

令和元年6月12日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08373

研究課題名(和文) オーフアントランスポーターによる細胞老化調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation mechanism of cell senescence by 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(薬)・准教授

研究者番号：20466535

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)：オーファントランスポーターSLC22A18は細胞内小器官の膜に発現し、ヘキサミン経路に関わるタンパク質と代謝物の発現を変動させることによって、タンパク質のO-GlcNAc化に与ることが示唆された。細胞老化とがん化に関わるp53タンパク質がO-GlcNAc化を受けている可能性が示唆され、また、SLC22A18発現低下ががんの悪性を増加させたことから、SLC22A18は細胞老化とがん化に関わる重要な分子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、オーファントランスポーターSLC22A18の生理・病態機能の一旦を明らかにすることができ、SLC22A18の分子機能の解明につながるだけでなく、本研究手法がオーファントランスポーター研究の発展につながることを期待される。また、SLC22A18の発現変動によって細胞老化とがん化が調節される可能性が見出されたことから、SLC22A18による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を標的とした新規老化とがん発症を抑制する創薬につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The orphan transporter SLC22A18 is expressed on the membrane of intracellular organelles, and the expression of proteins and metabolites involved in the hexosamine pathway is increased in HEK293 cells expressing SLC22A18. Western blot analysis suggests that O-GlcNAcylation of the p53 protein involved in cell senescence and carcinogenesis was increased in HEK293 cells expressing SLC22A18. By contrast, that reduction of SLC22A18 expression increased cancer malignancy. These results suggest that SLC22A18 is involved in cellular senescence and canceration.

研究分野：分子薬理学

キーワード：オーファントランスポーター 細胞老化 がん 定量プロテオーム解析

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

### 1. 研究開始当初の背景

日本は高齢化率が20%を超える世界のどこの国も経験したことがない高齢化社会を迎えている。近年、生活習慣の欧米化によって日本人の肥満率が増加し、糖尿病やメタボリック症候群といった代謝性疾患が急増している。これら疾患発症には過食・肥満に伴う内臓脂肪の蓄積とそれに伴う慢性炎症が関与することが明らかになっている。p53 はがん抑制遺伝子として非常によく知られているが、近年、p53 はその活性化に依存する細胞老化シグナルによって加齢の進行や様々な代謝疾患病態に関与することが解明されてきている。特に、肥満に伴う p53 依存性シグナル活性化は脂肪細胞の老化促進や炎症を惹起し、悪玉アディポカインなどの液性因子を産生して全身性のインスリン抵抗性や血管障害を引き起こすことが報告されている。SLC22A18 は申請者が独自に開発した質量分析計を用いたタンパク質一斉定量法(標的プロテオミクス)によってヒト組織に発現することを見出した薬物や生体内基質の輸送担う SLC22A ファミリーに属している機能未知オーファントランスポーターである。遺伝学的解析から、SLC22A18 は腫瘍形成や脂質異常症と関連がある疾患関連遺伝子であることが報告されている。また、GWAS 解析からインスリン抵抗性を惹起するII型糖尿病発症遺伝子として KCNQ1 があり、日本人のII型糖尿病発症関連遺伝子において、現時点で最も重要な遺伝子である。興味深いことに、SLC22A18 発現は、KCNQ1 由来の non-coding RNA である KCNQ1OT1 により制御を受けることが報告されている。したがって、KCNQ1 の変異によるII型糖尿病発症に SLC22A18 が関与している可能性が考えられる。

以上の知見から、SLC22A18 は老化シグナルの調節スイッチとして加齢に伴う代謝性疾患の発症とがん発症の両方に重要な分子であることが考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は「SLC22A18 の発現増加が翻訳後修飾である O-GlcNAc 化による p53 タンパク質安定化と細胞内シグナル伝達活性化を引き起こしインスリン抵抗性が惹起されること、また、SLC22A18 の発現低下ががん発症およびがん病態を悪化させること」を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) SLC22A18 安定発現 293 細胞の構築

SLC22A18 安定発現細胞株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。

#### (2) SLC22A18 特異的 shRNA 導入 MCF7 細胞の構築

SLC22A18 に特異的な shRNA を 4 つ設計し、乳がん細胞株である MCF-7 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。本細胞に ScreenFectA siRNA (WAKO)を用いて siRNA を導入し、48 時間後に細胞を解析した。

#### (3) 細胞分画

100 mm dish 2~3 枚に培養した細胞に対して、細胞膜回収キット (BIO VISION)を用いて、当研究室で改変したプロトコールに従って細胞質画分、粗膜画分および細胞膜画分を分画した。タンパク質量は BSA を標準とした BCA アッセイキットを用いて行った。

#### (4) Western blot 法によるタンパク質発現解析

タンパク質溶液を Laemmli buffer と混合し、37°C、30 分間もしくは 95°C、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 次抗体を反応させた。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) SWATH 法を用いた網羅的タンパク質定量解析

細胞質画分に対して PTS 法を用いてトリプリン前処理を行った。網羅的定量プロテオミクスは nanoLC と TT5600 を組み合わせて、SWATH™ Acquisition を用いて解析した。得られた測定結果から 2 細胞間のタンパク質発現変動を fold change および有意差検定 (t-検定)によって行った。

#### (6) GO 解析および分子間ネットワーク解析

プロテオミクスデータに基づくネットワーク解析は DAVID を用いた GO 解析と生物学に関する論文などを網羅した分子間相互作用解析を行える KeyMolnet を用いて行った。

#### (7) 細胞増殖試験

細胞を collagen coated 96 well plate に播種し、播種後 1 日後に各種試薬による処理を行い、3 日後における細胞数を Cell-Counting kit8 (DOJINDO) を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) SLC22A18 発現 293 細胞におけるタンパク質と代謝物の変動解析

p53 タンパク質の発現を Western blot 法を用いて解析したところ、SLC22A18 発現 293 細胞において p53 タンパク質の発現増加が観察された。一方、p53 タンパク質のリン酸化には変動は観察されなかった。次に、SLC22A18 発現増加によって変動するタンパク質および代謝物の発現変動を SWATH 法による定量プロテオミクスおよびメタボロミクスを用いて検討した。その結果、SLC22A18 発現 293 細胞においてヘキソサミン合成経路に関わる酵素と代謝物が増加していることを見出した。この結果から、UDP-GlcNAc を基質とする翻訳後修飾であるタンパク質の O-グリコシル化の増加が予想されたため Western blot 法を用いて解析したところ、SLC22A18 発現 293 細胞では複数の O-グリコシル化タンパク質の発現が増加していた。SLC22A18 発現 293 細胞において、タンパク質の O-グリコシル化を検討したところ、複数のタンパク質の O-グリコシル化が増加していた。その中で、抗 p53 抗体で検出されるバンドと同じ分子量のタンパク質において O-グリコシル化が増加しており、SLC22A18 発現増加によって p53 が O-グリコシル化されている可能性を見出した。一方、SLC22A18 発現 293 細胞において、Western blot 解析から炎症反応に必要なさまざまな遺伝子を活性化させて炎症反応を誘導する NF- $\kappa$ B の発現が増加していた。また、SLC22A18 発現 293 細胞において、細胞内の活性酸素量が増加していた。以上の結果から、SLC22A18 は細胞内小器官に発現し、p53 の O-グリコシル化による機能変動や活性酸素産生を介して細胞老化と炎症を制御していることが考えられた。

##### (2) SLC22A18 発現 293 細胞におけるインスリン感受性の解析

SLC22A18 発現増加がインスリン感受性に与える影響を解析するために、SLC22A18 発現 293 細胞にインスリンを添加し、インスリンによって活性化される Akt のリン酸化 (pAkt) を解析した。その結果、野生型 293 細胞ではインスリンによって pAkt の増加が観察されたのに対し、SLC22A18 ではインスリンによる pAkt の増加は観察されなかった。従って、SLC22A18 発現増加によってインスリンシグナルが減弱することが示唆された。

##### (3) MCF7 細胞における SLC22A18 の発現局在

細胞老化とがん化は密接に関係していることから、SLC22A18 発現低下は細胞老化を抑制して細胞のがん化を促進させることが考えられた。そこで SLC22A18 を発現するヒト乳がん MCF7 細胞に SLC22A18 shRNA を遺伝子導入して SLC22A18 遺伝子ノックダウン細胞を樹立した。MCF7 細胞における SLC22A18 タンパク質の発現局在を細胞分画法を用いて検討した結果、粗膜画分に最も発現が高かった。この結果は、SLC22A18 発現細胞で得られた結果と一致している。したがって、SLC22A18 は細胞小器官膜に発現していることが示唆された。

##### (4) MCF7 細胞における SLC22A18 発現低下によるタンパク質発現変動解析

SLC22A18 発現低下によって変動するタンパク質発現を SWATH 法による網羅的定量プロテオミクスによって解析した。その結果、SLC22A18 のノックダウンによって 31.0% の細胞質タンパク質の発現量が有意に変動した (図 1)。この中で、SLC22A18 ノックダウンによって最も発現が増加したタンパク質は Annexin A8 であり、最も発現が低下したタンパク質は DCLK1 であった。GO 解析の結果、最も変動が推定されたのは metabolic pathways の変化であり、TCA 回路や脂肪酸代謝も変動していることが推定された。分子間ネットワーク解析を行った結果、腫瘍の悪性度や乳がん患者における生存率を低下させるタンパク質が同定されていることがわかった。CD44 は乳がんの CSC マーカーであり、SLC22A18 ノックダウン MCF7 細胞において発現が有意に増加した。

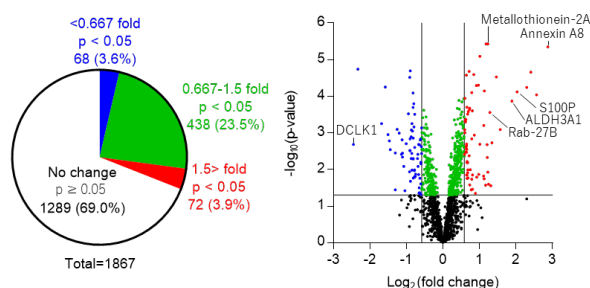


図1 SWATH法を用いたMCF7細胞におけるSLC22A18ノックダウンによるタンパク質発現変動解析

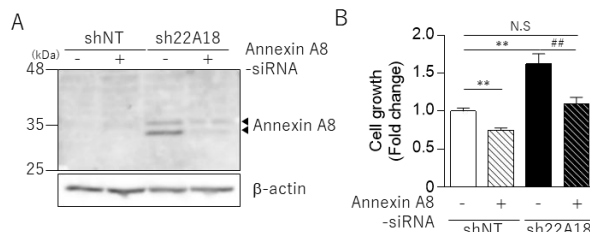


図2 SLC22A18ノックダウンによるMCF7細胞の細胞増殖増加におけるAnnexinA8の関与  
A タンパク質発現解析、B 細胞増殖解析

##### (5) MCF7 細胞における細胞増殖増加における Annexin A8 の関与

SLC22A18 発現をノックダウンすることによって、MC7 細胞の細胞増殖は有意に増加した。この細胞増殖増加に Annexin A8 が関与するかを siRNA によるノックダウン法を用いて検討したところ、Annexin A8 の発現をノックダウンすることによって細胞増殖は有意に低下した(図 2)。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Ito S, Honda G, Fujino Y, Ogata S, Hirayama-Kurogi M, Ohtsuki S. Knockdown of Orphan Transporter SLC22A18 Impairs Lipid Metabolism and Increases Invasiveness of HepG2 Cells. *Pharmaceutical research*. 36 (3): 39 (2019). (査読あり)
2. Ito S, Fujino Y, Ogata S, Hirayama-Kurogi M, Ohtsuki S. Involvement of an Orphan Transporter, SLC22A18, in Cell Growth and Drug Resistance of Human Breast Cancer MCF7 Cells. *Journal of pharmaceutical sciences*. 107 (12): 3163-3170 (2018). (査読あり)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Shingo Ito, Yu Fujino, Sumio Ohtsuki: SLC22A18 is involved in the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells by altering cellular protein expression, Japan-Turkey International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Kumamoto, Japan, 2-3 Oct, 2016
2. 藤野優、伊藤慎悟、大槻純男: ヒト乳がん細胞におけるオーファントランスポーター SLC22A18 のがん抑制機能の解明、第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2016 年 11 月 11-18 日、名古屋
3. 伊藤慎悟: SWATH による網羅的タンパク質定量法を用いた薬物動態研究の新展開、第 137 回日本薬学会 2017 年 3 月 25-27 日、仙台
4. 伊藤慎悟、本多玄太郎、赤澤貴憲、寺崎哲也、大槻純男: オーファントランスポーター SLC22A18 のタンパク質翻訳後修飾への関与、日本プロテオーム学会 2017 年 7 月 26-27 日、大阪
5. 伊藤慎悟、本多玄太郎、赤澤貴憲、寺崎哲也、大槻純男: トランスオミクスによるオーファントランスポーター SLC22A18 の生理機能解明、第 41 回九州シンポジウム 2017 年 8 月 31-9 月 2 日、阿蘇
6. 伊藤慎悟、本多玄太郎、赤澤貴憲、寺崎哲也、大槻純男: トランスオミクスによる SLC22A18 の生理機能の解明、第 10 回トランスポーター研究会九州部会、2017 年 9 月 2 日、熊本

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 <http://ohtsuki-lab.jp/ja/>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 大槻 純男

ローマ字氏名: Ohtsuki Sumio

所属研究機関名: 熊本大学

部局名: 大学院生命科学研究部(薬)

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 60323036

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 増田豪

ローマ字氏名: Masuda Takeshi

※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。