

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460385

研究課題名(和文)細胞膜ドメイン機能を制御するシグナル及び代謝基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidation of signals and metabolic bases that regulate functions of plasma membrane microdomains

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)・特任准教授

研究者番号：00444878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜ドメイン(脂質ラフト)はがん細胞の悪性形質など細胞機能の発現に極めて重要な役割を果たしている。そのため、細胞膜ドメイン機能の制御機構を解明することはがん細胞の悪性形質増強のメカニズムを理解し、悪性腫瘍に対する新しい治療戦略を開発する上で重要である。本研究課題において、我々は脂質代謝を制御する転写因子SREBPががん細胞の細胞膜ドメイン機能や悪性形質を制御する因子として極めて重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、小胞体でのSREBP活性化を調節する制御メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Plasma membrane microdomains (lipid rafts) play essential roles in cellular functions and in malignant properties of cancer cells. It is therefore important for developing therapeutic strategies for malignant tumor, to understand how functionality of lipid rafts is preserved in cancer cells. In this study, we showed that SREBP, a transcriptional factor that regulates lipid metabolism, functions as a crucial factor maintaining integrity of lipid rafts in and malignant properties of cancer cells. Furthermore, we revealed regulatory mechanisms that control the activation of SREBP at the endoplasmic reticulum.

研究分野：生化学

キーワード：膜ドメイン 脂質代謝 シグナル がん

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に深く関与している。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。

近年増加傾向にあるメラノーマ（悪性黒色腫）は悪性度が極めて高いがんの一つであり、特に転移後は有効な治療法が限られているため、新しい治療法の開発が期待されている。

ヒトメラノーマ細胞では、特徴的な酸性スフィンゴ糖脂質の発現がみられ、特にメラノーマ抗原として知られるジシアリル型スフィンゴ糖脂質の GD3 は原発巣の腫瘍組織やメラノーマ細胞株などに普遍的に発現している。GD3 を含むスフィンゴ糖脂質は、細胞膜の脂質ラフトと呼ばれる細胞膜ドメインに局在する。脂質ラフトは、コレステロールとスフィンゴ脂質に富む膜ドメインで、細胞情報伝達や細胞内輸送など細胞機能の発現に重要な役割を果たしている。我々は、メラノーマ細胞において、メラノーマ抗原 GD3 が脂質ラフトで増殖や接着のシグナルを増強することを明らかにしてきた (1)。GD3 以外にも多くのがん関連抗原が脂質ラフトにおいて様々なシグナルを活性化し、悪性形質を増強させることが知られている。しかし、その分子メカニズムは十分に理解されておらず、脂質ラフトの構造維持や機能調節の分子基盤を理解することは、シグナルの起点である脂質ラフトが関与する悪性形質増強のメカニズムを解明する上で特に重要である。

2. 研究の目的

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、その構築や維持に関する詳細なメカニズムはあまり知られていない。我々は、メラノーマ細胞において、GD3 の発現が mechanistic target of rapamycin (mTOR) シグナルを介して、sterol regulatory element binding protein (SREBP) とコレステロール合成の活性化を誘導することを報告した (2)。また、Akt-mTOR-SREBP シグナルがコレステロール生合成を制御することで脂質ラフトでの Akt 活性化に影響を与えることも示し、GD3 依存的なシグナルとコレステロール生合成との間にポジティブフィードバックが存在し、SREBP がメラノーマ細胞の悪性形質発現に重要な役割を果たしていることを示した (2)。しかしながら、mTOR シグナルが SREBP を調節する詳細な分子メカニズムはほとんど理解されていない。また、がん細胞の悪性形質発現における SREBP の役割についても不明な点が多く残されている。

本研究課題は、メラノーマ細胞を含むがん細胞などにおける細胞膜ドメイン機能を制

御するシグナル及び脂質代謝基盤を理解し、悪性腫瘍に対する新しい治療戦略を見いだすことを主な目的とした。

3. 研究の方法

(1) 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、浸潤能で評価した。

(2) 異種移植実験

ヒトメラノーマ細胞 SK-MEL-28 を Balb/c nu/nu ノードマウスの皮下に移植した。腫瘍が形成された後、低分子量化合物を腹腔内に 4 週間、投与し、腫瘍サイズを経時的に計測した。投与 4 週間後にマウスから腫瘍を摘出し、腫瘍の重量を測定するとともに、RNA を抽出し、定量 PCR にて遺伝子発現を解析した。

(3) 小胞体コレステロールレベルの評価

小胞体コレステロールレベルは、 $[^3\text{H}]$ 標識コレステロールのエステル化や $[^3\text{H}]$ 標識オレイン酸のコレステロールエステルへの取込みで評価した。また、SREBP の活性化や SREBP 標的遺伝子の発現を解析し、小胞体コレステロールレベルを間接的に評価した。

4. 研究成果

(1) mTOR シグナルによる SREBP 活性化制御

mTOR シグナルが SREBP 活性化を制御しているかにつき、ヒトメラノーマ細胞だけでなく複数のヒトがん細胞を用いて検討した。その結果、メラノーマ細胞だけでなく肺がん細胞や卵巣がん細胞においても mTOR の阻害が SREBP の不活化を引き起こすことが示された。

(2) SREBP が悪性形質発現へ及ぼす影響

京都大学の上杉（連携研究者）らが開発した新規 SREBP 阻害剤がヒトメラノーマ細胞における脂質代謝遺伝子の発現や細胞増殖能、細胞運動能、浸潤能に及ぼす影響について検討を行った。その結果、複数のメラノーマ細胞株においてこの SREBP 阻害剤は SREBP の活性化と SREBP 標的遺伝子の発現を顕著に抑制した。また、この SREBP 阻害剤は BRAF 遺伝子にオンコジェニック変異を持つヒトメラノーマ細胞だけでなく、BRAF と PTEN にオンコジェニック変異を持つメラノーマ細胞の増殖も顕著に抑制した。さらに、この SREBP 阻害剤はメラノーマ細胞の運動能や浸潤能も抑制することが示された。

(3) 新規 SREBP 阻害剤が異種移植したメラノーマ細胞に与える影響

細胞レベルの解析結果に基づき、新規 SREBP 阻害剤がヌードマウスに移植したヒトメラノーマ細胞の腫瘍増殖に与える影響について解析した。ヌードマウスにヒトメラノーマ細胞を移植後、腫瘍が

一定の大きさに成長した段階で、SREBP 阻害剤を4週間、マウスに投与した。その結果、新規 SREBP 阻害剤はマウスの体重に影響を与えることなく、腫瘍増殖能を顕著に抑制した。また、新規 SREBP 阻害剤投与群において、腫瘍組織の SREBP 標的遺伝子の発現が顕著に抑制されていることが確認された。これらの結果から、SREBP 依存的な代謝がヒトメラノーマ細胞の悪性形質の発現に極めて重要な役割を果たしていることが示された。

(4) 小胞体におけるコレステロール感知機構の解析

次に、がん細胞における SREBP 活性化機構について解析を行った。SREBP 活性化は小胞体のコレステロールレベルによって調節されていることが知られている。そこで、mTOR が小胞体コレステロールレベルに与える影響について解析した。その結果、mTOR が小胞体コレステロールレベルを調節していることが示唆された。さらに、SREBP のシャペロンタンパク質として機能している SCAP の恒常的活性化型を発現する変異細胞では、mTOR 阻害による SREBP の不活化が引き起こされないことが示された。これらの結果は、mTOR シグナルが小胞体コレステロールを制御することで SREBP の活性化を制御していることを強く示唆した。

ABC トランスポーター ABCA1 はリン脂質やコレステロールを膜内輸送する分子である。いくつかのがんにおいて ABCA1 を含む ABC トランスポーターの発現と予後や悪性後との関連性が指摘されている。我々は ABCA1 に着目し、ABCA1 の発現が脂質代謝や細胞膜ドメインに及ぼす影響について解析を行った。その結果、ABCA1 遺伝子をノックアウトした細胞において、SREBP の活性化とコレステロール合成の亢進が認められた (3)。また、ABCA1 が細胞膜ドメインのコレステロールやガングリオシド含量を制御するとともに、細胞膜のカベオラ数を調節していることを明らかにした。さらに、ABCA1 欠損細胞では、細胞膜ドメインの重要な機能の一つであるエンドサイトーシスに障害があると同時に、細胞膜から小胞体へのコレステロール輸送が障害されていることが示された。これらの結果をふまえ、ABCA1 の細胞内分布について解析を行った結果、ABCA1 が特殊な膜ドメインに局在することが明らかになった。以上の結果より、我々は図1に示すモデルを提唱した (3)。

以上の結果より、SREBP ががん細胞の悪性形質発現に重要な役割を果たしていることが明らかになるとともに、SREBP ががんの治療標的分子として有効である可能性が示された。さらに、mTOR

やコレステロールの逆行輸送が小胞体における SREBP 活性化の重要な調節因子となっていることが明らかとなった。今後は、小胞体での SREBP 活性化制御機構のより詳細な分子機構について解析を行う予定である。さらに、SREBP ががん細胞の悪性形質に及ぼす影響を細胞レベル及び個体レベルでより詳細に解析し、悪性腫瘍に対する新しい治療戦略を提案していきたいと考えている。

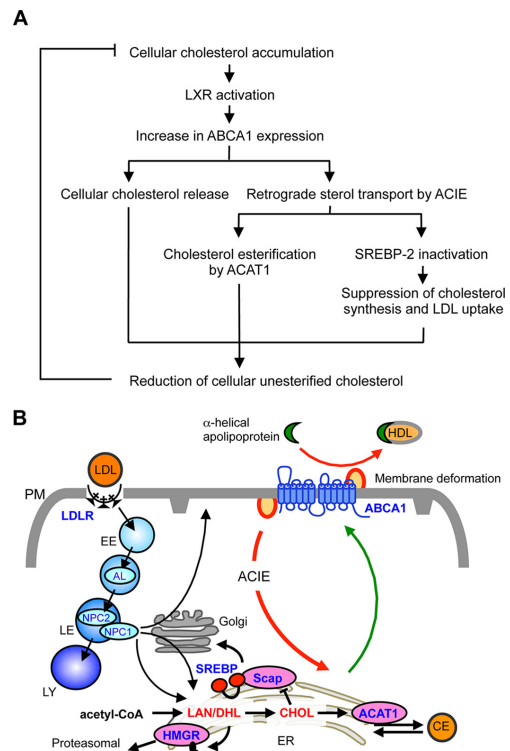


図1. ABCA1 を介した細胞内コレステロール恒常性の制御機構 (発表文献8より引用)

(引用文献)

- (1) Furukawa K, Ohkawa Y, Yamauchi Y, Hamamura K, Ohmi Y, Furukawa K, (2012) Fine tuning of cell signals by glycosylation, *J Biochem*, 151, 573-578.
- (2) 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.
- (3) Yamauchi Y, Iwamoto N, Rogers MA, Abe-Dohmae S, Fujimoto T, Chang CC, Ishigami M, Kishimoto T, Kobayashi T, Ueda K, Furukawa K, Chang TY, Yokoyama S, (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. 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 8 件)

- (1) Yamauchi Y, Hasan M, Chang CC, Cellular Cholesterol Homeostasis in Alzheimer's Disease, Chang TY, *J Lipid Res*, 2017, 印刷中, 査読有.
DOI: 10.1194/jlr.R075630
- (2) Yamauchi Y, Yokoyama S, Chang TY, Methods for Monitoring ABCA1-Dependent Sterol Release, *Methods Mol Biol*, 1583, 2017, 257-273, 査読有.
DOI: 10.1007/978-1-4939-6875-6_19.
- (3) Expression of B4GALNT1, an essential Yamaguchi T, Yamauchi Y, Furukawa K, Ohmi Y, Ohkawa Y, Zhang Q, Okajima T, Furukawa K, glycosyltransferase for the synthesis of complex gangliosides, suppresses BACE1 degradation and modulates APP processing, *Sci Rep*, 6, 2016, 34505, 査読有.
DOI: 10.1038/srep34505
- (4) 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, Increased expression levels of ppGalNAc-T13 in lung cancers: Significance in the prognostic diagnosis, *Int J Oncol*, 49, 2016, 1369-1376, 査読有.
DOI: 10.3892/ijo.2016.3638
- (5) Yamauchi Y, Yokoyama S, Chang TY, ABCA1-dependent sterol release: sterol molecule specificity and potential membrane domain for HDL biogenesis, *J Lipid Res*, 57, 2016, 77-88, 査読有.
DOI: 10.1194/jlr.M063784
- (6) 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, Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor, *Nat Chem Biol*, 12, 2016, 402-410, 査読有.
DOI: 10.1038/nchembio.2059
- (7) Bhuiyan RH, Kondo Y, Yamaguchi T, Tokuda N, Ohkawa Y, Hashimoto N, Ohmi Y, Yamauchi Y, Furukawa K, Okajima T, Furukawa K, Expression analysis of O-series gangliosides in human cancer cell lines with monoclonal antibodies generated using knockout mice of ganglioside synthase genes, *Glycobiology*. 26, 2016, 984-998, 査読有.
DOI: 10.1093/glycob/cww049

- (8) Yamauchi Y, Iwamoto N, Rogers MA, Abe-Dohmae S, Fujimoto T, Chang CC, Ishigami M, Kishimoto T, Kobayashi T, Ueda K, Furukawa K, Chang TY, Yokoyama S., Deficiency in the lipid exporter ABCA1 impairs retrograde sterol movement and disrupts sterol sensing at the endoplasmic reticulum, *J Biol Chem*, 290, 2015, 23464-23477, 査読有.
DOI: 10.1074/jbc.M115.662668.

[学会発表] (計 19 件)

- (1) 山内祥生、横山信治, Ta-Yuan Chang, 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, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017/3/18-20, 京都女子大学, 京都府京都市.
- (2) 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, 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, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市.
- (3) 山内祥生、岩本紀之、Maximillian A. Rogers、堂前純子、藤本豊士、Catherine Chang、石神正登、岸本拓磨、小林俊秀、植田和光、古川鋼一、Ta-Yuan Chang、横山信治、ABC トランスポーター ABCA1 はダイナミン依存性エンドサイトーシスを介したステロール逆行輸送を調節する, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015/12/1-4, 神戸国際会議場, 兵庫県神戸市.
- (4) 山内祥生、太田晃成、渡邊瑞貴、五十嵐政智、上杉志成、古川鋼一, SCAP を標的とした新規低分子量化合物から明らかになったがん細胞における SREBP 依存的メバロン酸経路の重要性, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015/10/8-10, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市.
- (5) 金子慶、大川祐樹、橋本登、大海雄介、山内祥生、岡島徹也、小谷典弘、本家孝一、古川圭子、古川鋼一, ヒト melanoma 細胞における Neogenin 細胞内ドメイン (NeICD) 標的遺伝子の同定, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015/10/8-10, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市.
- (6) Robiul H. Bhuiyan, Yuji Kondo, Tokiaki Yamaguchi, Noriyo Tokuda, Yuki Ohkawa, Yuhsuke Ohmi, Yoshio Yamauchi, Keiko Furukawa, Tetsuya Okajima, Koichi Furukawa, Expression and roles of

- asialo-series gangliosides in human cancer cell lines, 第74回日本癌学会学術総会, 2015/10/8-10, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市.
- (7) 山内祥生, 五十嵐政智, 太田晃成, 古川鋼一, mTOR シグナルは小胞体での脂質センシングを制御し, がん細胞のリポジェニックフェノタイプを増強する, 第87回日本生化学会大会, 2014/10/15-18, 国立京都国際会館, 京都府京都市.
- (8) 金子慶, 大川祐樹, 橋本登, 大海雄介, 小川光貴, 山内祥生, 小谷典弘, 本家孝一, 古川圭子, 古川鋼一, GD3 発現メラノーマにおける Neogenin の悪性形質創出メカニズム, 第87回日本生化学会大会, 2014/10/15-18, 国立京都国際会館, 京都府京都市.
- (9) 山口世堯, 山内祥生, 松本康之, 橋本登, 大海雄介, 近藤裕史, 古川圭子, 古川鋼一, ガングリオシドによる APP 切断とその切断断片による酸化ストレス応答の制御, 第87回日本生化学会大会, 2014/10/15-18, 国立京都国際会館, 京都府京都市.
- (10) 太田晃成, 山内祥生, 山口世堯, 渡辺瑞貴, 古川圭子, 上杉志成, 古川鋼一, SREBP のプロセッシングを標的とした新規低分子化合物はメラノーマ細胞の悪性形質を抑制する, 第73回日本癌学会学術総会, 2014/9/25-27, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市.
- (11) Robiul H. Bhuiyan, Yuji Kondo, Tokiaki Yamaguchi, Noriyo Tokuda, Yoshio Yamauchi, Keiko Furukawa, Tetsuya Okajima, Koichi Furukawa, Establishment of anti-GD1alpha mAbs and expression analysis of asialo-series gangliosides in human cancer cell lines, 第73回日本癌学会学術総会, 2014/9/25-27, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市.
- (12) 山内祥生, Alkmini Papadopoulou, 古川鋼一, スフィンゴ糖脂質の生合成における p24 タンパク質の役割, 第33回日本糖質学会年会, 2014/8/10-12, 名古屋大学, 愛知県名古屋市.
- (13) 山内祥生, 山口世堯, 藤田盛久, 木下タロウ, 古川鋼一, スフィンゴ糖脂質合成の調節における p24 タンパク質の関与の検討, 第36回日本分子生物学会年会シンポジウム, 2013/12/3-6, 神戸国際会議場, 兵庫県神戸市.
- (14) 山内祥生, 五十嵐政智, 古川鋼一, mTOR signaling regulates sterol regulatory element binding proteins by mediating lipid sensing, 第72回日本癌学会学術総会, 2013/10/3-5, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市.
- (15) 金子慶, 大川祐樹, 橋本登, 大海雄介, 山内祥生, 小谷典弘, 本家孝一, 古川圭子, 古川鋼一, Roles of Neogenin in GD3-expressing human melanoma cells, 第72回日本癌学会学術総会, 2013/10/3-5, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市.
- (16) 山内祥生, 五十嵐政智, 古川鋼一, The lipogenic phenotype of human melanoma cells expressing ganglioside GD3 is regulated by mTOR-mediated lipid sensing at the ER, 第86回日本生化学会大会, 2013/9/11-13, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市.
- (17) 山口世堯, 山内祥生, 松本康之, 大川祐樹, 大海雄介, 橋本登, 近藤裕史, 古川圭子, 古川鋼一, ガングリオシドによる amyloid β precursor protein (APP) の切断パターンの制御及び APP 切断断片が細胞の健全性に与える影響, 第86回日本生化学会大会, 2013/9/11-13, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市.
- (18) 金子慶, 大川祐樹, 橋本登, 大海雄介, 山内祥生, 小谷典弘, 本家孝一, 古川圭子, 古川鋼一, GD3 発現メラノーマの悪性形質における Neogenin の機能, 第86回日本生化学会大会, 2013/9/11-13, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市.
- (19) 山口世堯, 山内祥生, 松本康之, 大川祐樹, 大海雄介, 橋本登, 近藤裕史, 古川圭子, 古川鋼一, ガングリオシド GM1 による APP の切断とその切断断片により誘導される細胞死の制御, 第32回日本糖質学会年会, 2013/8/5-7, 大阪国際交流センター, 大阪府大阪市.

[図書] (計 3 件)

- (1) 古川 鋼一, 大川 祐樹, 松本 康之, 大海雄介, 橋本 登, 山内 祥生, 古川 圭子, 「第3章 糖鎖と疾患: ガングリオシドによるがんの悪性形質の制御機構-神経外胚葉系腫瘍」『糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック-創薬・医療から食品開発まで (監修: 秋吉一成)』, 2015, 154-161, エヌ・ティー・エス (株).
- (2) Gangliosides: Synthesis and Function in Nervous Tissues, Furukawa K, Ohmi Y, Ohkawa Y, Hashimoto N, Yamauchi Y, Tajima O, Furukawa K, Glycoscience: Biology and Medicine, 2015, 551-556, Springer Japan.
DOI: 10.1007/978-4-431-54841-6_121
- (3) Beta-1, 4 N-Acetylgalactosaminyltransferase 1, 2 (B4GALNT1, 2), Furukawa K, Furukawa K, Ohmi Y, Ohkawa Y, Yamauchi Y, Hashimoto

N, Tajima O, Handbook of
Glycosyltransferases and Related
Genes, 2014, 417-428, Springer Japan.
DOI: 10.1007/978-4-431-54240-7_34

[産業財産権]
該当なし

[その他]
該当なし

6. 研究組織

(1) 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・特
任准教授
研究者番号：00444878

(2) 研究分担者

古川 鋼一 (FURUKAWA, Koichi)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号：80211530

(3) 連携研究者

上杉 志成 (UESUGI, Motonari)
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・
教授
研究者番号：10402926

(4) 研究協力者

CHANG, Ta-Yuan Chang (CHANG, Ta-Yuan
Chang)
Geisel School of Medicine at Dartmouth,
米国・教授