

乳がんにおけるCoQ₁₀ とUBIAD1を介したがん細胞の硬化は、ECMシグナルとフェロプターシスを制御する

受領2023年4月19日

受理される2024年9月11日

Published online: 18 September 2024

アップデートの

Giovanni Tosi ¹, Alessandro Paoli¹, Gaia Zuccolotto², Emilia Turco³,
Manuela Simonato⁴, Daniela Tosoni ⁵, Francesco Tucci ⁵, Pietro Lugato
, ¹Monica Giomo ⁶, Nicola Elvassore ^{6,7}, Antonio Rosato ^{2,8}, Paola Cogo ^{4,9},
Salvatore Pece ^{5,10} & Massimo M. Santoro ^{1,7}

確認

CoQ₁₀ (コエンザイムQ₁₀) は、細胞代謝において重要な役割を果たす必須脂溶性代謝産物である。CoQ₁₀ の機能としてあまり知られていないのは、細胞膜安定化剤として働くかどうか、そしてこの性質が癌の発生や進行に影響を及ぼすかどうかである。ここでは、CoQ₁₀、およびその生合成酵素であるUBIAD1が、乳がん (BC) の進行や治療において注目される形質膜の力学的特性に重要な役割を果たしていることを示す。CoQ₁₀ とUBIAD1は膜の流動性を高め、BCにおける細胞の硬さを増加させる。さらに、CoQ₁₀ とUBIAD1の状態は、ECM (細胞外マトリックス) を介する発癌性シグナル伝達を障害し、BC設定におけるフェロプシス耐性を低下させる。ヒト患者およびマウスモデルを用いた解析から、UBIAD1の欠損はBCの発症と進行に関連し、BCにおけるUBIAD1の発現はCTC (循環腫瘍細胞) の生存と肺転移の形成を制限することが明らかになった。全体として、本研究は、予後不良のBC患者を治療するための治療的介入を開発するために、CoQ₁₀ とUBIAD1をさらに研究できることを明らかにした。

CoQ₁₀ (コエンザイムQ10、別名ユビキノンは、ほとんどの真核細胞の細胞膜と内膜に存在する必須脂溶性化合物である。

^{1,2}CoQ₁₀ は、ベンゾキノン環と親油性のイソプレノイド側鎖からなる。CoQ₁₀ は、ミトコンドリア呼吸や酸化ストレスからの膜脂質の保護など、細胞代謝のいくつかの側面で役割を果たしている。³あまり知られていないが、CoQ₁₀、リン脂質膜の機械的性質を変化させる膜安定化剤として働いている。実際、細胞膜の恒常性におけるCoQ₁₀の役割は、ミトコンドリアや好気性グラム陰性菌のようなコレステロールに乏しい膜に影響を与える。^{4,5}しかし

細胞膜CoQ₁₀レベルの上昇は、コレステロールが豊富な膜や病理学的環境におけるコレステロール依存性シグナル伝達に影響を与えるが、そのメカニズムはよくわかっていない。遺伝子変異、疾患、老化は細胞内のQ₁₀レベルに影響を与え、結果として深刻な健康問題を引き起こす可能性があるため、このようなCoQ₁₀の研究は臨床的観点からも非常に重要である。CoQ₁₀の含有量が癌の発生と進行にどのように影響するのか、また影響するのかについては、今のところほとんど研究されていない。^{6,7}

CoQ₁₀の生合成には、キノン頭部となる芳香族基の生成、イソプレノ尾部の生成、キノン頭部とイソプレノ尾部の結合という明確な段階があり、その後、わずかな生化学的修飾を経て、CoQが生成される。

¹イタリア、パドバ、パドバ大学生物学部、血管新生・がん代謝研究室。²免疫学・分子腫瘍学ユニット、ヴェネト腫瘍学研究所IOV-IRCCS、パドヴァ、イタリア。³トリノ大学分子バイオテクノロジーセンター（イタリア、トリノ⁴イタリア、パドヴァ、小児科研究所「チッタ・デラ・スペランツァ」。⁵IEO、ヨーロッパ腫瘍学研究所IRCCS、ミラノ、イタリア。⁶イタリア、パドヴァ、パドヴァ大学産業工学部⁷ヴェネト分子医学研究所、パドヴァ、イタリア。⁸イタリア、パドヴァ、パドヴァ大学、外科・腫瘍学・消化器科。⁹ウディネ大学医学部小児科、ウディネ、イタリア。¹⁰ミラノ大学腫瘍学・血液腫瘍学部門、ミラノ、イタリア。✉e-mail: massimo.santoro@unipd.it

CoQ₁₀ 最終生成物の形成^{8,9}。いくつかの代謝経路が、CoQ₁₀ 分子を生成する前駆体を提供することで、CoQ₁₀ 生合成に寄与している。キノン頭部は高等真核細胞のチロシンカタボリズムに由来し、イソプレノール尾部はメバロン酸経路のアセチル-CoAに由来する。¹⁰CoQの合成には、さまざまな律速段階がある¹⁰。第一は、キノン頭部が豊富なチロシン源に由来するため、イソペンテニルピロリン酸 (IPP) の利用可能性であり、第二は、UbiA酵素によって媒介されるキノン基へのイソプレノイド尾部の縮合である。¹¹哺乳類では、COQ2とUBIAD1と呼ばれる2つのUbiA酵素がポリプレニル-4-ヒドロキシ安息香酸転移酵素として働き、ミトコンドリアとゴルジ/ER装置に存在する。実際、ミトコンドリアとゴルジ体/ER装置は、哺乳類におけるCoQ₁₀ の合成部位として提案されている。^{12,13}

フェロプターシスは、脂質の活性酸素種 (ROS) の蓄積によって媒介される鉄依存性のプログラムされた細胞死の一形態であり、酸化損傷を誘発し、酸化防御バランスを破壊する。¹⁴がん細胞は正常細胞に比べて代謝が旺盛で、活性酸素をより多く蓄積するため、フェロプターシスを起こしやすい。¹⁵最近の研究から、フェロプターシスの誘導は、がん治療、特に治療抵抗性の腫瘍や転移傾向の強い腫瘍に対して大きな可能性を秘めていることが明らかになっている¹⁵。しかし、がん細胞は、グルタチオン (GSH) 系、CoQ (10) 系、チオレドキシン (TXN) 系が脂質ヒドロペルオキシドを解毒し、フェロプターシスを抑制するような別のメカニズムによって、フェロプターシスの感受性を低下させることもできる。¹⁶トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) は鉄分と脂質に富む腫瘍であるため、フェロプターシスの誘導は治療戦略として可能性がある。^{17,18}最近、TNBCがフェロプターシスの不均一性を示すことが示され、TNBCの内腔アンドロゲン受容体 (LAR) サブタイプはフェロプターシス誘導剤に対して過敏性を示すことから、GPX4阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤の併用がLAR TNBCの治療戦略となりうることを提唱されている。¹⁹フェロプターシスに対する耐性は、難治性癌の発生にも関係している。フェロプターシスは、複数の代謝経路によって制御されるプロセスであるが、TNBCにおけるフェロプターシスの明確な特徴は、まだ十分に明らかにされていない。このような背景から、我々は、UBIAD1とCoQ₁₀ が、生存と侵襲のシグナル伝達とフェロプターシス保護に強く依存しているTNBCサブタイプの生存と侵襲性に影響を及ぼすかどうかを調べた。全体として、UBIAD1とCoQ₁₀ の機能不全が、BCにおけるメバロン酸経路の中間体の機能が完全には解明されていないことから、BCの攻撃的な表現型の獲得を引き起こすのかどうか疑問である。

本研究では、CoQ₁₀ とUBIAD1が膜流動性の特性を制御する

機能を発見し、それがBCの環境と患者における転移能の低下とフェロプターシス抵抗性に関連することを明らかにした。

結果

CoQ₁₀ はBC細胞において膜の流動性と細胞の硬さを調節するCoQ₁₀ (またはユビキノリン) はミトコンドリアだけでなく細胞膜にも豊富に存在する強力な脂溶性抗酸化物質である^{2,20}。細胞膜 (PM) のCoQ₁₀ レベルが、細胞膜脂質のホメオスタシスを変化させたり、病的状況において膜安定化剤として作用するなど、酸化還元依存しない機能を持つかどうかは、まだ明らかにされていない。この目的のために、我々はTNBC細胞株MDA-MB-231をCoQ₁₀ の異なる製剤 (CoQ₁₀ とCoQH₁₀₂) で処理し、シグナル伝達と細胞膜の空間的構成を制御することが知られているマイクロドメインである、細胞膜のコレステロールに富む脂質ラフトの変化を評価した。CoQ₁₀ をTNBC細胞に投与すると、全生存期間に影響を与えることなく、細胞膜中のCoQ₁₀ 含有量が有意に増加した (補足図1a, b)。コレラ毒素Bサブユニット染色を用いて、CoQ₁₀ 処理による脂質ラフトマイクロドメインの減少を検出した (図1a, b)。これらの効果は

CoQ₁₀ の酸化還元状態は、MDA-MB-436のような別のTNBC細胞株でも明らかである（補足図1c）。

細胞膜コレステロールの枯渇は、皮質の剛性を増加させることによって細胞の剛性を高めることが報告されている。²¹⁻²³膜CoQ₁₀ レベルの増加がBC細胞の力学的特性に影響を及ぼすかどうかを調べるために、原子間力顕微鏡（AFM）を用いて単一細胞の皮質剛性を直接測定した。²⁴その結果、CoQ₁₀-supplemented BC細胞は、未処置細胞やコントロール細胞と比較して、高い皮質剛性を示した（図1c）。これはCoQ₁₀ の両製剤に当てはまり、処理時期とは無関係であった。

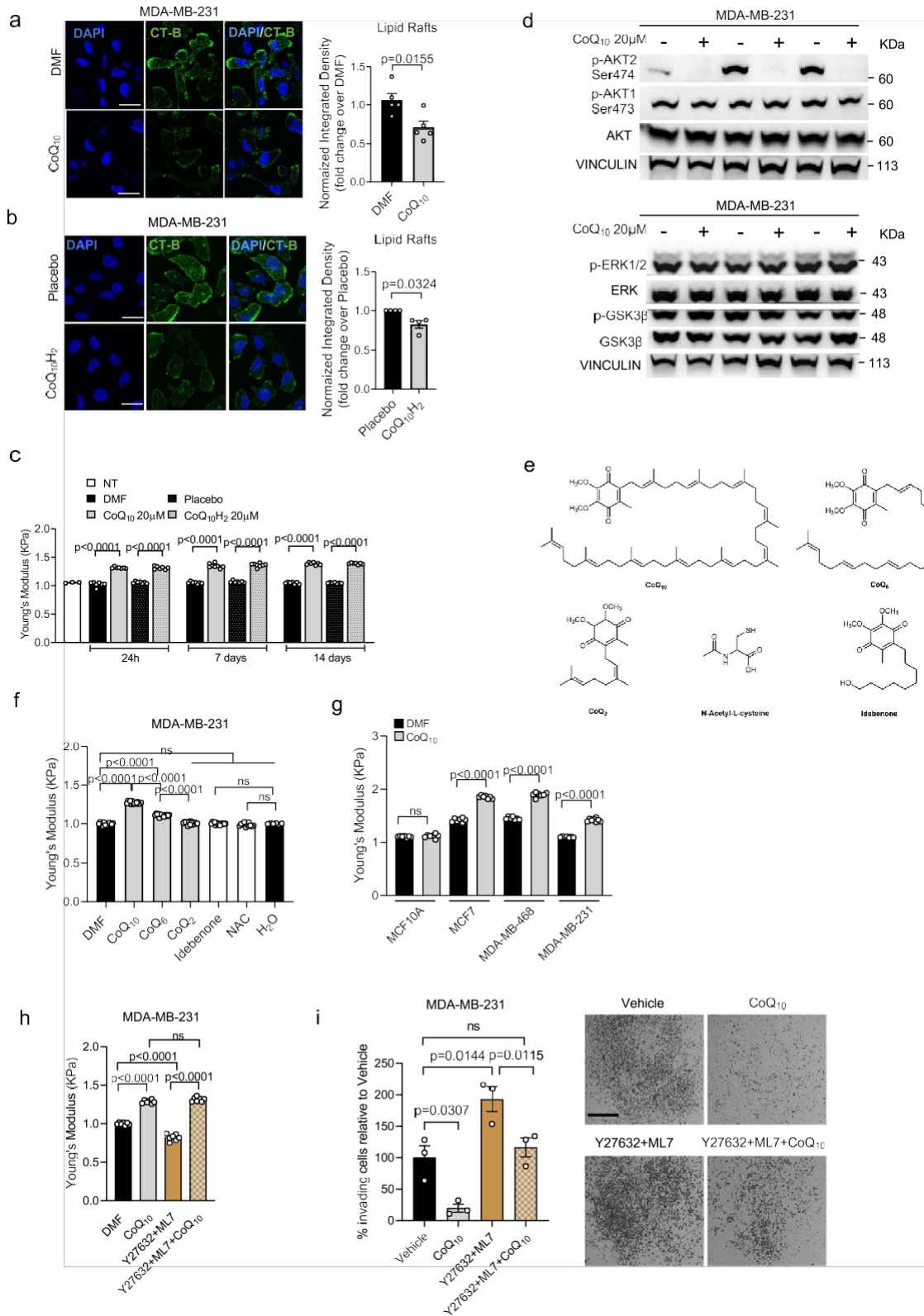
次に、CoQ（₁₀）処理によって誘導されるPMホメオスタシスのこのような変化が、細胞がシグナル伝達を制御する方法に変化をもたらすかどうかを評価した。²⁵BCの発生に関連する様々なシグナル伝達経路を分析した（図1d）。そのほとんどは変化しなかったが、PI3K/ACT経路の特異的阻害がAKT2アイソフォームのリン酸化状態の障害として検出された。興味深いことに、この特異的なアイソフォームは、乳がん患者の予後悪化と以前に関連していた。²⁶膜結合型CoQ₁₀ の生化学的特性を考慮すると、これらのデータは、CoQ₁₀ による治療が、BC細胞におけるPMホメオスタシスとPI3K/ACT発がんシグナル伝達に影響を与えることを示唆している。

CoQ₁₀ のユニークな二重機能性-キノン環の酸化還元サイクルを介した抗酸化特性と、ポリプレニル尾部（イソプレノイド部分）を介したPMに関連するメカノプロパティの組み合わせに関する我々の仮説を支持するために、AFMを利用した包括的な調査を行った。私たちの実験的アプローチでは、CoQ₆ やCoQ₂ のようなイソプレノイド部分を短くしたCoQ₁₀ の構造類似体や、イデベノンやNACのようなCoQ₁₀ の構造的特徴を欠きながらも抗酸化機能を持つ類似体など、様々な分子を検討した。

この解析は、CoQ₁₀ の多面的な役割に関する貴重な洞察に貢献することを目的としており、抗酸化と力学的特性の両領域におけるCoQの潜在的応用について、より深い理解を提供するものである。興味深いことに、イデベノンやNACのような抗酸化化合物は細胞の硬さを変化させないことが観察された。2イソプレノイド単位の短い側鎖を含むCoQ₂ も細胞の硬さを変化させないが、6イソプレノイド単位の側鎖を含むCoQ₆ は、CoQ₁₀ と同じレベルではないものの、硬さを有意に促進する（図1e、f）。従って、これらのデータは、CoQ₁₀（酸化還元ユビキノン環に結合）の脂質抗酸化的作用と、その細胞膜力学的役割（ポリプレニル尾部に結合）を分離することが可能であることを示している。

次に、異なるBC細胞株において、CoQ₁₀ が等しくその力学的特性を発揮できるかどうかを分析した（図1g）。CoQ₁₀ は、MCF7、MDA-MB-468およびMDA-MB-231では剛性を増加させたが、非腫瘍性のMCF10Aでは増加させなかった。このことは、CoQ₁₀ の効果は、おそらく乳癌細胞の腫瘍化状態またはむしろ異なるPM組成に関連していることを示唆している。CoQ₁₀ が細胞の硬さを調節する能力をさらに確認するため、MDA-MB-231細胞をCoQ₁₀ と、BCを柔らかくすることで知られるROCK阻害剤Y27632およびMLCK阻害剤ML7を併用して処理した（図1h）。²⁷（併用した（図1h）。ここでは、Y27632+ML7阻害剤が、予想通りMDA-MB-231細胞の軟化を促進することを示している。しかしながら、CoQ₁₀ の存在下では、この2つの阻害剤は細胞の軟化を促進せず、細胞はCoQ₁₀ 単独処理と同じ硬さを示した。

さらに、CoQ₁₀、BCの増殖を阻害するか、あるいは浸潤特性を変化させるかを調べた（図1iおよび補足図1d）。CoQ₁₀、MDA-MB-231の細胞増殖は変化しなかったが、マトリゲルでコートした膜に侵入する能力は著しく損なわれた。一方、ROCK阻害剤Y27632とMLCK阻害剤ML7の存在下では、細胞浸潤性は増加するが、CoQ₁₀（図1i）存在下では、そのような効果は有意に減少する。



最後に、ECMシグナル伝達とアクチンフィラメントをつなぐ重要な役割を果たす分子構成要素であるPaxillinとFAKタンパク質を含む構造を調べることで、CoQ₁₀ 処理が細胞形態を変化させるかどうかを検証した。これらは細胞骨格のダイナミクスと細胞浸潤時の細胞形態を制御している。²⁸CoQで処理したMDA-

MB-231細胞 (10) は、コントロールと比較して異なる細胞突起を示した。注目すべきことに、これらの変化は

は、FAKとPaxillinが局在する細胞膜に複数のブリーブを形成する。対照的に、対照細胞は間葉系細胞に特徴的なラメリポディアが見える、より伸長した形態を示した（補足図1e-h）。CoQ₁₀、皮質の収縮力を変化させることで作用することを確認するため、ROCK阻害剤Y27632とMLCK阻害剤ML7で処理した細胞の細胞骨格の変化を調べた（補足図1i-k）。Y27632+ML7で処理した

図1 | CoQ₁₀ はBC細胞の硬さを変化させ、AKT2活性化を阻害する。

a, b 20μM CoQ₁₀ (a) または20μM CoQ H₁₀₂ (b) で処理したMDA-MB-231細胞における脂質ラフト (CT-B) の代表的な画像。スケールバー、25μm。DAPIとCT-B/リビドラフト。細胞数に対して正規化した集積密度、Di-B/リビドラフトに対する倍数変化として表した。

メチルホルムアミド (a) またはプラセボ (b)。(a)はn=5、(b)はn=4の平均値±SEM。

c 20μM CoQ₁₀ または CoQ H₁₀₂ 処理後のMDA-MB-231細胞の硬さ。各ドットは、2つの独立した実験から得られた1細胞あたり3回の測定値の平均値である(非処理ではn=3、7日後のCoQ₁₀ およびCoQ H₁₀₂ ではn=8、その他ではn=7)。d PI3K-AKT、MEK/ERK、およびWnt経路の活性化を評価するためのAKT1、AKT2、ERK1/2、およびGSK3βリン酸化のウェスタンブロット。コントロールとしてVINCULINを用いた。e CoQ化合物とN-アセチル-L-システイン (NAC) およびイデベノンを含む抗酸化物質の化学構造。f 20 μM CoQ₁₀、CoQ₆、CoQ₂、イデベノン、または10 mM NACで24時間処理した後のMDA-MB-231細胞の硬さ。ビヒクル: ビヒクル: ジ-メチル-ホルムアミドまたはH₂O。各ドットは3

3回の独立した実験による細胞あたりの測定値 (H₂、n=6、CoQ₂、n=14)。平均値±SEM、一元配置分散分析およびTukeyの検定から調整したp値。g 20μM CoQ₁₀ 1週間処理後のMCF10Aおよび乳がん細胞株における硬さ。各ドットは、2回の独立した実験から得られた1細胞あたり3回の測定の平均値である(MDA-MB-231 CoQ₁₀ についてはn=8、その他についてはn=7)。平均値±SEM、両側検定によるp値。h 20 μM CoQ₁₀、ROCK阻害剤Y27632 (20 μM)、MLCK阻害剤ML7 (20 μM)、またはそれらの組み合わせで処理したMDA-MB-231細胞の硬さ。各ドットは、2回の独立した実験 (n=7) から得られた1細胞あたり3回の測定の平均値。Di-Methyl-Formamide, 20 μM CoQ₁₀, Y27632 (20 μM) + ML7 (20 μM)、またはそれらの組み合わせで24時間処理したMDA-MB-231細胞のマトリゲルコーティング膜を介した浸潤アッセイ。データは、ビヒクル (100%) に対する浸潤細胞の割合である。各ドットは3回の独立した実験から得られた2ウェルの平均値。平均値±SEM、一元配置分散分析およびTukeyの検定から調整したp値。ソースデータはSource data fileに記載。

興味深いことに、このような形態学的特徴は、CoQ₁₀ との共処理によって有意に回復し、CoQ₁₀ が皮質の収縮力を変化させることによって作用することが確認された。

これらの知見を総合すると、BC細胞におけるPMのメカノプロパティ、細胞形態、PI3K/AKTシグナル伝達経路の制御におけるCoQ₁₀ の予期せぬ役割が示唆される。

CoQ₁₀ 生合成酵素UBIAD1は乳がん (BC) 患者の転帰と関連する

膜結合型CoQ₁₀、ゴルジ区画に特異的に局在するUBIAD1酵素によって合成される。^{29,30}そこで我々は、BC腫瘍形成過程におけるUBIAD1酵素の機能を調べた。まず、BC患者におけるCoQ₁₀ 生合成酵素UBIAD1の発現を解析した。我々は、METABRIC (Molecular Taxonomy of Breast Cancer Consortium)データセットに含まれる、臨床病理学的情報と長期フォローアップが十分に注釈された~2000人のBC患者の臨床データとゲノムデータを調査した。³¹このデータベースのコピー数変化 (CNA) 解析から、正常組織と比較して、乳房腫瘍ではUBIAD1遺伝子座レベルのコピー数異常が頻繁に認められ、ほとんどの症例で深い欠失または浅い欠失で構成され、UBIAD1のコピー増加を示す症例は少数派 (~1%) であることが明らかになった (図2a)。METABRICコホートの解析では、UBIAD1欠失はLuminal B、HER2+、Basal-like Luminal Aの患者において非常に有意に濃縮されているようである (図2b)。BC患者におけるUBIAD1発現の変化の可能性を確認するため、我々は、組織マイクロアレイで入手可能な、長期完全追跡 (中央値14.1年) の

BC患者~2000人の大規模な連続コホートについて免疫組織化学 (IHC) 解析を行った。^{32,33}また、患者のサブセットについてマッチした正常乳腺組織サンプルが入手可能であったため、正常組織と腫瘍組織におけるUBIAD1の発現を比較することができた。UBIAD1は正常乳腺で様に、かつ十分に発現しており、基底上皮層と比較して管腔層で比較的高い発現レベルであったことから、恒常的な状態におけるUBIAD1の機能的役割が主張された (図2c)。この観察は、乳房腫瘍全体のUBIAD1染色の不均一なパターンと著しく対照的であり、腫瘍の大部分は正常組織と比較して、UBIAD1発現の顕著なダウンレギュレーション、あるいは完全な消失を示した (図2c)。次に、原発腫瘍 (材料と方法も参照) におけるUBIAD1タンパク質レベルに基づいて、コホートの患者を3つのグループに分類した: UBIAD1_{High}、UBIAD1タンパク質レベルが正常と区別できない腫瘍 (患者の9.2%) ; UBIAD1_{Intermediate}、UBIAD1発現が残存する腫瘍 (患者の67.0%) ; UBIAD1_{Low}、UBIAD1がほぼ完全または完全に消失した腫瘍 (患者の23.8%)。UBIAD1_{Low} BC患者は、UBIAD1_{High} 患者と比較して、全生存期間 (OS) が有意に短かった (HR_{Highvs.Low} = 0.57, CI, 0.34-0.94; P = 0.03) (図2d)。UBIAD1のマーカーとしての挙動は

記事

予後不良は、エストロゲンおよびプロゲステロン受容体の発現、結節の状態、腫瘍の大きさ、増殖指数、年齢、および悪性度で調整した多変量解析で評価したように、すべての標準的な臨床病理学的パラメータとは無関係であった。また、UBIAD1_{High}の腫瘍と比較して、UBIAD1_{Low}の腫瘍は、腫瘍径の増大、低分化度、エストロゲンおよびプロゲステロン受容体の消失、および高増殖率によって証明されるように、より悪性の臨床病理学的状態と関連していることがわかった（補足表1）。一方、リンパ節転移、HER2発現、年齢については有意な関連は認められなかった（補足表2）。一貫して、UBIAD1_{Low}腫瘍はトリプルネガティブBC（TNBC）（OR_{Lowvs. High} = 4.08, $p = 0.0012$ ）とも有意に相関しており、これは最も生物学的、臨床的に侵襲性の高いBCサブタイプを表している（図2e）。METABRICコホートにおけるUBIAD1 mRNA発現レベルを調べたところ、基底腫瘍についても同様の証拠が得られた（補足表3）。

患者と同じように、ヒトBC細胞株パネルにおけるUBIAD1の発現をmRNAとタンパク質の両レベルで解析した結果、同様の証拠が得られた。UBIAD1の発現は、特にTNBC株（図2fおよび補足図2a）、特に最も攻撃的なMDA-MB-231株、MDA-MB-436株、Hs578T株で減少していることがわかった。興味深いことに、総CoQ₁₀のレベルも、他の腫瘍性細胞株と比較して、MCF10A細胞で有意に高い（補足図2b）。

乳房組織におけるUBIAD1の役割を支持するために、エストロゲンを介したUBIAD1の制御を評価した。そこで、3つのER α 陽性株をエストロゲン受容体阻害剤4-OH-タモキシフェン（4OHT）で処理し（補足図2c）、BCL2、MYC、CCND1などのER α 標的遺伝子とUBIAD1の発現の変化を評価した。その結果、これら全てのER α 標的遺伝子とUBIAD1の発現低下が検出された（補足図2d, e）。この制御を確認するため、ER α 陽性株を17 β -エストラジオールで処理し、ERを介した転写を活性化した。その結果、エストロゲン処理によりUBIAD1発現の増加が検出された（補足図2f）。これらのデータは、ER α シグナルを介したUBIAD1の発現制御を示し、BCにおけるCoQ₁₀-産生酵素UBIAD1の関与を支持するものである。

要約すると、我々は、CoQ₁₀-合成酵素UBIAD1の乳腺腫瘍発生における腫瘍抑制遺伝子としての機能を提唱し、BC患者の予後層別化のための独立したバイオマーカーとしての本質的な臨床的価値を提案する。

*Ubiad1*の遺伝子欠損は、マウスBCモデルにおいてCoQ₉の合成を阻害し、腫瘍の発生を促進する。

BC発生におけるUBIAD1とCoQ₁₀の機能的役割を検証するため、 β -Gal/Neoカセットを挿入してエクソン1を破壊し、*Ubiad1*欠損マウスモデルを作製した（補足図3a）。*Ubiad1*^{-/-}マウスは生存能力がなく（補足図3b）、E10.5あたりで死に始めた。E9.5胚のタンパク質ライセートでは

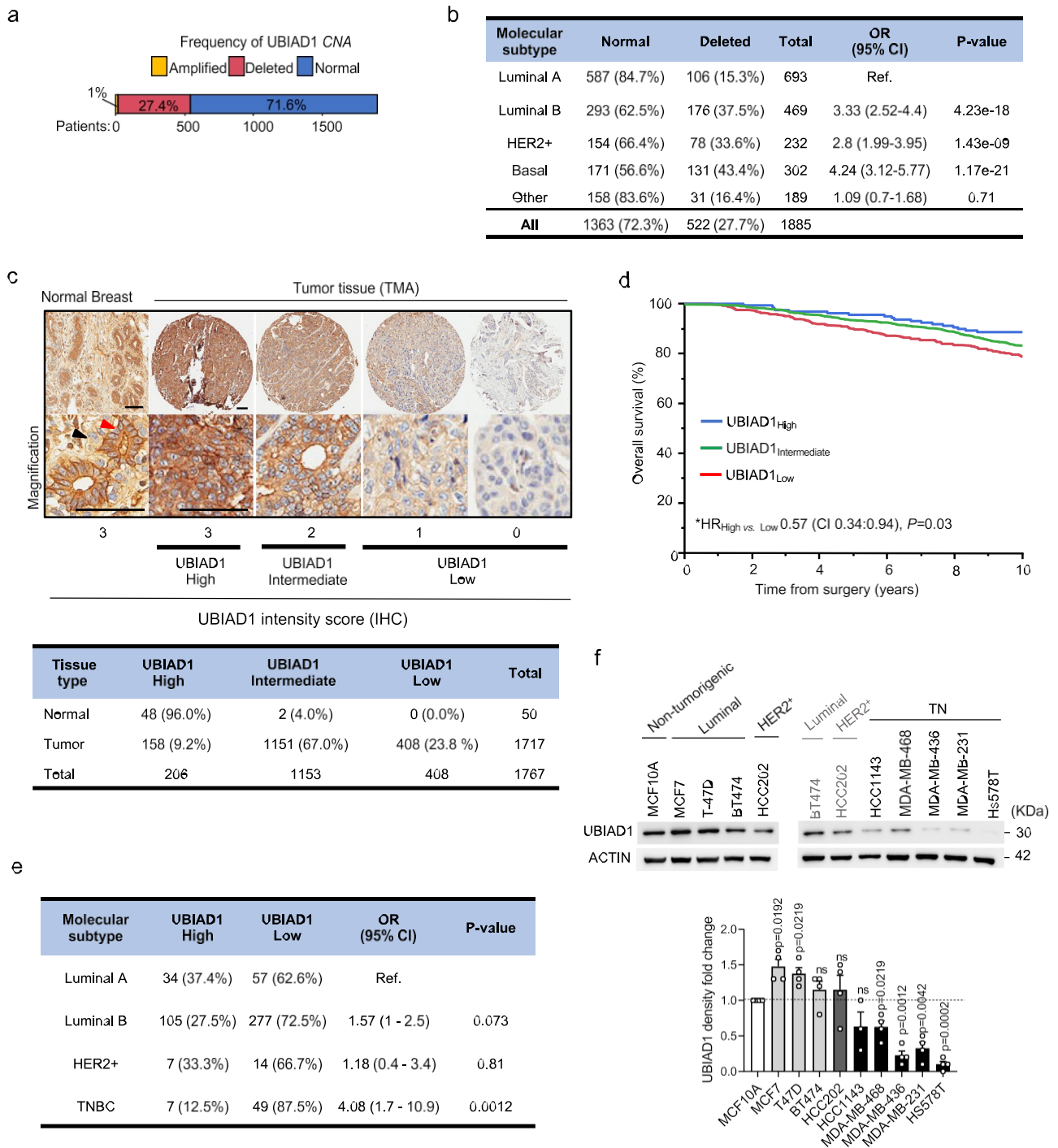
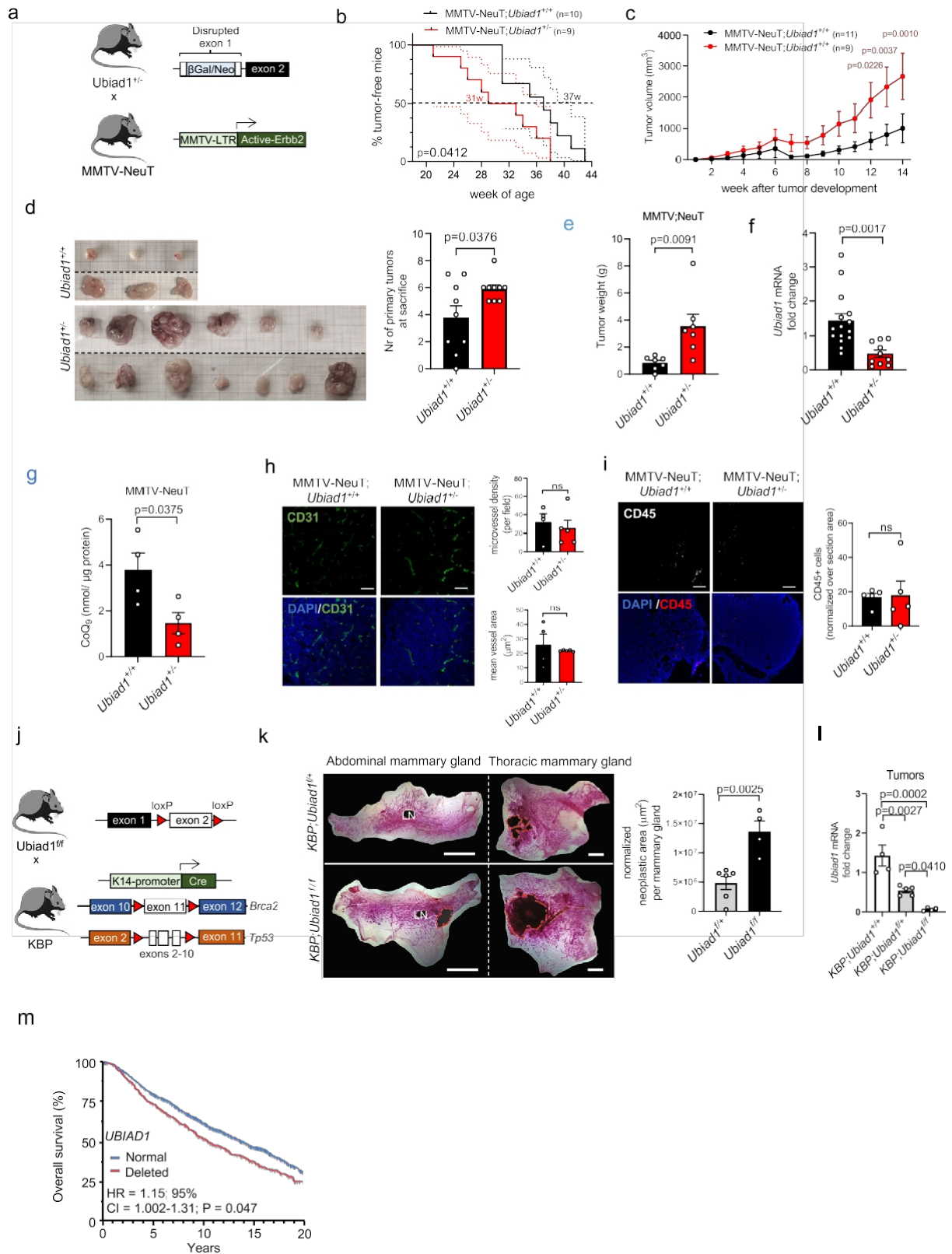


図2 | CoQ₁₀-生合成酵素UBIAD1の欠損は、BC患者の予後悪化と関連している。a 乳癌患者のMETABRICコホートにおけるUBIAD1コピー数変化 (CNA) の分布 (方法を参照)。CNAなし (正常)、増幅 (Amplified)、深い欠失および浅い欠失 (Deleted) を有する患者の割合を示す。b METABRICコホートにおけるUBIAD1の状態 (正常 vs. Deleted) とPAM50 BCサブタイプとの関連。HER2+はHER2陽性。OR、オッズ比; CI、信頼区間。Luminal Aサブタイプを基準として、両側フィッシャーの正確検定によるP値 (参考文献)。c TMAとして利用可能なコホート1767乳房検体 (腫瘍1717検体+正常乳腺50検体) における不均一なUBIAD1発現をIHCで示した代表的画像。赤矢印と黒矢印: それぞれ内腔細胞と基底細胞。腫瘍はUBIAD1強度スコアに基づいて高、中、低に分類され

る。スケールバー、100 μ m。正常組織および腫瘍組織におけるIHCによるUBIAD1発現の定量的解析で、各UBIAD1カテゴリー (High、Intermediate、Low) のサンプル数とパーセンテージを示す。

記事

UBIAD1の状態は(c)と同じ。*HRは、UBIAD1High群とUBIAD1Low群の多変量ハザード比。HRは、ER/PGR、pT、pN、Ki-67、HER2、年齢、グレードで調整した多変量Cox比例ハザード回帰を用いて95%CIとともに算出した。CIとP (p値)を示す。両側Wald検定によるP値。e UBIAD1の状態 (High、Low)とBCの分子サブタイプとの関連。HER2+はHER2陽性、TNBCはトリプルネガティブ。ORはオッズ比、CIは信頼区間。ルミナルAサブタイプを参照としたフィッシャーの正確検定によるP値 (参考文献)。各群の患者数と割合を示す。f ヒトBC細胞株におけるUBIAD1タンパク発現のウェスタンブロット解析 (分子サブタイプ別にグループ分け)。HER2+はHER2陽性、TNはトリプルネガティブ。UBIAD1タンパク発現のデンストメトリー解析で、各ドットはn = 4の独立した播種と処理を表す。データはACTINで正規化し、非腫瘍性乳房株MCF10Aとの相対値で表した。平均値±SEM。P値は、各サンプルの平均を1.0と比較する1標本 (両側) t検定を用いて計算した。ソースデータはSource data fileとして提供される。



UBIAD1^{+/x}、*UBIAD1*^{+/+}の両ライターメイトと比較すると、同じ胚段階で*UBIAD1*タンパク質レベルが強く減少していた(補足図3c)。また、E10.5/E11.5における*Ubiad1*^{+/x}胚のほぼ40%は、頭蓋出血と心臓出血を伴う出血性表現型を示すが、残りの胚は正常な外観を示すことが観察された(補足図3d)。これらの結果から、*Ubiad1*^{+/x}胚の一部は

心血管系の障害により胚発生中に死亡することが示唆された。

記事

Ubiad1^{+/-}、出生時に観察される仔魚の数が減少した。同様の結果はゼブラフィッシュモデルでも得られている。³⁰次に、全 *Ubiad1^{+/-}* 胚におけるCoQ₉のレベルをMSで測定したところ、*Ubiad1^{+/-}* 胚では*Ubiad1^{+/+}* 兄弟に比べてCoQ₉の量が減少していた（補足図3e）。CoQ₉が*Ubiad1* KOマウスの胚致死の原因となっている制限因子であるかどうかを調べるため、*Ubiad1^{+/-}* 妊娠中の雌にCoQ₁₀またはビタミンK₂を注射した。

図3 | *Ubiad1* 遺伝子の欠失は、モデルマウスにおいてBCの発症を促進する。

a *Ubiad1* 遺伝子のエクソン1を破壊したMMTV-NeuT BCモデルの作製。

b 出生から腫瘍発見までの無腫瘍生存期間。破線は95%信頼区間 (CI)。群平均生存率を報告。解析にはGehan- Breslow-Wilcoxon検定 (1自由度) を用いた。c 最初の触知可能な腫瘍 (0週目) からの腫瘍成長。n = 11 MMTV-NeuT;*Ubiad1*^{+/-} および n = 9 MMTV- NeuT;*Ubiad1*^{+/-} マウスのデータを平均値±SEMとして示した。d 2匹のMMTV-NeuT;*Ubiad1*^{+/-} および2匹のMMTV- NeuT;*Ubiad1*^{+/-} マウスの腫瘍。マウス1匹 (n = 9匹) あたりの原発腫瘍数を平均値±SEMで示す。両側検定によるP値。e n = 7マウス/群あたりの総腫瘍重量を平均値±SEMとして示す。両側検定によるP値。f n = 15 MMTV-NeuT;*Ubiad1*^{+/-} および n = 10 MMTV- NeuT;*Ubiad1*^{+/-} 腫瘍における*Ubiad1* mRNAレベル。平均値±SEM。両側検定によるP値。g n = 4マウス/群の腫瘍溶解物におけるCoQ₉ レベル。データは平均値±SEMで示した。両側検定によるP値。h 腫瘍におけるCD31染色。各ドットはn = 4 MMTV-NeuT;*Ubiad1*^{+/-} および n = 5 MMTV-NeuT;*Ubiad1*^{+/-} マウスの腫瘍を示す。スケールバー、100μm。微小血管密度と面積

平均値±SEMで示す。i腫瘍のCD45染色。各ドットはn = 5マウス/グループの腫瘍を示す。スケールバーは100μm。CD45+細胞は平均値±SEMで示す。両側検定によるP値。j 乳腺基底細胞における*Ubiad1* のエクソン2欠失を伴うKBP BCモデルの作製戦略。

k ヘテロ接合体 (*Ubiad1*^{fl/+}) またはホモ接合体 (*Ubiad1*^{fl/fl}) の*Ubiad1* ノックアウトKBP雌における病変を可視化するためのホールマウント乳腺染色。赤い破線は病変を強調している。各ドットはマウスを表す (n = 6 KBP;*Ubiad1*^{fl/+} および n = 4 KBP;*Ubiad1*^{fl/fl})。データは平均値±SEMで示す。両側検定によるP値。l n = 4 KBP、n = 5 KBP;*Ubiad1*^{fl/+}、および n = 4 KBP;*Ubiad1*^{fl/fl} 腫瘍における*Ubiad1* mRNA レベル。平均値±SEM。一元配置分散分析およびTukeyの検定による調整p値。m METABRIC BC患者におけるUBIAD1の状態別の生存期間のカプラン・マイヤー解析 (UBIAD1欠失は522例、正常は1363例。*HR、臨床病理学的パラメータで調整した多変量ハザード比。調整後のCox回帰によるHRおよび95%信頼区間。CIとP値を示す。多重比較の調整なしの両側Wald検定によるP値)。ソースデータはSource data fileに記載されている。

P0における各遺伝子型の仔の数を分析した。その結果、CoQ₁₀、ピタミンK₂、ではなく、ピタミンK^{+/-}、P0における*Ubiad1* 胚の割合を増加させることができたが、両者とも*Ubiad1*^{+/-} 遺伝子型の胚致死性を救うことはできなかった (補足図3f)。さらに、CoQ₉欠損胚で観察された心血管系不全の決定における酸化ストレスの亢進の寄与を検証するために、抗酸化剤NACの注入がCoQ₁₀ 処理と同程度に胚性致死を救うことを示した (補足図3f)。

次に、*Ubiad1*^{+/-} マウスを2つのBC遺伝子モデルマウスと交配させた: (i) MMTV-NeuT。³⁴(ii)MMTV-PyMT: 乳腺特異的プロモーターMMTVの制御下で発現する発癌性ポリオーマウイルスミドルT抗原 (PyMT)が多巣性乳腺癌の自然発生を促進する。³⁵いずれのモデルにおいても、*Ubiad1*^{+/-} コントロールマウスと比較して、*Ubiad1*^{+/-} マウスは有意に腫瘍形成が促進され、平均腫瘍形成間隔はMMTV-NeuTマウスでは37週ではなく31週、MMTV-PyMTマウスでは16.5週ではなく15週であった (図2a, bおよび補足図4a, b)。さらに、腫瘍が触知可能な大きさに達した後、腫瘍の成長動態をモニターすることにより、*Ubiad1*^{+/-} vs *Ubiad1*^{+/+} コントロールマウスで成長速度が加速していることがわかった (図3cおよび補足図4c)。その結果、MMTV- PyMT; *Ubiad1*^{+/-} 腫瘍において、コントロールと比較して増殖しているKi67+細胞の数が増加していることが検出された (補足図4d)。犠牲となったマウスでは、両モデルとも*Ubiad1*^{+/-} コントロールと比較して、*Ubiad1*^{+/-} ではマウス1匹あたりに発生した原発腫瘍の数と腫瘍総重量の増加が観察された (図3d, e、および補足図4e, f)。次に、MMTV-NeuT; *Ubiad1*^{+/-}、MMTV-PyMT; *Ubiad1*^{+/-} マウスで自然発生した腫瘍における*Ubiad1* の発現

を解析したところ、*Ubiad1*^{+/-} -由来の腫瘍では、対照と比較して*Ubiad1* mRNA発現が有意に減少しており、*Ubiad1* の欠損と腫瘍原性の増加との関連を支持する結果が得られた (図3f、補足図4g)。これらの腫瘍におけるCoQ₉ のレベルも測定したところ、*Ubiad1*^{+/-} マウスでは減少していた (図3g)。

内皮細胞におけるUBIAD1の重要な役割を考慮し³⁰*Ubiad1*^{+/-} 胚で観察された出血表現型の頻度を考慮し、血管密度と平均血管面積を分析することで、腫瘍内部の血管の存在を調べた (図3hおよび補足図4h)。解析の結果、*Ubiad1*^{+/-} マウスと*Ubiad1*^{+/+} マウスの間で、両パラメーターに有意な差は見られなかった。並行して、これらの腫瘍における免疫細胞浸潤 (CD45+細胞) を解析したところ、*Ubiad1*^{+/-} vs *Ubiad1*^{+/+} 動物間では有意差はなく (図3iおよび補足図4i)、UBIAD1の腫瘍細胞自律的機能を支持する結果となった。

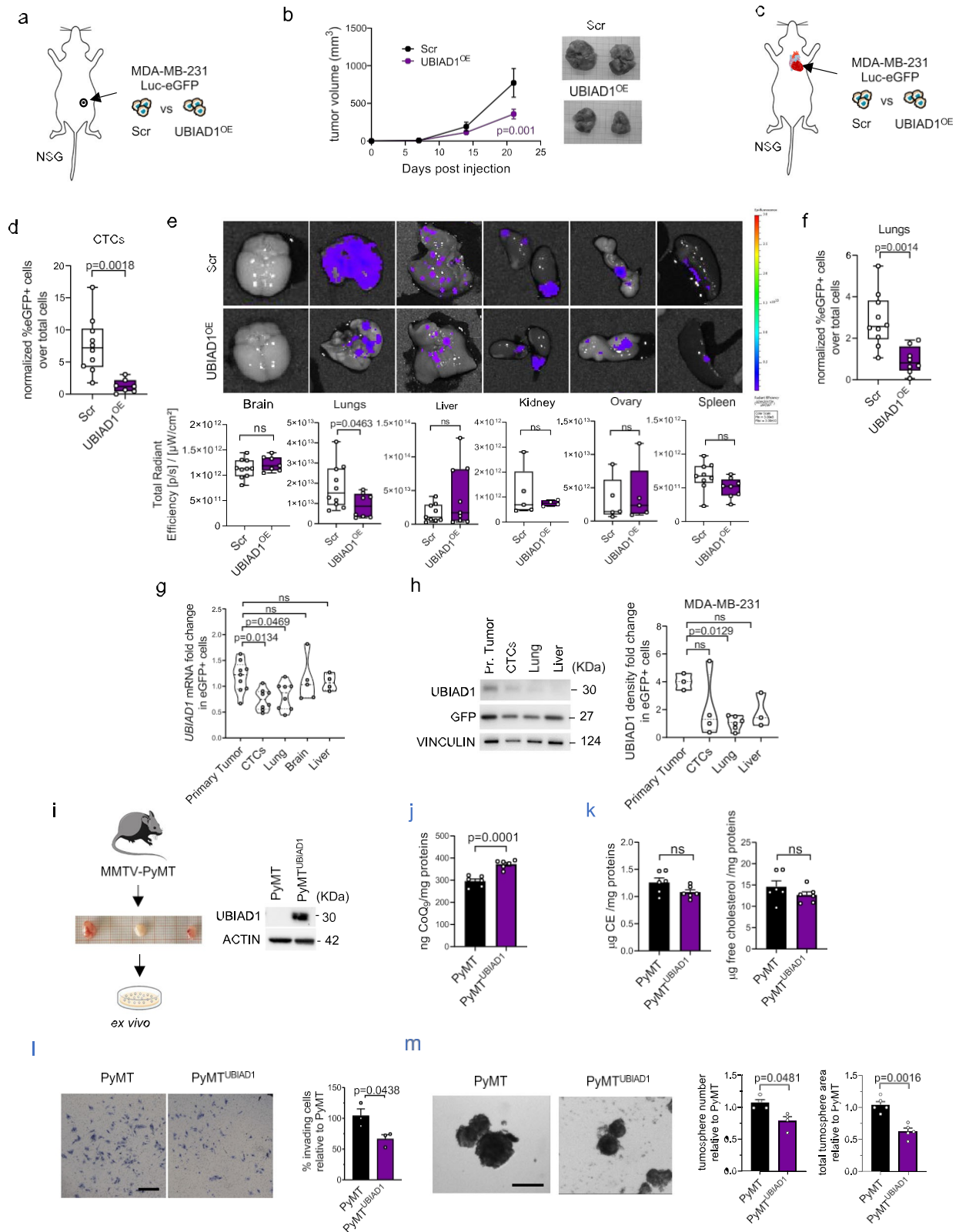
乳がん発症における*Ubiad1* の組織特異的機能をよりよく確認するため、我々は*Ubiad1* 遺伝子の第2エクソンを2つのlox-P部位で挟んだfloxed対立遺伝子モデル*Ubiad1*^{fl/fl} マウスを作製した。

記事

(補足図4j)。次に、これらのTg動物をBCモデルK14-Cre; *Brca1^{fl/fl}*; *Tp53^{fl/fl}*と交配した(図3)³⁶このモデルでは、*Tp53*、*Brca1*、*Ubiad1*の欠失が乳腺基底細胞で同時かつ特異的に起こる。KBP; *Ubiad1^{fl/fl}*、KBP; *Ubiad1^{fl/fl}*マウスの乳腺と乳がん細胞においてのみ、エクソン2の特異的欠失が起こっていることを、ゲノムDNAを用いたPCRで確認した(補足図4j, k)。これまでの結果と同様に、KBP; *Ubiad1^{fl/fl}*マウスで*Ubiad1*遺伝子を深く欠失させると、KBP; *Ubiad1^{fl/fl}*同腹子と比較して、乳腺に大きな腫瘍領域が発生する(図3k)。次に、KBP; *Ubiad1^{fl/fl}*およびKBP; *Ubiad1^{Δ4}*の条件と比較して、KBP; *Ubiad1^{fl/fl}*の腫瘍では*Ubiad1*の発現がないことを確認した(図3l)。興味深いことに、METABRICデータセットを用いて、BC患者における*UBIAD1*遺伝子の深い欠失が全生存期間の短縮と関連していることをヒトで確認した(図3m)。さらに、以前に証明されたように(図2)、*UBIAD1*の欠失は、臨床的に最も侵襲性が高いことが知られているTNおよびHER2+BC亜型においてより頻度が高い(図2e)。

まとめると、これらのin vivoデータは、CoQ_{9/10}-生合成酵素*UBIAD1*の欠損が、癌遺伝子による腫瘍形成と協力して、自然発生的な乳房腫瘍形成を増加させるという遺伝学的証拠を提供し、BC発生における*UBIAD1*およびおそらくCoQ_{9/10}の基本的な腫瘍抑制機能を示唆している。

*UBIAD1*の発現が攻撃的BC株における転移形成を制限するBCの発生と進行におけるCoQ₁₀と*UBIAD1*の役割をより明確にするため、*UBIAD1*の発現が著しく減少している転移性ヒトBC細胞株MDA-MB-231を利用した。そして、MDA-MB-231細胞で*UBIAD1*(*UBIAD1^{OE}*)を(再)発現させ(補足図5a)、HPLCでさまざまな*UBIAD1*由来の代謝物のレベルを測定した(補足図5b)。CoQ₁₀量は増加したが、遊離およびエステル化チヨ-レステロールは変化しなかった。ビタミンK₂は、コントロール細胞および*UBIAD1^{OE}*細胞の両方において、MSでは検出できなかった(データは示さず)。興味深いことに、*UBIAD1*の発現は、メバロン酸経路の律速酵素であるHMGCR(補足図5c)を安定化させ、CoQ₁₀の増加による代謝反応を示唆している。次に、*UBIAD1*の発現がMDA-MB-231の腫瘍形成特性を変化させるかどうかを測定した。*UBIAD1^{OE}*細胞は細胞増殖率に変化を示さないが、Scramble対照細胞と比較して細胞浸潤性に障害を示した(それぞれ補足図5d, e)。さらに、*UBIAD1*を発現させると、MDA-MB-231細胞の増殖能が低下し、無定着状態でのコロニー形成能も低下した(補足図5f)。これらの結果は、循環腫瘍細胞(CTC)の播種中にも不可欠なプロセスであるアノイキスから逃れる細胞の能力が低下していることを示していた^{37,38}。MDA-MB-436における*UBIAD1*発現の回復も同様の効果を示した(補足図5g, h)。



次に、免疫不全マウスでの異種移植アッセイを用いて、UBIAD1-発現MDA-MB-231細胞のin vivo腫瘍形成能を試験した。³⁹これらの細胞をルシフェラーゼ-eGFPで標識した後、NSGマウスの第4乳腺の脂肪パッドにUBIAD1^{OE} またはコントロール細胞を注入した (図4a, b)。毎週腫瘍の成長を測定したところ、UBIAD1^{OE}、コントロール

ル細胞に比べて成長速度が低下していることがわかった (図4b)。さらに、腫瘍の循環数を評価した。

記事

細胞 (CTC) と異なる部位での転移形成 (図4c-f)。UBIAD1^{OE} 細胞を心臓内注射したマウスでは、全血から選別されたCTCの数が対照と比較して劇的に減少しており (図4d)、UBIAD1^{OE} 細胞が血

<https://doi.org/10.1038/s41467-024-52523-y>

流中で生存する能力が低下していることが示唆された。さらに、UBIAD1^{OE} 細胞によって形成された肺転移は、臓器全体を分析しても (図4e)、解離した肺でGFP+細胞を選別しても (図4f) 減少した。

図4 | UBIAD1の発現は、CoQ₁₀ レベルを上昇させ、BCの播種を減少させる。

a, b 乳腺脂肪パッドにScramble細胞とUBIAD1過剰発現MDA-MB-231細胞を移植したNSG腫瘍保有マウスの腫瘍成長。データは平均値±1 SEM、2つの独立した実験から得られた各群 $n = 8$ マウス。調整後 c-f NSGマウスに心内注入したスクランブル細胞とUBIAD1-過剰発現MDA-MB-231細胞。d-f 中央値、25パーセンタイル、75パーセンタイル、最小値と最大値にひげをつけた箱ひげ図。両側検定なしのt検定によるP値。d 全血中の循環腫瘍細胞 (CTC) の割合。各ドットはマウスを表す ($n = 10$ MDA-MB-231 Scr および $n = 7$ MDA-MB-231 UBIAD1^{OE})。e 異なる臓器におけるMDA-MB-231 由来の転移の eGFP シグナル。f 解離肺におけるeGFP+細胞の割合。各ドットはマウスを表す ($n = 10$ MDA-MB-231 Scr および $n = 8$ MDA-MB-231 UBIAD1^{OE})。g, h MDA-MB-231 Scrを注射したマウスの全血、臓器、原発腫瘍から得られたeGFP+細胞におけるUBIAD1 mRNAおよびタンパク質発現。各ドットは3つの独立した実験からプールされた単一の臓器を表す。

分析した他の臓器全体では、有意差は検出されなかった。qPCRにより、原発腫瘍、血液、異なる転移部位から選別されたUBIAD1^{OE} 細胞において、UBIAD1の発現が高く維持されていることを確認した(補足図5i)。私たちの実験的証拠と一致して、MDA-MB-231由来のCTCと肺転移巣ではUBIAD1の発現が特異的にオフになっているが、他の部位(すなわち、脳と肝臓)に形成された転移巣ではオフになっていないことがわかり、低レベルのUBIAD1がCTCの生存と肺転移巣の増殖に特に有益であるという考えが裏付けられた(図4g, h)。

今回の知見が、UBIAD1の基底発現とは独立に、他のアグレッシブなBC株にも拡張される可能性があるかどうかを検証するために、UBIAD1を高発現するHER2+ヒト乳がん細胞株であるJIMT-1細胞株を用いて同様の実験を行った(補足図5j, k)。そこで、JIMT-1でUBIAD1を過剰発現させ、NSGマウスの第4乳腺の脂肪パッドに注射するか、心臓内注射により血流に注入した(補足図5l-r)。MDA-MB-231と同様に、UBIAD1の発現が増加すると原発腫瘍の増殖が抑制されることがわかった(補足図5m, n)。さらに、JIMT-1 UBIAD1^{OE} 細胞の心臓内注射後35日目に、マウスの血液から単離されたCTCの数が減少し、肺、脳、骨など様々な遠位部位へのコロニー形成が見られた(補足図5-r)⁴⁰。

UBIAD1の発現がBC腫瘍形成を阻害する能力を検証するために、MMTV-PyMT腫瘍を利用した。初期のPyMT腫瘍細胞を単離し、レンチウイルス感染によってUBIAD1を(再)発現させた(図4i)。UBIAD1の発現は、遊離コレステロールやCEレベルに影響を与えることなく、CoQ₁₀を増加させることが確認された(図4j, k)。次に、マトリゲルでコートした膜上での浸潤特性、および腫瘍球の生成能力を試験した(図4l, m)。ヒトBC細胞株におけるこれまでの結果と一致

データは平均値±SEM。i-m MMTV-PyMT由来腫瘍からのScramble (PyMT) およびUBIAD1-過剰発現 (PyMTUBIAD1) ex vivo培養の作製と特徴 i UBIAD1タンパク質発現 j マウスex vivo培養における総CoQ₉。各ドットは独立播種 ($n = 6$) を表す。データは平均値±SEMで示す。P値 k マウス生体外培養におけるコレステロールエステル (CE) および遊離コレステロールレベル。各ドットは独立播種 ($n = 6$) を表す。データは平均値±SEM。両側無対検定によるP値。l マウス生体外PyMT細胞およびPyMTUBIAD1細胞への浸潤。データはPyMT (100%とした)と比較した浸潤細胞のパーセンテージで表した。各ドットは独立播種 ($n = 3$) を表す。データは平均値±SEMで示した。P値は両側対応のないt検定による m PyMT腫瘍球。PyMT細胞に対する総腫瘍球および総面積の定量。各ドットは独立した播種を表す(数は $n = 4$ 、面積は $n = 5$)。データは平均値±SEM。P値は両側対応のないt検定によるもの。ソースデータはSource data fileにある。

するように、生体外PyMT細胞におけるUBIAD1の発現は、腫瘍球アッセイで評価された浸潤特性と癌幹細胞様の特徴の両方を損なった。

全体として、我々のデータは、代謝酵素UBIAD1が、転移部位に関連した特異性をもって、BC原発腫瘍の増殖と転移を減少させる役割を果たしていることを示した。

CoQ₁₀ とUBIAD1の発現は、BC細胞におけるECMを介したシグナル伝達とAKT2経路を障害する。

BCにおいてUBIAD1が駆動する分子メカニズムを調べるため、対照細胞およびUBIAD1^{OE} MDA-MB-231細胞についてRNA-seq解析を行った(図5a-c、補足表4-5、補足図6a)。KEGGパスウェイおよびジーンオントロジー (GO) の濃縮解析により、PI3K-ACT経路が最も影響を受けた発がん性シグナル伝達経路の1つであり、細胞外マトリックス組織が影響を受けた最も重要な生物学的プロセスであることが同定された。乳がんのがん遺伝子として指摘されているいくつかの遺伝子、すなわちLAMA5、IL6R、SRC、CHUK/IKKαが、UBIAD1^{OE} 細胞で発現低下していることが示された、

記事

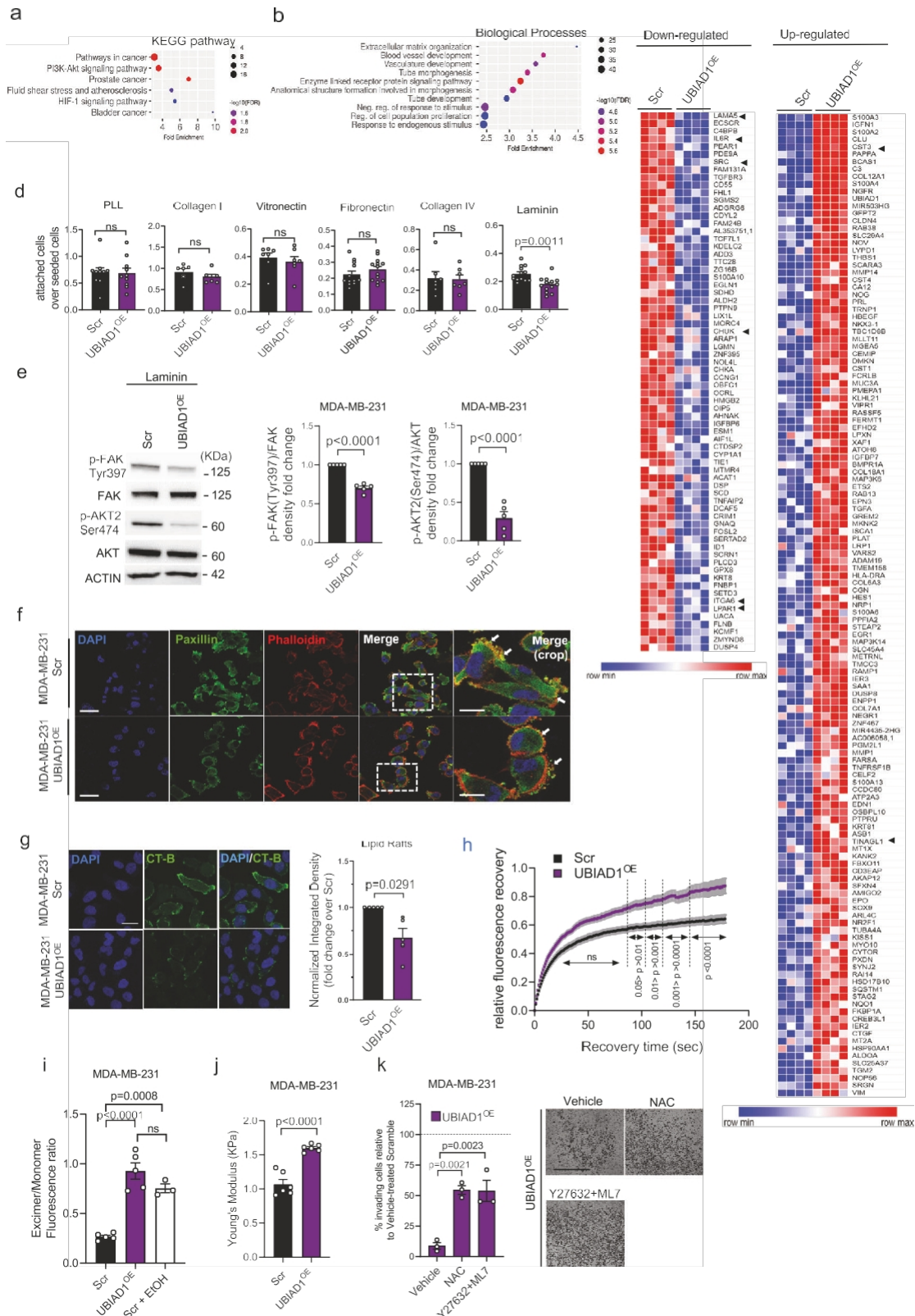
ITGA6、LPAR1⁴¹⁻⁴⁶そして、おそらくオンコサプレッサー遺伝子、すなわちCST3やTINAGL1がアップレギュレートされた。^{47,48}(図5c、補足表4-5、補足図6a)。

最も顕著にダウンレギュレートされた遺伝子はLM-511 (別名LAMA5) である。LM-511は最近、乳腺のリモデリングと管腔分化におけるその機能を強調するために、管腔乳腺上皮細胞において重要な役割を果たすことが示されている⁴⁹。LM-511の発現は乳腺腫瘍の悪性度と相関し、実験モデルでは転移能と関連していることから、本研究の興味深いターゲットとなる。実際、LM511は乳癌の転移性進行とその幹細胞性にメカノロジー依存的に寄与していることが提唱されている^{50,51}。そこで我々は、MDA-MB-231^{OE}細胞がインテグリン受容体に結合することによって、様々な細胞外マトリックス成分と結合する能力を調べた(図5d)。細胞接着アッセイにより、コントロールと比較して、UBIAD1^{OE}細胞はラミニンでコートされたプレートへの結合能が低下していることが明らかになった。一方、コラーゲンIおよびIV、ヒトロネクチン、フィブロネクチンでコートされた表面など、他のインテグリンリガンドでは差が検出されなかった。

ラミニン結合インテグリンはBC細胞でリクルートされ、焦点接着キナーゼ(FAK)の活性化を通してAKTを活性化する。²⁵そこで、細胞をラミニンコートした表面に接着させ、FAKとAKTシグナリングの両方が、サスペンション(BSA処理した表面)の細胞やPLLコートしたプレートに接着した細胞に比べてより活性化していること

を確認した(補足図6b)。そこで、ラミニンコートプレートに接着させたMDA-MB-231対UBIAD1^{OE}において、FAK上の活性化リン酸化Tyr397とAKT2上の活性化リン酸化Ser474のレベルを比較した(図5e)。予想通り、UBIAD1の発現はFAKとAKT2の活性化を有意に減少させた。我々は以前、AKT経路活性化に対するCoQ₁₀の長期投与の効果を示した(図1d)。次に、標準的な培養条件下でUBIAD1を過剰発現させたMDA-MB-231におけるAKT2活性化を調べることにした。ここでもまた、CoQ₁₀の過剰発現と一致して、UBIAD1^{OE}細胞におけるAKT2リン酸化の減少が検出された(補足図6c)。PyMTUBIAD1 ex vivo細胞株を用いて同様の結果を得たが、PyMTUBIAD1細胞はラミニン結合能が低下していた(補足図6d)。

この文脈におけるAKT2の機能的役割を確立するため、野生型AKT2またはその構成的活性型であるAKT2-MyrをUBIAD1発現細胞で過剰発現させた(補足図6e)。その結果、AKT2はUBIAD1過剰発現細胞の浸潤能を変化させなかったが、構成的活性型はこれらの細胞の浸潤特性を回復させることがわかった。次に、PIK3CA/PTENの変異の有無によって患者を層別化し、サブグループ解析を行った上で、METABRICコホートにおけるUBIAD1 mRNAレベルの挙動を解析した(補足図6f)。UBIAD1 mRNAの低発現に関連する有意な予後不良は、PIK3CA/PTENの変化のないサブグループでのみ観察された。これらのデータから、構成的に活性なPI3K-AKT2経路の存在が、UBIAD1の機能と癌抑制因子の状態を上書きすることがわかった。



全体として、CoQ₁₀、あるいはUBIAD1を過剰発現させると、BC細胞はラミニンへの結合能を失い、インテグリン依存性のFAK/AKT発がんシグナル伝達経路に関与するようになる結論した。

最後に、多くの細胞種において、細胞内アクチン束と細胞外基質との間に力学的リンクを形成する、インテグリン含有多タンパク質構造としての細胞突起と接着について調べた。FAKを含む

記事

の構造は、コントロールと比較して、UBIAD1を過剰発現したMDA-MB-231では、明らかに膜形態の変化を示した（図5fおよび補足図6g-i）。注目すべきことに、これらの変化は、CoQで処理したMDA-MB-231細胞における以前の状態に類似した、細胞膜における複数

<https://doi.org/10.1038/s41467-024-52523-y>

のブリーブとして現れた（補足図1e-k）。 10^{52} で処理したMDA-MB-231細胞（補足図1e-k）における以前の状態に似ている。同様に、UBIAD1を過剰発現しているMDA-MB-231細胞では、ROCKによる細胞骨格の変化に対する反応性が低いことが観察された。

図5 | UBIAD1発現はAKT発がん経路を阻害し、BC細胞の細胞骨格の硬さを変化させる。a-c MDA-MB-231スクランブル (Scr) 細胞とUBIAD1過剰発現 (UBIAD1^{OE}) 細胞のRNA-seq解析。a KEGGパスウェイとb Gene Ontology (GO) エンリッチメント解析による発現差のある遺伝子。d MDA-MB-231における細胞接着アッセイ。全播種細胞に対する接着細胞の比率で示す。PLLはn=10、コラーゲンIIはn=6、ピトロネクチンはn=7、コラーゲンIVはn=12、ラミニンはn=13の平均値±SEM。nsは有意ではない。

e ラミニン接着細胞におけるリン酸化-FAKとリン酸化-AKT2。全タンパク質に対するリン酸化タンパク質のデンストメトリー分析。各ドットは独立播種 (n = 5) を表す。データは平均値±SEM。UBIAD1^{OE} の平均値を1.0と比較した両側1標本のt検定によるP値。f Paxillin, DAPI, ファロイジン染色。矢印: 細胞接着またはプリーピング構造。スケールバー、60µm; クロップ、30µm。g 脂質ラフト (CT-B)。スケールバー、25µm。細胞数で正規化した集積密度。データ

Scrに対する倍数変化として。各ドットは、n=5個の独立した播種の5枚の写真的平均を表す。UBIAD1^{OE} の平均値を1.0と比較した両側1標本のt検定によるP値。MDA-MB-231細胞でのh FRAP分析。データは回復時間に対する相対蛍光強度として示した。各ドットは、3回の独立した播種、染色、解析にわたって解析された単一細胞 (n = 25 Scrおよびn = 27 UBIAD1^{OE}) を示す。ns, 有意でない。i 膜流動性分析。陽性対照としてEtOH。各ドットは独立播種を表す (ScrとUBIAD1^{OE}はn = 5、Scrはn = 3)。

+EtOH)。データは平均値±SEM。一元配置分散分析 (one-way ANOVA) とTukeyの検定から調整したp値。各ドットは単一細胞 (n = 6 cells/group) の3反復測定 の平均を表す。k ビヒクル処理Scr (100%とした) と比較した浸潤細胞の割合。スケールバー、100µm。N-アセチル-L-システイン (NAC)。各ドットは独立播種 (n = 3) を表す。データは平均値±SEM。一元配置分散分析とDunnettの検定による調整p値。ソースデータはSource Dataファイルに記載。

阻害剤Y27632とMLCK阻害剤ML7 (補足図6j-l)。

がん原性PI3K/AKT経路は、細胞膜に局在するインテグリン受容体の活性化を介して、がん細胞の生存、浸潤、転移形成を維持することが報告されている。⁵³解析されたインテグリンの中で、ラミニン結合インテグリンは、トランスダクションマシナリーをリクルートし、下流の経路を活性化するために、適切なPM脂質ラフトアセンブリーを必要とする⁵⁴。CoQ₁₀ 処理が膜流動性を増加させ、脂質ラフト含量を減少させ、皮質の硬さを増加させる能力を考慮し (図1a-c)、同様の表現型がUBIAD1^{OE} によって誘導されるかどうかを解析した。実際、UBIAD1^{OE} 細胞では脂質ラフトの減少が検出された (図5g)。この証拠に沿って、蛍光プロブDil-C16を用いて光退色後の蛍光回復 (FRAP) 解析を行ったところ、UBIAD1^{OE} MDA-MB-231細胞では、コントロールと比較して蛍光回復が増加していた。実際、Dil-C16は、コレステロールが豊富な脂質ラフトよりも、(自由に拡散できる) コレステロールが乏しい無秩序な細胞膜ドメインにより親和性がある (図5h⁵⁵)。PMの脂質ラフト構造の変化は、膜流動性の変化と関連していることが知られている。⁵⁶UBIAD1の過剰発現がMDA-MB-231細胞の膜流動性に及ぼす影響を調べた。解析の結果、UBIAD1^{OE} 細胞の膜流動性は、陽性対照として用いたEtOH処理後に観察されたものと類似しており、対照条件と比較して増加していた (図5i)。

膜流動性の変化は、細胞表面に露出しているレセプターの活性を制御することができるアクチン細胞骨格の組織化の文脈においても重要である。^{25,56}このことを確認するために、UBIAD1過剰発現に伴うMDA-MB-231細胞の単細胞コルチカルスティフネスを解析した。AFMを用いて、UBIAD1^{OE} の細胞は、CoQ₁₀ 処理 (図1c) の

場合と同様に、対照細胞 (図5j) よりも硬いことが示された。このことは、BCが細胞膜流動性の増加、コレステロールリッチな脂質ラフトの障害、皮質細胞骨格の硬さの増加に適応していることを示唆している。

興味深いことに、BCの浸潤阻止に対するUBIAD1発現の阻害効果は、Y27632+ML7阻害剤を用いて軟化を誘導するか、NACのような抗酸化剤を供給することによって減弱する (図5k)。このことは、UBIAD1によって合成されたCoQ₁₀ によって引き起こされる剛性の増大と酸化還元恒常性の潜在的な変化が、これらの細胞の腫瘍形成活性を低下させる原因である可能性が高いことを示唆している。

これらのデータを総合すると、UBIAD1とCoQ₁₀ が細胞膜のメカノプロパティを変化させ、その結果、BCの進行中にECMを介した発癌性AKT経路の活性化を阻害し、腫瘍形成特性を低下させることが示された。

記事

UBIAD1とCoQ₁₀は、FSP1を介してフェロプターシ

ス誘導物質に対するBCの感受性を高める。

PM脂質の特性の変化は、細胞の力学的特性やシグナル伝達の変化と関連している。しかしながら、脂質過酸化に対する細胞の感受性（例えば、フェロプトーシスや、フェロプシス誘導剤による処理に伴う脂質過酸化による死）をも調節する可能性があるかどうかは、現在のところよくわかっていない。最近、フェロプシスに対する耐性が、いくつかの難治性癌、特にBC¹⁹。そこで、我々はMDA-MB-231 UBIAD1^{OE}細胞を脂質過酸化誘導剤であるエラスチンとRSL3で処理し、脂質過酸化に対する細胞の感受性を評価した。その結果、ビヒクル処理細胞では、脂質過酸化に由来する生体産物であるマロンジアルデヒド（MDA）レベルはUBIAD1過剰発現の影響を受けなかったが、UBIAD1^{OE}細胞は対照と比較して、エラスチン処理により高い酸化還元ストレスを示した（図6a）。

酸化されると発光スペクトルがシフトする蛍光性脂質過酸化プローブであるBODIPY C11の酸化状態を評価したところ、同様のエビデンスが得られた。実際、UBIAD1^{OE}は、RSL3処理後、コントロール細胞と比較して、酸化BODIPYの高いレベルを示した（図6b）。興味深いことに、ROCK阻害剤Y27632とMLCK阻害剤ML7で処理するとRSL3から細胞が保護される傾向があるが、同じ阻害剤で処理したMDA-MB-231 UBIAD1^{OE}細胞では脂質過酸化が有意に高いことがわかった。このことは、PM皮質の性質の変化がフェロプトーシスの感受性に影響を与える可能性を示唆し

ている（図6c）。

次に、エラスチンとRSL3の濃度を上げて細胞生存率を評価したところ、MDA-MB-231 UBIAD1^{OE}細胞は、両薬剤の濃度が低いほど生存率が低下することがわかった（図6d）。同様の証拠が2つのTNBC細胞株MDA-MB-436とHs578Tでも得られた（補足図5gと7a-c）。一般的な酸化ストレス誘導剤（メナジオンなど）や化学療法剤（ドキソルビシンなど）に対する細胞の感受性は、UBIAD1の発現に影響されなかったため、このような効果はフェロプトーシス誘導剤に特異的であった（図6eおよび補足図7b、c）。これらの結果と同様に、*ex vivo*のPyMT^{UBIAD1}細胞も、コントロールよりもRSL3に対して感受性が高いことがわかった（図6f）。我々の結果を強化するために、MMTV-PyMT-Ubiad1^{+/+}、MMTV-PyMT-Ubiad1^{+/-}マウスの腫瘍由来細胞も試験した。その結果、UBIAD1レベルの低いMMTV-PyMT-Ubiad1^{+/-}癌細胞（補足図4g）は、フェロプトーシスに対してより抵抗性であることがわかった。フェロプトーシスを駆動する中心的な制御因子であるGPX4を、RSL3処理後のPyMT細胞で解析したところ（図6h）、PyMTがん細胞におけるUBIAD1発現は、重要なGPX4レベルを低下させ、したがってフェロプトーシスに対する耐性も低下させることがわかった。同様の結果がMDA-MB-231細胞でも得られ、エラスチンとRSL3の両方が、コントロール細胞ではGPX4レベルの増加を促進するが、UBIAD1過剰発現細胞では促進しないことがわかった（補足図7d）。さらに、PyMTコントロールとPyMT^{UBIAD1}細胞における*Acsf4* mRNAの発現を定量した。実際、ACSL4は

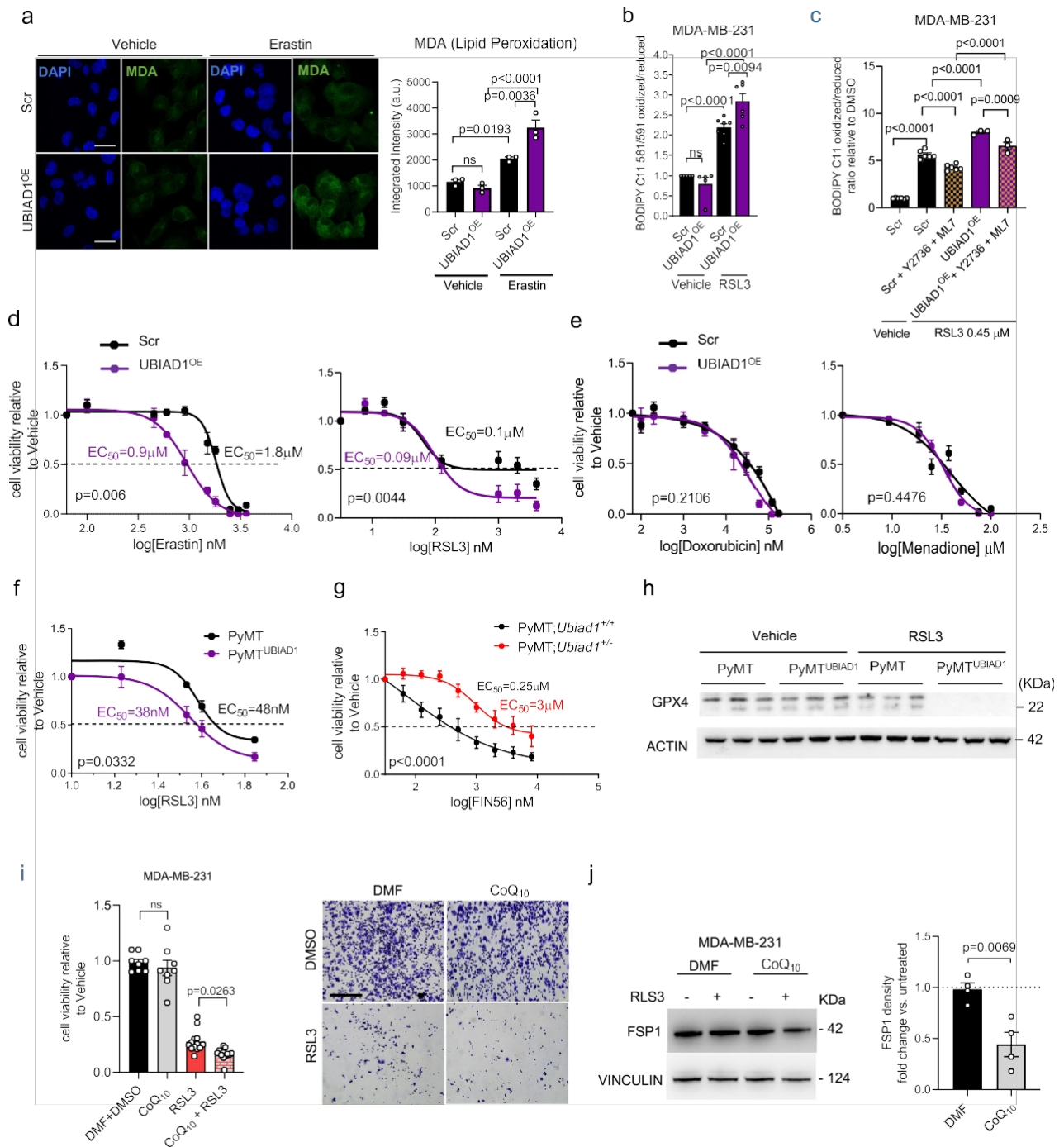


図6 | UBIAD1はBC細胞のフェロプターシス抵抗性に影響する。a ビヒクル (DMSO) または2μMエラスチンで24時間処理したMDA-MB-231細胞のマロンジアルデヒド (MDA) 染色。MDAシグナル強度は細胞数で正規化。3回の独立実験の平均値±SEM。b ビヒクル (DMSO) または0.45μM RSL3で24時間処理した細胞における脂質過酸化。各ドットは独立した実験を表す (ビヒクル処理 Scram- ble (Scr) はn = 6、RSL3処理ScrおよびScr+Y2736 + ML7はn = 6、RSL3処理UBIAD1^{OE} およびUBIAD1^{OE} + Y2736 + ML7はn = 3)。平均値±SEM。c ビヒクル (DMSO)、0.45μM RSL3、20μM Y27632および20μM ML7阻害剤の組み合わせで12時間処理した細胞における脂質過酸化。ゲーティングP1-Live_Cells-FITC/PE。データは、ビヒクル処理細胞に対する倍数変化として表した。各ドットは独立した実験を表す (ビヒクル処理ではn = 5、RSL3処理ではn = 6)。平均値±SEM。d, e エラスチンとRSL3(d)、ドキソルビシン(e)、メナジオン(e)を用いた細胞生存率アッセイ。n = 5の平均値±SEM。

記事

独立複製。f MMTV-PyMT ex vivo培養におけるRSL3を用いた細胞生存率アッセイ。n=3独立反復の平均値±SEM。二元配置分散分析を用いて算出したP値。g PyMT;Ubiad1^{+/+} および PyMT;Ubiad1^{-/-} 細胞における FIN56 を用いた細胞生存率アッセイ。n = 5独立反復の平均値±SEM。二元配置分散分析によるP値。ピヒクル (DMSO) または50 nM RSL3で24時間処理したex vivo細胞におけるh GPX4タンパク質。i 0.45 μM RSL3 単独、20 μM CoQ₁₀ 単独または併用で24時間処理した細胞における細胞生存率アッセイ。各ドットは、独立した播種、処理、溶解を表す (DMF + DMSO (ピヒクル) および CoQ₁₀ のみでは n = 8、RSL3 のみおよび CoQ₁₀ + RSL3 では n = 13) 。平均値±SEM。j CoQ₁₀ 20μMの有無にかかわらず、DMF (Vehicle) またはRSL3 0.45μMを24時間投与したFSP1タンパク質。VINCULINをローディングコントロールとして使用。各ドットは独立した実験 (n = 4) を表す。平均値±SEM。両側無対検定によるP値。ソースデータはSource data fileに記載。

ACSL4は、CoAと遊離PUFAとの結合を触媒し、フェロプターシス発症の素因となるPUFA-CoAを生成する。ACSL4の発現は、特にECMによって剥離された細胞において、インテグリン媒介シグナル伝達の活性化によって調整される⁵⁷。興味深いことに、剥離したPyMTUBIAD1細胞では、*Acs4*のmRNA発現がコントロール細胞と比較して有意に増加していることがわかった（補足図7e）。PyMTUBIAD1細胞で得られた腫瘍球でも同様の結果が得られた（補足図7f）。同様に、剥離したMDA-MB-231 UBIAD1^{9E}細胞では、Scrと比較してACSL4 mRNAの発現がより増加した（補足図7g）。これらのデータは、UBIAD1レベルが、異なる抗フェロトシス機構を介して、フェロトシス誘導物質に対するBC細胞の感受性を調節できることを示唆している⁵⁸。

最後に、UBIAD1がその生合成産物CoQ₁₀を介してBC細胞のフェロプターシス感受性を増加させるかどうかを試験した。そこで、MDA-MB-231細胞をCoQ₁₀、フェロプターシス誘導物質RSL3と一緒に、あるいはRSL3なしで処理し、細胞生存率を試験した（図6i）。CoQ₁₀の単独処理はMDA-MB-231細胞の生存率に影響を与えないが、RSL3との共処理は細胞死を有意に促進した。これらの結果を説明するために、他のBC細胞株と比較してMDA-MB-231におけるFSP1の発現を調べた。酸化型CoQ₁₀は、NADH依存性酸化還元酵素FSP1によってCoQ H₁₀₂に還元される必要があり、CoQ H₁₀₂だけがフェロプターシスを抑制するラジカル捕捉抗酸化物質として働くからである。⁵⁹異なるBC細胞株でウェスタンブロット分析によりFSP1の発現を調べたところ、MDA-MB-231や他のTNBC株は、例えば管腔BC細胞株MCF7と比較して、FSP1の発現量が非常に少ないことがわかった（補足図7h）。そこで、MCF7とMDA-MB-231のRSL3による脂質過酸化を比較することで、FSP1の発現がBC細胞のフェロプターシス感受性と相関しているかどうかを調べた（補足図7i）。MDA-MB-231はMCF7に比べてRSL3に対してより感受性が高い。この生物学的傾向は、CoQ₁₀の有無にかかわらず、RSL3処理後の細胞生存率を分析しても明らかであった。実際、CoQ₁₀処理は、MDA-MB-231（MCF7は含まない）をRSL3に対して有意に感受性が高にした（補足図7j）。次に、フェロプターシス誘導剤に対するCoQ₁₀-処理細胞の感受性上昇を説明するために、フェロプターシス誘導後のCoQ₁₀-処理細胞のFSP1レベルを分析した（図6j）。RSL3刺激は、CoQ₁₀処理細胞においてのみFSP1タンパク質レベルを減少させることから、フェロプターシスの間、CoQ₁₀はFSP1の安定性を損なうことによって作用する可能性が示唆された。

全体として、我々は、CoQ₁₀またはUBIAD1発現による処置が、PMの機械的性質と、おそらくはFSP1シールドシステムの有効性

を変化させることによって、乳がん細胞をフェロプターシスに感作する（その結果、フェロプターシス抵抗性を低下させる）ことを提案する。

ディスカッション

CoQ₁₀、細胞膜の酸化還元サイクル剤として働くことが知られている。^{59,60}しかし、膜安定化剤としての役割については、以前から仮説が立てられていた。⁵ここで我々は、CoQ₁₀、BCにおいてPMの流動性とおそらく皮質の硬さを増加させることにより、膜の力学的特性を変化させることができることを証明した。このような生物学的変化は、ゴルジ体/ERに局在する産生酵素UBIAD1を発現させるか、あるいは代謝物自体で細胞を処理することによって達成される。このようなCoQ₁₀を介したPMホメオスタシスの変化は、BCにおける脂質ラフト含量とECMを介したシグナル伝達の障害につながる。興味深いことに、CoQ₁₀-依存的なインテグリンシグナル伝達の障害は、アテローム性動脈硬化症において以前に報告されている。⁶¹TNBC細胞のような攻撃性のBC細胞は、コレステロールリッチな脂質ラフトを高レベルで示す。⁶²従って、UBIAD1とCoQ₁₀が、浸潤・生存とフェロプターシス防御のために脂質ラフトの完全性とインテグリン/ECMを介したシグナル伝達に強く依存するTNBCサブタイプの生存と攻撃性に影響を与えることは、十分に考えられる。^{63,64}メカニズム的には、このような効果は、CoQ₁₀が脂質二重層内でインターカレートし、コレステロール依存性のPM剛性と皮質細胞の柔らかさ対剛性を変化させる能力に依存すると予測される。^{23,65,66}コレステロールは生体脂質膜の安定化作用で知られている。

CoQ₁₀ は、膜の安定化におけるコレステロールの機能と直接競合することによって、細胞PMの流動性状態を増加させ、正反対の効果（コレステロール→剛性 vs. CoQ₁₀ →流動性）を引き起こすかもしれない。あるいは、CoQ₁₀、コレステロールとは無関係に、ある種の生体膜において膜安定化作用を発揮するのかもしれない。⁶⁷このような膜の変化は、膜に関連した収縮タンパク質の空間的構成に関与し、その機能や細胞膜との相互作用を変化させる可能性があると推測できる。このことは、ML7やY27632のようなMLCKやROCKの阻害剤の効果を妨害し、細胞の柔らかさに対する効果を制限する可能性がある。ともあれ、**本研究の結果を総合すると、UBIAD1/CoQ₁₀ 軸が細胞膜の恒常性維持に直接的な役割を果たし、その機能不全がBCにおける重篤な表現型の獲得に関与していることが明らかになった。したがって、がん細胞の細胞膜の流動性と力学的特性の変化は、BCにおける特異的治療のための理論的に実用可能なターゲットとなりうることが強調された。この見解を支持するものとして、臨床試験では、乳癌患者において血漿中および腫瘍組織中のCoQ₁₀ レベルの低下が示され、血漿中CoQ₁₀ レベルと乳癌の予後との間に統計学的に逆相関があることが示唆された。^{68,69}注目すべきことに、CoQ₁₀ の血漿中濃度の低下は、メラノーマ、リンパ腫、肺がんなど、他のタイプのヒトがんでも報告されている。^{70,71}また、メラノーマ患者を対象としたある研究では、転移リスクの上昇と相関していた。⁷²**

我々の研究のもう一つの特異な点は、UBIAD1とCoQ₁₀ の発現が、BCの転移とCTCの生存におけるフェロプトーシス抵抗性の制御と相関していることである。最近、メラノーマ細胞は血流を通じて腫瘍増殖の原発部位から退出することが示された。**メラノーマ細胞が遭遇する酸化ストレスにより、理論的には遠隔転移の形成を制限するフェロポトーシスと呼ばれる一種の細胞死を起こしやすくなる。しかし、メラノーマ癌細胞はフェロプトーシスに対抗する特異的なメカニズムを発達させ、血流中で生存し、転移を引き起こす。⁷³われわれのデータは、UBIAD1の発現が、BCの異種移植片モデルにおいてCTCと転移を有意に制限することを示しており、これはおそらくフェロプトーシスに対する感受性を高めるUBIAD1の能力に関係している。我々は、CoQ₁₀ を用いてこれらの所見を再現することができ、血漿中のCoQ₁₀ 濃度を高めることがBC患者の治療につながる可能性を示唆した。メカニズム的には、PM機能（例えば、コルチックアクチン、脂質ラフト内容物）を変化させることで、CoQ₁₀ とUBIAD1が、BCにおけるラミニン/α6インテグリンの活性化と発がん機能を障害することが示された。これはまた、インテグリン依存的なフェロプトーシス保**

護機能を制限する。これらのデータは、ラミニン（例えばLAMA5）とインテグリン（例えばα6β4）がGPX4の発現を維持することによってBC細胞を保護するのに必須であることを示す以前のデータと一致している^{51,57}。これは、GPX4フェロプターシス防御機構のアップレギュレーションを特徴とするTNBCの内腔アンドロゲン受容体（LAR）サブタイプにとって特に重要であろう。¹⁹

例えば、なぜUBIAD1がGPX4レベルに対してフェロプトーシス誘導条件下でのみ効果を示し、通常の基底状態では効果を示さないのか、といった疑問が残っている。がん細胞は、メバロン酸経路（MVA）と、IPPやDMAPPのようなそのインターメディエートを用いて、セレノプロテイン、ひいてはGPX4の合成をサポートすることが示されている。^{74,75}従って、TNBCにおいてUBIAD1が低い場合、MVA中間体はDMAPP-tRNASelCys-GPX4分岐をサポートするために使用され、一方、UBIAD1が高い場合、MVA中間体はCoQ₁₀合成をサポートするために必要となり、UBIAD1^{high}の状態におけるGPX4レベルの低下とフェロプトーシスに対するより高い感受性を説明すると推測できる（図7）。UBIAD1を発現している細胞のRSL3に対する感受性が高いのは、GPX4の代わりにCoQ₁₀を合成するように細胞の代謝メバロン酸経路が完全に再配線されているためである。フェロプターシス誘導物質がDMAPP-tRNASelCys-GPX4分岐反応に大きく関与しているかどうかという仮説を代謝学的に検証することは興味深い。この仮説と一致するように、BCのソフトな条件下では、DMAPPを合成するのに必要なメバロン酸IDI遺伝子が増加し、セレノプロテイン/セロトニンの合成をサポートすることが示されている。

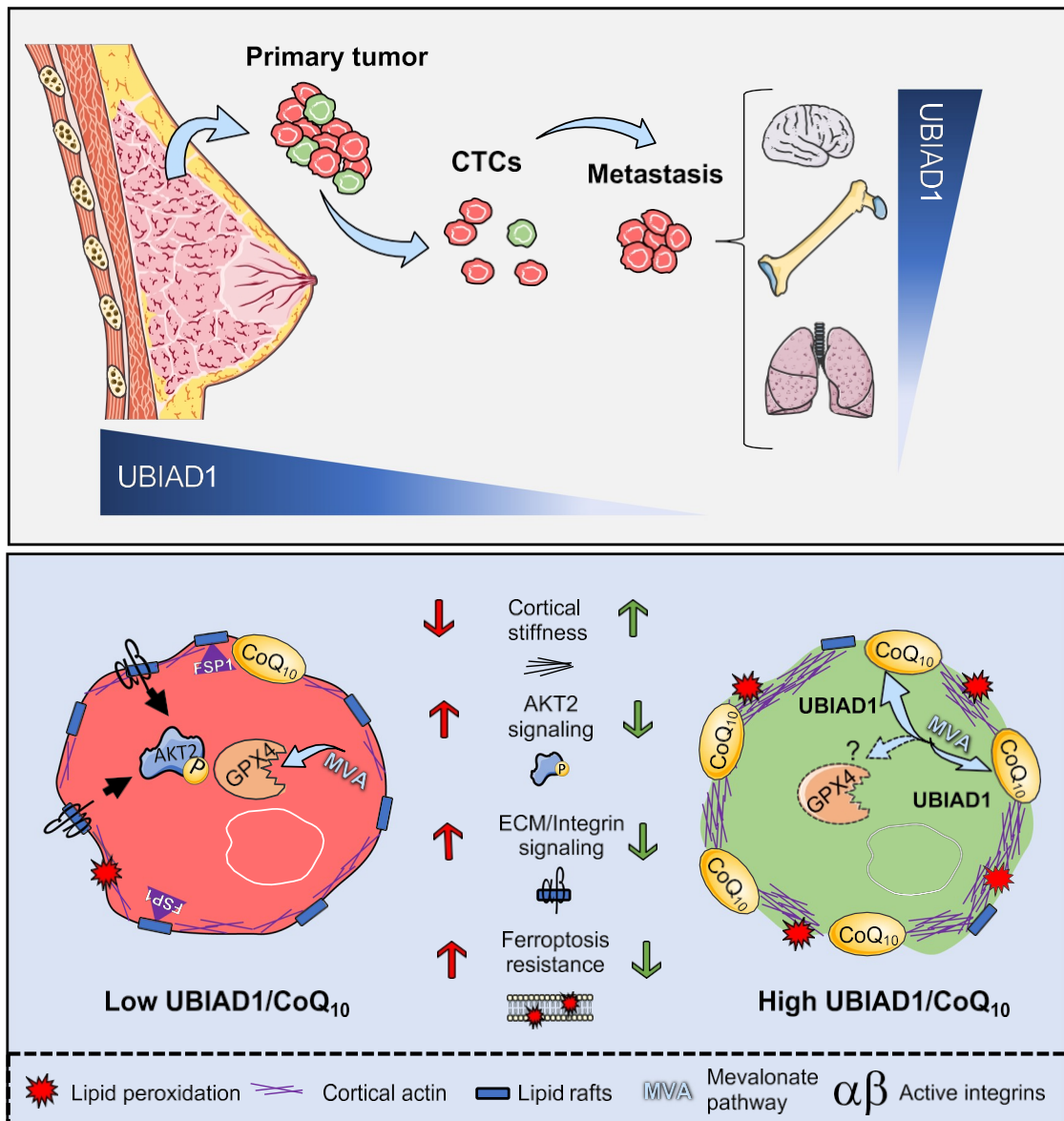


図7 | CoQ₁₀ と UBIAD1 の発現は、細胞膜依存性シグナル伝達の改変を介して、BC の転移と生存を障害する。CoQ₁₀ - 生合成酵素 UBIAD1 の発現は、侵襲性の高い BC、特に転移カスケードの間に減少する。さらに、特定の遠隔部位をコロニー化する能力は、特定の UBIAD1 発現レベルと関連している。BC における高レベルの CoQ₁₀ または UBIAD1 の発現は、脂質ラフト細胞膜の流動性を変化させ、その結果、以下のことが起こる。

は、細胞硬化、インテグリン活性の低下、および関連する発癌性 AKT2 シグナル伝達を増加させる。さらに、UBIAD1/CoQ₁₀ レベルの高い BC 細胞は、おそらく GPX4 合成と FSP1 レベルを低下させることにより、フェロプターシスと脂質過酸化に対する感受性の増加を示し、血中循環がん細胞の生存障害と肺コロニー形成の減少に寄与している。画像は、ライセンス CC BY4.0 の下、Smart Servier Medical Art を用いて作成された。

GPX4 の合成²⁷。FSP1 はまた、フェロプターシスの代替的抑制因子でもある。興味深いことに、FSP1 のミリスチル化は、このタンパク質の細胞膜への動員を仲介し、フェロプターシスの抑制につながることを示されている。^{60,76}したがって、UBIAD1/CoQ₁₀ もまた、脂質ラフトの数を減らし、細胞膜皮質の性質を変えることによって、FSP1 の安定性を低下させ、すでに FSP1 のレベルが低い細胞を、フェロプターシスに対してより感受性が高い状態にしている可能性は否定できない。

結論として、本研究は、UBIAD1 の欠損と CoQ₁₀ の細胞膜レベルの低下が、BC の発生とメタ静的拡散を促進し、おそらくフェロプターシスに対する BC の抵抗性に寄与することを示している。¹⁹ UBIAD1 の発現を安定化させ、および/または CoQ₁₀ レベルを上昇させる治療的介入（例えば、慢性的な CoQ₁₀ 補給に基づく）は、腫瘍細胞/CTC の細胞膜の流動性を増加させ、ECM を介するオンコジェニックシグナル伝達に対抗するように作用すると考えられ、攻撃的な疾患経過を示す BC 患者における興味深い治療的作用レベルに相当する。

記事

方法

倫理声明

研究目的で動物を使用するすべての手順は、パドヴァ大学の Organismo preposto al benessere degli animali (O.P.B.A.) およびイタリア保健省の承認（許可番号：336/2019-PR）を得た。

マウスモデル

我々は、ネオマイシン耐性カセットを *Ubiad1* の最初のエクソンの

ATG開始コドンにクローニングし、マウスES細胞にエレクトロポレーションでトランスフェクトすることにより、構成的 *Ubiad1* ノックアウトマウスを作製した。サザンブロットングにより、目的とする対立遺伝子を持つクローンを5つ同定し、そのうちの2つを C57BL/6J マウスの胚盤胞に注入した。キメラを用いてヘテロ接合体 *Ubiad1^{+/-}* マウスを得た。マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)ロングターミナルリピート(LTR)制御下でポリオーマウイルスミドルT抗原を発現するトランスジェニック雄性C57BL/6Jマウス

プロモーター (MMTV-PyMT, The Jackson Laboratory JAX #022974) を *Ubiad1^{+/-}* 雌と交配し、MMTV-PyMT; *Ubiad1^{+/+}* および MMTV-PyMT; *Ubiad1^{+/-}* 雌を作製した。この雌マウスを出生から28週目までモニターした。同様に、マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)長末端リピート(LTR)プロモーターの制御下で活性化ラットc-neu癌遺伝子(*ErbB2*)を発現するトランスジェニック雄性C57BL/6Jマウス(MMTV-*NeuT/ErbB2⁷⁷*)を *Ubiad1^{+/-}* 雌と交配し、MMTV-*NeuT*; *Ubiad1^{+/+}* および *NeuT*; *Ubiad1^{+/-}* 雌を作製した。この雌マウスを出生から1週目まで観察した。

50. BALB/c バックグラウンドで MMTV-*NeuT* マウスを入手し、C57BL/6Jに10世代以上戻し交配してから実験を行った。 *Ubiad1^{fl/fl}* C57BL/6Jバックグラウンドで、2つのLox-P部位で挟まれた *Ubiad1* の第2エクソンを持つマウスをCyagen社から特注した。C57BL/6J K14-Cre; *Brca1^{fl/fl}*; *Tp53^{fl/fl}* マウス、別名KBP³⁶マウスは、オランダがん研究所のBouwman教授のご好意により入手した。KBPマウスと *Ubiad1^{fl/fl}* マウスを交配し、本研究で用いたKBP; *Ubiad1^{fl/fl}* マウスを作製した。交配にはK14-Cre陽性の雄のみを用いた。⁷⁸実験にはメスのみを用いた。異種移植実験には、6-8週齢のNOD/SCIDコモンγ鎖ノックアウト (NSG; Charles River) 雌マウスを用いた。

マウスのジェノタイピングは、マウスの全胚または耳の小片を0.2 mg/ml Proteinase K (Thermo Fisher Cat.#E00492) を用いて56°Cで16時間消化したのから開始した。Proteinase Kを熱で不活性化した後、サンプルは以下のプライマーを用いて遺伝子型を決定した: *Ubiad1^{+/-}* FW 5'-CACGGGGCCGCAATTTGGTCAAG-3'、RV 5'-GGGGTCTCCAGCCACAGTAAGAGA-3' および Neo-Cassette 5'-CAGCTCGGCTCGACTAGAG CTTGC-3' (400bpのKO対立遺伝子および500bpのWT対立遺伝子); MMTV-PyMTのIMR-15 5'-CAAATGTTGCTTGTCTGTG-3'、IMR-16 5'-GTCAGTCGAGTGCACAGTTT-3'、IMR-384 5'-GGAAGCAAGTACTTCACAAGGG-3' および IMR-385 5'-GGGAAAAGTACTAGGAGCAGGG-3' (400bpのKO対立遺伝子および500bpのWT対立遺伝子)。

3' (200bpの内部CTRLおよび556bpのPyMT対立遺伝子); MMTV-*NeuT* / *ErbB2* FW 5'-ATCGGTGATGTCGGCGATAT-3'、RV 5'-GTAACACAGGCA-GATGTAGGA-3'、β-cas-FW 5'-GATGTGCTCCAGGCTAAAGTT-3'およびβ cas-RV 5'-AGAAACGGAATGTTGTGGAGT-3' (525bpの内部CTRLおよび225bpの*NeuT*対立遺伝子); *Ubiad1^{fl/fl}* LoxP1_FW 5'-CTCCTGAA-GACCATTGTCACCTGTC-3'、LoxP1_RV 5'-GAACACAGAGCCACAGTAA-CAAACAC-3'、LoxP2_FW 5'-

CACAAGGAGCAAGCAAGCCAGTA-3' および LoxP2_RV 5'-GGGAGGATAGGGAAATGAGGTTA-3' ; K14-Cre FW5'-CGATGCAACGAGTGATGAGGTTC-3'、RV5'-GCACGTTCCACCGGCAT-CAAC-3'、oIMR8744 Int ctrl5'-CAAATGTTGCTTGTCTGGTG-3'および oIMR8745_Int_ctrl5'-GTCAGTCGAGTGCACAGTTT-3'; *Brca1^{fl/fl}* LoxP1_FW 5'-TATCACCCTGAATCTACCG-3'、LoxP1_RV 5'-GACCTCAAACCTCTGAGATCCAC-3'、LoxP2_FW 5'-TATTCTTACTTCGGC-CATC-3' および LoxP2_RV 5'-TCCATAGCATCTCCTTCTAAAC-3'; *Tp53^{fl/fl}* LoxP1_FW 5'-CACAAAAACAGGTTAAACCCAG-3'、LoxP1_RV 5'-AGCA-CATAGGAGGCAGAGAGAC-3'、LoxP2_FW 5'-AAGGGGTATGAGGGA-CAAGG-3' および LoxP2_RV 5'-GAAGACAGAAAGGGAGGG-3'。ホット

ジェノタイピングにはFIREPol® Blend Master Mix (Solis BioDyne) を使用し、*Ubiad1 (+/-)* を除き、すべての反応においてタンニールリングを58°Cに設定した(タンニールリングは62°C)。

*Ubiad1*のエクソン2の組織特異的欠失は、以下のプライマーを用いて検証した: *Ubiad1^{fl/fl}* LoxP1_FW 5'-CTCCTGAA-GACCATTGTCACCTGTC-3'、LoxP2_FW 5'-CACAAGGAGCAAGCAAGC-CAGTA-3'およびLoxP2_RV 5'-GGGAGGATAGGGAAATGAGGTTA-3'。HOT FIREPol® Blend Master Mix (Solis BioDyne社製) を使用し、タンニールリングは63°C、伸長時間は20秒とした。

マウスは、22°C、12時間の明暗サイクルで、餌 (Mucedola S.r.l.、4RF21標準飼料) と水を自由に摂取できるように管理された室内で、個体ケージに入れられた通常の条件下で飼育され、体重と餌の消費量が定期的にモニターされた。腫瘍1個あたりの最大許容腫瘍体積4000 mm³を超えることはなかった。乳がん研究のゴールドスタンダードモデルとして、実験にはメスマウスのみを使用した。

初代細胞

MMTV-PyMT (alias MMTV-PyMT; *Ubiad1^{+/+}*) または MMTV-PyMT;*Ubiad1^{+/-}* トランスジェニック C57BL/6J 雌マウスの乳腺腫瘍から、それぞれ Ex vivo primary BC PyMT (alias PyMT; *Ubiad1^{+/+}*) または PyMT; *Ubiad1^{+/-}* 細胞を単離した。採取した腫瘍は、DMEM/F12培地 (Thermo Fisher Scientific Cat.#31331028) 中で氷上に置き、1時間以内に処理した。腫瘍から1gの断片を切り離し、小片 (<4 mm) に切断し、Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec Cat.#130-096-730) を用いて、メーカーの指示に従って解離した (軟部腫瘍用のプログラム)。懸濁液を70µmと40µmのセルストレーナーにかけ、300×gで10分間遠心した。細胞を、10% FBS (Carlo Erba Reagents Cat.#FA30WS1810500)、5ng/ml EGF (PeproTech Cat.#AF10015)、1µg/ml Hydrocortisone (Sigma Cat.#H0888)、100µg/ml Hydrocortisone (Sigma Cat.#H0888) を含むDMEM/F12 GlutaMAX™培地に再懸濁した。#H0888)、100 ng/ml コレラ毒素 (Sigma Cat. #C8052)、5 µg/ml インスリン (Sigma Cat. #16634)、100 µg/ml ペニシリンおよび100 µg/ml ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific Cat. #15140122) を添加し、培養した。培地は定期的に交換し、繊維芽細胞は差動トリプシン処理で数回継代して除去した。⁷⁹その後、PyMT細胞を、10% FBS、100µg/mlペニシリン、100µg/mLストレプトマイシンを添加したDMEM/F12 Glu-taMAX™培地で、5%CO₂の加湿雰囲気下、37°Cのインキュベーター内で維持した。細胞は実験に使用する前に、N GARDE Mycoplasma PCR Reagent Set (EuroClone Cat. #EMK090020)を用いてマイコプラズマ感染の有無を検査した。

細胞株

MCF7 (ATCC Cat.#HTB-22™)、T-47D (ATCC Cat.#HTB-133™)、BT474 (ATCC Cat.#HTB-20™)、HCC202 (ATCC Cat.#CRL-2316™)、HCC1143 (ATCC Cat.#CRL-2321™)、MDA-MB-438 (ATCC Cat.#HTB-132™)、MDA-MB-436 (ATCC Cat.#HTB-130™)、MDA-MB-231 (ATCC Cat.) Hs578T (ATCC, Cat. #HTB-126™)、JIMT-1 (Leibniz Institute DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cellcultures, Cat.#ACC-589) およびHEK293T (ATCC Cat.#CRL-11268) 細胞は、10% FBS (Carlo Erba Reagents Cat.#FA30WS1810500) および100µg/mlペニシリン、100µg/mLストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific Cat.#15140122) を含むDMEM、高グルコース、GlutaMAX™サプリメント、ピルビン酸 (Thermo Fisher Scientific Cat.#31966047) 中で培養した。MCF10A (ATCC Cat.#CRL-

10317™) 細胞は、5%ウマ血清 (Sigma Cat.#H1138)、20 ng/ml ヒトEGF (PeproTech Cat.#AF10015)、0.5µg/mlヒドロコルチゾン (Sigma Cat.#H0888)、100ng/mlコレラ毒素 (Sigma Cat.#C8052)、10µg/mlインシュリン (Sigma Cat.#16634)、100µg/mlペニシリンおよび100µg/mLストレプトマイシンを添加した。細胞は、5% CO₂の加湿雰囲気下、37°Cのインキュベーターで維持された。すべての細胞株は、N GARDE Mycoplasma PCR Reagent Set (EuroClone Cat. #EMK090020)を用いて、マイコプラズマ感染について定期的に検査された。

公開データセットの分析

METABRICコホートに登録された1904人の乳がん患者の、公開されているコピー数変化 (CNA)、*UBIAD1* mRNAレベル、PIK3CA/PTEN変異状態、関連する臨床病理学的データ、および生存データを cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) から検索した。

患者は、*UBIAD1* CNAの正常 (CNAなし)、増幅 (増幅あり)、欠失 (深い欠失または浅い欠失あり) によって層別化された。

*UBIAD1*増幅を有する19人の患者は、主要な関心事ではない稀な亜集団であるため、生存解析には含まなかった。

RNAの発現状態から推定されるERとHER2の状態は、乳癌の分子分類に使用され、関連する一部の患者におけるIHC情報の欠如を補った。

ヒト乳がんの免疫組織化学的解析

1997年から2000年までミラノのEuropean Institute of Oncologyに登録された乳癌患者約2400人のretro-spective連続コホートから得られた乳癌検体のホルマリン固定パラフィン包埋Tis-sueマイクロアレイ (TMA) を用いてIHC解析を行った。⁸⁰UBIAD1の発現は、Proteo-Genix社からカスタムメイドされたウサギ抗ヒトUBIAD1 (ペプチド配列: cys-FRSQAFNKLPQRTAK) を用いて評価され、クエン酸pH6.0での抗原回収工程の後、最終濃度0.17µg/mlで使用された。免疫複合体は、EnVision+ HRP Rabbit (DAB+) kit (DAKO Cat.#K4007) を用いて可視化し、Aperio ScanScope system (Leica Biosystems) で取得した。すべての被験者からインフォームドコンセントを得た。臨床的および病理学的パラメータとの相関解析のため、患者はUBIAD1染色の強度に基づいて以下のように層別化された: UBIAD1_{Low} (IHCスコア<2)、UBIAD1_{Intermediate} (IHCスコア>2および<3)、UBIAD1_{High} (IHCスコア≥3)。

自然発生腫瘍モデル

2ヶ月齢のマウスを週1回、触知可能な腫瘍についてモニターした。腫瘍が触知可能になった時点で、各マウスのすべての乳腺腫瘍の体積を、MMTV-PyMTマウスでは28週目まで、MMTV-NeuTマウスでは50週目まで、週1回測定した。腫瘍体積はノギスを用いて、腫瘍体積 = (長さ × 幅²) / 2という式で測定した。ここで、長さは腫瘍の最大直径を示し、幅は腫瘍の垂直直径を示す。マウス1匹あたりの総腫瘍体積は、1匹のマウスから発生したすべての腫瘍の体積の合計として計算した。実験終点で、腫瘍を数え、重量を測定し、組織学的検査または定量的PCR/ウェスタンブロット分析のために回収した。腫瘍総重量は、1匹のマウスから発生したすべての腫瘍 () の重量の合計として計算した。4ヶ月齢のKBPマウスを週1回、触知可能な腫瘍についてモニターした。子マウスの雌1匹に腫瘍が触知可能になり次第 (29~32週齢の間)、すべての兄弟を犠牲にし、第2~3乳腺 (胸部) および第4乳腺 (腹部) を解剖し、乳腺全体を染色した。あるいは、腫瘍病巣を採取し、RNA抽出のためにTRIzolで解離させるか、DNA抽出のためにProteinase Kで消化した。ゲノムDNAはフェノール/クロロホルム法で精製した後、PCRを行った。

異種移植腫瘍モデル

MDA-MB-231およびJIMT-1 cScrおよびUBIAD1^{OE} 細胞に、ホタルルシフェラーゼおよびeGFP発現用プラスミドを有するレンチウイルスを導入した。⁸¹eGFP+細胞のみをFACS Aria™ Illu Cell Sortingで選択し、in vitroで増殖させた。6-8週齢のNSG雌性マウスを麻酔し、5×10⁵ eGFP+ MDA-MB-231または4×10⁵ JIMT-1細胞を100µLの等量

PBSに懸濁した: マトリゲル (Growth Factor Reduced Matrigel, Corning Cat.#354230) を、26G針のついた注射器を用いて第4乳腺1個の脂肪パッドに注入した。腫瘍の成長は、MDA-MB-231細胞については注入後21日目まで、JIMT-1細胞については注入後35日目まで、ノギスを用いて週1回モニターした。心臓内注入では、2×10⁵ eGFP+ MDA-MB-231またはJIMT-1を100µLのPBSに懸濁し、30Gの注射針をつけた注射器を用いて麻酔したNSG雌の左心室に注入した。⁸²転移形成は、MDA-MB-231細胞では注入21日後まで、JIMT-1細胞では注入35日後まで、バイオルミネッセンスイメージング (BLI) を用いて週1回評価した。生物発光画像はIVIS Spectrum Imaging System (PerkinElmer) を用いて収集した。撮像の10分前に、動物をイソフルラン/酸素で麻酔し、PBS中150 mg/kgのD-ルシフェリン (PerkinElmer) をi.p.投与した。各動物について腹側および背側の画像を取得し、関心領域 (ROI) を通して定量化した。Living Image Software (PerkinElmer社製) を用いて生物発光イメージングデータセットを取得し、定量化した。生け贄に捧げる際、マウスの血液を25G注射針を用いた心臓穿刺により採取した。

50μLの500U/mLヘパリン (Sigma) を含む。1100×g、5分間、RTで遠心した後、血漿の上層を捨て、WBCと循環腫瘍細胞を含む下層のバフィーコート回収した。バフィーコートを、製造元の指示に従って Red Blood Cell Lysis Buffer (シグマ、商品番号 11814389001) で洗浄し、残存する赤血球を除去した。WBCとCTCをPBS中の3%BSAに再懸濁し、FACS Aria™ III Cell Sortingを用いてCTC-eGFP+細胞のみを分離した。採血後、原発腫瘍と複数の臓器を採取し、Xenogen IVIS Lumina II (Perkin Elmer) または蛍光灯に接続したLeica Stereomicroscopeを用いて、臓器全体のeGFPシグナルを評価した。その後、臓器と腫瘍を2 mmに切断し、DMEM (Thermo Fisher) 中の1 mg/mL Collagenase A (Sigma、Cat. #11088793001) に再懸濁し、37°Cで30分間解離させた。赤血球を溶解した後、細胞をPBS中の3%BSAに再懸濁し、FACS Aria™ III Cell Sortingを用いてeGFP+癌細胞のみを分離した。単離した細胞は、1x halt protease inhibitor cocktail (Roche Cat.#04693116001) と phosphatase inhibitor (Sigma Cat.#4906845001) を添加した自家製RIPAを用いたタンパク質抽出、またはRNA抽出に用いた。単離したeGFP+細胞の数に応じて、TRIzol™ 試薬 (ThermoFisher Scientific Cat.#15596018) または NucleoSpin RNA XS Kit (Carlo Erba、Cat. #FC140902L) のいずれかを、製造元の指示に従って使用した。

マウス治療

N-アセチル-L-システイン (NAC; Sigma Cat.#A9165) とビタミンK₂ (Sigma Cat.#V9378) はPBSで希釈し、CoQ₉ (Sigma Cat.#C9538) はヒマワリ油で希釈した。NAC、ビタミンK₂ およびCoQ₁₀ は150 mg/kgの用量で注射した。妊娠中の雌にはE2.5からE9.5の間に毎日腹腔内注射した。仔マウスはP0で遺伝子型を決定した。

CoQ₉ マウス胚および腫瘍からの測定

HPLC-MS分析用の試料は、前述の方法で調製した。³⁰CoQ₆ (Avanti Cat. #900150 O)を内部標準として、CoQ₉ レベルを HPLC-MS で検出した。各サンプルのタンパク質濃度は、Pierce™ BCA Protein Assay (ThermoFisher Scientific Cat. #23225)で測定し、CoQ₉ の量は、このタンパク質量にノルマル化した。

ホールマウント乳腺染色

マウス乳腺のホールマウント調製および染色は、以前に記載されたとおりに行った。⁸³特に、29~32週齢のマウスから採取した第2~3乳腺 (胸部) および第4乳腺 (腹部) をカルノイ液で24時間固定し、脱イオンH₂O中のカーマイン色素溶液 (シグマ、C1022) およびア

ルミニウムカリウム (シグマ、Cat.#A7167) を用いて3日間染色した。スライドをキシレン中で保管し、ライカMZ16Fステレオマイクロスコープで写真を撮った。腫瘍性病変の面積をImageJで計算し、異なるマウスの血統で正規化した。

細胞生存率アッセイ

1×10⁴、MDA-MB-231、MCF7、MDA-MB-436、Hs578T細胞^{◆◆}/ウェル、および5×10。

10³ ex vivo PyMT細胞/ウェルを96ウェルプレートに播種し、4時間またはO/Nで接着させた。細胞を標記化合物で標記濃度で24時間処理した。併用処理の場合、細胞を4時間接着させた後、20μM CoQ₁₀ (Sigma)と0.45μM RSL3 (Sigma Cat. #SML2234)を含む培地で24時間同時処理した。エラスチン (Sigma Cat.#329600)、RSL3、塩酸ドキソルピシン (Sigma Cat.#D2975000) はDMSO (Sigma Cat.#D2650)、メナジオン (Sigma Cat.#M5625) は96%エタノール、CoQ₁₀ はDMF (Sigma Cat.#227056) に溶解した。その後、培地を除去し、細胞を水道水で2回洗浄した。次に、20%メタノール中の0.5%(w/v)クリスタルバイオレット染色液(Sigma Cat. #C6158)50μlを各ウェルに加え、ベンチロッカー上で室温で20分間インキュベートした。

毎分20振動。プレートを水道水で4回洗浄し、乾燥させた。その後、各ウェルに200 μ lのメタノールを加え、毎分20振動のベンチロッカーで室温で20分間インキュベートすることにより、クリスタルバイオレットを溶解した。次に、プレートリーダーで595 nmの吸光度を分析した。あるいは、Leica DMI4000またはNikon AZ100顕微鏡を用いて各ウェルの写真を撮影し、クリスタルバイオレットで染色した細胞をImageJソフトウェアでカウントした。

細胞治療

細胞を、20 μ M CoQ₁₀ (Sigma Cat.#C9538)、CoQ₆ (Avanti Polar Lipids, Inc Cat.#900150)、CoQ₂ (Sigma Cat.#C8081) または DMF (ビヒクル、Sigma Cat.#227056)、20 μ M水分散性CoQ H₁₀₂ (別名ShiroQ™、40%カネカユビキノール水溶性粉末) またはプラセボ (ビヒクル)、イデベノン (Tocris Bioscience Cat.#3002)、Y27632 (Adooq Bioscience Cat.#A11001)、ML7 (Tocris Bioscience Cat.#4310)、NAC (Sigma Cat. # A9165)、または等容量のddH₂Oで処理した。細胞は2日ごとに培地を交換しながら、14日間処理した (特に指定がない限り)。

4-OHT処理細胞を6ウェルプレートに完全培地で播種し、一晚接着させた。翌日、タンパク質とRNAを回収する前に、細胞をDMSO中10 μ M 4-OH-タモキシフェン (Sigma Cat.#H7904) またはビヒクル (DMSO) で48時間処理した。

17 β -エストラジオールで処理する前に、細胞を播種し、4.5 g/L D-グルコース (Sigma, Cat. #G7021)、1 mM ビルビン酸ナトリウム (Thermo Fisher Scientific, Cat.#11360070)、2mM L-グルタミン (Thermo Fisher Scientific, Cat. #25030024)、10% Fetal Bovine Serum charcoal stripped (Thermo Fisher Scientific Cat. #A3382101)、100 μ g/mlペニシリン、100 μ g/ mLストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific Cat. #15140122) を添加した。同じ培地組成で、細胞を10 nM 17 β - Estradiol (Merk, Cat. #2001128945) in EtOHまたは Vehicle (EtOH)で24時間処理した後、RNA抽出を行った。

細胞増殖アッセイ

ウェル当たり3000個の細胞を96ウェルプレートに播種し、24時間後、48時間後、72時間後、96時間後、120時間後にクリスタルバイオレット染色液 (Sigma Cat.) 培地を除去し、それぞれの間隔で細胞を水道水で2回洗浄した。次に、20%メタノール中の0.5%(w/v)クリスタルバイオレット染色溶液50 μ lを各ウェル () に加え、毎分20振動のベンチロッカー上で室温で20分間インキュベートした。プレートを水道水で4回洗浄し、乾燥させた。その後、各ウェルに200 μ lのメタノールを加えてクリスタルバイオレットを溶解し、毎分20振動のベンチ

ロッカー上で室温で20分間インキュベートした。次に、プレートリーダーで595 nmの吸光度を測定した。CoQ存在下での細胞増殖アッセイ₁₀、96ウェルプレートに1ウェルあたり10,000個の細胞を播種し、DMF (ビヒクル) または20 μ M CoQ₁₀ (Sigma Cat.#C9538) で処理した。処理液は48時間ごとに交換した。

ウイルス導入と安定系統の作製

ヒトUBIAD1遺伝子のコード配列 (NM_013319.3) をゲートウェイクローニングシステムを用いてpLenti-CMV-Neo-DESTベクター (Addgene Cat.#17392) にクローニングした。pLenti-CMV-Neo-DEST-UBIAD1、pLenti-CMV-Neo-GFP-DEST(Addgene Cat. #19732)またはpLenti-CMV-Neo-DEST-emptyを有する組換えレンチウイルスを、pMD2.G(VSV-Gエンベロープ; Addgene Cat. #17392)からなるプラスミドDNAの混合物でHEK293T細胞を共導入することにより、プロ。G (VSV-Gエンベロープ; Addgene Cat.#12259)、pMDLg/pRRE (Gag/Pol; Addgene Cat.#12251)、およびpRSV-Rev (Rev; Addgene Cat.#12253) からなる混合プラスミドDNAを、Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Life Technologies Cat.#11668019) を用いて、メーカーの推奨に従ってHEK293T細胞に共導入した。レンチウイルスを含む上清を回収し、0.45 μ mフィルターを通し、-80°Cで保存した。

レンチウイルス粒子は、Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit (Takara Cat. #632200)を用いて定量した。同様に、スクランブル-gRNA (5'-GGCACTCACATCGCTA- CATCAGTTT-3') または UBIAD1-gRNA (5'-GGGCCAGAGGCGGGA-3') を含む lentiMPH v2 プラスミド (Addgene Ref.#89308) および lenti_SAM_v2 プラスミド (Addgene Ref.#75112) を有するレンチウイルスを用いた。GAAGGGGTTT-3') を用いて CRISPR 編集株を作製した。

UBIAD1 を過剰発現する安定株は、MDA-MB-231、MDA-MB-436、Hs578T および ex vivo PyMT 細胞に 5 MOI のレンチウイルスを導入することにより作製した。形質転換された細胞は、MOCK コントロール (形質転換されていない細胞) が完全に死滅するまで、1.5 mg/ml G418 (Gibco™ Cat.#10131019) で選択した。以下の実験はすべて、G418 を含まない培養液で行った。あるいは、MDA-MB-231 安定 UBIAD1 過剰発現細胞を CRSIPR-dCas9 技術を用いて作製した: まず細胞を lentiMPH v2 で形質導入し、100 µg/mL Hygromycin b (Santa Cruz Cat.#sc-29067)、2 番目は lenti_SAM_v2_UBIAD1-gRNA または lenti_SAM_v2_scramble-gRNA で導入し、2 µg/mL Blastidine (Sigma、Cat.)⁸⁴。

Luc-eGFP レンチウイルスの作製には、以下のレンチウイルスパッケージングベクターを使用した: pMDLg/pRRE、pRSV-Rev、pMD2.VSVG、および pADVantage。トランスファーベクター #945.pCCL.sin.cPPT.SV40ployA.eGFP.-nCMV.hPGK.δLNGFR.Wpre は自己不活性化(SIN)HIV由来ベクターである。⁸⁵このベクターは、minCMVPGK分岐双方向プロモーターを持ち、2つの遺伝子をアンチセンス配向で同時発現させる。hPGKプロモーターの制御下にあるルシフェラーゼ配列 (fluc)、および minCMV の制御下にある eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) である。fluc 配列は GeneArt, Life Technologies 社 (ドイツ、レーゲンスブルク) によって合成された。

AKT2過剰発現

細胞は、Lipofectamine 2000 (Invitrogen、Cat. #11668) を用いたリバーストランスフェクションによりトランスフェクションした。簡単に説明すると、 1.5×10^6 の細胞を、Pen/Strep および FBS を含まない培地中で、リポフェクタミンと 2 µg の pcDNA3-empty、pcDNA3-AKT2-wt、および pcDNA3-Myr-AKT2 と混合し、10cm のシャーレに播種した。⁸⁶6時間後、細胞を 1x PBS で洗浄し、完全培地を加えた。トランスフェクションの48時間後、細胞を破碎し、浸潤アッセイ用に播種した。AKT2の過剰発現は、抗ヒトAKT2抗体

(1:1000, GeneTex Cat. #GTX128457, RRID:AB_2750992) を用いたウェスタンブロット分析により確認した。

フォトブリーチ後の蛍光回復 (FRAP)

細胞を µ-Dish 35 mm, high (Ibidi, Cat. #81156) に培地ごと播種し、一晚観察した。翌日、細胞を PBS で洗浄し、PBS 中 1 µg/mL Dil-C16(3) 溶液 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、商品番号 D-384) と共に 1 分間、RT でインキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、細胞を温 HBSS (ThermoFisher Scientific, Cat.) 細胞は実験期間中、ヒーティングチャンバーを用いて 37°C に保った。FRAP は、共焦点顕微鏡 (Leica SP8) の 63×油浸対物レンズを用いて行った。標識膜の決められた領域 ($3 \times 3 \mu\text{m}^2$) の 60-80% の光退色を、552 nm の 100% レーザー スキャンを 4 回、合計 4 秒間行った。蛍光強度は、光退色前と、3 分間にわたって 1 秒ごとに写真を撮った後に記録した。バックグラウンドの正規化後、蛍光を経時的にプロットし、蛍光回復曲線を作成した。撮影中の不要な光漂白は、レーザーの出力設定により無視できる程度であった。

親油性ピレン・プローブを用いた膜流動性アッセイ

細胞を 96 ウェル Black/Clear Flat Bottom TC 処理 Imaging Microplates (Corning、Cat. #353219) に標準培地で播種した。80-90% のコンフルエントに達したところで、Membrane Fluidity Kit (Abcam、Cat. #ab189819) を用いて、メーカーの指示に従って細胞を染色した。簡単に説明すると、5 µM の蛍光脂質試薬の溶液に

0.08% Pluronic F127 in Perfusion Bufferを用い、25°C、暗所にて1時間細胞を染色した。その後、細胞をPBSで2回洗浄した。PBS中で、Tecan Plate reader Infinite 200 PROを用い、350 nm (± 10 nm) で励起した後、プレートの底から390 nmから510 nm (5 nm ステップサイズ) の蛍光発光を記録した。390-395 nmまたは475-485 nmの蛍光強度の平均を、それぞれプローブモノマーまたはエキシマーとみなした。バックグラウンド (染色していない細胞) を差し引いた後、モノマー蛍光強度に対するエキシマー蛍光強度の比を膜流動性の指標として計算した。膜流動性が高くなると、ピレン・プローブはモノマーではなくエキシマーを形成する。⁸⁷ 400 mM EtOHで48時間処理したものを陽性対照として用いた。

細胞接着アッセイ

細胞接着アッセイを行い、インテグリンが介在する様々な細胞外マトリックス成分への結合を解析した。フィブロネクチン (Sigma Cat.#ECM001)、コラーゲンI (Roche Cat.#11179179001)、コラーゲンIV (Sigma Cat.#C7521)、ビトロネクチン (Sigma Cat.#SRP3186)、ヒト胎盤由来ラミニン (Sigma Cat.#L6274)、およびポリ-L-リジン (PLL; Sigma Cat.#P4707) を、製造業者の指示に従って可溶化し、100 μ l/ウェルを用いて96ウェルプレートを37°Cで1時間コートした。プレートは、1.25 μ g/mlフィブロネクチン、0.4 μ g/mlコラーゲンI、0.2 μ g/mlコラーゲンIV、4 μ g/mlビトロネクチン、および2.5 μ g/mlラミニンでコートした。12.5 μ g/mlのポリ-L-リジン (PLL) をインテグリン非依存性付着コントロールとして用いた。コーティング後、2.5 mg/mlの熱変性BSA (Sigma Cat.#10735094001) を水中で37°Cで2時間ブロッキングすることにより、非特異的結合を減少させた。ブロッキング溶液を除去し、ウェルを無血清DMEMで2回洗浄した。PBS pH7.4中2mM EDTAを含む酵素フリーバッファーを用いて細胞を剥離し、100 μ lの無血清DMEMに 5×10^4 cells/wellを播種した。クリスタルバイオレット染色プロトコルを用いて染色する前に、細胞を5% CO₂ の加湿雰囲気下、37°Cのインキュベーター内で30分間接着させた。簡単に説明すると、細胞を水道水で2回洗浄した後、20%メタノール中の0.5%(w/v)クリスタルバイオレット染色液 (シグマ社製) 50 μ lを各ウェルに添加した。プレートを室温で20分間、毎分20振動のベンチロッカーでインキュベートした。ウェルは水道水で4回洗浄し、乾燥させた。その後、各ウェルに200 μ lのメタノールを加えてクリスタルバイオレットを溶解し、毎分20振動のベンチロッカーで室温で20分間インキュベートした。次に、プレートリーダーで595 nmの吸光度を分析した。

同様に、6ウェルプレートに7.5 μ g/mlのヒト胎盤由来ラミニン (シグマ社製) または7.5 μ g/mlのポリ-L-リジン (シグマ社製)

) をコートし、上記のようにブロッキングした。 5×10^5 細胞を2mlの無血清培地に播種し、5% CO₂ の加湿雰囲気下、37°Cのインキュベーターで30分間接着させた。その後、「方法」の詳細に記載されているように、ウェスタンブロッティング用のサンプルを調製した。

脂質ラフトの染色

生細胞中の脂質ラフトを可視化するために、Vybrant™ Alexa Fluor™ 555 Lipid Raft Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific Cat. #V34404) を使用した。簡単に説明すると、10%FBS添加DMEM Gluta-MAX™ 培地 (Thermo Fisher Scientific社製) を24ウェルプレートに入れたガラス製カバースリップ上に、 1.5×10^4 cells/ウェルを播種し、一晚接着させた。その後、培地を除去し、FBS無添加の培地中で、350 μ l/ウェルのCT-Bコンジュゲートとともに、+4°Cで10分間、穏やかに振盪しながらインキュベートした。インキュベーション後、細胞をPBSで2回洗浄し、350 μ l/wellの抗CT-B抗体とHoechst 33342 (1:2000, Thermo Fisher Scientific Cat. #62249) を加え、+4°Cで15分間、穏やかに振盪しながらインキュベートした。細胞をPBSで3回洗浄し、4%フォルムアルデヒドで室温で15分間固定した。PBSでさらに3回洗浄した後、ガラスカバースリップをMowiol® 4-88 (Sigma Cat. #81381) でマウントした。サンプルはLeica SP8 DLS

顕微鏡で観察し、Leica LASX software (<https://www.leica-microsystems.com/>)を用いて画像を処理した。蛍光強度はImageJソフトウェア (<https://imagej.nih.gov/ij/>)を用いて測定した。

リアルタイムq-PCR

採取した腫瘍をPBSで洗浄し、放射状に4分割した。1片をTRIzol™ 試薬 (Thermo Fisher Scientific Cat.#15596018) に懸濁し、IKA T-10 Basic Homogenizerを用いてホモジナイズした。細胞を氷冷したPBSでリンスし、TRIzol™ 試薬またはNucleoSpin RNA XS Kit (Carlo Erba, Cat. #FC140902L) のいずれかを直接プレートに加えた。サンプル採取後、RNA単離を製造業者の説明書に従って行った。RNAの濃度と純度は、NanoDrop分光光度計を用いてそれぞれA260とA280/260で測定した。RNAは、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific社、商品番号4368814)を用いてcDNAに逆転写した。QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)を用い、5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (Solis Cat.#08-36-00020)を用いて定量的PCR (q-PCR)を行った。転写レベルはβ-アクチンで正規化し、参照サンプルに対する相対値として報告した。q-PCRで使用したプライマーはすべて100%に近い効率を持ち、その配列を以下に示す。QuantStudio™ Design & Analysis Software (www.thermofisher.com)をq-PCRデータ処理に使用した。マウス *Ubiad1* FW: 5'-CACAGGAGGAATTGGATTCAAGT-3'; マウス *Ubiad1* RV: 5'-GGATGGCGTAGATTAGAGGGAAG-3'; マウスβ-*Actin* FW 5'-GTACTCTGTGGATCGGTGG-3'; マウスβ-*Actin* RV . 5'-AAACGCAG CTCAGTAACAGTCC-3'; Human *UBIAD1* FW: 5'-CACTTGGCTCTTATCT ACTTTGGA-3'; Human *UBIAD1* RV: 5'-GTCTCCCAGAGCCACGTACTT G-3'; Human β-*ACTIN* FW: 5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGT-3'; Human β-*ACTIN* RV . 5'-GCGGGAAATCGTGCCTAGCATT-3'; Mouse *Acs14* FW: 5'-GGCTGACAGAATCATGTGG-3'; Mouse *Acs14* RV: 5'-GAACTGTATAACACCTTCCTGC-3'; Human *MYC* FW: 5'-CTCTGA AAGGCTCTCCTTG-3'; Human *MYC* RV . 5'-CGTAGTCGAGGTCAT AGTTC-3'; ヒト *BCL2* FW: 5'-TGGATGACTGAGTACCTGAA-3'; ヒト *BCL2* RV . 5'-AGGAGAAATCAAACAGGC-3'; Human *CCND1* FW: 5'-TCGGTGTCTACTTCAAATG-3'; Human *CCND1* RV: 5'-CTCGCACTTCTGTTCTC-3'.

ウェスタンブロッティング

細胞を氷冷したPBSで洗浄し、培養プレートからスクレイピングで回収した。氷冷した自家製RIPA溶解バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl₂, 2%デオキシコール酸ナトリウム, 0.2% SDS, 2% NP40) に1x haltプロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche Cat.#ホスファターゼ阻害剤 (Sigma Cat. #4906845001) を20分間添加し、20,000×g、10分間、4 + Cで遠心分離することにより、可溶性溶解画分を明らかにした。

マウス胚を氷冷したRIPA Lysis and Extraction Buffer (Life Technologies) に懸濁し、1x halt pro teaseおよびphosphatase inhibitor cocktail (Roche and Sigma) を添加し、乳棒で穏やかにホモジナイズし、氷上で30分間インキュベートした。可溶性ライセート画分を20,000×g、10分間の遠心分離で清澄化した。

タンパク質濃度はBradford (Bio-Rad Cat. #5000006)で測定した。ウェルあたり20マイクログラムのタンパク質をSDS-PAGE (4-12%プレキャストゲル Invitrogen) にロードし、ニトロセルロース膜または100%メタノール活性化PVDF膜に転写した。適切な転写を確認するため、メンブレンをボンソー (EuroClone Cat.#EMR194500) で染色した。1x TBS-Tで数回洗浄してボンソーを除去した後、膜を1x TBS-T中5%牛乳で1時間ブロッキングし、1% BSA中4°Cで一晩一次抗体とインキュベートした。抗ヒトUBIAD1 (Santa Cruz Biotechnology) については、膜を5%BSAでブロックし、一次抗体と3時間RTでインキュベートした。インキュベーション後、すべての膜を3回洗浄した後、適切なホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギ免疫グロブリンGとインキュベートした。

(IgG) (Sigma Cat. #A6154, RRID: AB_258284)、HRP標識抗マウスIgG (Sigma Cat. #A4416, RRID: AB_258167)を用いた。バンドはChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad)を用いて可視化し、取得した。現像したフィルムのバンド強度をImage Labソフトウェア (Bio-Rad Laboratories; www.bio-rad.com)を用いて定量した。データはローディングコントロール (ACTINまたはVINCULIN)で正規化した。以下の一次抗体を用いた: 抗ヒトおよびマウスUBIAD1 (1:1000, Atlas Antibodies Cat. #HPA044862, RRID:AB_2679117)、抗ヒトVINCULIN (1:5000, Sigma Cat. #V9131, RRID:AB_477629)、抗ヒトおよびマウス β -ACTIN (1:5000, Sigma Cat. #A5316, RRID:AB_476743)、抗ヒトp-FAK (Tyr397) (1:1000, GeneTex Cat.#GTX129840, RRID:AB_2886103)、抗ヒトFAK (1:200, Santa Cruz Cat.#sc-558, RRID:AB_2300502)、抗ヒトAKT (pan) (1:1000, Cell Signaling Cat.#4691, RRID:AB_915783)、抗ヒトp-AKT1 (Ser473) (1:1000, Cell Signaling Cat.#9018, RRID:AB_2629283)、抗ヒトp-AKT2 (Ser474) (1:1000, Cell Signaling Cat. #8599, RRID:AB_2630347)、抗ヒトGSK-3 β (1:1000, Cell Signaling Cat.#9832, RRID:AB_10839406)、抗ヒトp-GSK-3 β (Ser9) (1:1000, Cell Signaling Cat. #9323, RRID:AB_2115201)、抗ヒトERK1/2 (1:1000, Santa Cruz Cat.#sc-514302, RRID:AB_2571739)、抗ヒトp-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (1:1000, Cell Signaling Cat. #9101, RRID:AB_331646)、抗ヒトFSP1/AMID (1:1000, Santa Cruz Cat. #sc-377120)、抗ヒトGPX4 (1:1000, Abcam Cat. #41787, RRID:AB_941790)、抗ヒトUBIAD1 (1:250, Santa Cruz BiotechnologyのCat.#sc-377013、クローンH8、Lot.#12313)、抗ヒトHMGCR (1:500, Santa Cruz Biotechnology Cat.#sc-271595、クローンC-1, RRID:AB_10650274)および抗ヒトER α (1:500, Santa Cruz Biotechnology Cat.#sc-542、クローンMC-20, RRID:AB_631470)。

ウェスタンブロット解析のために、ヒト細胞株およびマウス生体外細胞を80%コンフルエントに播種し、4時間接着させた。その後、ビヒクルまたは0.9 μ M ERASTIN、ヒト細胞では0.45 μ M RSL3、マウス生体外細胞では50nM RSL3で24時間処理した後、タンパク質サンプルの採取を行った。

侵襲アッセイ

細胞浸潤は、孔径 8.0 μ m の透明 PET メンブレン (Falcon 社製 Cat.#353097)を用いた 24 ウェルプレート用透過性支持体を用いて評価した。このメンブレンに、DMEM w/o FBSで1 mg/mlに希釈し

た氷冷 Growth Factor Reduced Matrigel (Corning Cat.#354230)を70 μ lコートし、37°Cで一晩インキュベートしてマトリゲルを固化させた。翌日、FBS無添加の培地200 μ lに2 \times 10⁵細胞を上側のチャンバーに加え、下側のチャンバーには10%FBS添加培地650 μ lを入れ、FBSの勾配を作った。Vehicle、NAC、CoQ₁₀、Y27632、ML7で処理する場合、化合物を指示濃度で上側チャンバーに添加した。細胞を5%CO₂の加湿雰囲気下、37°Cの恒温槽で24時間浸潤させた。その後、チャンバーを取り出し、PBSで2回洗浄した後、4% PFAで2分間 (RT)固定した。PBSでさらに2回洗浄した後、膜を20%メタノール中0.5%(w/v)クリスタルバイオレット染色液 (シグマ社製)で20分間、室温で染色した。最後に、余分な染色液をPBSで数回洗浄して除去し、浸潤していない細胞を綿棒で膜の上面から静かに取り除いた。イメージングを行う前に、メンブレンを風乾させた。浸潤細胞は、Nikon AZ100顕微鏡に接続したLeica DFC300 FXデジタルカメラ (ソフトウェアLeica Application Suite V4.13)で撮影し、ImageJソフトウェアでカウントした。

軟寒天アッセイ

12ウェルプレートに、1%低ゲル化温度アガロース (シグマ社製 Cat.#A9414)を含む600 μ lのフェノールレッドおよび血清不含 DMEM (Thermo Fisher Scientific社製 Cat.#11594416)をコートした。固化後、0.6%アガロースと4%FBSを含む400 μ lのフェノールレッドフリーDMEMに1 \times 10⁴ cells/wellを播種した。固化後、10%FBSを含むDMEM 1mlをアガロース層の上に加えた。培地は1週間に1回交換し、4週間後に培地を交換した。

0.5%(w/v)のCrystal Violet染色液(Sigma)を20%メタノールに溶かし、PBSで1:100に希釈した溶液で2時間RTした。染色液を除去し、アガロース層をPBSで2回洗浄した後、ライカMZ16F実体顕微鏡で撮影した。コロニーの数と面積はImageJソフトウェア (<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて算出した。

腫瘍球形成アッセイ

腫瘍球形成アッセイは既述の方法で行った。⁸⁸細胞をトリプシン処理し、200×gで5分間遠心した。上清を除去し、細胞を5mlの腫瘍球培地に再懸濁した: 100µg/mlペニシリン、100µg/mLストレプトマイシン、20ng/ml組換えヒト上皮成長因子(EGF; PeproTech Cat.#AF10015)、10ng/ml組換えヒト塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF; Sigma Cat.#F3685)、および1x B27サプリメント(Gibco Cat.#7504044)を含むDMEM/F12 GlutaMAX™培地(Thermo Fisher Scientific)。細胞懸濁液を40µmのセルストレーナーに通し、単細胞懸濁液を得た。細胞を数え、500µlの腫瘍球培地に2×10⁴ cells/wellを超低付着性24ウェルプレート(Coming Cat.#3473)に播種した。5日後、腫瘍球をLeica DMI4000顕微鏡で撮影し、ImageJソフトウェアでカウントした。100µm以上の腫瘍球のみを考慮した。

免疫蛍光

腫瘍の凍結切片(厚さ10µm)を4%PFAで10分間固定し、5%ヤギ血清(Merk Millipore Cat.#S26)、1%BSA、0.3Mグリシンを含むPBSで30分間ブロックした。その後、切片を抗マウスCD31(1:20、Dianova Cat.#DIA-310、RRID:AB_2631039)および抗マウスKi-67(1:100、Cell Signaling Cat.#9129-S、RRID:AB_2687446)一次抗体、およびAPC-Cy7抗マウスCD45(1:100、BD Biosciences Cat.#557659、RRID:AB_396774)抗体とともに4°Cで一晩インキュベートした。PBSで3回洗浄後、切片を対応するAlexa Fluor結合二次抗体(5µg/ml、Thermo Fisher Scientific)および核染色のための300 nM DAPI(Thermo Fisher Scientific)をマウントし、Leica SP8 DLS顕微鏡を用いて分析した。微小血管密度と平均血管面積を測定するために、腫瘍サンプルごとに無作為に選んだ4フィールドでCD31染色を評価した。Ki-67+細胞とCD45+細胞の定量は、腫瘍切片のすべての染色細胞を数え、その数を腫瘍切片の総面積で正規化することにより評価した。

培養細胞の免疫蛍光のために、細胞は24ウェルプレートに入れたガラスカバースリップ上か、15µ-Slide 8 well(Ibidi Cat.#80826)に播種した。ブリープとラメリポディアの解析のために、ヒト胎盤由来のラミニン(Sigma Cat.#L6274)を2.5µg/mlでコーティングし

た後に細胞を播種し、播種3時間後にサンプルを以下のように処理した。細胞はPBSで3回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで15分間RTで固定した。MDA染色のためにのみ、細胞は透過処理せず、以下のステップでも洗浄剤の使用を避けた。固定された細胞は、1×PBS中0.2%Triton X-100で10分間、室温で透過処理され、PBS中3%ヤギ血清+3%BSA+1.5mg/mlグリシンで1時間、室温でブロックされた。細胞を、PBS+3%BSAで希釈した抗ヒトMDA(1:100、Abcam Cat.#ab6463、RRID:AB_305484)、抗ヒトPaxillin(1:400、Transduction Laboratories Cat.#P13520)、抗ヒトFAK(1:50、Santa Cruz Cat.#sc-558、RRID:AB_2300502)と共に+4°Cで一晩インキュベートした。フィラメント状アクチン(F-アクチン)は、PBSで希釈したファロイジン(1:300、Sigma-Aldrich Cat.#F300)で3回洗浄した後、核染色用に0.2%BSA/PBSおよび300 nM DAPI(サーモフィッシャーサイエンティフィック)中、対応するAlexa Fluor結合二次抗体(0.75-2µg/ml、サーモフィッシャーサイエンティフィック)と共に室温で1時間インキュベートした。PBSでさらに3回洗浄した後、カバースリップをMowiol® 4-88(Sigma)でマウントし、Leica SP8 DLS顕微鏡を用いて可視化した。画像は

Leica LASXソフトウェアで処理し、ImageJソフトウェアで蛍光強度を測定した。PAXとファロイジン、またはFAKとファロイジンで染色した細胞のサンプルを用いて、突起のない細胞、ラメリポディアのみの細胞、またはブリープ構造を持つ細胞の割合を、各グループの細胞数を手作業でカウントすることにより算出した。細胞、細胞膜に沿って2つ以上のブリープ構造が見えた場合、ブリープがあるとみなした。

脂質過酸化測定

コレステリル BODIPY® 576/589 C11 (Thermo Fisher Scientific 社製 Cat.#C12680) を用いて、接着した生細胞の脂質過酸化を評価した。1.5×10⁴ 細胞/ウェルを、96ウェルBlack/Clear Flat Bottom TC処理イメージングマイクロプレート (Corning Cat.#353219) に標準培地で播種し、4時間接着させた。あるいは、5×10⁵ 細胞/ウェルを6ウェルプレートに播種し、一晚接着させた。その後、細胞を0.45 μM RSL3 (Sigma) または0.1% DMSO (NT) で12時間または24時間培養した後、培地を除去し、細胞を37°C、暗所で3 μM BODIPY® 576/589 C11およびHoechst 33342 (1:2000、Thermo Fisher Scientific Cat.#62249) と15分間インキュベートした。染色液を除去し、ウェルをPBSで穏やかに3回洗浄した。Hoechst Ex360/Em465、Oxidized BODIPY Ex485/Em535、およびReduced BODIPY Ex535/Em590フィルターを備えたInfi-nite 200 PROプレートリーダー (Tecan) を用いて蛍光シグナルを解析し、データをHoechst強度シグナルで正規化したOxidized/Reduced BODIPYで表した、または、(2) BD FACSCanto™ II Cell Analyzer (BD Biosciences社製) を用いたフローサイトメトリー解析により、Bodipy C11を染色していない非処理細胞をブランクとして用い、酸化型 (FITC-A) と還元型 (PE-A) のBodipy C11の比率を測定した (1サンプルあたり最低20,000イベントを取得)。

固定した細胞の脂質過酸化を評価するために、抗MDA抗体 (Abcam) を用いた免疫蛍光染色を、相対的なセクションで述べたように行った。脂質過酸化は、細胞を固定する前に2 μM ERATIN (Sigma) または0.1% DMSO (NT) で24時間処理することにより誘導した。

無添着状態での成長

6ウェルプレートを、FBS無添加の標準培地中、1mlの1%低ゲル化温度アガロース (シグマ社製、商品番号A9414) でコートし、アガロースを+4°Cで1時間固化させた。その後、2mlの完全増殖培地 () に1×10⁵ cells/wellをアガロース層の上に播種し、2-6日間懸濁増殖させた。細胞をTRIzol™ 試薬 (Thermo Fisher Scientific Cat.#15596018

) に再懸濁する前に、細胞懸濁液を回収し、+4°Cで300×g、5分間の遠心分離によって細胞をペレット化し、ペレットを冷PBSで3回洗浄した。その後、記述したようにRNA抽出を進めた。

原子間力顕微鏡 (AFM)

MDA-MB-231、MCF10A、MCF7、およびMDA-MB-468細胞を、35mmディッシュ (ファルコン社製、商品番号353001) の完全増殖培地に、翌日30~40%コンフルエントになるように播種した。分析の直前に、培地を3mLのPBSで置換した。倒立顕微鏡 (Nikon Eclipse Ti) を装備したXE Bio - AFM (Park Systems、韓国) を用いて、AFMによる圧痕測定を行った。

力-変位曲線は、公称バネ定数~0.2N/mのSi3N4カンチレバー (NanoSensors社製、Neuchatel, Switzerland) に取り付けられたPPP-CONTSCR-10ピラミッド型チップを用いて取得した。カンチレバーのバネ定数の値は使用前にメーカーから入手し、すべての計算に使用した。各試験の前に、AFM光検出器の感度 (光レバー感度) を、シリコン標準器上で取得した力-距離曲線の傾きを測定することによって計算した。実験はすべて室温で行った。

圧痕曲線は、細胞表面に5 μ m/sの速度で接近し、深さ0.5 μ mの圧痕を形成することで取得した。各セルについて、少なくとも2つの荷重曲線を収集した。

ヤング率は、ポアソン比を0.5と仮定し、各荷重-距離曲線にヘルツモデルのフィットを適用して算出した。

RNA-seq解析

lenti_SAM_v2_UBIAD1-gRNAまたはlenti_SAM_v2_scramble-gRNAで安定的に形質導入されたMDA-MB-231細胞を、翌日70%コンフルエントになるように完全培地に播種した。細胞をオートクレーブしたPBSで3回洗浄し、TRIzol™ 試薬 (Thermo Fisher Scientific Cat.#15596018) に懸濁した。1コンディションにつき4生物学的複製を集めた。全RNAはTRIzol™ 試薬の製造者の指示に従って抽出した。1 μ gの単離RNAに対して1 μ LのDNase I (Thermo Fisher Scientific, Cat.#18068015) を使用し、残存するゲノムDNAを消化した。DNase Iの不活性化後、RNA Clean & Concentrator-5 kit (Euroclone, Cat. #R1015)を用いてRNAサンプルを精製した。RNA濃度と純度は、NanoDrop分光光度計を用いてそれぞれA260とA280/260で測定し、完全性はTapestation System (AGI- LENT) で確認した。以下のRNA-seq解析には、RIN > 8のサンプルのみを使用した。ライブラリー調製のために、Qubit 4.0 fluorimetric Assay (Thermo Fisher Scientific) を用いて全RNAを定量した。ライブラリーは125 ngの全RNAからNEGEDIA Digital mRNA- seq research grade sequencing service (Next Generation Diagnostic srl) を用いて調製した。⁸⁹シングルエンド、100サイクル戦略 (Illumina Inc.) を用いたNovaSeq 6000シーケンスシステムでのライブラリー調製、品質評価、およびシーケンスを含む。

生データはNext Generation Diagnostic srl独自のNEGEDIA Digital mRNA-seqパイプライン (v2.0) により解析された。このパイプラインは、クオリティフィルタリングとトリミングによるクリーニングステップ、参照ゲノムへのアラインメント、遺伝子ごとのカウントを含む。^{90,91}生発現データは、Rosalind HyperScaleアーキテクチャ (OnRamp Bioinformatics社) によって正規化、解析、可視化された。⁹²(1.3 \geq fold-change \leq 1.3、p-Adj \leq 0.05の遺伝子のみを差次的発現とみなし、ヒートマップまたはボルケーノプロットとして表示した。

⁹⁰Scram-bleとUBIAD1の間で差次的に発現した遺伝子から出発し、ShinyGO 0.76.3 ([http:// bioinformatics.sdstate.edu/go/](http://bioinformatics.sdstate.edu/go/))を用いて、FDRカットオフ0.05、最小パスウェイサイズ2で、ジーンオントロジー (GO) とKEGGパスウェイの濃縮解析を行った。濃縮

度は、実験に関連するバックグラウンド遺伝子のセットとの相対値で計算した。

CoQsレベルのHPLC分析

細胞を標準培地に再懸濁し、100 mmシャーレに播種し、翌日70%のコンフルエントに達した。氷冷PBSで3回洗浄した後、細胞を掻き取り、250 μ lの氷冷PBSに再懸濁した。CoQ₁₀ またはCoQ₉ の定量を標準化するため、10 μ lの細胞/PBS懸濁液を タンパク質含量の定量用に取り置いた。残りのサンプルは直ちに液体窒素で凍結し、-80°Cで保存した。細胞からCoQを抽出するため、30 μ gのタンパク質を含むPBS中の細胞懸濁液100 μ lを、ヒトおよびマウス細胞の内部標準としてそれぞれ0.2 μ MのCoQ₉ (Sigma Cat. #27597) またはCoQ₆ (Avanti Cat. #900150 O) を含む氷冷抽出溶液 (エタノール/ヘキサン 1:2) 300 μ lに移し、続いてボルテックスした。CoQを含む上層のヘキサン層を遠心分離 (5分、13,200 \times g、+4°C) で分離し、質量分析用ガラスバイアルに加えた。この抽出操作を2回繰り返した。ヘキサンを窒素気流下で乾燥させ、乾燥したサンプルを100 μ lのメタノールに懸濁した。検量線は、CoQ₁₀ または CoQ₉ の原液を 2~1000 nMの範囲でメタノールに連続希釈して調製した。内部標準物質 (CoQ₉、CoQ₆) を0.2 μ Mの濃度で各校正標準物質に添加した。UHPLC-MS/MS分析は、ハイブリッド四重極-オービトラップ質量分析計 (Q Exactive、

Thermo Scientific) を、加熱エレクトロスプレーイオン源を介してUHPLCシステム (Ultimate 3000、Thermo Dionex) に結合した。Accucore C18 100×2.1 (粒子径2.6 μ) カラムを用い、水中10 mMギ酸アンモニウム (A相) とメタノール/2-プロパノール80:20中10 mMギ酸アンモニウム (B相) のグラジエント溶出を250 μl/分の流速で行い、目的分析物と内部標準物質のクロマトグラフィー分離を行った。サンプル注入量は4 μlであった。

検出と定量は、ポジティブエレクトロスプレーイオン化モードのフルMS/ddMS2モードで行った。質量分析計は、質量精度を5ppm以下に保つため、分析前に市販の校正用溶液を用いて校正した。CoQsは[M + H]⁺および[M + NH₄]⁺付加イオンとして検出された。CoQs濃度は、外部検量線によって内部標準に対する相対値を定量した。結果は、全タンパク質 mg に対して正規化した CoQ₁₀ または CoQ₉ の ng として表した。

脂質クラスの定量化

細胞を標準培地 (10% FBS) に再懸濁し、100 mmシャーレに播種し、翌日70%のコンフルエントに達した。氷冷PBSで3回洗浄した後、細胞を掻き取り、250 μlの氷冷PBSに再懸濁した。10μlの細胞/PBS懸濁液は、脂質クラスの定量を標準化するため、タンパク質含量を定量するために脇に置いた。残りのサンプルは直ちに液体窒素で凍結し、-80°Cで保存した。

トリアシルグリセロール (TG) にはトリノナノイルグリセロール (Sigma Cat.#92909) およびトリペンタデカノイルグリセロール (Sigma Cat.#T4217)、コレステリルエステル (CE) には5-α-コレスタン (Sigma Cat.#トリアシルグリセロール (TG) にはトリペンタデカノイルグリセロール (Sigma Cat.#T4217)、コレステリルエステル (CE) には5-α-コレスタン (Sigma Cat.#C8003)、遊離コレステロール (CO) には (3α, 5β)-コレスタン-3-オール (エピコプロスタノール) (Steraloids Inc.)

トリメチルシリル化剤、N, O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド(BSTFA)とトリメチルクロロシラン(Cat. #15238) およびHClメタノール(Cat. #90964)はMerk社から購入した。すべての有機溶媒は分析グレードのもので、Merk社から購入した。脂肪酸標準混合物(GLC 461)はNuchek Prep社から供給された(Cat. #GLC-461)。

クロロホルム-メタノール溶液を用いて、Folch法により試料100μlから脂質を抽出した。⁹³脂質抽出物は、以前に報告されたように、薄層クロマトグラフィーによってクラス分解された⁹⁴。

TG画分を2mlのHCl-メタノール(5%) で加水分解し、得られた遊離脂肪酸をトランスエステル化し、ヘキサンで抽出した。ヘキサ

ン含有脂肪酸メチルエステル(FAME)は、ガスクロマトグラフィー分析用に直接採取した。

簡単に言うと、COとCEを5mlのクロロホルム-メタノール2: 1でシリカから溶出した。溶媒を回収し、窒素気流下で蒸発乾固した。CEはサポニフィカチオンで加水分解され、遊離COはヘキサンで抽出された。最後に、COを含む乾燥残渣を50 μlのBSTFAで室温で30分間誘導体化し、得られた混合物1 μlをGC-MS分析用に注入した。

ステロールはガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) により定量した。使用した装置は、シングルイオンモニタリング (SIM) モードで Agilent 5973 イナート MS と結合した Agilent 6890 GC です。サンプルは 270 °C でスプリットレスモードで注入し、HP-5ms カラム (30 m × 0.25 mm 内径 × 0.25 μm フィルム厚; Agilent Technologies, Folsom, CA, USA) で分離しました。オープン温度は、最初200 °Cで1分間保持し、275 °Cまで10 °C/分で傾斜させ、277 °Cまで0.1 °C/分で上昇させ、最後に290 °Cまで10 °C/分で上昇させ、3分間保持した。ピークの同定は、保持時間を比較し、特徴的なイオンの高さ比を一致させることによって達成された。定量分析には内部標準法を用いた。

ガスクロマトグラフィー分析は、炎イオン化検出器を備えた Agilent 5890ガスクロマトグラフ (GC) で行った。

TGから得られたFAMEは、Omegawaxカラム（内径30 m × 0.25 mm × 膜厚0.25 μm; Supelco社製）を用い、注入量1 μlでオンカラムモードで分解した。オープン温度は以下のようにプログラムした：60 °Cで3分間、20 °C/分で205 °Cまで昇温し、15分間一定に保った。その後、0.4 °C/分で213 °Cまで昇温し、10分間保持した後、5.0 °C/分で240 °Cまで昇温し、8分間保持した。ピークは標準混合物（GLC 461, Nuchek Prep）に同定された。定量分析には内部標準法を用いた。結果はタンパク質1mgあたりのTG、CE、COのpgで表した。

定量化と統計分析

統計解析は、GraphPad Prism 8.0ソフトウェアおよびR（バージョン4.1）を用いて行った。図中の値は、特に断りのない限り±SEMを表す。サンプルサイズ（*n*）の正確な値は、図の凡例に記載されているか、図中の一点鎖線で表されている。3群以上は、一元配置分散分析（one-way ANOVA）とダネットの事後検定、またはシダックの多重比較検定を用いて分析した。二元配置分散分析（Two-way ANOVA）は、2つの変量でデータを比較するために用いた。2群の比較には両側検定なしのt検定を用いた。1標本のt検定は、値が対照に対する相対値で表され、対照が1.0または100と設定された場合に、群と仮想値との比較に使用された。多変量ハザード比（HR）は、年齢、pT（腫瘍径）、pN（所属リンパ節）、ER（エストロゲン受容体）、HER2（Erb-B2受容体チロシンキナーゼ2/HER2）、腫瘍の悪性度、診断時の患者年齢で調整した後、多変量Cox比例ハザード回帰を用いて95%信頼区間とともに算出した。分割表における統計的有意性の判定にはフィッシャーの正確検定を用いた。統計的有意性は、正確*p*値、調整*p*値、または有意でない場合はn.s.として報告される（*p*値または調整*p*値>0.05）。その他の統計的詳細については、図中の凡例を参照されたい。

図中の"独立実験"および"生物学的複製"という用語は、播種、処理、染色、および解析が、異なる細胞調製と作業溶液を用いて、独立に行われた実験を指す。

報告概要

研究デザインに関する詳しい情報は、この記事にリンクされているNature Portfolio Reporting Summaryに掲載されている。

データの可用性

本研究で作成された生データおよび処理済みRNAシーケンスデータは、GEOデータベースにアクセスコードGSE229792で寄託

されている。本研究で使用したMETABRICコホートのRNA発現および関連する臨床病理学的データは、アクセスID brca_metabricでcBioPortalに掲載されている [https://www.cbioportal.org/study/summary?id=brca_metabric]。RNAシーケンスデータのアライメントに使用したヒトGRCh38およびマウスGRCm39参照ゲノム（一次ゲノムアセンブリ）はGENCODEで入手可能。METABRIC (Molecular Taxonomy of Breast Cancer Consortium)データセット3から1904人の患者の一般に入手可能なRNA発現および関連する臨床病理学的データをcBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>)から検索した。すべてのデータは原稿、補足情報、またはSource data filesで入手できる。ソースデータは本論文に添付されている。

参考文献

1. モートン、R. A. ユビキノン。 *Nature* 182, 1764-1767 (1958).
2. ユビキノン（補酵素Q）の発見と機能概説。 *Mitochondrion* 7, S2-S7 (2007).
3. 老化とストレス応答における細胞膜補酵素Qの重要性。 *Mitochondrion* 7, S34-S40 (2007).

4. Agmo Hernández, V., Eriksson, E. K. & Edwards, K. Ubiquinone-10 alters mechanical properties and increases stability of phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Biomembr.* 1848, 2233-2243 (2015).
5. コビキノンの蓄積は大腸菌の浸透圧ストレス耐性を改善する。 *Nat. Chem. Biol.* 10, 266-272 (2014).
6. Thapa, M. & Dallmann, G. がん代謝における補酵素の役割。 *Semin Cell Dev.* 98, 44-53 (2020).
7. Martínez-Reyes, I. et al. Mitochondrial ubiquinol oxidation is necessary for tumour growth. *Nature* 585, 288-292 (2020).
8. Lee, S. Q. E., Tan, T. S., Kawamukai, M. & Chen, E. S. Cellular factories for coenzyme Q10 production. *Microb. Cell Fact.* 16, 39 (2017).
9. Coenzyme Q biochemistry and biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 48, 463-476 (2023).
10. Göbel, A., Riffel, R. M., Hofbauer, L. C. & Rachner, T. D. 乳癌生物学におけるメバロネート経路。 *Cancer Lett.* 542, 215761 (2022).
11. ジョージ, D. M., ラマドス, R., マッキー, H. R. & ピンセント, A. S. コエンザイムQ10生合成のためにカタールのマングローブの微生物マットから培養した紫色光合成細菌に内在するUbiAプレニル基転移酵素を増強するための比較計算研究。 *Biotechnol. Rep.* 36, e00775 (2022).
12. Wang, Y. & Hekimi, S. Molecular genetics of ubiquinone biosynthesis in animals. *Crit. Rev. Biochem. Biol.* 48, 69-88 (2013).
13. Li, W. Bioactive compounds into membranes: the UbiA superfamily of intramembrane aromatic prenyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* 41, 356-370 (2016).
14. フェロプトーシスのメカニズム、生物学、疾患における役割。 *Nat. Cell Biol. Cell Biol.* 266-282 (2021).
15. Lei, G., Zhuang, L. & Gan, B. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 22, 381-396 (2022).
16. Zheng, J. & Conrad, M. フェロプターシスの代謝的基盤。 *Cell Metab.* 32, 920-937 (2020).
17. Doll, S. et al. ACSL4は、細胞脂質組成を形成することにより、フェロプターシス感受性を決定する。 *Nat. Chem. Biol.* 13, 91-98 (2017).
18. Xiao, Y. et al. Comprehensive metabolomics expands precision medicine for triple-negative breast cancer. *Cell Res.* 32, 477-490 (2022).
19. トリプルネガティブ乳癌におけるフェロプターシスの不均一性が、革新的な免疫療法併用戦略を明らかにする。 *Cell Metab.* 35, 84-100.e108 (2023).
20. Bentinger, M.ら、補酵素Q合成の刺激。 *バイオファクター* 32, 99-111 (2008).
21. Byfield, F. J., Aranda-Espinoza, H., Romanenko, V. G., Rothblat, G. H. & Levitan, I. コレステロール欠乏は大動脈内皮細胞の膜剛性を増加させる。 *Biophys. J.* 87, 3336-3343 (2004).
22. Khatibzadeh, N., Gupta, S., Farrell, B., Brownell, W. E. & Anvari, B. 生細胞細胞膜のナノ力学的特性に対するコレステロールの効果。 *Soft Matter* 8, 8350-8360, (2012).
23. Lei, K. et al. コレステロール欠乏による癌細胞の硬化が養子T細胞免疫療法を強化する。 *Nat. Biomed. Eng.* 5, 1411-1425 (2021).
24. Vahabikashi, A. et al. 細胞内細胞骨格ネットワークの硬さに対する皮質プローブの感度。 *Biophys. J.* 116, 518-529 (2019).
25. Kanchanawong, P. & Calderwood, D. A. インテグリンを介した細胞-ECM接着の組織化、ダイナミクス、メカノレギュレーション。 *Nat. Cell Biol. Cell Biol.*
26. 乳癌におけるAKTアイソフォームの異なる機能: 包括的レビュー。 *Cell Commun. シグナル* 17, 154 (2019).

27. Romani, P. et al. 細胞外マトリックスのメカニカルキューは、Lipin-1とSREBPを介して脂質代謝を制御する。 *Nat. Cell Biol.* 338-347 (2019).
28. Wu, C. 局所接着：現在の細胞生物学と分子医学における焦点。 *Cell Adh Migr.* 1, 13-18 (2007).
29. Wang, X. et al. 腫瘍抑制因子 UBIAD1 の新規ゴルジ体保持シグナル RPWS。 *PLoS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072015> (2013).
30. Ubiad1は、CoQ10合成によってeNOS活性を制御する抗酸化酵素である。 *Cell* 152, 504-518 (2013).
31. Curtis, C. et al. 2,000個の乳腺腫瘍のゲノムおよびトランスクリプトーム構築から、新規サブグループが明らかになった。 *Nature* 486号、346-352 (2012).
32. 乳癌におけるセンチネルリンパ節生検とルーチン腋窩郭清の無作為比較。 *N. Engl. J. Med.* 349, 546-553 (2003).
33. Filippone, M. G.ら、CDK12は腫瘍形成を促進するが、乳癌における葉酸-炭素代謝を阻害する治療法に対する脆弱性を誘導する。 *Nat. Commun.* 13, 2642 (2022).
34. MMTV マウスモデルとヒト乳癌における MMTV 類似配列の診断価値。 *Expert Rev. Mol. Diagn.* 9, 423-440 (2009).
35. Fluck, M. M. & Schaffhausen, B. S. ポリオーマウイルス中間T抗原からのシグナル伝達と腫瘍形成の教訓。 *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 542-563 (2009).
36. Jonkers, J.ら、条件付き乳癌モデルマウスにおけるBRCA2とp53の相乗的癌抑制活性。 *Nat. Genet.* 29, 418-425 (2001).
37. Borowicz, S. et al. 軟寒天コロニー形成アッセイ。 *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/51998> (2014).
38. Paoli, P., Giannoni, E. & Chiarugi, P. Anoikis分子経路と癌進行におけるその役割。 *Biochim. Biophys. Acta.* 1833, 3481-3498 (2013).
39. Capaci, V. et al. 突然変異 p53 は、ゴルジ管瘤形成を誘導し、前転移性セクレタームを駆動する。 *Nat. Commun.* 11, 3945 (2020).
40. 循環腫瘍細胞と微小塞栓の遺伝子発現データベース。データベース(*Oxf.*) 2020, baaa020 (2020).
41. ラミニン511マトリックスはTAZによって制御され、乳がん幹細胞を維持する $\alpha 6\beta 1$ インテグリン のリガンドとして機能している。 *Genes Dev.* 29, 1-6 (2015).
42. Geraldo, L. H. M. et al. 健康および疾患におけるリゾホスファチジン酸とその受容体の役割：新規治療戦略。 *Signal Transduct. Target Ther.* 6, 45 (2021).
43. トリプルネガティブMDA-MB-231乳がん細胞において、オールトランスレチノイン酸は浸潤促進作用のあるSrc-YAP-インターロイキン6軸を活性化し、セリバスタチンはこの作用を逆転させる。 *Sci. Rep.* 8, 7047 (2018).
44. Song, L.ら、プロトオンコジーンSrcは、リピン-1を介した脂肪生成と乳癌の悪性化に関連している。 *Nat. Commun.* 11, 5842 (2020).
45. Weng, Y. S. et al. MCT-1/miR-34a/IL-6/IL-6Rシグナル軸は、トリプルネガティブ乳癌におけるEMT進行、癌幹細胞化、M2マクロファージ分極を促進する。 *Mol. Cancer* 18, 42 (2019).
46. NIK-IKK α モジュールは、p27/Kip1の核外輸送を刺激することで、ErbB2誘導腫瘍開始細胞を拡大する。 *Cancer Cell* 23, 647-659 (2013).
47. Shen, M. et al. Tinag1は、インテグリン/FAKとEGFRシグナルを同時に阻害することにより、トリプルネガティブ乳がんの進行と転移を抑制する。 *Cancer Cell* 35, 64-80.e67 (2019).
48. マスト細胞は、シスタチンCの分泌を介してERストレスを誘導することにより、大腸がんの発生を抑制する。
49. Englund, J. I. et al. ラミニン $\alpha 5$ は、管腔細胞の分化とWnt4を介した上皮のクロストークを通じて、乳腺のリモデリングを制御している。 *Development* 148, dev199281 (2021).

50. 乳癌の転移進行における腫瘍由来ラミニン-511の役割の証拠。
Am. J. Pathol. 170, 2135-2148 (2007).
51. Chang, C. et al. ラミニン511マトリックスは、TAZによって制御され、乳がん幹細胞を維持する $\alpha 6\beta 1$ インテグリンのリガンドとして機能する。*Genes Dev.* 29, 1-6 (2015).
52. Ghosh, I., Singh, R. K., Mishra, M., Kapoor, S. & Jana, S. S. ブリーピングとラメリポディアの切り替えは、その程度に依存する。非筋肉ミオシンII活性の。 *J. Cell Sci.* 134, jcs248732 (2021).
53. インテグリン機能の調節における脂質ラフトの関与。 *J. Cell Sci.* 115, 963-972 (2002).
54. Lietha, D. & Izard, T. インテグリンを介した細胞接着における膜ドメインの役割。 *Int J. Mol. Science.* 21, 5531 (2020).
55. Baumgart, T. et al. 巨大細胞膜小胞におけるプロテイン and lipids の大規模な流体 / 流体相分離。 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 3165-3170 (2007).
56. Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S. & Eggeling, C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Cell Biol. Cell Biol.* 18, 361-374 (2017).
57. Brown, C. W., Amante, J. J., Goel, H. L. & Mercurio, A. M. $\alpha 6\beta 4$ インテグリンはフェロプトーシスに対する抵抗性を促進する。 *J. Cell Biol.* 4287-4297 (2017).
58. Doll, S. et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature* 575, 693-698 (2019).
59. Santoro, M. M. 非ミトコンドリア型CoQ10の抗酸化的作用: 謎が解けた! *Cell Metab.* 31, 13-15 (2020).
60. Bersuker, K. et al. CoQ酸化還元酵素FSP1は、GPX4と並行してフェロプトーシスを阻害する。 *Nature* 575, 688-692 (2019).
61. Ya, F. et al. コエンザイムQ10は血小板インテグリンを抑制する。 ApoE欠損マウスにおける $\alpha 11b\beta 3$ シグナル伝達と血小板過反応。 *Food Funct.* 11, 139-152 (2020).
62. Ehmsen, S. et al. コレステロール生合成の増加は、患者の転帰に影響する乳がん幹細胞の重要な特徴である。 *Cell Rep.* 27, 3927-3938.e3926 (2019).
63. Li, Y. C., Park, M. J., Ye, S. K., Kim, C. W. & Kim, Y. N. がん細胞におけるコレステロールリッチな脂質ラフトレベルの上昇は、コレステロール除去剤によって誘導されるアポトーシス感受性 () と相関している。 *Am. J. Pathol.* 168, 1107-1118 (2006).
64. Badana, A. et al. 脂質ラフトの完全性はトリプル陰性乳がん細胞の生存に必要である。 *J. Breast Cancer* 19, 372-384 (2016).
65. 人工膜におけるコエンザイムQ10の局在性に関するESRおよび単分子膜研究。 *Gen. Physiol. Biophys.* 24, 449-460 (2005).
66. CoQ10の選択的混和性と横方向の充填密度が低い脂質単分子膜への浸透。 *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Biomembr.* 1859, 1173-1179 (2017).
67. Clarke, C. F., Rowat, A. C. & Gober, J. W. CoQは膜のビライザーか? *Nat. Chem. Biol.* 10, 242-243 (2014).
68. Jolliet, P. et al. 乳房癌における血漿コエンザイム Q10 濃度: 予後と治療上の影響。 *Int. J. Clin. Pharm. Ther.* 36, 506-509 (1998).
69. 乳がん患者の組織におけるコエンザイムQ10濃度と抗酸化物質の状態。 *Clin. Biochem.* 33, 279-284 (2000).
70. コエンザイムQ10の生合成とDNAの4塩基、癌の分子的原因と治療法の根拠としての関連性。 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 358-361 (1996).
71. Folkers, K., Osterborg, A., Nylander, M., Morita, M. & Mellstedt, H. 動物モデルにおけるビタミンQ10の活性と癌患者における深刻な欠乏症。 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 296-299 (1997).

72. Rusciani, L. et al. 血漿中コエンザイム Q10 低値は黒色腫進行の予後因子として不変である。 *J. Am. J. Am. Acad. Dermatol.* 54, 234-241 (2006).
73. Ubellacker, J. M. et al. リンパは転移するメラノーマ細胞をフェロプトーシスから守る。 *Nature* 585, 113-118 (2020).
74. Hassannia, B., Vandenabeele, P. & Berghe, T. V. Targeting ferroptosis to iron out cancer. *Cancer Cell* 35, 830-849 (2019).
75. Juarez, D. & Fruman, D. A. がんにおけるメバロン酸経路の標的化。 *Trends Cancer* 7, 525-540 (2021).
76. ゲノムワイドなCRISPR-Cas9ノックアウト・スクリーニングにより、ワルファリン耐性ビタミンK還元酵素としてFSP1が同定された。 *Nat. Commun.* 14, 828 (2023).
77. Quaglini, E., Mastini, C., Forni, G. & Cavallo, F. ErbB2トランスジェニックマウス: 乳がんの免疫学的予防と治療の研究ツール。 *Curr. Protoc. Immunol.* 82, 20.29.21-20.29.10 (2008).
78. Hafner, M. et al. ケラチン14Creトランスジェニックマウスはケラチンを証明する14を卵子発現タンパク質として発現させた。 *Genesis* 38, 176-181 (2004).
79. Saxena, M., Kalathur, R. K. R., Neutzner, M. & Christofori, G. PyMT-1099, a versatile murine cell model for EMT in breast cancer. *Sci. Rep.* 8, 12123 (2018).
80. Pece, S. et al. がん幹細胞の生物学的性質を調べ、乳がんの転移を事前に予測する多遺伝子アッセイの同定と臨床的検証: 後方視的連続研究。 *EBioMedicine* 42, 352-362 (2019).
81. Porcù, E. et al. BMP9は膠芽腫の腫瘍形成能と血管新生能に対抗する。 *Cell Death Differ.* 25, 1808-1822 (2018).
82. Campbell, J. P., Merkel, A. R., Masood-Campbell, S. K., Eleferiou, F. & Sterling, J. A. 骨転移のモデル。 *J. Vis.* <https://doi.org/10.3791/4260> (2012).
83. Tolg, C., Cowman, M. & Turley, E. A. マウス乳腺ホルマウントの調製と解析。 *Bio Protoc.* 8, e2915 (2018).
84. Wiel, C. et al. 抗酸化物質によるBACH1の安定化は肺がん転移を刺激する。 *Cell* 178, 330-345.e322 (2019).
85. 同調的双方向性プロモーターを持つレンチウイルスベクターによる二重遺伝子導入の協調。 *Nat. Biotechnol.* 23, 108-116 (2005).
86. Saoncella, S. et al. 核内Akt2は、FOXO-mTORC1シグナル伝達経路を抑制することにより、辺縁角化細胞幹細胞の自己複製に対抗する。 *Stem Cells* 32, 754-769 (2014).
87. Zhao, W. et al. 候補となる抗転移薬は、膜流動性を低下させることで乳がん細胞の準静的能力を抑制する。 *Cancer Res.* 76, 2037-2049 (2016).
88. Lombardo, Y., de Giorgio, A., Coombes, C. R., Stebbing, J. & Cas-tellano, L. ヒト乳癌組織および細胞株からのマンモスフィア形成アッセイ。 *J. Vis. Exp.* 97, e52671 (2015).
89. Xiong, Y. et al. ランダムプライミングライブラリーと3'-ダイレクトライブラリーを用いたmRNAシーケンスの比較。 *Sci. Rep.* 7, 14626 (2017).
90. Dobin, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15-21 (2013).
91. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq-a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166-169 (2015).
92. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. DESeq2によるRNA-seqデータのフォールドチェンジと分散のモデル推定。 *Genome Biol.* 15, 550 (2014).
93. 動物組織からの総脂質の単離と精製のための簡便な方法。 *J. Biol. Chem.* 226, 497-509 (1957).
94. Correani, A.ら、ヒトにおける分娩時の遊離およびエステル化フィステロールの母体-胎児勾配。 *Clin. Nutr.* 37, 2107-2112 (2018).

謝辞

Raj Sewduth博士にはUBIAD1 KOマウスの抗酸化レスキュー実験を、Chiara Gorrini博士には乳房摘出実験とマウスモデルについて助言を、Marianna Spizzotin博士にはマウスの取り扱いについて、Prof. NeuTマウスのFederica Cavallo, Pier Paolo Di Fiore教授、Giovanna Jodice博士、Francesca Montani博士、Francesca Sanguedolce教授（European Institute of Oncology (IEO)のMolecular and Digital Pathology Unit）。Dr. M. TakahashiとDr. Peter Lambrechtには、ShiroQTMカネカコビキノール水溶性粉末とプラセボ溶液を提供していただいた。Enzo Calautti教授よりAkt2コンストラクトの提供を受けた。MMSの研究室は、欧州研究会議（ERC）助成金（ERC-CoG 647057およびERC-PoC 963865）およびAIRC（Associazione Italiana Ricerca sul Cancro）IG助成金20119、テレソン助成金GGP20003の支援を受けている。AIRC MultiUnit -5×1000 MCO 10.000、IG 11904、IG 23049、イタリア大学・科学研究省（MIUR）-PRIN 20177E9EPY_002およびMIUR-PRIN 202032AZT3_004、イタリア保健省-リチェルカ・コレンテおよびウンベルト・ヴェロネージ財団（FUV）、PSR-ミラノ大学支援。
S.P. 編集を担当したエレン・ジェーン・コーコランに感謝する。

著者寄稿

M.M.S.とG.T.は本研究の計画と実行を管理した。G.T.、A.P.、G.Z.はin vivoマウス実験の実施と解析を行った。
A.R.はNGSマウス実験の監督を行った。G.T.とA.P.はAFMと細胞培養実験の実施と解析を行った。E.T.と
M.M.S.はUBIAD1ノックアウトマウスを作製した。M.S.とP.C.は質量分析を行った。M.G.とN.E.はAFM解析を行い、監督した。S.P.、D.T.、F.T.はヒト乳がんサンプルにおけるUBIAD1の発現解析を行った。G.T.、A.P.、P.L.は細胞培養実験解析を行った。原稿はG.T.とM.M.S.が執筆した。MMSは本研究と実験デザインを考案し、監督を行った。著者全員が最終原稿に同意した。

競合する利益

著者らは競合する利害関係はないと宣言している。

追加情報

補足情報 オンライン版には

<https://doi.org/10.1038/s41467-024-52523-y>。

通信、資料請求はマッシモ・M・サントロまで。

査読情報 *Nature Communications*誌は、Luis Carlos Lopez氏、Ghassan Mouneimne氏、およびその他の匿名査読者に感謝する。査読ファイルはこちら。

<http://www.nature.com/reprints>。

発行者注：シュプリングer・ネイチャーは、出版された地図や所属機関に関する法的主張については中立を保っています。

オープンアクセス この記事はクリエイティブ・コモンズ表示-非営利-改変禁止4.0国際ライセンスの下でライセンスされています。このライセンスは、あなたが原著者および出典に適切なクレジットを与え、クリエイティブ・コモンズ・ライセンスへのリンクを提供し、ライセンスされた素材を改変したかどうかを示す限り、いかなる媒体または形式においても、非営利目的での使用、共有、配布、複製を許可するものです。本ライセンスの下では、本記事またはその一部から派生した翻案物を共有する許可はありません。この記事に掲載されている画像やその他の第三者の素材は、その素材へのクレジット表示で別段の指示がない限り、記事のクリエイティブ・コモンズ・ライセンスに含まれています。この記事のクリエイティブ・コモンズ・ライセンスに含まれていない素材で、あなたの意図する利用が法的規制により許可されていない場合、または許可された利用を超える場合は、著作権者から直接許可を得る必要があります。このライセンスのコピーを見るには、<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>をご覧ください。

©著者（複数可）2024