

A distinct function of the retinoblastoma protein in the control of lipid composition identified by lipidomic profiling

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-11-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Muranaka, Hayato メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00052711

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



【総説】

第16回 高安賞優秀論文賞受賞

論文 「A distinct function of the retinoblastoma protein in the control of lipid composition identified by lipidomic profiling」

Oncogenesis 6 (6): e350 2017年6月掲載

Hayato Muranaka, Akio Hayashi, Keiichi Minami, Shunsuke Kitajima, Susumu Kohno, Yuuki Nishimoto, Naoko Nagatani, Misa Suzuki, Liyana Arachchillage Nilakshi Kulathunga, Nobunari Sasaki, Nobuhiro Okada, Takashi Matsuzaka, Hitoshi Shimano, Hideaki Tada, Chiaki Takahashi

「リポドミクス・プロファイリングによるがん抑制遺伝子産物pRbの脂質代謝制御における役割の探索」

村中 勇人 (むらなか はやと)

背 景

Rb (*retinoblastoma*) 遺伝子は、1986年に網膜芽細胞腫の原因遺伝子として発見された、最初のがん抑制遺伝子である。その遺伝子産物pRbは、多くのがんで不活性化されており、がんの発症や進展に深く関与すると考えられる。pRbの古典的機能としては、細胞周期がS期に移行するのを抑制することが知られているが、それ以外の機能についても様々な研究報告が存在する。最近、我々を含む複数の研究グループから、pRbがオートファジーや解糖系、グルタミン代謝、ミトコンドリア機能等の代謝に関与することが報告され、pRbの代謝機能が注目を集めている¹⁾。この一連の研究成果は、がん細胞の特徴の一つである代謝変化が引き起こされる分子メカニズムを理解する上で、重要な知見だと言える。

我々は、pRbの不活性化がN-Rasのイソプレニル化を介して細胞老化やDNA損傷を誘導することを明らかにした。さらに、このpRbの機能が、pRbの主要なパートナーの転写因子E2Fsおよび脂質合成系の主要な転写因子sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs)によって制御されることを示した²⁾。上記の研究成果から、我々は、pRbが脂質代謝においても重要な役割を果たしているのではないかと仮説に至った。そこで、本研究では、リポドミクス解析およびトランスクリプトミクス解析を用いて、pRbの不活性化が脂質代謝に及ぼす影響を検討した。

結果と考察

pRb不活性化による脂肪酸代謝物の変動を網羅的に明らかにするため、我々は、*Rb* shRNAあるいはcontrol shRNAを発現するLentivirusを感染した野生型マウス胚線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs) から脂質を抽出し、超高速液体クロマトグラフィー-scheduled multiple reaction monitoring (MRM) を用いたリポドミクス解析を行った。主成分分析 (principal component analysis, PCA) およびhierarchical clustering analysisの結果は、pRbを不活性化した細胞の脂肪酸代謝物がcontrolの細胞の脂肪酸代謝物とは異なる集団として明瞭に分離されることを示した。Variable importance in the projection (VIP) スコアの大きい脂質代謝産物は、pRb不活性化による脂質代謝物の変動にもっとも影響を及ぼした代謝物だと考えられるが、その中には、diacylglycerol (DAG)

36:2, acylcarnitine (AcCar) 17:0, AcCar 18:0, DAG 34:0, DAG 32:0, DAG 36:1, Ceramide (Cer) d18:1/22:1, phosphatidylserine (PSa) 38:1, phosphatidylcholine (PCa) 36:1およびlysophosphatidylserine (LPSa) 16:0が含まれていた。

pRb不活性化が各脂質クラスの総量に及ぼす影響を検討した結果、LPS, DAG, Fatty acid (FA), AcCar, PC, arachidonoyl ethanolamide (AEA) はpRb不活性化により増加、phosphatidylglycerol (PG), monoacylglycerol (MAG) 等は減少し、lysophosphatidic acid (LPA) 等ほぼ変動が認められなかった脂質クラスも存在した。一方、測定した脂肪酸代謝物の総量に変化は認められなかった。また、各脂質クラスごとにヒートマップを作製し、pRb不活性化が各脂質分子に及ぼす影響を検討した結果、LPSのように全体的に増加あるいはMAGやhexosyl-ceramide (HexCer) のように全体的に減少する傾向を示すものが存在する一方で、DAGのように特徴的な変動パターンを示す脂質クラスも存在した。DAGでは、アシル鎖の二重結合の数が0あるいは1-2のものがpRb不活性化により増加する傾向があるのに対し、二重結合の数が多いものは変動しないか減少するものが多いことを見出した。さらに、DAGの各分子種の脂肪酸組成を検討した結果、pRb不活性化により増加するものには、C16:0, C18:0, C18:1等から構成される分子種が多いのに対し、C18:2やC20:3等、C=C二重結合が2つ以上あるアシル鎖を持つ分子種は変動しないか減少するものが多かった。以上の結果から、pRbが幅広い脂質クラスの脂肪酸代謝物に影響を及ぼすこと、さらに、複数の脂質クラスにおいては脂肪酸アシル鎖のパラメーター (炭素数、二重結合の数等) によってその変動パターンが異なることが明らかになった。

上記の結果は、pRbが脂肪酸組成に影響を及ぼし、その変化が一部の脂質クラスの脂肪酸代謝物の組成に反映される可能性を示唆した。そこで、pRbが脂肪酸組成に及ぼす影響を検討した結果、pRb不活性化がFA14:0, FA16:0, FA16:2, FA17:0, FA18:1およびFA20:2を特異的に増加することを見出した (図1)。FA18:0についても、有意差はないが増加傾向が認められた。これらの脂肪酸はpRb不活性化により顕著に増加した脂質代謝物の脂肪酸アシル鎖の組成とよく一致する。

pRb不活性化により顕著に増加するFA14:0, FA16:0,

FA18:0およびFA18:1は、脂肪酸伸長酵素 *elongation of long chain fatty acid family member 6 (Elovl6)* による伸長反応および脂肪酸不飽和化酵素 *stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1)* による不飽和化反応により合成される (図2)。このことから、我々は、pRbが *Elovl6* および *Scd1* の遺伝子発現を制御する可能性を想定した。pRbを不活性化した野生型MEFおよびそのコントロール細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った結果、pRb不活性化により有意に発現増加する遺伝子群の中に *Elovl6* および *Scd1* が含まれることが示された。さらに、マイクロアレイ解析のデータから脂質代謝関連遺伝子を抽出してパスウェイ解析を行った結果、pRbがBiosynthesis of unsaturated fatty acidsだけでなく、Steroid biosynthesis, Arachidonic acid metabolism等の脂質代謝に影響を及ぼすことが明らかになった。

脂質合成関連遺伝子は転写因子SREBPsにより発現制御されることが知られる。野生型MEFにおけるpRbの不活性化は、*Srebf1* の遺伝子発現には影響を及ぼさないが、その核移行を促進し、さらに *Srebf2* の遺伝子発現増加を誘導した。*Elovl6* および *Scd1* のプロモーター領域の塩基配列の解析結果から、SREBPsの結合配列の他、pRbのパートナー分子E2Fsの結合配列が複数存在することを見出した。pRb不活性化による *Elovl6* の遺伝子発現の増加は、SREBP阻害剤およびE2F阻害剤の処置により

抑制された。さらに、E2Fの阻害は、pRb不活性化によるSREBP-1の核移行の促進を抑制した。また、ChIP-qPCRの結果は、*Elovl6* および *Scd1* のプロモーター領域に、E2Fファミリーの中でも特にE2F3がリクルートされることを明らかにした。以上の結果から、pRbがSREBPsやE2Fsを介して *Elovl6* および *Scd1* の遺伝子発現を制御する可能性が示唆された。(図3)

以前、我々は、*Rb*^{-/-}; *N-ras*^{-/-} MEFより不死化細胞株を樹立する際、spontaneousに変異型p53を有する細胞株を得た(RN6)。この細胞株は、スフィア形成能および免疫不全マウスにおける造腫瘍能を示し、RBの再構成によりそれらの表現型が顕著に抑制される³⁾。興味深いことに、RN6における *Elovl6* および *Scd1* の遺伝子発現はスフィア形成時に誘導され、RBの再構成により抑制された。上記の実験系を用いて、pRb依存的なスフィア形成における *Elovl6* や *Scd1* の役割を検討した結果、*Elovl6*・*Scd1* のノックダウン、および *Scd1* の薬理的阻害はスフィア形成を顕著に抑制した。また、*Scd1* 阻害によるスフィア形成の抑制は、*Scd1* によって生成される一価不飽和脂肪酸 (FA16:1およびFA18:1) の添加によりレスキューされた。RN6を免疫不全マウスに皮下投与した実験では、*Elovl6*・*Scd1* のノックダウンが造腫瘍能を顕著に抑制することを見出した。以上の結果は、*Elovl6* および *Scd1* によって生成される脂質がpRb不活性化により誘導されるがん悪性形質に寄与する可能性を示唆する。

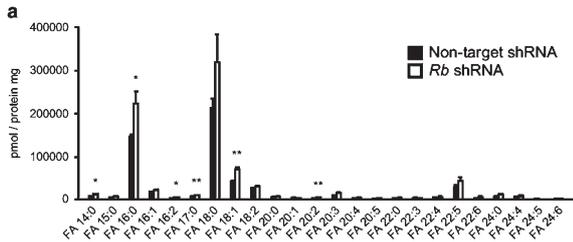


図1. pRb不活性化が脂肪酸組成に及ぼす影響
Rb不活性化MEF (白) およびコントロール細胞 (黒) における各脂肪酸の量。*P<0.05, **P<0.01
Oncogenesis 6 (6): e350, 2017 より転載

結 論

本研究により、がん抑制遺伝子Rbが *Elovl6* や *Scd1* 等の脂肪酸合成関連酵素の遺伝子発現制御を介して、脂肪酸および脂肪酸代謝物の組成に影響を及ぼす可能性が示唆された。pRbが不活性化したがんにおいて、これらの脂肪酸代謝関連酵素が新たな治療標的となり得るかについては、今後、がん細胞やマウスモデルを用いたさらなる検討が必要である。現在、我々はがんにおけるELOVL6の役割と新たな治療標的としての可能性についてさらなる検討を進めている。

文 献

- 1) Kohno S, Kitajima S, Sasaki N, Takahashi C. Retinoblastoma tumor suppressor functions shared by stem cell and cancer cell strategies. *World J Stem Cells* 2016; 8: 170-184.
- 2) Shamma A, Takegami Y, Miki T, Kitajima S, Noda M, Obara T et al. Rb Regulates DNA damage response and cellular senescence through E2F-dependent suppression of N-ras isoprenylation. *Cancer Cell* 2009; 15: 255-269.
- 3) Kitajima S, Kohno S, Kondoh A, Sasaki N, Nishimoto Y, Li F et al. Undifferentiated state induced by Rb-p53 double inactivation in mouse thyroid neuroendocrine cells and embryonic fibroblasts. *Stem Cells* 2015; 33: 1657-1669.

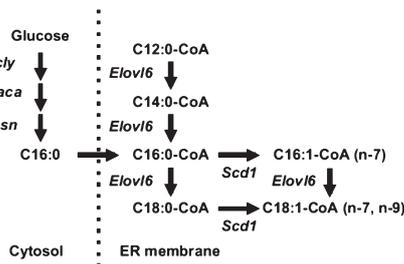


図2. 炭素数 16-18 の脂肪酸の生合成経路
炭素数 16-18 の脂肪酸の合成は、脂肪酸伸長酵素 *Elovl6* や脂肪酸不飽和化酵素 *Scd1* により行われる。マウス胚線維芽細胞におけるpRb不活性化は、これらの脂肪酸を特異的に増加する。
Oncogenesis 6 (6): e350, 2017 より転載

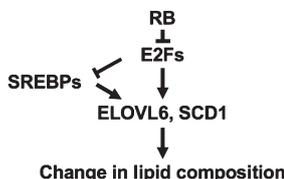


図3. pRbによる *Elovl6* および *Scd1* を介した脂質代謝制御



Profile

2009 富山医科薬科大学薬学部薬科学科卒業
2011 富山大学大学院修士課程修了 (医学薬学教育部薬科学科専攻)
2017 金沢大学大学院博士課程修了 (医学系研究科がん医科学専攻) 金沢大学がん進展制御研究所 博士研究員
2018 カリフォルニア大学ロサンゼルス校に留学予定
趣味 登山, 釣り, ピアノ, 音楽鑑賞