

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890170

研究課題名(和文) オーフアントランスポーターの生理機能解明による新規がん治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Identification of a novel cancer therapy target molecule by elucidating the physiological function of the orphan transporter

研究代表者

伊藤 慎悟 (Ito, Shingo)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：20466535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：機能未知のオーファントランスポーターであるSLC22A18の細胞内局在は細胞膜ではなく細胞内小器官の膜に発現していることが示唆された。メタボロミクスによる細胞内代謝物変動解析からタンパク質の翻訳後修飾であるO-GlcNAc化の基質であるUDP-GlcNAc量が増加していることを見出し、Western blot法を用いた解析からSLC22A18発現変動によってO-GlcNAc化タンパク質量が変動することを明らかにした。がん細胞においてSLC22A18発現低下は細胞増殖速度を増加させることから、SLC22A18が腫瘍形成と関連があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We detected the expression of SLC22A18, an orphan transporter and tumor suppressor gene, in organelle membranes, but not within the plasma membrane. We showed that the level of UDP-GlcNAc, an O-GlcNAc modification substrate, is higher in cells stably expressing SLC22A18 than in mock cells. In addition, the levels of O-GlcNAc-modified proteins detected using western blot analysis are increased in cells stably expressing SLC22A18. We found that SLC22A18 knockdown in some tumor cell types increased cell proliferation rates, suggesting that a relationship exists between low SLC22A18 levels and acceleration of tumorigenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：オーファントランスポーター タンパク質翻訳後修飾 がん治療標的分子 腫瘍形成

1. 研究開始当初の背景

輸送担体(トランスポーター)は組織間の内因性物質や薬物の移動を制御する膜タンパク質である。これまでに、トランスポーターの生理機能・発現異常が、生活習慣病やがんなどの疾患発症および薬剤耐性に関与することが示されてきている。ヒトにおいてトランスポーターは533分子が登録されているにも関わらず、発現・機能が明らかにされたトランスポーター分子は一部に過ぎず、未だ基質や機能が特定されていないオーファントランスポーターが数多く存在する。したがって、オーファントランスポーターの生理機能の解明は、発現・機能異常による疾患発症機構の解明や薬物動態制御に基づく個別化薬物療法の確立への発展が期待されている。

申請者らは独自の質量分析計を用いたタンパク質一斉定量法を開発し、内因性物質や薬物輸送に関与する可能性が高い約100種類のオーファントランスポーターを標的とした定量プロテオミクス解析を行った。その結果、薬物動態に深く関わる組織である肝臓および小腸において SLC22A18 が高発現しているという興味深い予備的知見を得た。SLC22A18 が属する SLC22A ファミリーには内因性物質だけでなく臨床で用いられる薬物やその代謝物を基質とする体内動態制御にとって重要な有機アニオンおよび有機カチオントランスポーター(OAT, OCT, OCTN 等)が含まれ、さらに SLC22A ファミリーのトランスポーター遺伝子の変異によるトランスポーター機能異常が全身カルニチン欠乏症などの遺伝的疾患に関与していることが報告されている (Nat Genet. 1999, 21, 91-4)。一方で、SLC22A18 は輸送機能等の分子機能は全く明らかにされていないオーファントランスポーターであるが、これまでに、1) SLC22A18 タンパク質を過剰発現させたバクテリアは chloroquine や quinidine に対して耐性を示すこと (FEBS Lett. 1998, 433, 245-50)、2) SLC22A18 遺伝子は先天性奇形症候群である Beckwith-Wiedemann 症候群や小児三大固形悪性腫瘍の1つであるウィルムス腫瘍発症に関与する疾患関連遺伝子であること (Proc Natl Acad Sci U S A. 1998, 95, 3873-8)、3) ゲノム刷り込みによる SLC22A18 遺伝子の発現抑制は成人における肝臓がん、乳がんなどの悪性腫瘍発症に関与する (Gene. 2008, 15, 40-7) ことが報告されている。以上の知見から、「SLC22A18 のトランスポーター機能の低下が遺伝性疾患および腫瘍形成と深く関わっており、SLC22A18 の分子機能が遺伝性疾患発症メカニズムの解明と新しい腫瘍形成機構の解明につながる」ことが考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、機能未知のオーファントランスポーターである SLC22A18 の「生体分子機能」と「病態生理的役割」を解明する

ことである。そこで本研究課題では SLC22A18 の 1) 内因性基質の同定と体内動態制御機構、2) 腫瘍形成への関与と分子機構を解明し、SLC22A18 の生理学的機能および疾患発症・進行への関与とその分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) SLC22A18 安定および一過性発現細胞株の作成

SLC22A18 安定発現細胞株の樹立は目的遺伝子を効率的にゲノム DNA に挿入できる Flp-In 法を用いて行った。SLC22A18 安定発現細胞における SLC22A18 遺伝子発現は定量 PCR によって行った。3xFlag tag を付加した pcDNA5/FRT-3x Flag tagged SLC22A18 は合成遺伝子と pcDNA5/FRT-SLC22A18 の遺伝子組換えによって作成した。このベクターを 293 細胞に同様の方法で遺伝子導入し、48 時間後の細胞を回収して以下の解析に使用した。

(2) 抗 SLC22A18 抗体の作成

SLC22A18 について TMHMM2.0 による膜貫通領域の予測と BLAST 検索から特異的抗原部位を決定した。この部位に対する合成ペプチドを作成し、キャリアーである KLH と結合させた。この抗原とアジュバンドとのエマルジョンをウサギに投与し(2週間間隔4回)最終投与から2週間後に全血を採取した。抗血清をペプチドカラムによって精製し、抗体を得た。

(3) 細胞分画とタンパク質の可溶化

細胞膜回収キット (BIO VISION) を用いて、プロトコールに従って培養細胞から細胞質、粗膜画分および細胞膜画分を分画した。Whole cell lysate および分画したタンパク質は RIPA buffer にて可溶化し、BCA アッセイキットを用いてタンパク質定量を行った。

(4) Western blot 解析

タンパク質溶液を Lammili buffer と混合し、37、30 分間もしくは 95、5 分間インキュベーションすることによって SDS 化を行った。定法に従ってサンプルを SDS-PAGE によって分離後、PVDF メンブレンに転写し、ブロッキングを行い、各種 1 抗体と 1 昼夜反応させた。次に PVDF メンブレンを洗浄後、HRP 標識 2 次抗体と反応させた。ECL 試薬を用いて HRP 由来の化学発光をイメージアナライザーで検出した。

(5) 免疫組織化学的解析

チャンバースライドガラス上にて 2-3 日培養した細胞を 4%PFA/PBS にて固定後、1% Triton-X100 で処理し、ブロッキング後、各種 1 次抗体で 1 昼夜反応させた。細胞を洗浄後、蛍光標識 2 次抗体にて反応させた。蛍光退色防止剤含有封入剤を用いてプレパラ-

トを調整後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(6) 細胞増殖試験

細胞を 96 well plate に播種し、播種後 1 および 3 日目における細胞数を Cell-Counting kit8 (DOJINDO) を用いて測定した。

(7) shRNA による SLC22A18 ノックダウンがん細胞の作成

SLC22A18 に特異的な shRNA を 4 つ設計し、肝臓がん細胞株である HEPG2、乳がん細胞株である MCF-7 および大腸がん細胞株である Caco2 細胞に ScreenFectA (WAKO) を用いて遺伝子導入し、puromycin によってセレクションを行い、安定ノックダウン細胞を樹立した。SLC22A18 mRNA 発現量は特異 probe を用いた定量 PCR 法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 抗 SLC22A18 抗体の評価

SLC22A18 の細胞内発現・局在は未だに不明なままである。SLC22A18 タンパク質の発現・局在解析を行うことができる抗体を得るために、今回作成した抗体および購入した計 5 種類の抗体の反応性を SLC22A18 安定発現細胞の細胞質および粗膜画分を用いて行った。その結果、粗膜画分において 4 種類の抗体が 35 kDa に SLC22A18 を検出した。SLC22A18 タンパク質の予想サイズは 45 kDa であるが、現在の実験条件では 35 kDa に検出される。4 種類の異なるエピトープを標的とした抗体によって同一のバンドが検出されたことから得られたバンドは SLC22A18 タンパク質由来である可能性が高い。この点を検証するために、N 末端もしくは C 末端に 3xFLAG を付加した SLC22A18 を一過性に発現させて Western blot 法によって解析したところ、どちらも同じ大きさに検出された。従って、SLC22A18 は何かしら切断を受けてサイズが小さくなっているのではないことが示唆された。おそらく、マイルドな SDS 化条件でのみ抗体が反応するため、SDS 化が完全にされていないことが原因かと考えられる。今回検討した抗体の中で反応性が高く非特異的バンドが少ない Abcam 社から購入した抗体と今回作成した自作抗体を今後使用することとした。

(2) SLC22A18 安定発現細胞におけるタンパク質発現・局在解析

次に、SLC22A18 タンパク質発現・局在解析を細胞分画を行ったサンプルに対する Western blot 法にて解析した。その結果、SLC22A18 安定発現細胞における SLC22A18 タンパク質発現は粗膜画分が細胞膜画分よりも高かった。次に、細胞内局在を検討するために、免疫組織化学的解析を行った。その結果、SLC22A18 安定発現細胞に

おいて細胞内に強くシグナルを検出し、細胞膜における発現はほとんど観察されなかった。これら結果は両抗体によっても同様であった。以上の結果から、SLC22A18 タンパク質は細胞内小器官の膜画分に発現していることが示唆された。

(3) SLC22A18 安定発現細胞のメタボローム解析

SLC22A18 安定発現細胞および mock 細胞に含まれる内因性代謝物質について、メタボローム解析を実施し、2 細胞株間での内因性代謝物質の細胞内含有量の差異を比較した。得られた内因性化合物を解糖系などの糖代謝に関連する経路に当てはめていったところ、タンパク質の O-GlcNAc 化修飾の基質である UDP-GlcNAc 量が増加していることを見出し、ヘキソサミン合成経路が活性化している可能性があることが推察された。

(4) SLC22A18 安定発現細胞におけるタンパク質の O-GlcNAc 化への影響

SLC22A18 安定発現細胞における O-GlcNAc 化タンパク質の変動を Western blot 法を用いて解析を行った。その結果、多くの抗 O-GlcNAc 抗体 (Cell signaling) に反応するタンパク質の O-GlcNAc 化が亢進していた。従って、SLC22A18 は細胞内代謝調節に関与してタンパク質の O-GlcNAc 化を制御する機構を担っていることが示唆された。がん細胞が膨大なエネルギーを作り出す機構に O-GlcNAc 化は関与する。すなわち、UDP-GlcNAc の産生増大によって IKK-β の O-GlcNAc 修飾が亢進し、これが NF-κβ を介した解糖系がさらに亢進する。そこで、SLC22A18 安定発現細胞における NF-κβ の発現量およびリン酸化に関して Western blot 法を用いて検討したところ、NF-κβ 発現量は増加し、リン酸化も増加することが示唆された。p53 タンパク質は IKK-β の O-GlcNAc 化による活性化を抑制する役割を果たしている。そこで p53 タンパク質の発現量およびリン酸化を検討したところ、p53 タンパク質発現量は増加していたが、p53 タンパク質の活性を示す Ser15 のリン酸化は観察されなかった。p53 タンパク質の発現増加には p53 タンパク質の O-GlcNAc 化が関与することが報告されているため、免疫沈降法を用いて検討を行った。その結果、SLC22A18 発現細胞において p53 タンパク質は mock 細胞よりも O-GlcNAc 化されていた。以上の結果から、SLC22A18 発現増加は細胞内代謝変動によってタンパク質の O-GlcNAc 化を促進させることで、細胞内シグナリングを変動させていることが示唆された。

(5) SLC22A18 安定発現細胞の細胞増殖試験

SLC22A18 発現細胞の細胞増殖速度を測定したところ、播種後 3 日目において SLC22A18 細胞と mock 細胞との間で有意な

細胞増殖速度の差は観察されなかった。

(6) がん細胞における SLC22A18 発現解析

がん細胞における SLC22A18 の病態生理機能を解析するために、HEPG2、乳がん細胞株である MCF-7 細胞および大腸がん細胞株である Caco2 細胞における SLC22A18 発現量を Western blot 法を用いて解析した。その結果、Caco-2 および MCF-7 細胞において SLC22A18 タンパク質発現が検出された。HEPG2 細胞においてはタンパク質発現が検出されるものの発現量は他の 2 細胞に比べて小さかった。

(7) SLC22A18 安定ノックダウン HEPG2 および MCF-7 細胞の作成

がん細胞における SLC22A18 の病態生理機能を解析するために、HEPG2、MCF-7 および Caco2 細胞において SLC22A18 安定ノックダウン細胞を樹立を試みた。その結果、HEPG2 および MCF-7 細胞においては puromycin 耐性のクローニングされた細胞を得ることができたが、Caco2 細胞では得られなかった。そのため、当初計画していた Caco2 細胞では安定発現ノックダウン細胞を樹立できなかった。次に puromycin 耐性 HEPG2 および MCF-7 細胞における SLC22A18 発現量を定量 PCR 法によって解析したところ、それぞれ 50%程度の発現低下が観察された。したがって、SLC22A18 安定ノックダウン HEPG2 および MCF7 細胞が樹立された。さらにタンパク質発現量を MCF-7 細胞において検討したところ、粗膜画分においてその発現は 50%程度減少していた。

(8) SLC22A18 ノックダウン HEPG2 および MCF-7 細胞の細胞増殖における SLC22A18 ノックダウンの影響

SLC22A18 ノックダウンが細胞増殖に与える影響を細胞増殖試験によって解析した。その結果、HEPG2 細胞および MCF7 細胞において細胞増殖速度はそれぞれ約 1.5 および 2 倍有意に増加した。従って、SLC22A18 タンパク質発現減少が細胞増殖を促進させることが示唆された。

(9) MCF7 細胞におけるタンパク質の O-GlcNAc 化翻訳後修飾

MCF7 細胞における O-GlcNAc 化タンパク質発現変動を Western blot 法を用いて解析したところ、予想外に細胞質内の複数のタンパク質の O-GlcNAc 化が増加していた。また、NF-kb および p53 タンパク質の発現変動を同様に解析したところ、両タンパク質発現量が増加していた。以上の結果から、MCF-7 細胞においては SLC22A18 タンパク質発現量が低下することで安定発現株と同様のタンパク質発現変動が起こることが示唆された。NF-kB の活性化は解糖系を亢進させ、ヘキソサミン生合成経路を活性化させること

から、SLC22A18 はがん細胞が膨大なエネルギーを作り出す機構の一部を担っていることが推察される。SLC22A18 安定発現とノックダウン細胞で同様のタンパク質発現変動が起きるメカニズムについて今後解析を行っていく予定である。

(10) 結論

以上の結果から、SLC22A18 は細胞内小器官の膜に発現し、細胞内代謝調節に関与することで細胞におけるエネルギー代謝に関与していることが示唆された。SLC22A18 はがん抑制遺伝子として報告されており、がん細胞における増殖試験では有意に増殖速度を増加させたことから、SLC22A18 発現低下が腫瘍形成と関連があることが示唆された。今後、SLC22A18 発現変化に伴う細胞内代謝変動と腫瘍形成機構の関係を解明することによって、SLC22A18 を標的とした新規がん発症抑制薬の創薬につながることを期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.ohtsuki-lab.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
伊藤 慎悟 (ITO SHINGO)

熊本大学・大学院生命科学研究部
助教
研究者番号：20466535

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし