

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：丑丸 秀

専攻分野：内科学（腎臓・高血圧内科）

指導教授：柴垣 有吾

主論文の題目：

Roles of Layilin in Regulation of Low-Density Lipoprotein Receptor in Malignant Glioma Cells
(悪性神経膠腫細胞における LDL 受容体の制御に対するライリンの役割)

共著者：

Mitsumi Arito, Atsuhiko Tsutiya, Toshiyuki Sato, Kazuki Omoteyama, Masaaki Sato, Naoya Suematsu, Manae S. Kurokawa, Atsuko Kamijo-Ikemori, Yugo Shibagaki, Tomohiro Kato

緒言

Layilin (ライリン) は I 型膜貫通タンパク質の構造を有するタンパク質で、N 末端側の細胞外とされる領域に C 型レクチン様モチーフを持つ。

悪性神経膠腫 (malignant glioma, MG) は高い浸潤性を有する、予後不良の悪性腫瘍である。当グループは MG 細胞で正常のアストロサイトと比較してライリンが強く発現していること、そして、ライリンが snail family transcriptional repressor 1 (SNAIL1) を介して epithelial-mesenchymal transition (EMT) 様変化を誘導し細胞の浸潤性の獲得または増強に寄与することを報告した。すなわち、ライリンの強発現による細胞浸潤性の増強は MG 細胞の特徴のひとつと言える。

一方、MG 細胞の他の特徴のひとつとして、low-density lipoprotein receptor (LDLR) の強発現が指摘されている。そのため、LDLR は MG の有望な治療標的としての可能性があり、複数の研究が進められている。LDLR は細胞膜表面に局在する約 160 kDa のタンパク質で、細胞内への LDL の取り込みを担っているが、MG 細胞で LDLR が高発現している理由は現在のところ不明である。

このように、ライリンと LDLR は共に MG 細胞で高発現しているが、両分子の間に何等かの機能的関連があるのかどうかについては報告がない。そこで本研究では、MG 細胞において、ライリンが LDLR の存在量や LDLR を介した LDL の取り込みに影響を及ぼすか否かを調べた。

方法・対象

ヒト MG 細胞株 A172 細胞で、2 種類のライリン siRNA (siL-1 および siL-2) の導入により、ライリンの発現を抑制 (ライリン KD) し、siRNA 導入から 24 時間、32 時間、40 時間、48 時間、72 時間でそれぞれ細胞回収を行い、RNA および蛋白質を抽出した。対照として、コントロール siRNA (siC) を導入した細胞を準備した。抽出 RNA を逆転写後、定量 PCR により LDLR の mRNA 量を測定した。抽出蛋白質は、ウエスタンブロットに供し、LDLR の蛋白質量を調べた。さらに、同様にしてライリン発現を抑制した A172 細胞を蛍光色素標識された LDL (LDL-Dylight™550) を含む培地で培養し、6 時間後に、蛍光顕微鏡で観察した。BZ-X Analyzer (KEYENCE) を用いて、LDL-Dylight™550 の蛍光輝度を解析した。統計処理は Student' s t-test を用いて $p < 0.05$ を有意とした。

結果

siL-1 及び siL-2 を用いたライリン KD により LDLR の mRNA は変化しなかったが、LDLR 蛋白質量は siRNA 導入から 48、72 時間後に有意に増加した。さらに、細胞内への LDL 取り込み実験の結果、ライリン KD に

より LDL の取り込み量は有意に増加した。

考察

本研究では、1) ライリン KD は LDLR の転写レベルには影響を与えないが、LDLR のタンパク質量を増加させること、および、2) ライリン KD は LDL の取り込みを増加させることが見出された。

1) について、ライリン KD は LDLR の転写レベルには影響を与えないが、LDLR のタンパク質量を増加させることから、ライリンは LDLR タンパク質の安定性を低下させる可能性が考えられる。一般に LDLR は proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) や inducible degrader of the LDL-receptor (IDOL) などにより特異的に分解され、その分解の程度により、量が調節されることが報告されている。そのため、ライリンが直接 LDLR に働く可能性のほか、PCSK9 や IDOL の発現量や活性を増加させて LDLR タンパク質の安定性を低下させている可能性も考えられる。これらの点については今後調べる必要がある。

先にも述べた通り、MG では、LDLR が高発現であるため、治療標的として注目されている。加えて、LDL 粒子に薬剤を含ませ LDLR を介して細胞に取り込ませるなど、LDL をドラッグ輸送体として利用できることが報告された。それ故、ライリンを含め MG における LDLR 量の調節機構を明らかにすることは重要である。

2) について、本研究では、ライリン KD により LDL の取り込みが増加することから、ライリンは機能的な LDLR 量を負に制御することで LDL の取り込みを抑制する可能性が示された。MG でコレステロールの異化代謝物である 27-ヒドロキシコレステロールが EMT を誘導して細胞の増殖や浸潤を促進するとの報告がある。このことから、ライリンは LDLR のタンパク量を負に調節することで EMT による細胞の増殖や浸潤を抑制する可能性が考えられる。しかしこれまでに当グループは、ライリンは EMT に必須であること、また SNAI 1 による EMT 様変化を促し、MG 細

胞の浸潤能を高めることを報告している。このように本研究は、先行研究と一部相反する結果となった。この点を解決するためには、ライリン誘導性 EMT における LDL/LDLR の役割および LDL/LDLR 誘導性 EMT におけるライリンの役割について今後明らかにする必要がある。

結論

本研究により、ライリンは LDLR 量をタンパク質レベルで低下させ、LDL の取り込みを抑制する機能をもつことが示唆された。