

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659150

研究課題名(和文)ラフトを標的とした新たながん形質抑制法

研究課題名(英文)Control of tumor progression by targeting the lipid rafts

研究代表者

小根山 千歳 (Oneyama, Chitose)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：90373208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Srcによるがん形質に伴うラフトの量的・質的变化の詳細な解析を行った。まずがん形質と共にセラミド合成に関わる遺伝子群が発現亢進し、ラフト領域のセラミド量が増加することがわかったため、セラミド合成経路を阻害する薬剤あるいはセラミド合成酵素の発現を抑制するとがん形質が抑制されることを見出した。さらにはがん細胞ではラフト領域のコレステロール量が減少するため、マウスにスタチンを投与すると腫瘍形成が促進することを見出した。これらにより、がん化においてラフト構成脂質が量的・質的に変化することから、脂質を変化させることによってラフトの状態を人為的に干渉し、がん形質を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In c-Src-induced transformation, we found that c-Src up-regulation perturbs sphingolipid/cholesterol-enriched membrane microdomains (lipid rafts) by activating ceramide synthesis and downregulation of cholesterol, resulting in promotion of c-Src translocation to focal adhesions. Inhibition of ceramide conversion into glucosylceramide promotes liberation of c-Src from microdomains, and inhibition of de novo ceramide synthesis restores the microdomain distribution of c-Src and suppresses c-Src-induced transformation. We tested whether alteration of the cholesterol content of lipid rafts in c-Src-dependent cell membranes affects tumor progression in vivo. We found simvastatin, a cholesterol synthesis inhibitor, lowered raft cholesterol content, promoted tumorigenicity of colon cancer cells. These results suggest that ceramide and cholesterol could be critical modifiers of tumor progression probably by modulating lipid rafts function.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・分子腫瘍学

キーワード：ラフト Src

### 1. 研究開始当初の背景

私はがんの基礎研究として、「がん原遺伝子」c-Src によるがん化メカニズムの解明を目標に研究を進めてきた(Oneyama et al., Genes Cells, 2008)。Src は、ヒトがん細胞においては自身の遺伝子変異を伴わない場合が多く、Src の周辺でその制御系が破綻した結果として発現・活性の亢進からがんに至ると考えられている。申請者は、Src によるがん化に伴い発現が減少する分子として、細胞膜ミクロドメイン「ラフト」に局在する膜アダプター蛋白質 Cbp を見出した。Cbp は Src によるがん化や腫瘍形成を顕著に抑制し、活性型 Src を直接ラフトにリクルートすることで、ラフト外の膜構造(細胞接着斑など)から発信されるがん化シグナルを遮断し、がん化を抑制することを明らかとした。この研究から、これまでシグナル伝達の起点と考えられてきたラフトが、がん化シグナルに関してはむしろ抑制的に作用するという新しい概念に至った(Oneyama et al., Mol Cell, 2008)。さらに、ラフトの構成成分であるコレステロールを添加・除去することでラフト自体の量を増減させるとがん形質が変化することを見出した(Oneyama et al., Mol Cell Biol, 2009)。

### 2. 研究の目的

私はがん原遺伝子 Src によるがん化メカニズムの研究を進めるなかで、これまでシグナル伝達の起点と考えられてきた細胞膜ミクロドメイン「ラフト」が、がん化シグナルに関してはむしろ抑制的に作用しているという新しい概念に至った。本研究ではこの概念を発展させ、ラフトをがん形質抑制機能を持つ構造体として捉え、その機能を積極的に利用することでがん形質を抑制する新たな手法を探索する。

### 3. 研究の方法

本研究では、これまでの研究で示唆されたラフトの持つ潜在的ながん抑制能を利用し、ラフトを標的としたがん形質抑制法について探索する。その目的のため、がん形質に伴うラフトの量的・質的变化の詳細な解析とその制御法の開発につながる以下の研究を行った。

- 1) がん化モデル細胞におけるがん形質と脂質の量的・質的变化に伴うラフト形成との相関を調べる。
- 2) 脂質の量的・質的变化を誘起した際のラフト形成とがん形質の関わりを調べる。に対する役割を調べる。

- 3) ヒトがん細胞における脂質ラフトの役割
- 4) ラフトを標的としたがん診断及びがん形質抑制に向けた手法の探索を行う。

### 4. 研究成果

本研究では、ラフトを標的としたがん形質抑制法について探索するため、がん形質に伴うラフトの量的・質的变化の詳細な解析を行った。まずモデル細胞における脂質のがんにおける役割解明に関して1) がん化モデル細胞におけるがん形質とラフト形成及び脂質の量的・質的变化及び、2) 脂質の量的・質的变化を誘起した際のラフト形成とがん形質の解析を行った。その結果、1)については、Src がん化モデル細胞において、そのがん形質とラフト構成に関わる脂質について放射性ラベルした脂質の取り込みを薄層クロマトグラフィーによって分離し詳細に調べたところ、がん形質発現時にラフト領域においてセラミド量の増加が見られることを明らかとした。さらにがん形質発現時のラフト領域におけるセラミド量の増加がなぜ起こるのかを明らかにするため、セラミド合成・代謝に関わる遺伝子群の発現を解析した。これにより、セラミドの代謝ではなく合成に関わる遺伝子群全般が発現亢進していることを明らかとした。さらに2)については、1)の結果からがん形質発現時にラフト領域における変化が明らかとなったセラミドについて、セラミド合成経路を阻害する薬剤あるいはセラミド合成酵素の発現抑制によりセラミド合成を抑制すると、がん形質が抑制されることを見出した。これらにより、がん化においてラフトを構成する脂質が量的・質的に変化すること、脂質を変化させることによるラフトの状態を人為的に干渉し、がん形質を抑制することができる可能性が示唆された。一方で、3)ヒトがん細胞における脂質ラフトの役割及び4)ラフトを標的としたがん診断及びがん形質抑制に向けた手法の探索に取り組んだ。具体的には、モデル細胞の解析結果においてがん形質との関係が示唆されたラフト形成に関わるセラミドのラフト領域における増加やセラミド合成に関わる遺伝子群の発現亢進について、株化されたヒト各種がん細胞を用い解析した。その結果、ヒト乳がん細胞株について解析したところ、c-Src 活性が高いことが知られるいくつかの細胞において Src がん化モデル細胞同様のセラミド量の亢進が見られた。さらにこれらの細胞株についてセラミド合成経路の阻害剤(Fumonisin B1 や Myriocin)を処理すると、ラフトにおけるセラミド量が減少し、がん形質が抑制されることを明らかとした。さらに4)については、ヌードマウスに脂質添加餌を摂食させた状態においてヒトがん細胞を移植した場合の腫瘍形成を調べようと試みたが、脂質添加餌を与えると摂食が抑制され結果を得ることができなかった。一方、血中のコレステロール量をコレステロール合成

阻害剤であるスタチンの腹腔投与により抑制した状態で、大腸がん細胞株を皮下移植し腫瘍形成を調べたところ、コレステロール量の抑制に伴い腫瘍形成が促進する傾向にあることを見出した。このことにより、あるがん種においては、コレステロール等ラフト構成脂質の組成を変化させることにより、ラフトを標的としたがん形質抑制に向けての手法の可能性が示唆された。

#### 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7件)

(1) Saitou T, Kajiwara K, Oneyama C, Suzuki T, Okada M. Roles of Raft-Anchored Adaptor Cbp/PAG1 in Spatial Regulation of c-Src Kinase.

*PLoS One*, 9(3):e93470 (2014) 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0093470.

(2) Mori S, Nada S, Kimura H, Tajima S, Takahashi Y, Kitamura A, Oneyama C, Okada M,. The mTOR pathway controls cell proliferation by regulating the FoxO3a transcription factor via SGK1 kinase. *PLoS One*, 9(2):e88891 (2014) 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0088891.

(3) Kajiwara K, Yamada T, Bamba T, Fukusaki E, Imamoto F, Okada M, \*Oneyama C. c-Src-induced activation of ceramide metabolism impairs membrane microdomains and promotes malignant progression by facilitating the translocation of c-Src to focal adhesions.

*Biochem J*, 458(1):81-93 (2014) 査読有 doi: 10.1042/BJ20130527. \*corresponding author

(4) Soma-Nagae T, Nada S, Kitagawa M, Takahashi Y, Mori S, Oneyama C, Okada M. The lysosomal signaling anchor p18/LAMTOR1 controls epidermal development by regulating lysosome-mediated catabolic processes. *J Cell Sci*. 126(16):3575-3584 (2013) doi: 10.1242/jcs.121913. 査読有

(5) Tanaka H, Akagi KI, Oneyama C, Tanaka M, Sasaki Y, Kanou T, Lee YH, Yokogawa D, Dobenecker MW, Nakagawa A, Okada M, Ikegami T. Identification of a new interaction mode between the Src homology 2 (SH2) domain of C-terminal Src kinase (Csk) and Csk-binding protein (Cbp)/phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains (PAG). *J Biol Chem*. 288(21):15240-54 (2013) doi: 10.1074/jbc.M112.439075. 査読有

(6) Sekino-Suzuki N, Yuyama K, Miki T, Kaneda M, Suzuki H, Yamamoto N, Yamamoto T, Oneyama C, Okada M, Kasahara K.

Involvement of gangliosides in the process of Cbp/PAG phosphorylation by Lyn in developing cerebellar growth cones. *J Neurochem*. 124(4):514-522 (2013) doi: 10.1111/jnc.12040. 査読有

(7) \*Oneyama C, Morii E, Okuzaki D, Takahashi Y, Ikeda J, Wakabayashi N, Akamatsu H, Tsujimoto M, Nishida T, Aozasa K, Okada M. MicroRNA-mediated upregulation of integrin-linked kinase is crucial for Src-induced tumor progression. *Oncogene*, 31: 1623-1635 (2012) doi: 10.1038/onc.2011.367. 査読有

[学会発表](計10件)

(招待講演)

1. 小根山千歳 「Src チロシンキナーゼの脂質ラフトによるがん化シグナル制御」

大阪大学蛋白質研究所セミナー 2014.3.15

2. 小根山千歳 「脂質ラフトを介する c-Src がん化シグナルの制御」

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 2014.3.7

3. 小根山千歳 「Src によるがん形質発現メカニズムの再考」

奈良先端技術大学未来開拓コロキウム(奈良) 2013.10.22

(通常発表)

1. Ari Hashimoto, Shigeru Hashimoto, Yasuhito Onodera, Tsukasa Oikawa, Chitose Oneyama, Rumiko Kinoshita, Jin-Min Nam, Mishie Tanino, Hirokazu Sugino, Ayumu Yoshikawa, Yutaro Otsuka, Haruka Handa, Masanao Yoshino, Hiroki Sato, Satoshi Fukuda, Shinya Tanaka, Hiroki Shirato, Yoichi Ito, Masato Okada, Hisataka Sabe 「Mechanisms by which p53 alterations generate GEP100-Arf6-AMAP1 pathway as a mesenchymal invasion machinery to be activated by RTK-ligands and TGF-beta1」 第36回日本分子生物学会年会 2013. 12.4

2. 小根山千歳, 吉川由利子, 飯野琢也, 月田早智子, 岡田雅人 「Fer を介した c-Src によるがん形質発現」 第36回日本分子生物学会年会 2013. 12.4

3. 田中宏明, 赤木謙一, 小根山千歳, 田中雅千, 佐々木優一, 狩野孝, Lee Young-Ho, 横川大輔, Dobenecker Marc-Werner, 中川敦史, 岡田雅人, 池上貴久 「C末端 Src キナーゼの SH2 ドメインと Cbp/PAG との間の新しい相互作用様式の発見」 第36回日本分子生物学会年会 2013. 12.3

4. 吉川由利子, 小根山千歳, 飯野琢也, 岡田雅人 「Regulation of c-Src-induced oncogenic pathways via membrane microdomain」 第35回日本分子生物学会年会 2012.12.14

5. 梶原健太郎, 小根山千歳, 今本文男, 岡田雅人 「Src-induced ceramide overexpression promotes tumor progression

by perturbing membrane  
microdomains」第 35 回日本分子生物学会年  
会 2012.12.11

6 . 吉川由利子、小根山千歳、飯野琢也、岡  
田雅人「細胞膜ミクロドメイン“脂質ラフ  
ト”を介した c-Src がん形質発現シグナルの  
制御」第 7 1 回日本癌学会学術総会  
2012.9.19

7 . 吉川由利子、小根山千歳、岡田雅人「Lipid  
raft によるがん化制御」第 4 回シグナルネッ  
トワーク研究会 2012.5.19

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/oncogene/index.htm>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小根山 千歳 (ONEYAMA CHITOSE)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：90373208