

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20890207

研究課題名(和文) 足場非依存下に癌細胞死を誘導する新規ステロールの作用機構

研究課題名(英文) Mechanism for novel sterols induced anchorage-independent cancer cell death

研究代表者

田中 亜路 (TANAKA ARO)

岩手医科大学・薬学部・助手

研究者番号：60509040

研究成果の概要(和文)：真菌由来のテルペノイドであるアニセコールのもつ大腸癌細胞 DLD-1 及び HT-29 に対する anoikis 誘導活性について、その分子メカニズムの解明を目指した。その結果、p38MAPK 経路がなんらかのかたちでアニセコールの癌細胞に対する anoikis 誘導活性に関与することを示した。また、Rho-Kinase 阻害剤 Y27632 の効果により p38MAPK 経路と Rho 経路のクロストークがアニセコールのもつ癌細胞に対する anoikis 誘導活性に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Anicequol is a terpenoid derived from fungus. We aimed the elucidation of the mechanism underlying anicequol induced anoikis in colon cancer cell lines DLD1 and HT29. As a result, we showed that the p38MAPK pathway is associated with anicequol induced anoikis. In addition, Rho-kinase inhibitor Y27632 inhibited anicequol induced anoikis, suggesting that p38MAPK pathway links Rho pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：癌、シグナル伝達、anoikis、p38MAPK、Rho

## 1. 研究開始当初の背景

アニセコールは *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx と分類学上位置づけられた、TP-F0213 という青カビが産生する物質として単離されたものである。

アニセコールの構造は、NMR 解析によってコレステロールと類似している、16-acetoxy-3,7,11-trihydroxyergost-22-en-6-one と決定されている。

アニセコールは DLD-1(ヒト大腸癌細胞)の

足場非依存性増殖を、足場依存性増殖と比較して有意に阻害することが報告されてきたが、その作用機作については不明である。そこで、本研究は、アニセコールが持つ、足場非依存性増殖活性の作用機作を解明することを目的とし研究をおこなった。

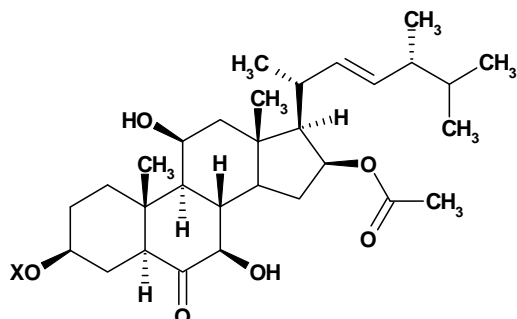


図1. アニセコールの構造

## 2. 研究の目的

アニセコールの anoikis 誘導活性の分子メカニズムの探索をおこなうことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 足場非依存性状態の構築

足場とは、細胞表面のインテグリンと ECM タンパク質(ファイブロネクチン、ラミニン、コラーゲンなど)の結合である。伝統的な方法として Poly-HEMA という物質を 96well plate 等にコートしておくことにより、Plate への細胞接着を阻害することができる。これを用いて足場非依存性増殖を判定することができる。

### 生細胞数の数値化

本研究では MTT アッセイを用いた。MTT アッセイとは生細胞内では黄色の化合物である MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) がミトコンドリア内のコハク酸脱水素酵素などにより、紫色のホルマザン産物に還元される反応を利用したものである。この生成物を溶解し、呈色させた後で、その吸光度を測定し生細胞数の指標とする。

### シグナル伝達システムの解析

各種リン酸化抗体を網羅的に使用し、シグナル伝達システムの検討を行った。そのさい汎用されている各種阻害剤も併用して実験をおこなった。

## RNAi 法

RNAi 法は近年爆発的に利用されている実験方法で、細胞が元から持っている発現制御システムを利用し、目的のタンパク質を特異的に発現阻害させるものである。簡便であること、培養細胞を用いた実験に特に向いていることから、RNAi 法と MTT アッセイを組み合わせた実験系を確立した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞死シグナルに関与する因子の同定

アニセコールによる anoikis 誘導が細胞内シグナル伝達機構のどの経路をとっているかについて検討した。その結果、アニセコールや 25-ヒドロキシコレステロール処理細胞において、p38MAPK の活性化が起きていることを、特異的リン酸化抗体を用いてあきらかにした。さらに、p38MAPK の下流因子である ATF-2 および HSP27 についても同様の活性化が起きていることをあきらかにした。ついで、p38MAPK に対する特異的阻害剤 ML3403 を用いた実験により、アニセコール及び 25-ヒドロキシコレステロールによる anoikis 誘導活性がやや抑制されることを発見した。これは p38MAPK 経路がなんらかのかたちでアニセコール及び 25-ヒドロキシコレステロールのもつ癌細胞に対する anoikis 誘導活性に関与することを示唆するものである。また、大腸癌細胞 HT-29 及び WiDr についてもアニセコール及び 25-ヒドロキシコレステロールが同様の anoikis 誘導活性をもつことをあきらかにした。この結果は、大腸癌細胞特異的な機構がアニセコール及び 25-ヒドロキシコレステロールのもつ癌細胞に対する anoikis 誘導活性に関与することを示唆するものである。

### (2) アニセコール誘導性 anoikis に関わる OSBP/ORPs ファミリータンパク質の同定

アニセコールの標的タンパク質と目される OSBP/ORPs ファミリータンパク質は 12 種類存在し、機能については冗長性をもつものと予想できる。そのうち、最も機能解析がなされている OSBP を標的とし研究をおこなった。まず大腸癌細胞 DLD-1 に内在的に発現していることを特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティング法により確認した。次に、OSBP に対する RNAi 法をおこない、発現量を低下させた状態でアニセコールや 25-ヒドロキシコレステロールの anoikis 誘導活性に与える影響を MTT アッセイによる細胞の viability を測定した。その結果、OSBP はアニセコールや 25-ヒドロキシコレステロールの anoikis 誘導活性に対する耐性を与える効果をもつことが示唆された。

### (3)p38MAPK シグナルの影響の解明

アニセコールおよび 25-ヒドロキシコレステロールによる anoikis 誘導が細胞内シグナル伝達機構のうち p38MAPK の活性化によりおきていることをあきらかにしていたが、その中でも p38MAPK ファミリーのうちメインファクターである p38MAPK $\alpha$  についての研究をおこなった。浮遊培養状態での RNAi ノックダウン法を確立し、p38MAPK $\alpha$  の発現量を特異的に減少させたところ、アニセコール及び 25-ヒドロキシコレステロールによる anoikis 誘導活性が 30%前後抑制されることを見出した。これは p38MAPK 経路がなんらかのかたちでアニセコール及び 25-ヒドロキシコレステロールのもつ癌細胞に対する anoikis 誘導活性に関与することを示唆するものである。

### (4)Rho/ROCK 経路の関与の解明

さまざまな阻害剤を検討するなかで、試薬 Y27632 がアニセコール及び 25-ヒドロキシコレステロールによる anoikis 誘導活性を 50%以上減少させることを発見した。Y27632 は Rho-Kinase 阻害剤であり、低分子 G タンパク質 Rho $\rightarrow$ Rho-Kinase $\rightarrow$ Myosin Light Chain 2 の経路を阻害する薬剤として知られている。p38MAPK 経路との関係を調べるため、Y27632 存在下でのアニセコール及び 25-ヒドロキシコレステロールによる p38MAPK 誘導活性を検討したところ、p38MAPK の活性化/リン酸化は Y27632 により抑制されることがあきらかになった。これは p38MAPK 経路と Rho 経路のクロストークがアニセコール及び 25-ヒドロキシコレステロールのもつ癌細胞に対する anoikis 誘導活性に関与することを示唆するものである。

### [ABCA1 に関する研究]

ABCA1 は細胞膜タンパク質ファミリーとしては最大の規模を誇る ABC トランスポーターのひとつであり、末梢組織での HDL 新生に関与していることで知られている。今回、我々は ABCA1 の細胞内局在とその機能について以下の二点を明らかにしたので報告する。

### (5)ABCA1 は細胞膜と細胞内をリサイクリングしながら HDL 新生に関与している。

ABCA1 に蛍光タンパク質 GFP を融合させた ABCA1-GFP を恒常的に発現する HEK293 細胞 (A1-WT) と活性をもたない点変異体をもつ ABCA1 を恒常的に発現する HEK293 細胞 (A1-KM) を樹立した。この細胞らにプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンや MG132 を作用させると、A1-WT は細胞内にコレステロールを含む巨大な構造体を形成したのに対し、A1-KM ではその構造体は形成されなかった。我々はこの構造体を A1body と命名し、

さらなる解析をおこなった。その結果、A1body は脂質二重膜からなり、後期エンドソーム/リソソームに近い構造体であることが明らかになった。A1-KM の結果より、A1body は HDL 新生能に由来するものと予想される。加えて我々は遺伝子チップ解析を行い A1body 形成に必要であると考えられるタンパク質 Rab4 を同定した。Rab4 は ABCA1 を細胞内に留めおかせ、細胞内で機能(コレステロールの蓄積を促す)することを明らかにした。

### (6)小胞体ストレス応答に関する新たな知見

われわれは ABCA1 の解析の途中で、変異体 ABCA1-QR (A1-QR) が小胞体に局在していることを発見した。さらに、この A1-QR は DTT や タブシガルジンなどの小胞体ストレス誘導剤により小胞体から離れ、ゴルジ体を経由して細胞膜まで到達することを明らかにした。この応答は今まで報告されていた応答とは異なり、小胞体へ再度戻されることがないことを特徴とする。同様に小胞体ストレスにより小胞体から移行するタンパク質である ATF-6 とその応答速度を比較したところ、圧倒的に A1-QR のほうが早かった。これらの結果は、A1-QR は比較的完成されたタンパク質で小胞体ストレスによりクオリティコントロールの精度が低下した条件では、完全に折りたたまれたタンパク質として認識されることを示している。以上により、我々は新たな小胞体品質管理機構の存在を示唆することとなった。

### 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 Tanaka AR, Kano F, Ueda K, Murata M. The ABCA1 Q597R mutant undergoes trafficking from the ER upon ER stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 369(4):1174-8. 2008
- ② Tanaka AR, Kano F, Yamamoto A, Ueda K, Murata M. Formation of cholesterol-enriched structures by aberrant intracellular accumulation of ATP-binding cassette transporter A1. *Genes Cells.* 査読有 13(8):889-904. 2008

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中亜路 (TANAKA ARO)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：60509040

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：