

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 5 月 29 日現在

機関番号：32660
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23701104
 研究課題名（和文） タラノ芽由来抗腫瘍性タンパク質 aralin の癌細胞選択的毒性発現機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of membrane receptor of aralin, a cancer-selective cytotoxic protein from aralin elata
 研究代表者
 秋山 弘匡 (AKIYAMA HIROTADA)
 東京理科大学・基礎工学部生物工学科・助教
 研究者番号：40400254

研究成果の概要（和文）：タラノ芽より単離したタンパク質 aralin は、がん細胞特異的に毒性を示すことが明らかとなっており、その細胞膜受容体である HDLBP の機能解析を行った。種々のがん細胞において、aralin 感受性と HDLBP 発現量の相関関係を明らかにした。HeLa 細胞を用い HDLBP 高発現と発現抑制細胞株を樹立し、aralin による抗腫瘍効果を検討したところ、aralin による腫瘍抑制効果はプロセッシングにより生じた 110-kDa HDLBP 量に依存している事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Aralin from *Aralia elata* is a new type II ribosome inactivating protein (RIP). Its A-chain exhibits RNA N-glycosidase activity to inactivate the ribosome and inhibit protein synthesis, while B-chain is the Gal and its derivatives-specific lectin. Aralin preferentially induces apoptosis in cancer cells compared with normal cells. To identify the potent aralin receptor, we previously analyzed the membrane proteins by far Western blotting with anti-aralin antibody, and LC/MS. The obtained data suggested that aralin receptor is the 110-kDa high density lipoprotein binding protein (HDLBP), which is processed from 150-kDa HDLBP and existing in lipid raft as an active HDL receptor. The expression levels of 110-kDa HDLBP of various cancer cells were higher than those of normal cells. Furthermore, we established 110-kDa HDLBP-knockdown HeLa cells using miRNAs. The sensitivity of these cells against aralin was robustly reduced. In contrast, 110-kDa HDLBP-over-expressing cells were not obtained by only forced expression of 150-kDa HDLBP. Expectedly, sensitivity of these cells against aralin was comparable to the control cells. Thus, these results indicate that the processed 110-kDa HDLBP is the authentic receptor and its expression level in the lipid raft determines the sensitivity toward aralin. HDLBP processing analysis from 150-kDa to 110-kDa active form using N- and C-terminal-tagged 150-kDa HDLBP indicated that the N-terminal region could be removed. Currently, we were pursuing the identification of the N-terminal cutting site and possible processing enzymes. In addition, we are exploring the processing mechanism of the HDLBP affecting variety of cancer cells.

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	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：分子標的治療、抗癌剤

1. 研究開始当初の背景

癌の治療法の進歩は目覚しく、早期診断法の確立と外科的治療の進歩により、胃癌をはじめとする多くの癌の治癒率は向上している。その一方で、死因の第1位は依然として悪性新生物であり、日本人の約3人に1人は癌で死亡している。外科的治療、放射線療法に加えて様々な抗癌剤が化学療法として用いられているが、抗癌剤で治すことができる癌は白血病など一部の癌に限られている。固形癌においては未だに完治は難しく、一時的な癌の縮小が認められるものの、効果は生存期間の延長にとどまっている。さらに、抗癌剤による、重篤な副作用により死亡する患者も多数存在している。この様な観点から癌細胞特異的に存在する癌抗原を標的とし、正常細胞には影響を与えず、速やかに癌細胞のみを排除する抗癌剤の開発が重要となる。

我々は植物体から抗腫瘍性タンパク質の単離、精製を行なっている秋田県総合食品研究所の戸松らと、新規の抗腫瘍性タンパク質 aralin に着目し共同研究を行なっている。戸松らは植物体に含まれる抗腫瘍性タンパク質を探索するために、秋田県内で採取された山菜・キノコ・海藻類約100種の抽出液を調製し、正常繊維芽細胞 WI38 とその SV40 形質転換細胞株 (VA13) およびヒト子宮頸癌 HeLa 細胞に対する 50%致死濃度を比較することで、癌細胞選択的な致死活性を測定した。その結果、タラノキ (*Aralia elata*) の芽より採取した aralin は、正常細胞である WI38 の IC50 が 10 ng/ml であるのに対し、VA13 は 0.8 ng/ml、HeLa 細胞は 0.08 ng/ml と癌細胞特異的に毒性を発揮することが明らかにした。

aralin は、RNA N-グリコシダーゼ活性をもつ A-chain (33 kDa) とレクチン活性を有する B-chain (36 kDa) の2つのサブユニットからなるヘテロタンパク質で、ヒマ種子より単離された毒性タンパク質 ricin と高い相同性を有している。近年、癌の悪性度合に応じて、細胞膜表面上の糖鎖構造が変化することが明らかとなっており、CA19-9、SLX、CA125 など、現在用いられている腫瘍マーカーの多くは、癌細胞膜上の糖鎖を認識する糖鎖マーカーが用いられている。aralin は、レクチン活性を有しており、ラクトース、ガラクトースおよびフコースを含む糖鎖に結合することが明らかとなった。このことから、aralin は、癌細胞特異的な細胞膜上の糖鎖を認識し細胞膜に結合し、細胞内に取り込まれた後、RNA N-グリコシダーゼ活性により 28S rRNA アデニンを遊離させることでタンパク質合成を阻害し、アポトーシスを誘導し、細胞毒性を発揮すると考えられた²⁾。このように、aralin の細胞毒性の作用機序は明らかにされたも

の、aralin の癌細胞選択性や細胞内への取込み機構など詳細なメカニズムは不明であった。そこで、我々は、aralin の癌細胞選択性に関与する膜レセプターの同定を Far Western および LC/MS 解析により試み、HDLBP (high density lipoprotein binding protein) を同定した。

2. 研究の目的

近年、癌発症の詳細な分子機構が解明され、癌の原因分子を標的とした抗癌剤の開発により、癌の治癒率と予後は向上しつつある。しかしながら、抗癌剤による完治は未だ難しく、副作用も患者に対して大きな負担となっている。これは、抗癌剤による細胞毒性が、正常細胞にも及んでしまうことに起因している。そこで、癌細胞特異的に存在する癌抗原を標的とし、速やかに癌細胞を排除する抗癌剤の開発が重要となる。タラノキから単離・精製された aralin は、癌細胞特異的に細胞毒性を有している。本研究は、aralin の癌細胞選択性および分子機構を解析することで、癌の治療や予防に応用できる抗癌剤の開発に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) aralin 感受性と HDLBP 発現量の相関性の解析

種々の癌細胞株と正常細胞株を用い、aralin 感受性と HDLBP 発現量の相関関係を明らかにした。aralin 添加後、細胞死をトリパンブルー排除法を用いて定量的に測定した。さらに、各種細胞の HDLBP 発現量をウェスタンブロットにより定量した。

(2) HDLBP 安定発現株および発現抑制株での aralin 感受性の解析

aralin 高感受性である HeLa 細胞を用い、HDLBP 安定発現株および発現抑制株を作製した。これら細胞株を用い、aralin 感受性を検討した。

(3) HDLBP による腫瘍形成能および転移能の解析

NOD/SCID マウス皮下に HDLBP 安定発現細胞株もしくは、HDLBP 発現抑制 HeLa 細胞株を移植し、腫瘍形成能や転移能について解析した。

(4) HDLBP を介した aralin による腫瘍抑制能の解析

NOD/SCID マウス皮下に HDLBP 安定発現細胞株もしくは、HDLBP 発現抑制 HeLa 細胞株を移植し、aralin を経口投与し、コントロール細胞株と比較することで、腫瘍形成抑制能や転移抑制能について解析した。

(5) HDLBP プロセッシング部位の同定

完全長 HDLBP は 150 kDa であるがプロセッシングで生じた 110 kDa HDLBP が aralin 受容

体として機能している。そこで、HDLBP の N 末および C 末に EGFP を融合させ、HeLa 細胞に導入し、EGFP 抗体および HDLBP 抗体で検出することで、切断部位の同定を行った。

4. 研究成果

(1) 現有している種々の癌細胞に対して aralin の感受性と aralin 受容体である HDLBP 発現量の相関関係を解析した。その結果、IC50 が 0.08 ng/ml と最も aralin 感受性の高い HeLa 細胞でプロセッシングによって生じた 110 kDa HDLBP の発現量が最も高く、IC50 : 8.8 ng/ml の HepG2 細胞で HDLBP 発現量は HeLa 細胞と比較し 1/5 に減少し、aralin に対して感受性を示さなかった Huh7 細胞では HDLBP の発現は検出限界以下であった。これらの結果より、aralin 感受性と HDLBP 発現量の相関関係が認められた。

(2) HeLa 細胞を用い HDLBP 安定発現株と発現抑制株を樹立した。HDLBP 発現抑制株においては、HDLBP の発現減少にともなって aralin 感受性の減少が確認された。安定発現株においては、HDLBP 発現量が増加しても aralin 感受性は変化しなかった。これは、HDLBP 安定発現株では完全長の 150 kDa HDLBP を導入しただけでは、プロセッシングで生じる 110 kDa HDLBP の発現量に変化が現れないことが示唆された。これらの結果より、細胞膜上の 110 kDa HDLBP の量が aralin の抗腫瘍活性の本質となることが示された。

(3) aralin 添加時の HDLBP および aralin の細胞内局在変化をモニタリングする為、EGFP 融合 HDLBP 安定発現 HeLa 細胞株を樹立した。

(4) 以前の研究で、aralin 経口投与により皮下移植した HeLa 細胞の腫瘍形成能が著しく抑制したことから、形成された腫瘍に対しての腫瘍抑制効果を検討した。NOD/SCID マウス皮下に HeLa 細胞を移植し、腫瘍の大きさが 150 mm³を超えた時から aralin を経口投与した。その結果、腫瘍の縮小までは認められなかったが、腫瘍の増大が停止した。次に、HDLBP 安定発現 HeLa 細胞株と発現抑制株を NOD/SCID マウス皮下に HeLa 細胞を移植し、同様に aralin による腫瘍形成能を検討した。その結果、HDLBP 発現抑制株は aralin を経口投与しても、PBS を経口投与したコントロールマウス群と同様に腫瘍抑制効果が見られず、腫瘍が増大した。しかし、HDLBP 安定発現株での、aralin による腫瘍抑制効果はコントロール細胞株と同様であった。この結果は、細胞株を用いた aralin 感受性と同様であったことから、プロセッシングで生じる 110 kDa HDLBP の発現量が aralin による腫瘍抑制に寄

与していることが示唆された。これらの結果より、aralin は抗癌剤として腫瘍形成を抑制し、aralin による腫瘍抑制効果は、その受容体である 110 kDa HDLBP 発現量に依存することが明らかとなった。

(5) 完全長 150 kDa HDLBP よりプロセッシングで生じる 110 kDa HDLBP が aralin 受容体として機能することから、プロセッシング部位の同定を行った。HDLBP の N 末端もしくは C 末端に、EGFP 融合させたプラスミドを HeLa 細胞に導入し、EGFP 抗体もしくは HDLBP 抗体を用いウェスタンブロットを行った。その結果、HDLBP の N 末端部位がプロセッシングを受けることが明らかとなった。

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 Yamada T, Urano-Tashiro Y, Tanaka S, Akiyama H, Tashiro F., Involvement of crosstalk between Oct4 and Meis1a in neural cell fate decision., PLoS One, 査読有, 8(2), 2013, e56997, doi: 10.1371/journal.pone.0056997
- ② Uchida T, Furumai K, Fukuda T, Akiyama H, Takezawa M, Asano T, Fujimori F, Uchida C., Prolyl isomerase pin1 regulates mouse embryonic fibroblast differentiation into adipose cells., PLoS One, 査読有, 7(3), 2012, e31823, doi: 10.1371/journal.pone.0031823

[学会発表] (計 10 件)

- ① 清田政宏、須藤祐人、秋山弘匡、田代文夫、ヒト肝癌における癌幹細胞形質獲得に関わる CD133 の機能解析、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 - 14 日、福岡
- ② 小野孝英、大塚寛子、秋山弘匡、戸松誠、飯田直幸、服部成介、田代文夫、癌細胞選択的毒性を有するタラノ芽由来 aralin 受容体 HDLBP の同定とその機能的プロセッシング機構、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 - 14 日、福岡
- ③ 村上重和、上元寿人、坂本依里奈、加藤康平、茂木南士、二宮航、日笠里英、柴田龍弘、秋山弘匡、田代文夫、前立腺がんの悪性化過程における SRY の新たな機能、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 - 14 日、福岡
- ④ 坂本依里奈、村上重和、上元寿人、加藤康平、茂木南士、二宮航、日笠里英、柴田龍弘、秋山弘匡、田代文夫、ヒト肝

癌細胞において性決定因子 SRY は stemness factors の転写制御を介して癌幹細胞の性質を維持する、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11-14日、福岡

- ⑤ Hirotda Akiyama, Shigekazu Murakami, Fumio Tashiro, The 14-3-3 beta/FBI1 complex target gene, SPARC acts as a suppressive oncogene, 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月19-21日, 札幌
- ⑥ Shigekazu Murakami, Hirotda Akiyama, Fumio Tashiro, Ectopic BCAS2 expression causes abnormal amplification of centrosome, 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月19-21日, 札幌
- ⑦ Shigekazu Murakami, Satomi Chishima, Hisato Uemoto, Erina Sakamoto, Tatsuhiro Shibata, Hirotda Akiyama, Fumio Tashiro, Possible involvement of SRY in occurrence of cancer stem cells, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13-16日, 横浜
- ⑧ Hiroko Otsuka, Hirotda Akiyama, Yoshitaka Gotou, Makoto Tomatsu, Takashi Komeno, Naoyuki Iida, Seisuke Hattori, Yasushi Kawasaki, Fumio Tashiro, Analysis of membrane receptor of aralin, a cancer-selective cytotoxic protein from aralin elata, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13-16日, 横浜
- ⑨ Akiyama Hirotda, Murakami Shigekazu, Tashiro Fumio, FBI1/Akirin2 target genes, SPARC and B-CAM, are suppressive oncogenes, 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3-5日, 名古屋
- ⑩ Hirotda Akiyama, Akito Hattori, Shogo Hayashi, Kohei Soga, Fumio Tashiro, Establishment of the highly sensitive detection method of cancer cells under near infrared excitation, and its possible application for cancer therapy, International Symposium on Technologies against Cancer (ISTC2011), 2011年9月1-2日, 江戸川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 弘匡 (AKIYAMA HIROTADA)

東京理科大学・基礎工学部生物工学科・助教

研究者番号：40400254

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：