

## 上皮細胞特異的な脂質分子種の機能解析

九州大学 理学研究院 生物科学部門  
池ノ内 順一

### 1. はじめに

私は、これまで上皮細胞の細胞接着構造および細胞極性形成に関するタンパク質に関して研究を進めてきた。現在、タンパク質の研究に加えて、細胞接着や細胞極性に関わる脂質の探索を進めている。細胞膜の主たる構成成分である脂質は、数千種類にも及ぶ多様な分子種で構成されているにもかかわらず、その細胞内局在や機能については不明な点が多い。膜タンパク質の機能発現を考える上で、そのタンパク質の周囲に配置する脂質が与える影響は非常に大きいことは、イオンチャネルや膜輸送体の活性を例に示されている。そのため、上皮細胞が、アピカル膜、バソラテラル膜に適切な脂質分子種の構成をもち、それぞれの脂質構成を維持していることは、方向性をもった物質の輸送などの上皮細胞固有の機能ひいては個体の恒常性の維持に必須であると考えられる。

上皮細胞を発生母地とする癌は、悪性化の過程で間葉細胞に転換し（上皮間葉転換）、隣り合った細胞との間の細胞接着を失い、細胞極性を喪失して、浸潤癌になる。本研究提案では、正常上皮細胞が浸潤癌に転換する過程で、細胞膜脂質にどのような変化が生じるかについて網羅的に解析し、個々の脂質分子種の機能解明を目指すと共に、浸潤癌の細胞膜脂質マーカーの探索や浸潤癌の治療標的の探索といった応用面での展開を見据えて実験を行った。

### 2. 方法

#### 上皮間葉転換の実験系の確立

上皮間葉転換は、上皮細胞を発生母地とする癌細胞が、より運動性の高い間葉系細胞の表現型を獲得し、転移を起こしやすくなった状態をいう。また上皮間葉転換を起こした細胞は アポトーシスに抵抗性になることが知られている。したがって、上皮間葉転換を理解し、その制御を行うことは新しいがん治療戦略と考えられる(Polyak, K. & Weinberg, RA. *Nature Reviews Cancer* 2009)。これまでの研究で、上皮間葉転換を引き起こすマスター転写因子として **Snail** が同定された。私はこれまで培養上皮細胞に転写抑制因子 **Snail** を発現させ、間葉細胞に転換する実験系を確立し、知見を蓄積してきた (Ikenouchi J et al. *J Cell Sci.* 2003)。上皮細胞に転写因子 **Snail** を強制発現することによって間葉転換した細胞を用いることで、遺伝的背景を揃えた状態で上皮細胞と間葉細胞の様々な違いを比較することができる。本研究に先立って、上皮細胞と、転写因子 **Snail** を強制発現することにより間葉細胞様に転換した細胞の間での、網羅的な遺伝子発現の違いを調べるため、**Gene chip** 解析を行った。その結果、上皮細胞に特異的に発現する遺伝子として、上皮細胞の細胞接着分子であるカドヘリンやクロロディンといった既知の遺伝子に加えて、多数の機能未知の上皮細胞特異的な遺伝子群を同定した。それらの中にトリセルリンや **FRMD4A** などの上皮細胞の細胞接着や極性形成に関わる新規の遺伝子を見つけることができた (Ikenouchi et al. *J Cell Biol.* 2005; Ikenouchi et al. *PNAS* 2010)。私は、これまでこれらの新規の遺伝子に着目して機能解析を進めていたが、興味深いことに上皮細胞特異的な発現

を示す遺伝子群には、数多くの脂質代謝に関わる酵素が含まれていることを一方で見出した。そこで本研究では、既に確立した上述の細胞株を用いて、上皮細胞と間葉細胞の細胞膜脂質の組成を比較することを試みた。

### 形質膜の単離法および脂質組成の解析

これまで見出した上皮細胞特異的な遺伝子群の中には、形質膜に分布する膜タンパク質が多数含まれていた。そこで、上皮細胞の形質膜の脂質組成は間葉細胞の形質膜の脂質組成と異なることが予想された。細胞全体の脂質量を考えた場合に、形質膜は細胞全体のわずか1%の脂質を占めるに過ぎない。そこで、本研究に先立って形質膜を物理的に単離する手法の開発に取り組んだ。結果、界面活性剤を使用せずにコロイド状シリカ粒子を用いて形質膜を単離する手法を開発した(Ikenouchi et al. *J Biol Chem.* 2012)。本手法により形質膜を単離して、脂質を抽出し、質量分析(LC-ESI-MS)によって解析することで形質膜の脂質解析の方法論を確立した。この方法を上述の上皮細胞および転写抑制因子Snailを強制発現することにより間葉細胞様に転換した細胞に適用した。

## 3. 結果

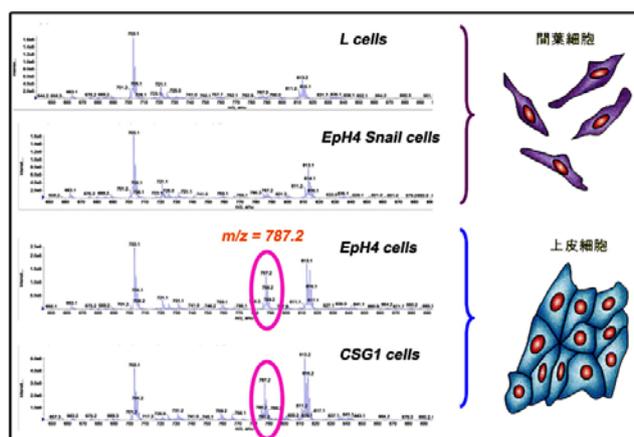
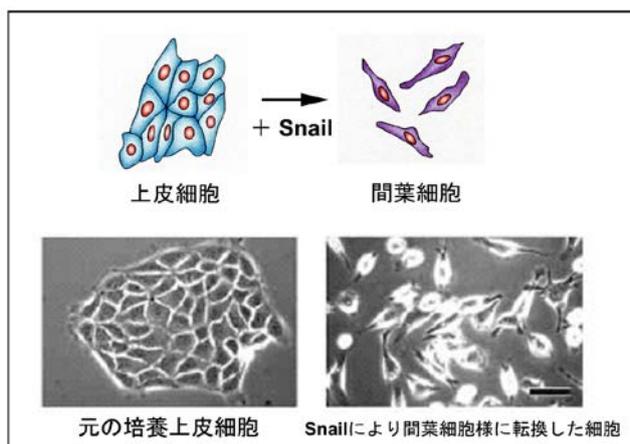
### 上皮細胞特異的な脂質分子種の同定

実験に用いた上皮細胞(マウス乳腺由来の培養上皮細胞EpH4細胞)と、転写因子Snailによって間葉細胞に転換した細胞の位相差像を右図に示す。

これらの細胞から形質膜を単離して、細胞膜脂質を液体クロマトグラフィによって極性基ごとに分離し、スフィンゴミエリンの脂質分子種のプロファイルを示したものをその下の図に示す。スフィンゴミエリンの分子種を示す3本のピークの中で、上皮細胞に限定して認められる $m/z=787.2$ の脂質分子種のピークが存在することを見出した(論文未発表)。この脂質分子種は、他の上皮細胞(例えば唾液腺由来培養上皮細胞CSG1細胞)には存在するのに対して、間葉細胞(L線維芽細胞)には存在しない。

### 上皮細胞特異的な脂質代謝酵素

上皮細胞・間葉細胞における遺伝子発現の比較の結果を元に、スフィンゴミエリン代謝に関わる酵素を検索した結果、Enzyme Xのisoformの一つが上皮細胞特異的に発現することを見出した。RT-PCRを用いた解析においてもEnzyme Xのisoformが上皮細胞にのみ発現することを確認した(右図;論文未発表)。



スフィンゴミエリン以外の脂質分子種においても、上皮細胞特異的な脂質分子種の同定とその代謝酵素の同定を進めている。

#### 上皮細胞特異的な脂質代謝酵素の機能解析

これらの上皮細胞特異的な脂質分子が、細胞接着や細胞極性に関与しているか否か、あるいは関与しているとすればどのようなタンパク質と協働しているか、を明らかにするために、培養上皮細胞において、上皮細胞特異的な脂質代謝酵素のノックダウンを試みている。MDCK細胞において上述の脂質代謝酵素Enzyme Xのノックダウンを行い、3次元培養をおこなったところ、複数の管腔を持つ異常な上皮細胞のシストを形成することが明らかになった（Data not shown：論文未発表）。

#### 4. 考察

上述の結果から、上皮細胞特異的な脂質分子種が存在し、上皮細胞の極性形成に寄与することが示唆された。今後は、上皮細胞特異的な脂質分子が、上皮細胞固有の現象である細胞接着や細胞極性において、どのようなタンパク質と協働しているかを明らかにしていきたい。

また現在、マウスの培養細胞を用いて得られた知見について、ヒトの癌細胞でも同様の結果が得られるかについて検討を行っている。上述の上皮細胞特異的なm/z=787.2の脂質分子種は、Snailが陰性の良性腫瘍においてのみ存在し、Snail陽性の上皮間葉転換を起こした浸潤癌では消失していることを確かめている。Physiologicalな状況とPathologicalな状況の両面において、細胞膜脂質の変化が細胞膜に存在する膜タンパク質の機能や上皮接着・極性の形成・維持にどのような影響を与えるか、という点を今後さらに解析を進めていきたい。

#### 5. 発表論文、参考文献

池ノ内 順一： 上皮細胞の極性形成とリン脂質：医学のあゆみ「生命を支える脂質—最新の研究と臨床」、248巻13号 2014年3月29日

