極めて重要な役割を果たしているが、その構造及び機能の調節機構については十分に理解されていない。また、がん細胞における脂質代謝変化が脂質ラフトなどの膜環境や膜機能をどのように制御しているか、その連関はほとんど理解されていない。

研究代表者らは、メラノーマ細胞において、メラノーマ抗原 GD3 の発現が Akt-mTOR シグナルを介して SREBP を活性化することで脂質合成を惹起することを報告している(3)。さらに、SREBP の活性化に伴うコレステロール生合成の亢進が、脂質ラフトの構造及び機能性の調節に重要な役割を果たしていることを明らかにした(3)。また、研究代表者らは、ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの1つである ABCA1 を欠損した細胞では細胞膜のコレステロール動態が変化し、コレステロールの他、脂質ラフトマーカーに局在するスフィンゴ糖脂質 GM1 やカベオリンが細胞膜に蓄積するとともに、カベオラ構造が増加することを報告している(4)。これらの結果は、細胞膜におけるコレステロールやスフィンゴ糖脂質の動態が脂質ラフト構造や機能を調節していることを示唆しているが、その詳細な分子機構は不明な点が多い。

2. 研究の目的

脂質ラフトは、細胞の機能発現に極めて重要な役割を果たしており、がん細胞の悪性形質発現においても重要な機能を果たしている。しかしながら、脂質ラフトの機能調節機構に関する知見は乏しく、その理解はがんを含む様々な疾患の発症機序の理解や治療標的の探索の上で重要となっている。本研究課題では、脂質ラフトを構成する重要な脂質分子であるコレステロールとスフィンゴ糖脂質の細胞内動態と脂質代謝の連関を明らかにするとともに、両者の連関が膜ドメイン機能に果たす役割について明らかにすることを目的とした。さらに、がん細胞の悪性形質発現における脂質輸送-脂質代謝の連関が果たす役割を明らかにすることを旨として本研究を実施した。

3. 研究の方法

- (1) 脂質代謝関連因子の発現解析
脂質生合成や脂質の取込みに関与する遺伝子の発現は、定量的 RT-PCR およびウエスタンブロット法によって解析した。
- (2) 脂質代謝に関する解析
コレステロール代謝に関する解析：¹⁴C標識コレステロールでラベルした細胞から細胞脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーで展開した後、コレステロールから酸化コレステロールやコレステロールエステルへの変換をモニターした。
スフィンゴ脂質代謝に関する解析：細胞を³H標識スフィンゴシンでラベルした後、細胞脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーで展開した。展開後、各スフィンゴ脂質（セラミド、スフィンゴミエリン、GlcCer, LacCer, Gb3, GM3）の合成量を測定した。
- (3) がん細胞の悪性形質の評価
がん細胞の悪性形質は、細胞増殖能、コロニー形成能、細胞運動能で評価した。

4. 研究成果

- (1) がん細胞におけるコレステロール代謝の解析
複数のがん細胞を用いて、コレステロール代謝に関連する ABCA1 および SREBP の発現レベルの比較を行った。その結果、調べたほとんどのがん細胞で ABCA1 の発現は検出限界以下であった。脂肪酸とコレステロール合成を制御する主要な転写因子である SREBP-1 は全てのがん細胞で発現とその活性化が認められた一方、主にコレステロール合成を制御する SREBP-2 の発現と活性化はメラノーマ細胞株では普遍的に認められたが、その他のがん細胞株ではその活性化はほとんど認められなかった。がん細胞の種類によって、SREBP の発現や活性化が異なることが示された。

(2) 酸化ステロールによるコレステロール代謝制御

細胞内コレステロールの60~90%程度は細胞膜に分布するのに対し、小胞体やミトコンドリアのコレステロール量は細胞コレステロールの1%もしくはそれ以下である(2)。細胞膜のコレステロールは一定の割合で細胞内に取込まれ、小胞体やミトコンドリアに輸送され、これらの細胞内小器官に特異的に発現する水酸化酵素やエステル化酵素によって代謝を受ける(図1)。コレステロール代謝産物である酸化コレステロールは、SREBP-2の最も主要な制御因子となっている他、LXRの生理的リガンドとしても機能する。また、酸化ステロールは膜構造及び膜機能に影響を与えることが報告されている(5)。しかしながら、内因性の酸化ステロールに関する報告は少なく、内因性酸化ステロールの産生や内因性酸化ステロールががん細胞に及ぼす影響等について、さらに解析を進めることとした。内因性の酸化ステロール産生ががん細胞の悪性形質や脂質代謝に及ぼす影響について検討するため、コレステロールの25位、27位、7位をそれぞれ水酸化するCH25H、CYP27A1、CYP7A1の発現系を構築し、これらの発現がコレステロール恒常性制御の中心的な転写因子であるSREBP及びLXRの活性に与える影響について解析を行った。その結果、産生される酸化ステロールの種類によって、SREBP及びLXRの活性に与える影響が異なることが示された。つまり、CH25Hによって産生される25-ヒドロキシコレステロール(25-HC)とCYP27A1によって産生される27-HCはSREBP-2活性を顕著に抑制する一方、CYP7A1によって産生される7-HCはSREBP-2活性にほとんど影響を及ぼさないことが観察され、内因性酸化ステロールにおいても、水酸化の位置によってSREBP-2活性の阻害効果が異なることが示された。さらに、これら内因性酸化ステロールによるSREBP-2の活性抑制はSREBPを負に制御するInsigタンパク質の安定化によって引き起こされることが示唆された。一方、内因性酸化ステロールの産生によるLXRの活性化はほとんど認められなかった。高濃度の酸化ステロールによるLXRの活性化は認められることから、細胞内で産生される酸化ステロールはLXRのリガンドになりにくいことが示唆された。

続いて、内因性酸化ステロールの産生が細胞の増殖などに与える影響について解析を行った。その結果、CH25HとCYP27A1の発現によって、細胞の増殖能が顕著に抑制されるのに対し、CYP7A1の発現は細胞増殖にほとんど影響を及ぼさないことが示された。これらの結果より、内因性酸化ステロールによる細胞増殖抑制は、SREBP活性抑制に伴う脂質合成能の低下に起因すると考えられた。

(3) スフィンゴ糖脂質の発現制御機構

スフィンゴ糖脂質は、脂質ラフトにおいて細胞増殖シグナルや細胞接着シグナルを調節していることが知られているが、その細胞表面への輸送機構はほとんど理解されていない。そこで、スフィンゴ糖脂質とともに脂質ラフトに発現するGPIアンカー型タンパク質の細胞内輸送に関与するp24ファミリータンパク質に着目し、解析を進めた。その結果、p24ファミリータンパク質であるTMED2及びTMED10の発現抑制によって細胞表面のスフィンゴ糖脂質の発現レベルが減少することが示された。さらに解析を進めた結果、これらのp24ファミリータンパク質は、小胞体で合成されるセラミドのゴルジ体への輸送を仲介することで、スフィンゴ糖脂質の生合成を調節していることが示唆された。GD3などのジシアリル型スフィンゴ糖脂質は、脂質ラフトでがん細胞の悪性形質の増強に寄与していることが知られていることから、p24ファミリータンパク質によるスフィンゴ糖脂質の生合成調節はがん細胞の悪性形質を調節する可能性が考えられた。

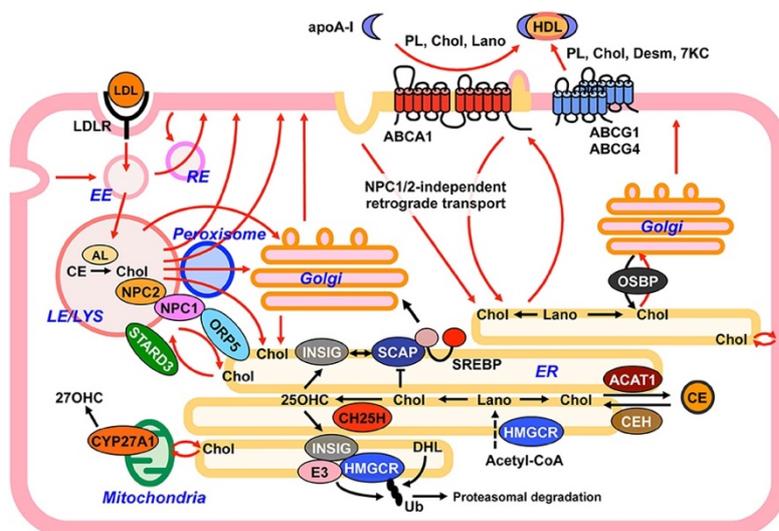


図1. 細胞内ステロール輸送の模式図 (Yamauchi and Rogers, 2018, Front. Endocrinol. より引用)。

(4) 総括

脂質ラフトの重要な構成脂質であるコレステロール及びスフィンゴ糖脂質の代謝制御について解析を行った。細胞内コレステロールの輸送と代謝制御は、図 1 に示すように極めて複雑であり、その経路の分子機序は不明な点が多い。コレステロール代謝制御機構に関する研究では、コレステロール代謝産物である内因性酸化ステロールによる **SREBP-2** と **LXR** の活性調節において、独立した制御機構の存在が示唆された。特に、内因性酸化ステロールによって **LXR** の活性化がみられないことから、産生される酸化ステロールの量的な問題や酸化ステロールによる **LXR** 活性化を負に制御する因子の存在などの可能性が考えられ、さらなる解析が必要である。また、スフィンゴ糖脂質の生合成や細胞表面への発現に関しては、**p24** ファミリータンパク質が小胞体からゴルジ体へのセラミド輸送を仲介することで、その合成を制御することが示唆され、本研究で新しいスフィンゴ糖脂質生合成制御因子が示された。コレステロールとスフィンゴ脂質は脂質ラフトの形成に重要な脂質であり、これらの細胞内輸送と代謝の連関が脂質ラフトの機能性に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

【引用文献】

1. Schulze A. and Harris AL. (2012) How cancer cell metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* 491. 364-373.
2. Yamauchi Y. and Rogers M. (2018) Sterol metabolism and transport in atherosclerosis and cancer. *Front. Endocrinol.* 9. 509 (1-22).
3. Yamauchi Y, Furukawa K, Hamamura K, Furukawa K, (2011) Positive feedback loop between PI3K-Akt-mTORC1 signaling and the lipogenic pathway boosts Akt signaling: Induction of the lipogenic pathway by a melanoma antigen, *Cancer Res*, 71, 4989-4997.
4. Yamauchi Y. et al. (2015) Deficiency in the lipid exporter ABCA1 impairs retrograde sterol movement and disrupts sterol sensing at the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 290. 23464-23477.
5. Bielska A.A., Schlesinger P., Covey DF., Ory DS. (2012) Oxysterols as non-genomic regulators of cholesterol homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* 23. 99-106.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kuan YC, Takahashi Y, Maruyama T, Shimizu M, Yamauchi Y, Sato R.	4. 巻 295
2. 論文標題 Ring finger protein 5 activates sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) to promote cholesterol biosynthesis via inducing polyubiquitination of SREBP chaperone SCAP.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 3918-3928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011849	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chikazawa M, Shimizu M, Yamauchi Y, Sato R.	4. 巻 522
2. 論文標題 Bridging molecules are secreted from the skeletal muscle and potentially regulate muscle differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 113-120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamauchi Yoshio, Rogers Maximillian A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Sterol Metabolism and Transport in Atherosclerosis and Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2018.00509	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamauchi Y, Yokoyama S, Chang TY.	4. 巻 1583
2. 論文標題 Methods for Monitoring ABCA1-Dependent Sterol Release	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 257-273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-6875-6_19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Chang TY, Yamauchi Y, Hasan MT, Chang C	4. 巻 58
2. 論文標題 Cellular cholesterol homeostasis and Alzheimer's disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Lipid Res	6. 最初と最後の頁 2239-2254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.R075630	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Komura N, Suzuki KG, Ando H, Konishi M, Koikeda M, Imamura A, Chadda R, Fujiwara TK, Tsuboi H, Sheng R, Cho W, Furukawa K, Furukawa K, Yamauchi Y, Ishida H, Kusumi A, Kiso M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Nature Chem Biol	6. 最初と最後の頁 402-410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nchembio.2059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Bhuiyan RH, Kondo Y, Yamaguchi T, Tokuda N, Ohkawa Y, Hashimoto N, Ohmi Y, Yamauchi Y, Furukawa K, Okajima T, Furukawa K	4. 巻 26
2. 論文標題 Expression analysis of O-series gangliosides in human cancer cell lines with monoclonal antibodies generated using knockout mice of ganglioside synthase genes	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 984-998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cww049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nogimori K, Hori T, Kawaguchi K, Fukui T, Mii S, Nakada H, Matsumoto Y, Yamauchi Y, Takahashi M, Furukawa K, Tetsuya O, Yokoi K, Hasegawa Y, Furukawa K	4. 巻 49
2. 論文標題 Increased expression levels of ppGalNAc-T13 in lung cancers: Significance in the prognostic diagnosis	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 1369-1376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2016.3638	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi T, Yamauchi Y, Furukawa K, Ohmi Y, Ohkawa Y, Zhang Q, Okajima T, Furukawa K	4. 巻 6
2. 論文標題 Expression of B4GALNT1, an essential glycosyltransferase for the synthesis of complex gangliosides, suppresses BACE1 degradation and modulates APP processing	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 34505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep34505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計19件(うち招待講演 5件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小野敦子、清水誠、近澤未歩、山内祥生、佐藤隆一郎
2. 発表標題 骨格筋障害・萎縮におけるABCA1遺伝子発現応答の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊雄一、三吉翔子、清水誠、山内祥生、佐藤隆一郎
2. 発表標題 脂質代謝制御因子Insigを介した酸化ステロールによる新規応答
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤穂高、佐藤隆一郎、山内祥生
2. 発表標題 細胞内で産生された酸化ステロールによるコレステロール代謝制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内祥生
2. 発表標題 Regulation of cellular sterol homeostasis by endogenous oxysterols
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamauchi Y, Saito H, Sato R
2. 発表標題 Role of endogenous oxysterols in cellular cholesterol homeostasis
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内祥生
2. 発表標題 コレステロール恒常性維持機構とその生理的な役割
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内祥生、佐藤隆一、古川鋼一
2. 発表標題 mTORシグナルによるコレステロール代謝調節機構
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山内祥生
2. 発表標題 Sterol flux at the plasma membrane and sterol sensing at the ER
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山内祥生
2. 発表標題 細胞ステロールセンシング：制御機構とその異常
3. 学会等名 第102回日本栄養・食糧学会関東支部シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤穂高、山内祥生、佐藤隆一郎
2. 発表標題 内因性酸化ステロールによるコレステロール代謝制御機構に及ぼす影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山貴史、官産州、清水誠、山内祥生、佐藤隆一郎
2. 発表標題 SREBP-SCAP相互作用部位の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤穂高、山内祥生、佐藤隆一郎
2. 発表標題 内因性酸化ステロールによるコレステロール恒常性制御
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山内祥生
2. 発表標題 がん細胞におけるlipogenic phenotypeの重要性とその制御機構
3. 学会等名 第59回日本脂質生化学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山内祥生、古川鋼一、佐藤隆一郎
2. 発表標題 mTORシグナルによるSREBP活性化機序の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤穂高、山内祥生、佐藤隆一郎
2. 発表標題 内因性酸化ステロールがSREBP-2活性に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田壮志、橋詰力、清水誠、井上順、山内祥生、佐藤隆一郎
2. 発表標題 骨格筋萎縮時に発現誘導されるAnkrd1の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山内祥生、太田晃成、渡邊瑞貴、五十嵐政智、佐藤隆一郎、上杉志成、古川鋼一
2. 発表標題 SREBPプロセッシングを阻害する新規低分子量化合物によって明らかになったヒトメラノーマ細胞におけるSREBP依存的なメバロン酸経路の重要性, ポスター
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山内祥生、横山信治, Ta-Yuan Chang
2. 発表標題 ABCA1依存的HDL形成におけるステロール分子特異性と膜ドメイン
3. 学会等名 日本農芸化学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山内祥生、横山信治, Ta-Yuan Chang
2. 発表標題 ABCA1依存的HDL形成におけるステロール分子特異性と膜ドメイン
3. 学会等名 日本農芸化学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	佐藤 隆一郎 (Sato Ryuichiro) (50187259)	東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授 (12601)	