

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 若手研究(B)  
 研究期間： 2008 ～ 2009  
 課題番号： 20790796  
 研究課題名(和文) 酸性糖脂質によって活性化される脂質代謝経路の解析とそのメラノーマ治療戦略への応用  
 研究課題名(英文) Analysis of lipid metabolic pathway activated by ganglioside in human melanoma cells and its application to melanoma therapy  
 研究代表者  
 山内 祥生 ( YAMAUCHI YOSHIO )  
 名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：00444878

研究成果の概要(和文)： 細胞膜ドメインは、がん細胞において、その悪性形質の発現に重要な役割を果たしている。そこで、ヒトメラノーマ細胞において、膜ドメインの構成必須因子のコレステロールを中心とした脂質代謝と悪性形質との関連性につき検討した。その結果、メラノーマ細胞において、コレステロールの生合成は特異的な転写因子の Akt シグナルを介したスイッチによって調節されていることが明らかになった。また、そのスイッチを阻害することでメラノーマ細胞の増殖は強く抑制され、メラノーマ制御の新しい治療標的となりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Plasma membrane microdomains plays crucial roles in malignant properties of various cancer cells. Metabolism of cholesterol, an essential component of the microdomains, and its role in malignant phenotype of melanoma cells were investigated. The results show that Akt signaling serves as a molecular switch to

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：メラノーマ、ガングリオシド、脂質代謝、Akt シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

がんは、我が国における死因の約3分の1を占め、死因の第1位となっている。がんは、諸外国でも主要な死因の1つとなっており、その克服は我が国だけでなく、国際的にも重要な課題である。メラノーマは、悪性度の極

めて高い皮膚がんの一種で、特に転移後の有効な治療法はほとんどなく、有効な新しい治療法の開発が期待されている。

がん細胞では、様々な糖鎖構造の変化がみられる。糖鎖構造の変化は、タンパク質だけでなく脂質分子にもみられ、がん細胞

では特徴的なスフィンゴ糖脂質の発現がしばしばみられ、その糖脂質が悪性形質の発現に重要な役割を果たしていることが示唆されている。メラノーマ細胞では特徴的な酸性糖脂質の発現が見られ、特にジシアリル糖脂質 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。メラノーマ細胞において GD3 はその悪性形質の発現に重要であり、GD3 が脂質ラフトで増殖や接着のシグナルを増強していることが示唆されている。しかしながら、GD3 依存的な悪性形質発現の分子メカニズムは十分に理解されておらず、その解明はメラノーマの新しい治療法の開発に向けた標的分子を探索する上で、極めて重要である。

## 2. 研究の目的

メラノーマは、悪性度の極めて高い皮膚がんの一つで、特に転移後の有効な治療法はほとんどなく、有効な新しい治療法の開発が期待されている。メラノーマ細胞では、ガングリオシド GD3 の発現がみられる。最近の我々の研究結果より、GD3 がメラノーマ細胞の悪性形質を増強していることが明らかになったが、その分子メカニズムは十分に理解されていない。

GD3 などのスフィンゴ糖脂質は、細胞膜の脂質ラフトと呼ばれる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、細胞情報伝達系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。特に、コレステロールは脂質ラフトの構成に必須の役割を果たしており、細胞内コレステロール恒常性と脂質ラフトの機能は密接に関連している。したがって、細胞内コレステロール恒常性は様々なコレステロールセンサーによって厳密に調節されている。中でも、sterol regulatory element binding protein (SREBP) はコレステロールや脂肪酸生合成に関与する多くの遺伝子発現を調節する転写因子として、コレステロール恒常性に重要な役割を果たしている。SREBP は、Site 1 protease (S1P) と S2P という 2 種類のプロテアーゼによる切断を受けることで転写活性を含むドメインが放出され、活性化される。この活性化は、細胞内ステロールレベルで厳密に調節されている。一方、がん細胞では、代謝変化がよく観察される。脂質代謝の変化もしばしばみられ、いくつかのがん細胞では、脂質合成の亢進が報告されている。しかしながら、メラノーマ細胞における脂質代謝変化の報告はこれまでない。がん細胞における脂質合成亢進の分子メカニズムは十分に理解されていない他、その腫瘍生物学的な意義も分かっていない。そこで、本研究では、メラノーマ細胞における脂質代謝変化とその腫瘍生物学

的意義、またその分子メカニズムにつき検討し、脂質代謝がメラノーマ治療の標的となるか検討するものである。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞

ヒトメラノーマ細胞株として、SK-MEL-25, SK-MEL-26, SK-MEL-28, SK-MEL-31, SK-MEL-37, SK-MEL-130, SK-MEL-131, SK-MEL-173 及び MEWO を用いた。また、SK-MEL-28 由来 GD3 欠損細胞株として SK-MEL-28-N1 (以下、N1) を用いた。N1 細胞に GD3 合成酵素 cDNA を安定導入した細胞株として、G5 及び G11 細胞株を用いた。

### (2) 細胞膜ドメインの調製

メラノーマ細胞を 1% Lubrol WX で処理し、細胞ライセートを調製した。細胞ライセートに最終濃度が 37.5% となるよう OptiPrep を加えた後、これを試験管の底に置き、次に 30% OptiPrep、その上にバッファーを重層した。試験管を 200,000 xg で遠心した後、フラクションを回収した。

### (3) タンパク質の発現解析

メラノーマ細胞を増殖因子で刺激した後、細胞ライセートを調製し、ウエスタンブロット法にて、Akt のリン酸化や SREBP の活性化、脂質合成酵素の発現につき解析した。

### (4) 細胞増殖アッセイ

コレステロール合成阻害剤や SREBP 阻害剤の細胞増殖能への影響は、MTT アッセイにて測定した。

### (5) 脂質合成アッセイ

メラノーマ細胞を放射能標識した酢酸と培養した後、細胞から脂質を抽出した。脂質は、薄層クロマトグラフィーで分離した後、コレステロール及びホスファチジルコリン画分の放射能活性を液体シンチレーションにて測定した。

## 4. 研究成果

### (1) メラノーマ細胞における GD3 発現に伴う脂質代謝変化

ヒトメラノーマ細胞では、SREBP の活性化がみられた他、コレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素の発現も高くなっていた。しかしながら、GD3 欠損メラノーマ細胞では、SREBP の活性化がほとんどみられず、HMG-CoA 還元酵素の発現も弱くなっていた。GD3 の発現が、SREBP の活性化やそれに伴う脂質代謝の変化に影響を及ぼしている可能性が示唆されたので、GD3 欠損メラノーマ細胞株に GD3 合成酵素遺伝子を導入し、GD3 を安定発現する細胞と GD3 欠損細胞を比較す

ることで、GD3 の影響を検討した。その結果、GD3 発現細胞株において、コレステロール合成の亢進、HMG-CoA 還元酵素の発現増加、SREBP の活性化が認められ、GD3 の発現が SREBP の活性化を誘導し、コレステロール合成を亢進させていることが示唆された。

### (2) メラノーマ細胞におけるコレステロール合成阻害剤及び SREBP 阻害剤の影響

メラノーマ細胞では、SREBP の活性化とコレステロール合成の亢進がみられたことから、これらがメラノーマ細胞の悪性形質にどのような役割を果たしているか、検討した。その結果、メラノーマ細胞をコレステロール合成阻害剤 (HMG-CoA 還元酵素阻害剤やスクアレンエポキシダーゼ阻害剤) は、メラノーマ細胞の増殖を顕著に抑制することが示された。また、SREBP を阻害することで、同様にメラノーマ細胞の増殖は顕著に抑制された。以上のことから、メラノーマ細胞において、コレステロール合成の亢進は、メラノーマ細胞の増殖に非常に重要な役割を果たしていることが示唆された。

### (3) SREBP の活性化に関するシグナル伝達

GD3 は増殖因子刺激に伴うシグナル伝達を増強していることが報告されているので、GD3 を介したシグナルが SREBP の活性化を惹起していると考えられた。GD3 は、増殖因子刺激に伴う Akt の活性化を増強することが示されている。また、いくつかの細胞種で Akt が SREBP の活性を調節していることが報告されている。したがって、メラノーマ細胞において、Akt が SREBP の活性化に関与しているかにつき検討した。その結果、ヒトメラノーマ細胞において、Akt を阻害することで、SREBP の活性化は顕著に抑制された。さらに、Akt を阻害することで、増殖因子刺激によるコレステロール合成の亢進や HMG-CoA 還元酵素の増加も阻害された。また、Akt によって制御を受ける別のキナーゼ、mammalian Target of Rapamycin complex 1 (mTORC1) の特異的阻害剤であるラパマイシンによっても、SREBP の活性化は阻害された。以上の結果から、ヒトメラノーマ細胞において、SREBP の活性化やそれに伴う脂質合成の亢進は、Akt-mTORC1 シグナルによって制御されていることが示唆された。

### (4) 結論

ヒトメラノーマ細胞では、糖脂質 GD3 の発現が特異的にみられ、メラノーマのがん抗原としても知られている。GD3 は、脂質ラフトにおいて細胞外からのシグナルを増強していることが報告されている。本研究において、GD3 を介した Akt-mTORC1 シグナルは、SREBP の活性化を引き起こし、脂質ラフト構造の必

須因子であるコレステロール合成を制御していることが明らかになった (図 1)。コレステロール合成阻害剤や SREBP の阻害剤によって、ヒトメラノーマ細胞の増殖が顕著に抑制されることから、Akt-mTORC1 シグナルを介した脂質合成の活性化は、ヒトメラノーマ細胞の増殖に極めて重要な役割を果たしていることが示唆された。

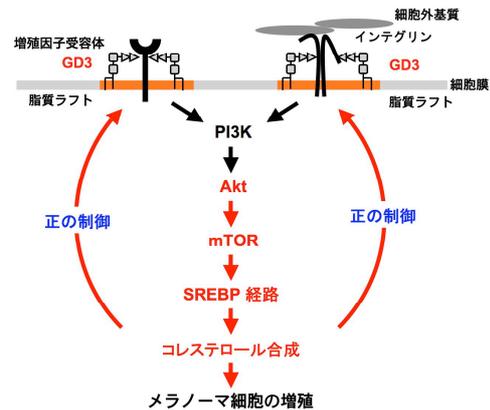


図 1. メラノーマ細胞における脂質合成亢進メカニズムのモデル

### (5) 今後の展望

代謝変化は、がん細胞全般にわたる生化学的な特徴の一つであり、脂質の代謝変化も報告されている。本研究で明らかになったように、ヒトメラノーマ細胞では、コレステロール合成の亢進が認められ、コレステロール合成を制御している転写因子 SREBP の活性化も認められた。さらに、コレステロール合成阻害剤や SREBP 阻害剤は、メラノーマ細胞の増殖を顕著に抑制する。今後は、SREBP 経路を中心とした脂質代謝の制御やそれに伴う膜ドメイン制御を標的としたメラノーマの治療法につきさらに検討されることが期待される。

### 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 2 件)

- ① Dong Y., Ikeda K., Hamamura K., Zhang Q., Kondo Y., Matsumoto Y., Ohmi Y., Yamauchi Y., Furukawa K., Taguchi R., Furukawa K. GM1/GD1b/GA1 synthase expression results in the reduced cancer phenotypes with modulation of composition and raft-localization of gangliosides in a melanoma cell line.

(in press, 2010). 査読有

- ② 古川鋼一、山内祥生、章青、大海雄介、古川圭子. 脂質ラフトを介するシグナル制御と糖脂質糖鎖機能. 日本内分泌学会雑誌 **84: 147. 2008.** 査読無

[学会発表] (計5件)

- ① 山内祥生、古川圭子、古川鋼一. Role of SREBP pathway in Akt signaling in human melanoma cells. 第82回日本生化学会大会、2009年10月、神戸.
- ② 山内祥生、古川圭子、古川鋼一. ヒトメラノーマ細胞においてSREBP経路はAktシグナルによって制御されている。第68回日本癌学会学術総会、2009年10月、横浜.
- ③ 山内祥生、渡邊夕樹、宮崎清香、古川圭子、古川鋼一. Ganglioside GD3-dependent Akt signaling leads to activation of SREBP to regulate lipogenesis in human melanoma cells. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月、神戸.
- ④ 山内祥生、渡邊夕樹、宮崎清香、古川圭子、古川鋼一. ヒトメラノーマ細胞においてganglioside GD3はAktシグナルを介してSREBPを活性化する。第67回日本癌学会学術総会、2008年10月、名古屋.
- ⑤ 古川鋼一、山内祥生、浜村和紀、章青、大海雄介、愛新覚羅維、古川圭子. 脂質ラフトを介するシグナル制御と糖脂質糖鎖. 第81回日本内分泌学会学術総会、2008年5月、青森.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山内 祥生 (YOSHIO YAMAUCHI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：00444878