

令和元年9月28日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08252

研究課題名(和文) 多様な細胞機能を制御するレギュカルチンの病態生理的役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathophysiological role of regucalcin regulating diverse cell functions

研究代表者

村田 富保 (Murata, Tomiyasu)

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号：80285189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、膵臓癌を発症している患者において、腫瘍組織におけるレギュカルチン(regucalcin: RGN)の発現量が高い患者ほど生存率が高くなることを見出し、RGNが細胞増殖関連遺伝子の発現を調節することで癌細胞の増殖を抑制することを見出した。また、アルツハイマー病の発症には脳内のアミロイド β の余剰蓄積が関与しており、アミロイド β の神経毒性に対してRGNが保護効果を示すことを見出した。さらに、RGNが脂肪分化を促進することを見出し、RGNの発現上昇が肥満症の発症につながることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RGNによる癌細胞増殖抑制機構を解明することができれば、RGNを標的とした新しい癌の治療方法を提言できる。また、RGNがアルツハイマー病の発症を抑制することが証明できれば、RGNが神経変性疾患に対する防御因子として機能しているという新しい概念を提言できる。さらに、RGNによる脂肪分化の異常亢進が肥満症の発症や進行につながることを証明できれば、肥満症を抑制できる新しい概念を提言できる。以上のことから、RGNと病態成因との関連性が証明できれば、本研究は、癌、アルツハイマー病、肥満症の分子病態メカニズムを理解するうえで学術的意義が高く、新規治療法を確立するうえで社会的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined pathophysiological role of regucalcin in cancer, neurodegenerative disease and obesity. (1) The prolonged survival of patients with various types of cancers (colorectal cancer, liver cancer, lung cancer, breast cancer and pancreatic cancer) is associated with a higher regucalcin gene expression. Regucalcin suppressed proliferation of various types of human cancer cells by regulating expression of cell proliferation-related genes. (2) Excessive accumulation of amyloid- β in brain cells is the key defining event in the pathogenesis of Alzheimer's disease, reflecting the neurotoxicity of amyloid- β . Regucalcin possesses antioxidant activity against amyloid- β -induced oxidative and nitrosative stress. (3) Exogenous regucalcin enhanced adipogenesis by controlling the extracellular signal-related kinase pathway in 3T3-L1 adipocytes in vitro.

研究分野：生物系薬学 分子生物学

キーワード：レギュカルチン 癌 アミロイド β アルツハイマー病 脂肪分化 肥満症

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

1. 研究開始当初の背景

私共は、肝細胞内のカルシウムシグナル経路を解明することを目的として、新規カルシウム結合タンパク質としてレギュカルチン (regucalcin: RGN) を精製単離し、世界で初めて cDNA クローニングに成功していた。そして、RGN 遺伝子のプロモーター領域の解析を進め、RGN 遺伝子の転写調節機構を明らかにした。さらに、RGN の機能的役割についても研究を進め、以下に示した新知見をもとに RGN が多機能性タンパク質であることを報告してきた。

(1) ヒト RGN 遺伝子の発現が肝臓癌、膵臓癌、肺癌において低下しており、RGN が癌細胞の増殖を抑制することを見出し、癌の発症に RGN の機能低下が関与する可能性を報告した (Murata and Yamaguchi, *Int. J. Mol. Med.* 2015; Yamaguchi and Murata, *Mol. Med. Rep.* 2015; Yamaguchi and Murata, *Int. J. Mol. Med.* 2015)。

(2) RGN が脂肪細胞の分化を促進することを見出し、RGN が脂肪分化誘導過程に関与していることを報告した (Yamaguchi, Weitzmann, Baile, Murata, *Integr. Biol.* 2012)。

(3) RGN が骨芽細胞分化を抑制すると共に、破骨細胞分化を促進することを見出し、RGN が骨代謝に関与していることを報告した (Yamaguchi, Weitzmann, Murata, *Mol. Cell. Biochem.* 2012)。

一方、他の研究グループからは、RGN が加齢に伴って肝細胞内で減少するタンパク質として同定され、老化に伴って生じる組織障害を軽減させる因子として提唱された (Kondo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006)。また、RGN が精子形成過程で重要な役割を果たしていることが報告されていた (Laurentino et al., *Mol. Hum. Reprod.* 2012)。

以上のことから、本研究では、RGN の多機能性に関する知見をもとに、RGN の病態生理的役割を解明するための研究立案に至った。

2. 研究の目的

本研究では、癌、アルツハイマー病、肥満症における RGN の病態生理的役割を解明することを目的とした研究を実施した。具体的には、癌患者の腫瘍組織における RGN の発現量が癌患者の生存率に相関することを調べ、癌細胞に対する RGN の細胞増殖抑制効果を分子レベルで調べた。また、神経変性疾患の一つであるアルツハイマー病の発症因子であるアミロイド β の神経毒性に対する RGN の保護効果について調べた。さらに、RGN の過度な発現上昇が脂肪分化を異常に亢進し、肥満症の発症につながることを調べた。

3. 研究の方法

(1) 癌の病態機序における RGN の関与の解明

ヒト由来の大腸癌細胞、肝癌細胞、肺癌細胞、乳癌細胞、膵臓癌細胞に RGN 遺伝子を恒常的に過剰発現させた細胞株を単離した。細胞増殖能は、クリスタルバイオレッドを用いたコロニー形成アッセイによって測定した。癌原遺伝子、癌抑制遺伝子、細胞内シグナル伝達因子の発現量は、RGN 過剰発現細胞と mock 細胞から cell lysate を調製した後、特異的抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。

(2) アルツハイマー病の病態機序における RGN の関与の解明

マウス RGN 遺伝子あるいは β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子が組み込まれたレトロウイルスを PC12 細胞に感染させた後、RGN 過剰発現細胞および LacZ 過剰発現細胞 (コントロール細胞) を作製した。アポトーシス細胞数の測定は、TUNEL 染色陽性の細胞数を調べることで算出した。ミトコンドリア膜電位は、細胞を膜電位反応試薬 TMRM で処理した後、赤色蛍光強度を測定することで測定した。カスパーゼ活性は、cell lysate に蛍光特異的基質を添加して測定した。細胞培養メディアウム中の一酸化窒素 (NO) 量は、Griess 法にもとづいて測定した。誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現量は、抗 iNOS 抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。NF- κ B の転写活性化能は、NF- κ B 応答エレメントを有するレポーターベクターを細胞に遺伝子導入して測定した。細胞内のニトロ化チロシン量は、cell lysate を調製した後、ELISA キットを用いて測定した。

(3) 肥満症の病態機序における RGN の関与の解明

肥満モデルラットとコントロールラットから白色脂肪細胞を単離して cell lysate を調製した後、抗 RGN 抗体を用いたウエスタンブロット法により、RGN の発現量を解析した。マウス RGN 遺伝子が組み込まれたレトロウイルスあるいは外来遺伝子が組み込まれていないレトロウイルスを脂肪前駆 3T3L1 細胞に感染させて、RGN 過剰発現細胞及び mock 細胞 (コントロール細胞) を作製した。3T3L1 細胞の脂肪分化は、インスリン、デキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチンを含有するメディアウムを用いて分化誘導した。

4. 研究成果

(1) 癌の病態機序における RGN の関与の解明

大腸癌、肝癌、肺癌、乳癌、膵臓癌を発症している癌患者の腫瘍組織を用いて RGN の発現量を解析したところ、腫瘍組織における RGN の発現量が高いほど、生存率も高くなることを見出した。そこで、RGN の発現量が癌細胞の増殖能に影響を及ぼすと考え、ヒト由来の大腸癌 RKO

細胞, 肝癌 HepG2 細胞, 肺癌 A549 細胞, 乳癌 MDA-MB-231 細胞, 膵臓癌 MIA PaCa-2 細胞に RGN 遺伝子を過剰発現させて, 細胞増殖が抑制されるか否かを調べた。その結果, いずれの癌細胞でも RGN を過剰発現させることで, 細胞増殖が有意に抑制された。また, RGN は細胞周期の G2/M 期を停止させると共に, 癌原遺伝子である ras, c-fos, c-jun の発現を低下させ, 癌抑制遺伝子である p53, Rb, p21 の発現を上昇させることを見出した。さらに, RGN が細胞増殖に関与する MAP キナーゼ経路や PK3 キナーゼ/Akt 経路の活性化を抑制することも見出した。以上の結果から, RGN が癌の発症や進展を抑制する生体内因子であることが示唆され, RGN を標的とした遺伝子治療システムの構築が癌治療において有用であることが考えられた。

(2) アルツハイマー病の病態機序における RGN の関与の解明

神経成長因子によって神経細胞様に分化した PC12 細胞を, アルツハイマー病の発症因子であるアミロイド で処理したところ, RGN 過剰発現細胞では, LacZ 過剰発現コントロール細胞に比べて, TUNEL 陽性のアポトーシス細胞数の増加が有意に抑制された。また, アミロイド 処理によって惹起されるミトコンドリアの膜電位の低下やカスパーゼ-9/3 の活性上昇も, RGN の過剰発現によって有意に抑制された。以上の結果より, アミロイド 処理条件下では, RGN はミトコンドリア膜電位の低下を抑制することで, カスパーゼ経路の活性化にもとづくアポトーシス誘導を阻止することが示唆された。

また, 神経細胞様に分化した RGN 過剰発現 PC12 細胞をアミロイド で処理したところ, LacZ 過剰発現コントロール細胞に比べて, NO の過剰産生が有意に抑制されると共に, NO の過剰産生に関与する iNOS の発現誘導が NF- κ B の転写活性化能の低下に伴って有意に抑制された。さらに, アミロイド による細胞内ニトロ化チロシン量の増加が RGN の過剰発現によって有意に抑制された。以上の結果から, アミロイド 処理条件下では, RGN が NF- κ B の転写活性化を阻害することで, NF- κ B 応答遺伝子である iNOS の発現誘導を抑制し, その結果として, NO 過剰産生にもとづくニトロ化ストレスが軽減されることが示唆された。

(3) 肥満症の病態機序における RGN の関与の解明

RGN を過剰発現させたトランスジェニックラットにおいて, 週齢の増加に伴って高脂血症が発症することを見出しており, 脂質代謝異常と RGN の関連性について調べた。肥満モデルラットの脂肪組織において, コントロールラットに比べて, RGN の発現が有意に上昇していることを見出した。さらに, mock 3T3L1 細胞と RGN 過剰発現 3T3L1 細胞を, 脂肪分化誘導剤で処理したところ, RGN の発現上昇に伴って脂肪分化が亢進することが判明した。以上の結果から, RGN が 3T3L1 細胞の脂肪分化を促進することが判明し, RGN による脂肪分化の異常亢進が肥満症の発症につながることを示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Masayoshi Yamaguchi, Satoru Osuka, Tomiyasu Murata (2018) Prolonged survival of patients with colorectal cancer is associated with a higher regucalcin gene expression: Overexpression of regucalcin suppresses the growth of human colorectal carcinoma cells in vitro. *International Journal of Oncology*, 53(3), 1313-1322.
doi: 10.3892/ijo.2018.4458 査読有

Masayoshi Yamaguchi, Tomiyasu Murata (2018) Exogenous regucalcin suppresses the growth of human liver cancer HepG2 cells in vitro. *Oncology Reports*, 39(6) 2924-2930.
doi: 10.3892/or.2018.6357 査読有

Tomiyasu Murata, Masayoshi Yamaguchi, Susumu Kohno, Chiaki Takahashi, Mitsumi Kakimoto, Yukiko Sugimura, Mako Kamihara, Kiyomi Hikita, Norio Kaneda (2018) Regucalcin confers resistance to amyloid- toxicity in neuronally differentiated PC12 cells. *FEBS Open Bio*, 8(3) 349-360.
doi: 10.1002/2211-5463.12374 査読有

Kiyomi Hikita, Natsuki Hattori, Aya Takeda, Yuko Yamakage, Rina Shibata, Saori Yamada, Kuniki Kato, Tomiyasu Murata, Hitoshi Tanaka, Norio Kaneda (2018) Potent apoptosis-inducing activity of erypoeigin K, an isoflavone isolated from *Erythrina poeppigiana*, against human leukemia HL-60 cells. *Journal of Natural Medicines*, 72(1), 260-266.
doi: 10.1007/s11418-017-1147-9 査読有

Masayoshi Yamaguchi, Tomiyasu Murata (2017) Involvement of regucalcin gene promoter region-related protein-p117, a transcription factor, in human obesity. *Biomedical Reports*, 6(4), 374-378.
doi: 10.3892/br.2017.874 査読有

Masayoshi Yamaguchi, Satoru Osuka, Mamoru Shoji, M. Neale Weitzmann, Tomiyasu Murata (2017) Survival of lung cancer patients is prolonged with higher regucalcin gene expression: suppressed proliferation of lung adenocarcinoma A549 cells in vitro. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 430(1-2), 37-46.

doi: 10.1007/s11010-017-2952-x 査読有

Masayoshi Yamaguchi, Satoru Osuka, M. Neale Weitzmann, Bassel F. El-Rayes, Mamoru Shoji, Tomiyasu Murata (2016) Prolonged survival in hepatocarcinoma patients with increased regucalcin gene expression: HepG2 cell proliferation is suppressed by overexpression of regucalcin in vitro. *International Journal of Oncology*, 49(4), 1686-1694.

doi: 10.3892/ijo.2016.3669 査読有

Masayoshi Yamaguchi, Tomiyasu Murata (2016) Potential suppressive effects of gentian violet on human breast cancer MDA-MB-231 cells in vitro: Comparison with gemcitabine. *Oncology Letters*, 12(2), 1605-1609.

doi: 10.3892/ol.2016.4773 査読有

Masayoshi Yamaguchi, Satoru Osuka, M. Neale Weitzmann, Mamoru Shoji, Tomiyasu Murata (2016) Increased regucalcin gene expression extends survival in breast cancer patients: Overexpression of regucalcin suppresses the proliferation and metastatic bone activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells in vitro. *International Journal of Oncology*, 49(2), 812-822.

doi: 10.3892/ijo.2016.3538 査読有

Masayoshi Yamaguchi, Satoru Osuka, M. Neale Weitzmann, Bassel F. El-Rayes, Mamoru Shoji, Tomiyasu Murata (2016) Prolonged survival in pancreatic cancer patients with increased regucalcin gene expression: Overexpression of regucalcin suppresses the proliferation in human pancreatic cancer MIA PaCa-2 cells in vitro. *International Journal of Oncology*, 48(5), 1955-1964.

doi: 10.3892/ijo.2016.3409 査読有

[学会発表](計5件)

村田富保, 河野 晋, 高橋智聡, 疋田清美, 金田典雄: PC12 細胞におけるアミロイド 誘導性の細胞内ストレスに対する regucalcin の保護作用: 第 41 回日本分子生物学会年会 平成 30 年 11 月 28 日(横浜)

服部緩菜, 徳井麗佳, 疋田清美, 金田典雄, 村田富保: 脂肪分化におけるレギュカルチンの機能的役割の解析: 第 64 回日本薬学会東海支部大会 平成 30 年 6 月 30 日(名古屋)

瀧川和希, 井藤千裕, 糸魚川政孝, 疋田清美, 金田典雄, 村田富保: レギュカルチン発現誘導化合物による炎症性メディエーターの産生抑制効果: 第 64 回日本薬学会東海支部大会 平成 30 年 6 月 30 日(名古屋)

徳井麗佳, 服部緩菜, 河野 晋, 高橋智聡, 疋田清美, 金田典雄, 村田富保: 線維芽細胞 3T3L1 細胞におけるレギュカルチンの脂肪分化促進効果: 日本薬学会第 138 年会 平成 30 年 3 月 26 日(金沢)

神原真子, 杉村祐貴子, 河野 晋, 高橋智聡, 疋田清美, 金田典雄, 村田富保: 神経細胞様に分化した PC12 細胞におけるアミロイド 毒性に対するレギュカルチンの保護効果: 日本薬学会第 138 年会 平成 30 年 3 月 26 日(金沢)

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 河野 晋

ローマ字氏名: Kohno Susumu

研究協力者氏名: 疋田 清美

ローマ字氏名: Hikita Kiyomi

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。