

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22790280

研究課題名(和文)がん及び神経変性疾患関連スフィンゴ糖脂質の細胞内輸送システムの独自性と普遍性

研究課題名(英文) Intracellular transport and function of cancer- and neurodegenerative disease-related glycosphingolipids

研究代表者

山内 祥生 (YAMAUCHI, Yoshio)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00444878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴ糖脂質(GSL)は、がんや神経変性疾患などの病態に深く関与している。本研究では、メラノーマ抗原GD3と重篤な神経変性疾患であるニーマン・ピック病C型(NPC病)に関連するガングリオシドの細胞内輸送や膜ドメインの維持機構について解析を行った。その結果、GD3が脂質代謝を調節する因子を活性化することで膜ドメインの形成をサポートしていることが明らかになった。また、この脂質代謝調節因子を阻害することでメラノーマ細胞の増殖を抑制することに成功した。一方、NPC病に関連するガングリオシドが蓄積する細胞内小器官を明らかにすると共に、ガングリオシド蓄積を軽減する低分子量化合物を同定した。

研究成果の概要(英文)：Glycosphingolipids (GSLs) are involved in pathophysiology of cancer and neurodegenerative disorders. In this work, I studied cellular distribution and functionalities of gangliosides associated to melanoma, a skin cancer and to Niemann-Pick type C (NPC) disease, a neurodegenerative disorder. The results showed that the melanoma-associated antigen ganglioside GD3 plays a role in the activation of the regulatory factor involved in lipid biosynthesis, which promotes lipid biosynthesis for the integrity of membrane microdomains in human melanoma cells. Pharmacological inhibition of the regulatory factor prevented tumor growth. Also, I studied cellular distribution of gangliosides related to NPC disease in NPC cells. The results showed that disease-associated gangliosides accumulate in the lysosome. Several small-molecules that promote their redistribution from the lysosome to cell surface were identified.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：スフィンゴ糖脂質 ガングリオシド がん 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ糖脂質 (GSL) は、がん細胞や神経細胞で特に重要な役割を果たしており、がんや神経変性疾患などの病態に深く関与している。GSL は脂質ラフトと呼ばれるコレステロールに富む細胞膜ドメインに局在し、細胞機能の調節に重要な役割を果たしている。一方、神経変性を伴ういくつかのリソソーム病では、リソソームへの GSL の顕著な蓄積が認められる。つまり、GSL の適切な分布は細胞機能の発現に極めて重要な役割を果たしており、その異常な細胞内分布は重篤な疾患の原因にもなっている。

GSL の糖鎖構造は多様性に富んでおり、その糖鎖構造の変化が個々の GSL に機能を付与している。GSL の糖鎖構造は、組織や細胞の分化や発生、疾患などで変化することが知られている。また、がん細胞では、しばしば GSL の糖鎖構造の変化が認められ、この変化は、がん細胞の悪性形質に重要な役割を果たしている。しかしながら、糖鎖構造の変化に伴う GSL の機能の違いについては、不明な点が多い。

これらのことから、異なる細胞における異なる糖鎖構造を持つ GSL の細胞内輸送メカニズムや脂質ラフトへの集積メカニズム、脂質ラフトにおける機能発現メカニズムを理解することは、がんや神経変性疾患の病態の理解や治療法の開発にとって非常に重要であるが、これらのことはほとんど理解されていない。

2. 研究の目的

GSL は、主に細胞膜の脂質ラフトに局在し、細胞機能の調節に重要な役割を果たしている。一方、GSL の糖鎖構造は多様性に富んでおり、それぞれの糖鎖が特異的な役割を果たしていると考えられている。がん細胞では、しばしば特異的な GSL の発現が認められ、がん細胞の悪性形質に重要な役割を果たしている。また、神経系には多様な GSL が発現しているが、GSL の代謝や輸送異常を原因とする神経細胞への GSL の蓄積は、重篤な神経変性疾患を伴うリソソーム病の原因となっている。本研究では、がんと神経変性疾患に関連する GSL に着目し、糖鎖構造が異なる GSL の細胞内輸送システムの普遍性と独自性を理解すると共に、がん細胞と神経細胞でその細胞内輸送システムの独自性と普遍性について解明することを目的とした。特に、最近増加傾向を示す悪性度の高い皮膚がんであるメラノーマと重篤な神経変性を伴い、まだ治療方法が存在しないニーマン-ピック C 型 (NPC) 病に焦点を当てた。

(1) メラノーマと GSL

メラノーマでは酸性 GSL の GD3 が、原発巣やメラノーマ細胞株に普遍的に発現している。私が所属する名古屋大学大学院医学系研究科生物化学講座のこれまでの研究結果より、GD3 が Akt などのシグナル伝達分子の活

性を増強し、メラノーマ細胞の悪性形質を強めていることが明らかになっている。がん細胞では、しばしば Akt シグナルの高度な活性化が認められ、悪性形質発現における Akt の重要性が明らかになっているが、メラノーマ細胞における Akt シグナルの機能は不明な点が多い。Akt は活性化に伴い脂質ラフトに移行することが報告されており、GD3 が局在する脂質ラフトの機能性がいかに保たれ、メラノーマを含むがん細胞の悪性形質の増強に寄与しているか解析することは、新しいがんの治療法の開発につながることを期待される。

(2) NPC 病と GSL

NPC 病は、中枢神経や肝臓などに GSL とコレステロールが蓄積するリソソーム病で、プルキンエ細胞などの神経細胞の脱落を伴う重篤な神経変性疾患である。NPC 病は、後期エンドソーム (LE) / リソソーム (LYS) に局在する NPC1 もしくは NPC2 の機能欠損によって引き起こされ、NPC 細胞では LE/LYS に GSL とコレステロールが蓄積する。特に、NPC 病の脳では健常人の脳にはほとんど存在しない GM2 の蓄積が顕著である。NPC1 と NPC2 はコレステロールに直接結合し、LE/LYS からのコレステロール輸送に機能している。GSL が蓄積する詳細なメカニズムは明らかになっていないが、興味深いことに、GSL の蓄積を改善することでコレステロールの蓄積が解消され、NPC 病モデルマウスの寿命も延びることが示され、GM2 など GSL の LE/LYS への輸送と LE/LYS からの輸送メカニズムの解明が重要になっている。

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 細胞を用いた。また、SK-MEL-28 から GD3 発現欠損株として単離された N1 に GD3 合成酵素 cDNA を導入し、GD3 を安定発現する G5、G11 細胞を用いた。

NPC 細胞として、NPC1 欠損 CHO 細胞である CT43 細胞、NPC 病患者より単離された NPC1 欠損皮膚線維芽細胞及び NPC2 欠損皮膚線維芽細胞を用いた。これらの細胞株は、Dartmouth Medical School (米国) の Ta-Yuan Chang 教授よりご供与頂いた。GM2/GD2 合成酵素を発現する野生型 (WT) CHO 及び CT43 細胞は、当研究室でクローニングされた GM2/GD2 合成酵素 cDNA を導入し、GM2 の発現を指標に安定発現細胞株を単離した。

(2) 細胞表面 GSL の発現解析

細胞表面の GSL の発現は、各種 GSL を特異的に認識する抗体やプローブを用いて、フローサイトメトリーによって解析した。

(3) GSL の細胞内分布の解析

細胞をパラホルムアルデヒドで固定後、透過処理を行い、GSL やオルガネラマーカに對

する抗体を用いて蛍光染色を行った。検体は、共焦点顕微鏡にて観察し、GSLの細胞内分布を決定した。

(4) 異種移植実験

SK-MEL-28細胞をBalb/c nu/nuマウス(6週齢)の皮下に移植し、低分子量化合物を2日に一度、4週間、腫瘍にインジェクトすることで、抗腫瘍効果を解析した。

4. 研究成果

(1)メラノーマ細胞におけるGD3による脂質ラフトの機能維持機構。

脂質ラフトはコレステロールを基盤にする脂質ドメインであることから、GD3がコレステロールを含む脂質代謝に与える影響について解析を行った。その結果、脂質合成を制御する転写因子であるSREBPの活性化が、GD3発現メラノーマ細胞において観察された。GD3発現メラノーマ細胞におけるSREBPの活性化は、Akt-mTORシグナルによって制御されていることが示された。また、Akt-mTOR-SREBP経路が脂質ラフトの構造維持に重要であることが示された。さらに、SREBPを阻害することで、Aktの活性化や活性化型Aktの脂質ラフトへの移行が抑制され、SREBP経路が脂質ラフトの機能にも重要な役割を果たしていることが示された。さらに、GD3の発現に伴うSREBP活性化の重要性につき解析するため、SREBP阻害剤がGD3発現メラノーマ細胞(SK-MEL-28)の増殖に及ぼす影響をin vitro及びin vivoで解析した。その結果、SREBPの阻害がin vitroでの細胞増殖だけでなく、ヌードマウスに異種移植された腫瘍の増殖にも極めて重要な役割を果たしていることが明らかになった。これらの結果より、SREBPを介した脂質ラフトの維持がメラノーマ細胞の悪性形質に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(2) NPC病における疾患関連GSLの蓄積とその蓄積を軽減する低分子量化合物の発見。

疾患関連GSLの細胞内輸送をより詳細に明らかにすることを目的に、NPC1欠損CHO細胞(CT43)に対して糖鎖リモデリングを行った。CHO細胞の主要なGSLはGM3であったので、CT43及びWT CHO細胞にGM2/GD2合成酵素(β 1,4-GalNAc転移酵素)を導入し、GM2を恒常的に発現する細胞株を得た(それぞれCT43/GM2細胞、CHO/GM2細胞)。これらの細胞の細胞表面に発現するGSLを解析した結果、GM2だけでなく脳に発現が多く認められるGM1やGD1aを発現していた。そして、CT43/GM2細胞とCHO/GM2細胞におけるGSLの細胞内分布を解析した結果、CT43/GM2細胞ではGM2やGM1、GD1aがLE/LYSに強く蓄積していた。一方、CHO/GM2細胞では、これらのGSLは主に細胞膜に発現していた。また、NPC病患者由来の繊維芽細胞におけるGSLの細胞内局在を解析した結果、GM3がLE/LYSに蓄積していた。

これらの結果、NPC細胞では、疾患関連GSLがLE/LYSに局限して蓄積することが明らかになった。また、NPC1及びNPC2が様々な糖鎖構造を持つGSLの細胞内輸送に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

GSLの蓄積は、NPC病の病態に重要な役割を果たしており、その蓄積を改善することはNPC病や他のGSL蓄積症の治療方法の開発にとって重要である。CT43/GM2細胞を用いて、GM2などのGSLの輸送を促進し、その蓄積の軽減が期待できる低分子量化合物の探索を行った。その結果、LE/LYSから細胞膜へ疾患関連GSLの輸送を促進する低分子量化合物を3種類発見した。そのうち1種類はLYSの蓄積を軽減することが示された。また、この効果はNPC病患者由来の細胞においても確認された。これらの結果から、疾患関連GSLのLE/LYSから細胞膜への輸送とLYSの蓄積を軽減する低分子量化合物は、NPC病の病態を改善することが期待された。

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 8 件)

- (1) Furukawa K, Ohkawa Y, Yamauchi Y, Hamamura K, Ohmi Y, Furukawa K. Fine tuning of cell signals by glycosylation. *J Biochem.* 151. 2012. 573-578. (査読有) DOI: 10.1093/jb/mvs043
- (2) Ohmi Y, Ohkawa Y, Yamauchi Y, Tajima O, Furukawa K, Furukawa K. Essential roles of gangliosides in the formation and maintenance of membrane microdomains in brain tissues. *Neurochem Res.* 37. 2012. 1185-1191. (査読有) DOI: 10.1007/s11064-012-0764-7
- (3) Ohkawa Y, Ohmi Y, Tajima O, Yamauchi Y, Furukawa K, Furukawa K. Wisp2/CCN5 up-regulated in the central nervous system of GM3-only mice facilitates neurite formation in Neuro2a cells via integrin-Akt signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411. 2011. 483-489. (査読有) DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.118
- (4) Hamamura K, Tsuji M, Hotta H, Ohkawa Y, Takahashi M, Shibuya H, Nakashima H, Yamauchi Y, Hashimoto N, Hattori H, Ueda M, Furukawa K, Furukawa K. Functional activation of Src family kinase yes protein is essential for the enhanced malignant properties of human melanoma cells expressing ganglioside GD3. *J Biol Chem.* 286. 2011. 18526-18537. (査読有) DOI: 10.1074/jbc.M110.164798

- (5) Yamauchi Y, Furukawa K, Hamamura K, Furukawa K. 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. 2011. 4989-4997. (査読有) DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4108
- (6) Ohmi Y, Tajima O, Ohkawa Y, Yamauchi Y, Sugiura Y, Furukawa K, Furukawa K. Gangliosides are essential in the protection of inflammation and neurodegeneration via maintenance of lipid rafts: elucidation by a series of ganglioside-deficient mutant mice. *J Neurochem.* 116. 2010. 926-935. (査読有) DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.07067.x.
- (7) 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. *Cancer Sci.* 101. 2010. 2039-2047. (査読有) DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01613.x.
- (8) Ohkawa Y, Miyazaki S, Hamamura K, Kambe M, Miyata M, Tajima O, Ohmi Y, Yamauchi Y, Furukawa K, Furukawa K. Ganglioside GD3 enhances adhesion signals and augments malignant properties of melanoma cells by recruiting integrins to glycolipid-enriched microdomains. *J Biol Chem.* 285. 2010. 27213-27223. (査読有) DOI: 10.1074/jbc.M109.087791.
- (4) Yoshio Yamauchi, Kosuke Yoshida, Ta-Yuan Chang, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa. The Niemann-Pick type C protein NPC1 regulates trafficking of disease-associated ganglioside from the lysosome to the plasma membrane. 第34回日本分子生物学会年会. 2011年12月14日. パシフィコ横浜, 横浜市.
- (5) Yoshio Yamauchi. ABCA1, membrane meso-domains, and sterol sensing. iCeMS Joint International Symposium ABC 2011 in Kyoto. 2011年11月16日. 京都大学, 京都市.
- (6) Yoshio Yamauchi, Kazunori Hamamura, Yuki Ohkawa, Noboru Hashimoto, Yuhsuke Ohmi, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa. Total analyses on the roles of cancer-associated gangliosides in malignant properties of melanomas. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2011年10月4日. 名古屋国際会議場, 名古屋市.
- (7) 山内 祥生, 古川 圭子, 浜村 和紀, 古川 鋼一. Tumor antigen-activated lipogenic pathway is regulated via mTOR signaling: Crucial role of mTOR-SREBP pathway in the integrity of lipid rafts. 第84回日本生化学会大会. 2011年9月24日. 国立京都国際会館, 京都市.
- (8) Yoshio Yamauchi, Keiko Furukawa, Kazunori Hamamura, Koichi Furukawa. Positive feedback loop between PI3K-Akt-mTORC1 signaling and the lipogenic pathway boosts Akt signaling: Induction of the lipogenic pathway by a melanoma antigen. The 30th Naito Conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology [II]: Domains, Droplets and Diseases. 2011年6月30日. シャトラーゼガトーキングダム サッポロ, 札幌市
- (9) Yoshio Yamauchi, Kosuke Yoshida, Ta-Yuan Chang, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa: Lysosomal accumulation of disease-associated gangliosides and small molecules that stimulate their lysosome-to-plasma membrane transport in Niemann-Pick type C cells. 第33回日本分子生物学

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 山内 祥生, 五十嵐 政智, 古川 鋼一. Role of mTOR kinase in the lipogenic phenotype of human cancer cells. 第85回日本生化学会大会. 2012年12月16日. 福岡国際会議場, 福岡市.
- (2) 山内 祥生. Regulation of cholesterol homeostasis by ABCA1-dependent retrograde sterol transport. 第7回トランスポーター研究会年会. 2012年6月9日. 京都大学, 京都市.
- (3) Yoshio Yamauchi. Miglustat and cyclodextrin promote lysosome-to-plasma membrane transport of disease-associated gangliosides in Niemann-Pick type C cells. Gordon Research Conference, Glycolipid & Sphingolipid Biology. 2012年4月24日. Lucca, Italy.

会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010 年 12 月 7 日.
神戸国際会議場, 神戸市.

- (10) Yoshio Yamauchi, Kosuke Yoshida, Ta-Yuan Chang, Koichi Furukawa. Accumulation of disease-related gangliosides in the late endosome/lysosome and small molecules that stimulates their transport to the plasma membrane in Niemann-Pick type C cells. GlycoT 2010 Tokyo 7th International Symposium on Glycosyltransferases. 2010 年 7 月 31 日. KFC-Kokusai Fashion Center, 東京都墨田区.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し