

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830076

研究課題名(和文) Rbの脂質代謝を介したがん悪性進展制御メカニズム

研究課題名(英文) The metabolic function of RB in controlling mevalonate (MVA) pathway regulates tumor progression

研究代表者

佐々木 信成 (Sasaki, Nobuaki)

金沢大学・がん進展制御研究所・博士研究員

研究者番号：40415170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞ががん化する際には様々な代謝異常が生じるが、近年これらの代謝異常が、がん細胞の増殖や悪性化に深く関与していることが報告され、がん治療の新たな標的として注目を集めている。我々は、がん抑制遺伝子RBの機能喪失が、脂質代謝経路、特にメバロン酸経路の多くの遺伝子発現を誘導することを見出した。また、その結果生じるコレステロールやその誘導体脂質が、細胞内ROSレベルを抑制することにより、がんの悪性化形質の獲得に寄与していることを明らかにした。本研究は、RBによる脂質代謝制御という新たな機能と、その破綻が引き起こすメバロン酸経路の異常な亢進が、がんの悪性化形質の獲得に寄与していることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：Recent advances in cancer metabolism have revealed that metabolic abnormalities in cancer cells are closely related to enhanced cell proliferation and malignant progression of a number of tumors.

Mutations in Retinoblastoma (RB) gene are found at the initiation of limited human cancers, whereas RB protein inactivation is frequently found in much wider variety of cancers mainly during their progression. These findings suggest that RB exerts more roles than previously thought. Here we show that RB affects transcription of many enzymes involved in Mevalonate (MVA) pathway. We demonstrate that RB depletion in prostate cancer cells induces some of typical malignant features including tumor sphere forming-activity and hormone-refractory growth. Cholesterol and its derivatives generated by MVA pathway contribute to these phenotypes through modifying cellular ROS level. These results indicate that RB regulates cancer progression through the metabolic function in controlling MVA pathway.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：コレステロール エステル メバロン酸経路 悪性進展 細胞内ROS RB 前立腺がん 癌幹細胞 コレステロール

1. 研究開始当初の背景

(1) Retinoblastoma (RB) 遺伝子は、世界で最初に同定されたがん抑制遺伝子であり、転写因子 E2F ファミリーの活性制御を介して、細胞周期の G1/S 期への移行を制御している。当初、RB はその細胞周期に与える影響から、様々ながんの発がん過程において、イニシエーションに関与する因子として捉えられていたが、近年 RB の機能喪失が、むしろがんの悪性化進展過程において、より頻りに観察されるようになり、この過程における RB の新たな役割に注目が集まっていた。

(2) 細胞ががん化する際には、様々な代謝異常が生じることが知られているが、特に「脂質代謝経路」及び「解糖系」の亢進は、非常に多くのがん細胞において観察されている代謝異常である。近年、これらの代謝異常が、がん細胞の増殖や悪性化に深く関与していることが報告され、がん治療の新たな標的として注目を集めているが、脂質代謝の異常が生じるメカニズムやがん細胞に与える影響などは、いまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

Rb のヘテロ型欠損マウスは、正常アレルの体性欠失 (LOH) に伴い、脳下垂体腺癌や甲状腺 C 細胞腺腫を発生する。研究代表者の研究室では、この甲状腺 C 細胞腺腫由来の細胞を用い、Rb の欠失により発現が変化する遺伝子を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に探索した (Shamma et al., Cancer Cell 2009)。同定された遺伝子群の解析から、研究代表者は Rb の欠失が、脂質代謝経路、特にメバロン酸経路に関わる多くの酵素の発現を誘導していることを見出した。そこで、研究代表者は、Rb 欠失による脂質代謝の異常な亢進が、がんの悪性化進展において重要な役割を担っているのではないかと考えた。がんの悪性化進展過程において機能喪失する RB と、その結果誘導される脂質代謝の異常が、がんの悪性化進展に及ぼす影響を明らかにするため、がんの悪性化進展過程において、脂質代謝の異常が関与する現象の同定、がんの悪性化進展に作用する脂質の同定、脂質による、がん悪性化進展促進の作用機序の解明を行い、これらの研究を基に将来的な臨床応用への基盤を築くことを目指す。

<引用文献>

Shamma A, Takegami Y, Miki T, Kitajima S, Noda M, Obara T, Okamoto T, Takahashi C. Rb Regulates DNA damage response and cellular senescence through E2F-dependent suppression of N-ras isoprenylation. Cancer Cell. Vol.15, 2009, pp.255-269

3. 研究の方法

RB の機能喪失によって引き起こされる脂質

代謝の異常が、がんの悪性化進展過程に及ぼす影響を分子レベルで明らかにするため、顕著な亢進が見られたメバロン酸経路に注目し、以下に記した三つの項目に研究計画を分け、研究を進める。これらの研究により得られる結果から、臨床標的となりうる脂質や酵素を見つけ出し、将来的な臨床応用への基盤を築くことを目指す。

(1) がんの悪性化進展過程において、脂質代謝の異常が関与する現象の同定。RB の機能喪失による脂質代謝の異常な亢進が、がんの悪性化進展過程における、どの現象に影響を与えるのか、特に癌幹細胞性や薬剤耐性に注目して解析する。

(2) がんの悪性化進展に作用する脂質の同定。先行して解析が進んでいるコレステロールやその誘導体を中心に、RB の機能喪失により合成が促進される様々な脂質の中で、がんの悪性化進展に寄与する脂質を、(1)で同定した現象を指標として用いて評価する。

(3) 脂質による、がん悪性化進展促進の作用機序の解明。(1), (2)の結果を受け、がんの悪性化進展過程の各現象を制御している主要な分子・シグナル経路に注目し、その発現量や活性、細胞内局在が、(2)で同定された脂質の量を変化させた際に、どのように変化するかを観察し、脂質がシグナル経路に及ぼす影響を明らかにする。

4. 研究成果

(1) RB は、ヒト前立腺がんの悪性化進展過程において、頻りに不活性化していることが臨床サンプルの解析から示されている。研究代表者は、野生型 RB を発現するホルモン応答性のヒト前立腺がん由来細胞 LNCaP において、RB のノックダウンが、マウスの甲状腺 C 細胞腺腫と同様に、メバロン酸経路上の遺伝子発現を誘導することを見出した。また、RB のノックダウンは、通常培地での増殖には影響を及ぼさないが、ステロイドホルモンを除去し、さらにアンドロゲン受容体 (AR) の阻害剤を加えたホルモン療法を模した培養条件下においては、強い薬剤耐性 (ホルモン療法抵抗性) を示した (図 1A)。さらに、RB ノックダウン細胞は、非接着培養条件下において、がん幹細胞様の細胞集団と考えられるスフィアの形成能が非常に高く (図 1B)、また免疫不全マウスへの移植実験では、コントロール細胞に比べて造腫瘍能が高いことが観察された。次に、ホルモン療法抵抗性やスフィア形成能の誘導を、がんの悪性化形質獲得の指標として用い、RB のノックダウンが引き起こすメバロン酸経路の亢進との関係を調べた。まず、メバロン酸経路に特異的な阻害剤であるスタチンで細胞を処理した結果、RB のノックダウンが引き起こす、ホルモン療法抵抗性やスフィア形成能を強く

抑制することが観察された。メバロン酸経路は複数の分岐を有するが、分岐したそれぞれの経路に特異的な阻害剤を細胞に処理したところ、コレステロール合成経路に対する阻害剤のみが、スフィア形成を強く抑制し、またコレステロールの添加はスタチンによって抑制されたスフィア形成能を回復させた。これらの結果は、RB の機能喪失が引き起こすコレステロール合成経路の異常な亢進が、薬剤耐性や幹細胞特性の獲得で示される、がん悪性化進展に関与していることを強く示唆するものである。

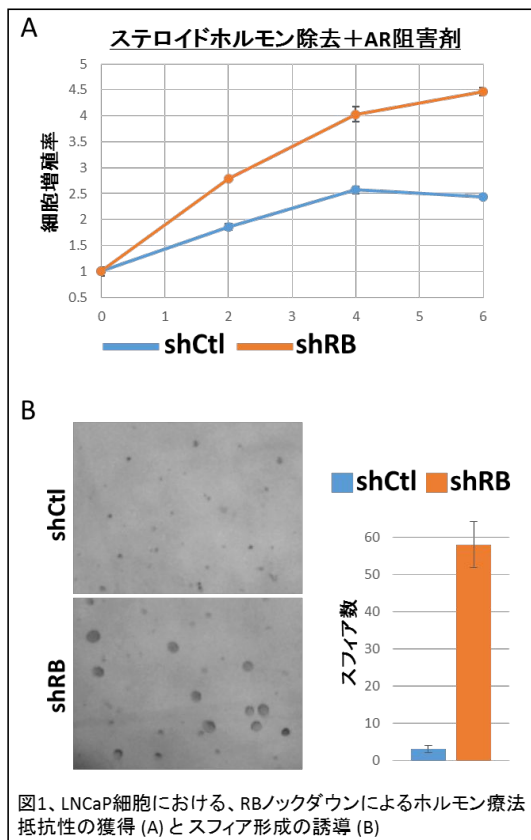


図1、LNCap細胞における、RBノックダウンによるホルモン療法抵抗性の獲得 (A) とスフィア形成の誘導 (B)

(2) コレステロールの添加が、スタチンによって抑制されるスフィア形成を回復させるという予備的な実験結果から、コレステロールが、がん悪性化に作用する標的脂質として有力な候補であると考えられたが、コレステロールはそれ自身で機能するだけでなく、オキシステロールやコレステロールエステルなどの様々な誘導体の合成にも利用される。それらのコレステロール誘導体が標的脂質である可能性も考慮し、誘導体の直接添加や、合成酵素もしくは誘導体の受容体に対する阻害剤を作用させた際に、がん細胞の悪性化進展に与える影響を評価した。その結果、コレステロールエステルを合成する酵素である Sterol O-acyltransferase1 (SOAT1)の阻害剤である Avasimibe が、RB のノックダウンが誘導するホルモン療法抵抗性やスフィア形成能の獲得を強く抑制することが明らかになった。これらの結果から、コレステロールとコレステロールエステルが、単独も

しくは協調して働くことで、がんの悪性化に作用している可能性が高いと考え、この二つの脂質に注目し解析を進めている。

(3) RB は細胞内の Reactive Oxygen Species (ROS)レベルを制御していることが報告されており、また、コレステロールは細胞内の酸化ストレスにより酸化され、オキシステロールを形成することが知られている。これらのことから、RB の機能喪失が引き起こす、コレステロール合成経路の異常な亢進と細胞内 ROS レベルとの間に何らかの相関があるのではないかと考え、解析を行った。その結果、RB のノックダウンは細胞内 ROS レベルを強く抑制すること (図 2A)、また、細胞を脂質除去した血清 (lipid-depleted serum (LDS)) 培地中で培養すると、細胞内 ROS レベルは著しく上昇するが、そこにコレステロールを添加すると、細胞内 ROS レベルを濃度依存的に抑制することが観察された (図 2B、C)。さらに、SOAT1 の阻害剤である Avasimibe の添加は細胞内 ROS レベルを上昇させた (図 2D)。これらの結果は、RB の機能喪失が引き起こす、コレステロール合成経路の異常な亢進が、細胞内 ROS レベルを抑制するように働いていることを示唆している。

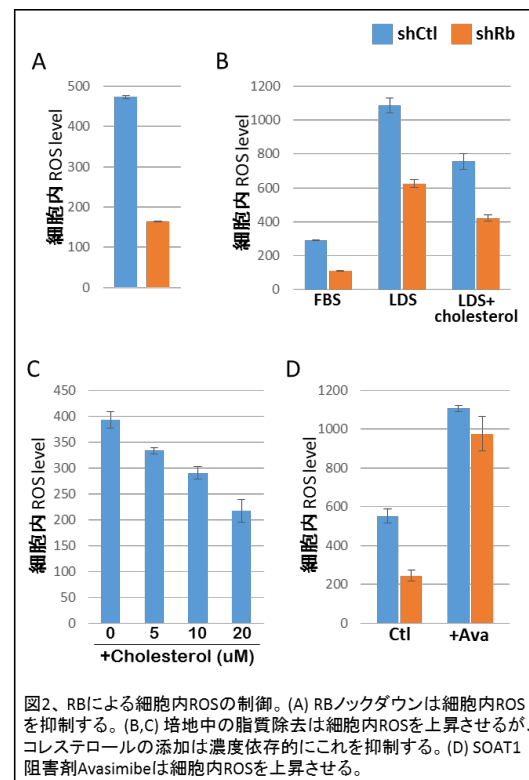


図2、RBによる細胞内ROSの制御。(A) RBノックダウンは細胞内ROSを抑制する。(B,C) 培地中の脂質除去は細胞内ROSを上昇させるが、コレステロールの添加は濃度依存的にこれを抑制する。(D) SOAT1阻害剤Avasimibeは細胞内ROSを上昇させる。

次に、コレステロールやその誘導体による細胞内 ROS の制御が、がんの悪性化に及ぼす影響を調べるために、ROS のスカベンジャーである NAC を細胞に添加してスフィアアッセイを行った。その結果、SOAT1 阻害剤によって抑制されたスフィア形成が、同時に NAC を添加することによって回復すること

が観察された。この結果は、コレステロールやその誘導体による細胞内 ROS の抑制が、がんの悪性化形質の獲得に寄与していることを示唆している。

以上の研究成果より、本研究は RB の持つ脂質代謝（メバロン酸経路）の制御という新たな機能を提示すると共に、RB の機能喪失が誘導するメバロン酸経路の異常な亢進が、コレステロールやその誘導体を介して細胞内 ROS レベルを制御し、がんの悪性化形質の獲得に寄与しているという重要な知見を明らかにした。今後、さらに詳細な分子メカニズムを解明することで、RB の機能喪失が認められる様々ながんに対して、この脂質代謝経路を新たな治療標的とする原拠を与えることに繋がると期待できる。

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)

Kitajima S, Kohno S, Kondo A, Sasaki N, Nishimoto Y, Li F, Mohammed MS, Muranaka H, Nagatani N, Suzuki M, Kido Y, Takahashi C. Undifferentiated State Induced by Rb-p53 Double Inactivation in Mouse Thyroid Neuroendocrine Cells and Embryonic Fibroblasts. STEM CELLS. 査読有、vol.33, 2015, pp.1657-1699, DOI: 10.1002/stem.1971.

Shamma A, Suzuki M, Hayashi N, Kobayashi M, Sasaki N, Nishiuchi T, Doki Y, Okamoto T, Kohno S, Muranaka H, Kitajima S, Yamamoto K and Takahashi C. ATM mediates pRB function to control DNMT1 protein stability and DNA methylation. Molecular and Cellular Biology. 査読有、vol.33, 2013, pp.3113-3124
DOI: 10.1128/MCB.01597-12.

[学会発表](計 19 件)

佐々木信成, 村中勇人, 北嶋俊輔, 河野晋, Shamma A, 高橋智聡. RB によるメバロン酸経路を介したがん悪性進展制御機構. 日本癌学会シンポジウム/共同利用・共同研究拠点シンポジウム 2015 年 1 月 21 日 石川県立音楽堂(金沢)

Sasaki N, Kitajima S, Muranaka H, Shamma A, Kohno S, Takahashi C. The metabolic function of RB in controlling mevalonate (MVA) pathway regulates tumor progression. Keyston Symposia 2015 年 1 月 16 日 Vancouver (Canada)

佐々木信成, 村中勇人, 北嶋俊輔, 河野晋, Shamma A, 高橋智聡. RB によるメバロン酸経路を介したがん悪性進展制御機構. 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 27 日 パシフィコ横浜(横浜)

Sasaki N, Muranaka H, Kitajima S, Kohno S, Shamma A and Takahashi C. The metabolic function of RB in controlling mevalonate (MVA) pathway and tumor progression. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 27 日 パシフィコ横浜(横浜)

佐々木信成, 村中勇人, 北嶋俊輔, 河野晋, Shamma A, 高橋智聡. RB によるメバロン酸経路を介したがん悪性進展制御機構. 平成 26 年度文部科学省 新学術領域研究 『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』がん若手研究者ワークショップ 2014 年 9 月 3 日 蓼科グランドホテル滝の湯(蓼科)

Sasaki N, Takahashi C. The metabolic function of RB in controlling mevalonate (MVA) pathway and cancer cells. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa & Symposium on Drug Discovery in Academics 2014 年 1 月 23 日 金沢エクセルホテル東急(金沢)

佐々木信成, 高橋智聡. RB によるメバロン酸経路の制御とがん幹細胞における役割. 平成 25 年度文部科学省 新学術領域研究 『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』がん若手研究者ワークショップ 2013 年 9 月 5 日 蓼科グランドホテル滝の湯(蓼科)

[図書](計 1 件)

佐々木 信成、羊土社、実験医学「News & Hot Paper Digest」, Vol.32、No.18、(11 月号) 2014、p2940-p2941

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 信成 (Sasaki Nobunari)

金沢大学・がん進展制御研究所・博士研究員

研究者番号：40415170