

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23701056

研究課題名（和文）脂質ラフトによる Src 制御機構の総合的理解に向けた研究

研究課題名（英文）Toward understanding of the lipid raft-based Src regulatory system

研究代表者

梶原 健太郎 (KAJIWARA KENTARO)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：30581102

研究成果の概要（和文）：多くのがん細胞において活性化が認められている c-Src の活性制御機構の解明を目指した研究を行った。これまでの研究から、活性化した c-Src は細胞膜上の脂質ラフト上で不活性化されることが明らかにされていた。本研究では、がん化に伴って脂質ラフトの構成脂質が質的・量的に変化し、活性型 c-Src が脂質ラフト外に移行しやすく、不活性化機構から逃れやすい膜環境に変化していることが明らかになった。さらに、この脂質代謝の変化を抑制することで、活性化 c-Src の移行およびがん化を抑制できることも明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The proto-oncogene product c-Src is highly upregulated in various cancer cells. Src function is downregulated in the lipid rafts, indicating the lipid rafts serve as a negative regulator of activated c-Src. However, it has not been known how lipid rafts are altered during c-Src-induced cancer progression. In this study, we newly revealed that raft-localization of c-Src is regulated by lipid metabolism and that inhibition of lipid alteration suppresses c-Src-induced cell transformation. Taken together, Src regulates raft integrity by alteration of lipid metabolism for maintaining c-Src activation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん化、Src、脂質ラフト、スフィンゴ脂質

1. 研究開始当初の背景

がん原遺伝子産物 c-Src は細胞膜直下に存在する非受容体型チロシンキナーゼである。細胞外からの刺激に応答して、細胞内にシグナルを伝える役割を担っている。c-Src は種々のがん細胞において高発現、活性化しており、その基質タンパク質にはがん化に重要なも

のが多いことから、がん化・悪性化との関連が強く示唆されている。したがって、c-Src 活性制御機構の解明はがん抑制において重要な課題のひとつである。これまでの当研究グループの研究から、Src 不活性化因子 Csk と Csk 結合タンパク質 Cbp が同定され（Okada 1997; Kawabuchi 2000）、タンパク

質レベルでの不活性化機構を明らかにしてきた。さらに、c-**Src** の不活性化は細胞膜上の脂質ラフトで起こることを明らかにした (Oneyama 2008)。活性化した c-**Src** は Cbp によって脂質ラフトにリクルートされ、そこで Csk によって効率的に不活性化されると考えられる。脂質ラフトはスフィンゴ脂質とコレステロールが高密度に集積した膜ドメインであり、細胞内外の情報伝達を担うプラットフォームと考えられている。我々が提唱した脂質ラフトによる c-**Src** 活性制御モデルはこれまでのコンセプトとは異なり、シグナル伝達に抑制的に機能するものである。

2. 研究の目的

脂質ラフトは **Src** によるがん化に対して抑制的に機能すると考えられる。しかし、がん化によって脂質ラフトが変化するか、また変化するとした場合どのような影響を与えるのか不明であった。本研究では、c-**Src** 発現誘導細胞をもちいたがん化、特に初期過程における脂質ラフトの変化を解析する。具体的には、c-**Src** 活性制御機構とスフィンゴ脂質代謝の関係を解析する。これまでのがん細胞や臨床検体を用いた解析から、がん化とともにスフィンゴ脂質の代謝が変動することが多数報告されている。しかし、脂質ラフトの構成脂質として注目した解析は報告されておらず、またがん化初期過程における代謝の変動に注目した報告もない。本研究によって、がん化初期のスフィンゴ脂質の代謝変動とそれががん化に与える影響を明らかにできれば、がん化抑制の新たな一手になると期待される。

3. 研究の方法

正常細胞のマウス繊維芽細胞に **Src** のウイルス型 (v-**Src**) を発現させるとがん化するが、通常存在する細胞型 (c-**Src**) を過剰発現して

もがん化しない。しかし、**Src** の不活性化因子 Csk を欠失した細胞 (KO 細胞) では、c-**Src** を発現させるだけでがん形質の発現が起こる (Oneyama 2008)。この細胞を利用することで **Src** によるがん化の本質的な経路を解析することができる。本研究では、がん化の過程を解析するために、doxycycline (Dox) によって c-**Src** の発現を誘導することができる CskKO + pBKT2-c-**Src** 細胞を利用する (Inoue 2009)。

4. 研究成果

まず CskKO + pBKT2-c-**Src** 細胞に Dox を添加し、c-**Src** の発現と活性化を解析した。Dox 添加後、ただちに c-**Src** の発現が認められ、同時に活性化も確認された。**Src** の基質タンパク質であり接着斑に存在する FAK や cortactin、さらに下流に位置する Akt や Erk の活性化も認められた。c-**Src** の活性化は発現誘導後 12 時間でピークに達した。このときの活性型 c-**Src** の細胞内局在を解析すると、接着斑への集積は 12 時間以降に加速していた。以上の結果は、活性型 c-**Src** の接着斑への移行は、フルに活性化した後の変化が重要であることを示唆していた。

活性型 c-**Src** の接着斑への移行の原因を探索するために、発現誘導後の c-**Src** の脂質ラフトへの分配を解析した。本研究では、脂質ラフトの性質 (界面活性剤に不溶) を利用して生化学的に濃縮する方法を採用した。この方法では、c-**Src** はラフト (DRM) と非ラフト (非 DRM) 画分の両方に存在するのに対して、FAK や cortactin は非 DRM 画分にのみ存在する (Oneyama 2009)。c-**Src** 発現誘導開始から 12 時間のあいだ、活性型 c-**Src** の一部は DRM 画分に存在したが、その後 FAK や cortactin が存在する非 DRM 画分に移行した。また、脂質ラフトのマーカータンパク質も同じタイミングで移動したことから、この現象

は c-Src に特異的なものではないことが推察された。以上の結果から、活性型 c-Src は脂質ラフトから離れて接着斑に移行すること、その原因はがん化にともなう脂質ラフト自体が変質である可能性が示唆された。

そこで脂質ラフトを構成するスフィンゴ脂質の変化を解析した。その結果、c-Src 発現誘導開始から 12 時間以降にセラミド合成関連遺伝子群が遺伝子発現レベルで増加していた。さらにセラミドが顕著に増加しており、その増加は DRM 画分で確認された。セラミドはアポトーシス細胞死を誘導する因子として機能することから、一般的にその増加はがん化に対して拮抗的に作用すると考えられている。このセラミドの増加の意義を明らかにするために、スフィンゴ脂質合成系の阻害剤 D-PDMP を用いてセラミドの増加を引き起こした条件で解析をおこなった。その結果、D-PDMP の濃度に依存して活性型 c-Src が DRM 画分から遊離することが明らかとなった。これとは逆に、セラミドの合成を阻害する Fumonisin B1 (FB1) で処理すると、処理濃度に依存して活性型 c-Src が DRM 画分に集積した。また同様の結果が、スフィンゴ脂質の合成過程を阻害する Myriocin で処理した条件でも確認された。さらに FB1 処理細胞では、FAK や cortactin のリン酸化も抑制された。以上の結果は、セラミドの増加は活性型 c-Src の脂質ラフト外への移行と、そこでの基質タンパク質のリン酸化に寄与することを示唆するものであった。

次に FB1 で活性型 c-Src の移行を抑制したときのがん形質発現を解析した。その結果、ポドソームの形成、細胞運動、足場非依存性の増殖など、c-Src の活性化によって引き起こされるがん形質が抑制された。これらの結果から、セラミドの増加による活性型 c-Src の脂質ラフト外への移行は、がん形質の獲得

に重要であることが示唆された。

本研究の結果を総括する。c-Src 活性化によるがん化の過程では、脂質ラフト内のセラミドが一時的に増加する (図 1)。この増加によって、脂質ラフトが変質して、活性型 c-Src は脂質ラフトから遊離しやすくなる。これによって活性型 c-Src は脂質ラフトに存在する不活性化機構から逃れると考えられる。さらに脂質ラフト外に移行した活性型 c-Src の一部は接着斑において FAK や cortactin などの基質をリン酸化し、がん形質発現の亢進へ導くと推測される。

本研究は、がん化初期にスフィンゴ脂質の代謝がダイナミックに変動して脂質ラフトが変質すること、さらにその変化ががん化に促進的に作用することをはじめて明らかにした。近年、疾患を含む脂質代謝の異常とがん化との関連が示唆されはじめており、本研究成果は分子レベルでの関連を示したものである。今後、ヒトがん細胞や臨床検体レベルでの解析を進める必要がある。

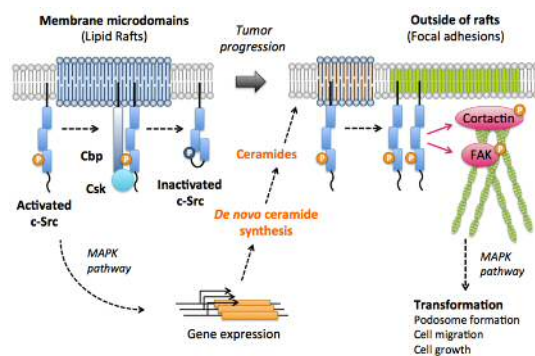


図 1. セラミドの増加による c-Src 不活性化機構の破綻

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)

[学会発表] (計 7 件)

1) 梶原健太郎、小根山千歳、岡田雅人；Src 活性化に伴うセラミドの増加はがん形質発現を促進する、がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム、2013 年 1 月 30 日、学術総合センター

2) 安藤雄哉、梶原健太郎、小根山千歳、岡田雅人; スフィンゴリエリン分解酵素 nSMase2 によるがん形質発現制御機構の解析、第 34 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜

3) 梶原健太郎、小根山千歳、今本文男、岡田雅人 ; Metabolic alteration of lipid components in membrane microdomain by c-Src-induced transformation、第 34 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜

4) 梶原健太郎、小根山千歳、今本文男、岡田雅人 ; Src 活性化に伴うセラミドの増加はがん形質発現を促進する (口頭発表)、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡国際会議場

5) 梶原健太郎、小根山千歳、今本文男、岡田雅人 ; Src 活性化に伴うセラミドの増加はがん形質発現を促進する (ポスター発表)、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡国際会議場

6) Kentaro Kajiwara, Chitose Oneyama, Masato Okada; Alteration of ceramide metabolism is required for c-Src redistribution to focal adhesions and following activation of signal transduction pathways during cell transformation, The 4th EMBO meeting, 2012 年 9 月 24 日, Nice Acropolis (France)

7) 梶原健太郎、小根山千歳、今本文男、岡田雅人 ; Metabolic alteration of raft lipids by c-Src expression、平成 23 年度がん若手研究者ワークショップ、2012 年 9 月 2 日、アートルランドホテル蓼科

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶原 健太郎 (KAJIWARA KENTARO)
大阪大学・微生物病研究所・特任研究員
研究者番号 : 30581102