

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2014～2015  
課題番号：26860109  
研究課題名(和文) オーフアントランスポーターの細胞内代謝調節機構解明と破綻による腫瘍形成への関与  
  
研究課題名(英文) The pathological role of an orphan transporter in the regulation of cancer cell characteristics  
  
研究代表者  
伊藤 慎悟 (ITO, SHINGO)  
  
熊本大学・その他の研究科・助教  
  
研究者番号：20466535  
  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：がん組織においてオーファントランスポーターであるSLC22A18の発現低下が悪性度を増加させることが報告されている。そこで本研究では、ヒト肝臓がん細胞であるHepG2細胞においてSLC22A18発現低下ががん細胞特性に与える影響を解析した。HepG2細胞はSLC22A18のノックダウンによって細胞増殖および遊走性は低下したが、浸潤性は増加した。網羅的定量プロテオミクス解析から、SLC22A18発現低下が細胞増殖に関するタンパク質の発現を低下させた。以上の結果から、SLC22A18は細胞内タンパク質発現変動を介して肝臓がん細胞の特性を変化させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Low SLC22A18 protein expression has been reported to be associated with a poor survival rate in several cancers. In this study, we investigated the expression and functional role of SLC22A18 in HepG2 hepatoblastoma cells. Western blotting confirmed the protein expression of SLC22A18 in HepG2 cells. The invasiveness of SLC22A18-knockdown HepG2 cells was increased, while proliferation and chemotaxis of SLC22A18-knockdown HepG2 cells were reduced. Quantitative whole proteomic analysis using SWATH technology demonstrates a significant change in the intracellular proteins involved in cell proliferation in the SLC22A18-knockdown HepG2 cells. These findings suggest that SLC22A18 plays a pivotal role in the regulation of hepatocarcinoma cancer cell growth characteristics, by altering the expression of cellular proteins.

研究分野：分子薬理学

キーワード：オーファントランスポーター がん プロテオミクス

### 1. 研究開始当初の背景

トランスポーターは組織間の内因性物質や薬物の移動を制御する膜輸送タンパク質である。これまでに、トランスポーターの生理機能・発現異常が、がんや生活習慣病などの疾患発症および薬剤耐性に大きく関与することが明らかにされてきている。しかし、ヒトゲノムが終了したにも関わらず、未だ基質や機能が特定されていないオーファントランスポーターが多数ある。申請者が注目している SLC22A18 は独自に開発した質量分析計を用いたタンパク質一斉定量法 (標的プロテオミクス) を用いた解析から薬物動態に大きく関与するヒト肝臓・小腸において高発現しているという興味深い知見を得た。

SLC22A18 が属する SLC22A ファミリーには内因性物質だけでなく臨床で用いられる薬物やその代謝物を基質とする体内動態制御にとって重要な有機アニオンおよび有機カチオントランスポーター (OAT, OCT, OCTN 等) が含まれているが、SLC22A18 の機能は未知のままである。一方、SLC22A18 は遺伝学的解析から先天性奇形症候群である Beckwith-Wiedemann 症候群や小児三大固形悪性腫瘍の 1 つであるウィルムス腫瘍発症に関与する疾患関連遺伝子であり、さらに成人の肝臓がん・乳がん・前立腺がん発症と関連がある遺伝子であることが報告されている。このように、SLC22A18 は内因性基質や薬物の輸送と複数の遺伝性悪性腫瘍や成人の腫瘍形成への関与が示唆されているにもかかわらず、その分子機能と病態生理的役割が不明であるために、薬物動態予測および疾患治療へ応用できない状況である。

申請者は SLC22A18 の細胞内代謝への関与をメタボロミクスを用いて解析したところ、SLC22A18 のタンパク質発現増加によってタンパク質の翻訳後修飾である O 結合 N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) 化に関与する細胞内代謝産物量の増加が見出され、Western blot 法を用いた解析で SLC22A18 タンパク質発現増加によって多くの O-GlcNAc 化タンパク質発現が増加していることを確認した。O-GlcNAc 化はリン酸化と同アミノ酸部位に修飾されるため細胞内シグナルへの関与が近年注目されている。特に、がん抑制遺伝子である p53 タンパク質シグナル制御に O-GlcNAc とリン酸化のクロストークが重要であり、p53 は O-GlcNAc 化されることで安定性が増加し発現量が増加する。申請者は SLC22A18 タンパク質発現増加によって p53 タンパク質発現量が増加していることを見出した。したがって、SLC22A18 を介したタンパク質の O-GlcNAc 化によるタンパク質機能制御はがん発症に重要である可能性が高い。以上の知見から、申請者の仮説「がん抑制遺伝子かつ機能未知オーファントランスポーターである SLC22A18 は機能低下による細胞内代謝調節機構異常によって腫瘍形成を促進さ

せる」と発想するに至った

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者の仮説「がん抑制遺伝子でかつオーファントランスポーターである SLC22A18 の機能低下は細胞内代謝調節機構破綻によるシグナル伝達異常によって腫瘍形成を促進させる」の解明である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞分画

100 mm dish 2~3 枚に培養した細胞に対して、細胞膜回収キット (BIO VISION) を用いて細胞質画分および粗膜画分に分画した。粗膜画分は RIPA buffer を用いて可溶化した。タンパク質量は BSA を標準とした BCA アッセイキットを用いて行った。

#### (2) Western blot 法によるタンパク質発現解析

タンパク質溶液を Lammili buffer と混合し、37、30 分間もしくは 95、5 分間インキュベーションすることによって SDS 化を行った。定法に従ってサンプルを SDS-PAGE によって分離後、PVDF メンブレンに転写し、ブロッキングを行い、各種 1 抗体と一昼夜反応させた。次に PVDF メンブレンを洗浄後、HRP 標識 2 次抗体と反応させた。ECL 試薬を用いて HRP 由来の化学発光をイメージアナライザーで検出した。

#### (3) SLC22A18 特異的 shRNA を用いた SLC22A18 安定ノックダウン HepG2 細胞の構築

SLC22A18 に特異的な shRNA を 4 つ設計し、肝臓がん細胞株である HepG2 細胞に ScreenFectA (WAKO) を用いて遺伝子導入し、puromycin によってセレクションを行い、安定ノックダウン細胞を樹立した。SLC22A18 mRNA 発現量は特異 probe を用いた定量 PCR 法を用いて行った。

#### (4) 細胞形態観察

##### 1. 2 次元培養

細胞を normal coated 100 mm dish および collagen type 1 coated 100 mm dish に培養し、実体顕微鏡を用いて形態を観察した。

##### (5) 細胞増殖試験

1. Trypan blue exclusion assay: 細胞を normal および collagen type 1 coated 6 well plate に播種し、播種後 1 日および 3 日目における生細胞数を Luna 自動細胞計数装置を用いて測定した。

2. Cell counting assay: 細胞を collagen type 1 coated 96 well plate に播種し、播種後 1 日後に各種試薬による処理を行い、72 時間後における細胞数を Cell-Counting kit8 (DOJINDO) を用いて測定した。

#### (6) 細胞内脂肪蓄積

細胞を collagen type 1 coated 6 well plate に播種し、72 時間培養後に Oil-red O 染色を行った。また、遊離脂肪酸混合液 (1 mM palmitic acid および oleic acid) を処理 36 時間後に Oil-red O 染色を行った。

#### (7) SWATH を用いた網羅的タンパク質定量解析

細胞質画分に対して PTS 法を用いてトリプリン前処理を行った。網羅的定量プロテオミクスは nanoLC (Dionex) と TT5600 を合わせて、SWATH™ Acquisition を用いて解析した。

#### (8) 分子間ネットワーク解析

プロテオミクスデータに基づくネットワーク解析は生物学に関する論文などを網羅した分子間相互作用解析を行える Keymolnet を用いて解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト肝臓、小腸および腎臓ミクロソームにおける SLC22A18 タンパク質発現

SLC22A18 に対する特異的抗体を用いてヒト肝臓、小腸および腎臓ミクロソームにおける SLC22A18 タンパク質発現を Western blot 法を用いて解析した。その結果、ヒト肝臓、小腸および腎臓ミクロソームにおいて、SLC22A18 安定発現細胞株から検出されたタンパク質と同じ 35 kDa 付近にバンドを検出した。また、バンド強度はヒト腎臓が最も強く、ヒト肝臓および小腸は同程度であった。これは SLC22A18 mRNA の発現量比と類似していた。従って、SLC22A18 はヒト肝臓に発現することが示唆された。

#### (2) HepG2 細胞における SLC22A18 タンパク質発現解析

肝臓がんモデル細胞である HepG2 細胞における SLC22A18 タンパク質発現を Western blot 法を用いて解析した。その結果、SLC22A18 タンパク質発現が確認されている乳がんモデル細胞である MCF-7 細胞および結腸がんモデル細胞である Caco2 細胞と同様に 35 kDa 付近にバンドを検出した。従って、HepG2 細胞に SLC22A18 タンパク質が発現していることが示唆された。

#### (3) SLC22A18 安定ノックダウン HepG2 細胞の構築

肝臓がん細胞における SLC22A18 の病態生理機能を解析するために、HepG2 細胞に SLC22A18 shRNA を遺伝子導入し、puromycin 耐性を示すクローンを選択した。shRNA による SLC22A18 mRNA 発現量の低下を定量 PCR 法によって解析したところ、SLC22A18 shRNA 処理することによって 50% の SLC22A18 mRNA 発現低下が観察された。したがって、SLC22A18 安定ノックダ

ウン HepG2 細胞が樹立された。

#### (4) 細胞形態の変化

SLC22A18 発現低下による HepG2 細胞の形態変化を観察した。その結果、negative control HepG2 (HepG2-NC) 細胞および SLC22A18 shRNA 発現 HepG2 (HepG2-shRNA) 細胞を normal dish に培養した時、両細胞間に形態学的変化は観察されなかった。一方、両細胞を細胞外マトリックスの主成分である collagen type I coated dish で培養した時、HepG2-NC 細胞は丸い形、HepG2-shRNA 細胞は細長い繊維芽細胞様の形態を示した。

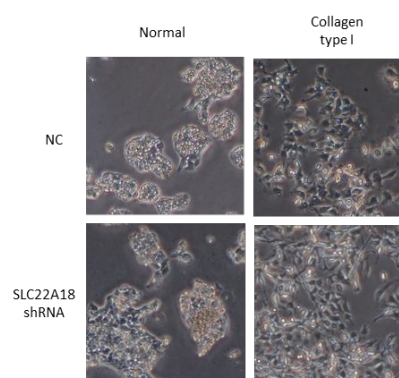


図1 HepG2細胞におけるSLC22A18ノックダウンによる細胞形態変化

#### (5) 細胞増殖

HepG2-NC および HepG2-shRNA 細胞の細胞増殖を trypan blue excretion assay を用いて検討したところ、SLC22A18 の発現低下によって normal および collagen type 1 coated dish のどちらにおいても細胞増殖速度は約 50% 低下した (図 2)。

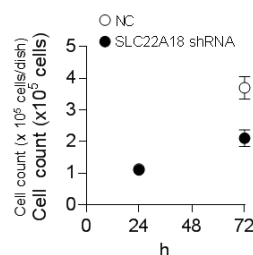


図2 HepG2細胞におけるSLC22A18ノックダウンによる細胞増殖への影響

#### (6) 細胞増殖における細胞外基質の影響

HepG2-shRNA 細胞の細胞増殖は、遊離脂肪酸によって HepG2-NC 細胞と同定まで増加した。また、IGF-1 による HepG2-NC 細胞増加は HepG2-shRNA 細胞では観察されなかった。

#### (7) 細胞内脂肪蓄積

HepG2 細胞における SLC22A18 発現低下

と細胞内脂肪動態との関連を検討するために、細胞内脂肪滴量を Oil-red O 染色を用いて解析した。その結果、HepG2-shRNA 細胞の脂肪滴量は HepG2-NC 細胞に比べて有意に増加していた。また、培地中に脂肪酸を処理することによって両細胞における脂肪滴量は同程度に増加したことから、SLC22A18 発現低下が脂肪滴合成に影響しないことが考えられる。従って、SLC22A18 発現低下による脂肪滴増加には分解系の低下が関与することが示唆された。

#### (8) 細胞遊走性および浸潤性

細胞遊走性を検討したところ、HepG2-shRNA 細胞の遊走性は HepG2-NC 細胞より有意に低下した。一方、HepG2-shRNA 細胞の浸潤性は HepG2-NC 細胞より有意に増加した (図 3)。

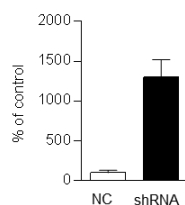


図3 HepG2細胞におけるSLC22A18ノックダウンによる浸潤への影響

#### (9) 網羅的定量タンパク質発現変動解析

SLC22A18 発現低下による細胞内タンパク質発現変動を明らかにするために、HepG2 細胞の細胞質画分における網羅的タンパク質定量解析を SWATH を用いて行った。その結果、SLC22A18 発現低下によって発現が有意に増加したタンパク質が 241 個および有意に低下したタンパク質が 257 個同定された。これらタンパク質定量情報を基に Keymolnet を用いて分子間ネットワーク解析を行ったところ、腫瘍形成や悪性化に直接関与するネットワークの同定には至らなかった。次に、変動タンパク質の中で肝臓がんに関連がある分子を文献情報を基に探索したところ、肝臓がんにおいて発現量低下が生存率低下に関連が報告されているインスリン様成長因子結合タンパク質-1 (IGFBP-1) タンパク質発現量が HepG2-shRNA 細胞で有意に低下していた。IGFBP 分解に関与する Cathepsin D 発現量は HepG2-shRNA 細胞において有意に増加していた。細胞内における IGFBP-1 の分解が増加していることが推察される。肝臓がんマーカーである  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) 発現は HepG2-shRNA 細胞において有意に増加した。肝臓がん細胞は分化によって IGFBP-1 が増加し、AFP が低下することが報告されている。従って、HepG2 細胞における SLC22A18 発現低下は未分化状態に戻すことで、がんの悪性度が増加することが推察された。

#### (10) 結論

SLC22A18 発現低下が細胞内代謝物変動を介して細胞内タンパク質発現変動を誘導することで、肝臓がん細胞の悪性度を増加させることが示唆された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

本多玄太郎、赤澤貴憲、伊藤慎悟、仲村健司、平山未央、寺崎哲也、大槻純男：オーファントランスポーターのタンパク質翻訳後修飾への関与、日本薬学会第 30 年会、2015 年 5 月 21-23 日、長崎  
伊藤慎悟、本多玄太郎、赤澤貴憲、平山未央、寺崎哲也、大槻純男：オーファントランスポーター SLC22A18 のタンパク質翻訳後修飾への関与、第 10 回トランスポーター研究会年会(JTRA2015)、2015 年 6 月 20-21 日、東京

Shingo ITO : SLC22A18 regulates the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells by altering cellular protein expression, 74th Annual meeting of the Japan Cancer Science Association, 10, October, 2015, Nagoya, Japan

Yu Fujino, Shingo Ito, Mio Hirayama, Sumio Ohtsuki: Facilitation of cell proliferation by suppression of SLC22A18 in human breast cancer cells, MCF-7. International Symposium on Chronic Inflammatory Diseases, Kumamoto (ISCIDK2015), 16-17 Oct,2015, Kumamoto, Japan,

〔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

<http://www.ohtsuki-lab.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

伊藤 慎悟 (ITO SHINGO)  
熊本大学・大学院生命科学研究部  
助教  
研究者番号：20466535

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし