

令和元年9月12日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08636

研究課題名(和文)糖鎖シグナルを介した発癌防御機構の解明

研究課題名(英文)The role of O-glycan in tumor suppression

研究代表者

山越 貴水 (YAMAKOSHI, Kimi)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・老化機構研究部・室長

研究者番号：50423398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：O-グリカンのコア2糖鎖合成に関わるbeta1,6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ3(GCNT3)糖転移酵素のがん化における機能とその発現制御について調べた。GCNT3の発現は、ポリコーム複合体1(PRC1)の構成因子の一つであるBmi1により発現抑制されており、コア2糖鎖を介して異常細胞の増殖能や浸潤能を抑制する機能をもつことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行により、がんとコア2糖鎖の関係の詳細を分子メカニズムから解明した。本研究の成果は、がん糖鎖の関係について新たな知見を提供し、がん化のメカニズムについての理解を促進すると考えられる。また、本成果は、がんの予防や治療に応用できる可能性があり、人類の福祉に大きく貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Bmi-1, a core component of the polycomb repressive complex 1 (PRC1), is dysregulated in various types of cancer, and its upregulation strongly correlates with invasive phenotype and poor prognosis in patients with certain types of carcinoma. In addition, changes in glycosylation of cell-surface glycoconjugates are also known to be associated with tumor malignancy. However, the relationship between Bmi-1 and altered glycosylation as to invasiveness has not been elucidated. In this study, we found that the expression of the GCNT3 gene, which encodes mucin-type core 2 1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase enzyme was suppressed by Bmi-1. In addition, we demonstrated that GCNT3 has a function to suppress the proliferation and invasive behavior of abnormal cells through core 2 O-glycans.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：がん 糖鎖

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖鎖は、蛋白質や脂質に結合することでそれらが持つ機能を高め、様々な生命現象が円滑に営まれるように働く。しかし、がん化した細胞の膜表面に存在する糖鎖の構造は正常細胞の糖鎖構造と大きく異なることが古くから知られており、糖鎖構造の変化は細胞の接着性や免疫監視機構からの回避に関与することから、がん化の重要な原因となっている。特に、コア蛋白質のセリン・スレオニン残基が修飾される O-結合型糖鎖は、がん化に伴い構造が大きく変化することが明らかになっている。

(2) 近年の研究から、発がんや老化といった高次生命現象にエピジェネティックな遺伝子発現の制御が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。特に、ポリコーム複合体 1 (PRC1) の構成因子の一つとして知られる Bmi1 は、がん細胞において発現が著しく高く、がん抑制遺伝子のサイレンシングにも深く関わっている。最近、私達は Bmi1 がコア 2 型糖鎖構造をつくる糖転移酵素のコア 2 beta1,6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ 3 (GCNT3) 遺伝子の発現を抑制していることを見出した。コア 2 型糖鎖は、直鎖状の糖鎖骨格構造であるコア 1 に対し、N-アセチルガラクトサミンを起点とした枝分かれ構造をもつ。

### 2. 研究の目的

上皮細胞の膜表面に発現している糖蛋白質は、がん化により、その糖鎖構造が大きく変化し、がんの進展に深く関与することが知られている。しかし、コア蛋白質のセリン・スレオニン残基が修飾される O-結合型糖鎖、特に、高密度に大量の糖鎖が結合し巨大分子を形成するムチン等については、その取扱いの難しさから、糖鎖プロファイルのがん性変化についての研究は殆ど進んでいない。そこで、本研究では、最近私達が新たに見出した「ポリコーム複合体 1 (PRC1) の構成因子 Bmi1 による糖転移酵素遺伝子 GCNT3 のエピジェネティックな発現抑制機構」がヒト細胞においても働いており、糖転移酵素遺伝子 GCNT3 が糖鎖シグナルを介して、がん抑制機構として働く可能性を検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) RNAi を用いた Bmi1 または GCNT3 低下の誘導および GCNT3 過剰発現

Bmi1 または GCNT3 レベルの減少は、pLKO.1-puro Bmi1-shRNA (Sigma, Mission shRNA, TRCN000020158) または pLKO.1-puro GCNT3-shRNA (Sigma, Mission shRNA, TRCN0000279668) を用いて各々レンチウイルスを作製し、細胞に感染させた。感染後、各細胞に最適な濃度の puromycin で各 shRNA が導入された細胞を選択し、その後の実験に用いた。GCNT3 過剰発現は、GCNT3 が発現するように pMaRX puro ベクターに GCNT3 遺伝子を組み込み、用いてレトロウイルスを作製し、細胞に感染させた。感染後、puromycin で shRNA が導入された細胞を選択し、その後の実験に用いた。

#### (2) クロマチン免疫沈降 (ChIP)

細胞を回収した後、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific Inc., 78833) を利用して、核を単離した。その後、truChIP Chromatin Shearing Reagent Kit (Covaris Inc., 520154) と Covaris M220 を用いて、核の固定とクロマチンの剪断を行った。クロマチン剪断後、10,000 x g で 4、15 分間遠心し、不溶物を除去した。上清分画に免疫沈降用抗体を添加し、ローテーターにて攪拌しながら 4 で一晩インキュベーションした。また、この時、免疫沈降反応量の 1% をインプットとして採取した。Protein G を添加し、ローテーターにて攪拌しながら、4 で 1 時間インキュベーションし、96 穴マグネットプレートにより Protein G をペレット化し上清分画を除去した。冷却緩衝液にビーズを再懸濁し、ローテーターにて攪拌しながら 5 分間インキュベーション後、96 穴マグネットプレートにより上清分画を除去することにより洗浄した。溶出バッファーを加えてタンパク質/DNA 複合体を溶出後、タンパク質/DNA 複合体の架橋を切断することにより DNA を遊離した。遊離した DNA は MinElute PCR purification Kit (QIAGEN, 28004) により精製した。

#### (3) コア 2 糖鎖の分析

101Bio. Plasma membrane protein extraction kit を用いて、細胞ペレットから細胞膜画分 (M) と細胞質画分 (C) を抽出した。抽出したタンパク質を全量、還元 脱離反応により糖鎖を遊離した。遊離した糖鎖を完全メチル化し、MALDI-QIT-TOF MS にて測定した。

#### (4) GCNT3 レポーターアッセイ

GCNT3 遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーターコンストラクトを作製した。作製したレポータープラスミドと Bmi1 shRNA ベクターを同時に導入し、導入

後 72 時間のルシフェラーゼ活性を測定した。

#### (5)ヌードマウスへの皮下移植

ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞株 A549 を使用した異種移植片モデルを用いた。方法(1)により、GCNT3 レベルが減少した細胞とコントロール細胞をヌードマウスの皮下へ移植し、腫瘍のサイズを継時的に計測することにより移植細胞の腫瘍形成能力を判定した。

#### (6)がん細胞の増殖能、浸潤能

*In vitro*における HCT116 の細胞増殖能は、直径 6 cm の培養容器に  $2.5 \times 10^4$  細胞数の密度で細胞を播種し、各培養時間の生細胞数をカウントした。A549 の細胞浸潤能は、BioCoat マトリゲルインベーションチャンバー (CORNING, 354480) およびコントロールインサート (CORNING, 354578) へ細胞懸濁液を入れて一定時間インキュベーションを行い、膜を通過した細胞を測量した。

## 4 . 研究成果

### (1) Bmi1 レベルの低下は様々ながん細胞株において GCNT3 発現の増加を引き起こす

ヒトのがん細胞では、Bmi1 が GCNT3 の発現を抑制している可能性を検討するため、様々なヒトがん細胞株において RNAi により Bmi1 レベルを減少させた。その結果、OECM-1 (ヒト頭頸部がん細胞), HCT116 (ヒト結腸直腸がん細胞), A549 (ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞), FaDu (ヒト頭頸部がん細胞) において、Bmi1 レベルの低下により GCNT3 発現が上昇した。このことから、これらのがん細胞では、Bmi1 が GCNT3 の発現を抑制していることが示唆された。

### (2)ヒト細胞において Bmi1 は GCNT3 遺伝子座に結合している

Bmi1 が GCNT3 の発現を抑制する分子メカニズムを調べるため、Bmi1 を十分発現している TIG3 (コントロール) と Bmi1 レベルを低下させた TIG3 を準備し、GCNT3 遺伝子領域に対する Bmi1 の結合能をクロマチン免疫沈降 (ChIP) により調べた。その結果、コントロール細胞に対し、Bmi1 レベルの低い TIG3 では GCNT3 遺伝子領域に結合する Bmi1 量が減少した。また、FaDu 細胞を用いて GCNT3 遺伝子のレポーターアッセイを行ったところ、Bmi1 レベルの低下により、GCNT3 プロモーター活性が 1.7 倍上昇した。これらのことから、Bmi1 は GCNT3 遺伝子座に直接結合することにより GCNT3 の発現を抑制することが分かった。

### (3)GCNT3 レベルの減少は、がん細胞の増殖能・浸潤能を高める

ヒトがん細胞におけるコア 2 糖鎖の役割を調べるため、GCNT3 レベルが非常に高い A549 細胞を用い GCNT3 レベルを低下させた。A549 は GCNT3 以外のコア 2 合成酵素である GCNT1 と GCNT4 の発現レベルはそれ程高くない。このことと一致して、GCNT3 レベルを低下させるとコア 2 糖鎖の形成不全が生じた。コア 2 糖鎖形成が低下した細胞をヌードマウスの皮下へ移植すると腫瘍形成能が著しく亢進した。また、コア 2 糖鎖の形成不全は細胞の浸潤能を高めた。これらの結果から、A549 において、コア 2 糖鎖は腫瘍の増殖、異常細胞の浸潤能を抑制する機能をもつと考えられる。

### (4)GCNT3 の高発現は、がん細胞の増殖能を低下させる

ヒトがん細胞におけるコア 2 糖鎖の役割を調べるため、GCNT3 レベルが低い HCT116 細胞を用い GCNT3 を高発現させた。HCT116 は GCNT3 以外のコア 2 合成酵素である GCNT1 と GCNT4 の発現レベルは非常に低い。GCNT3 を高発現した HCT116 は、細胞サイズの肥大化を伴う細胞形態の変化が観察され、*in vitro* での増殖能が低下した。これらのことは、HCT116 において、コア 2 糖鎖が細胞の増殖を抑制する機能をもつことを示唆した。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Iida, M., Matsuno, YK., Watanabe, A., Maruyama, M., Kameyama, A., Yamakoshi, K.

A sialo-oligosaccharide-rich mucin-like molecule specifically detected in the submandibular glands of aged mice. Archives of Oral Biology, 12(97), 52-58, 2019.

doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.10.011. 査読有

Kameyama, A., Yamakoshi, K., Watanabe, A.

A rapid separation and characterization of mucins from mouse submandibular glands by supported molecular matrix electrophoresis. Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics, 1867(1), 76-81, 2019. 査読有

pii: S1570-9639(18)30073-6. doi: 10.1016/j.bbapap.2018.05.006.

Takahashi, D., Suzuki, H., Kakei, Y., Yamakoshi, K., Minami, Y., Komori, T., Nishita, M.

Expression of Ror2 Associated with Fibrosis of the Submandibular Gland. Cell Structure and

Function, 42(2), 159-167, 2017.

doi: 10.1247/csf.17019. 査読有

山越 貴水、糖鎖制御異常を介したポリコーン蛋白質のがん促進機構、日本基礎老化学会会誌, Vol.41, No.3, 37-40, 2017. 査読有

山越 貴水、細胞老化と慢性炎症、日本老年医学会雑誌, Vol.53, No.2, 88-94, 2016.

[学会発表](計 6件)

山越 貴水、亀山 昭彦、西島 里咲、飯田 万由、丸山 光生. ポリコーンタンパク質 Bmi1 による顎下腺ムチン糖鎖構造の制御. 第 42 回日本基礎老化学会大会, 2019.

山越 貴水. ポリコーン蛋白質 Bmi1 による顎下腺ムチン糖鎖構造の制御. 第 13 回日本エピジェネティクス研究会, 2019.

Yamakoshi K, Iida M, Nishijima R, Kameyama A, Maruyama M. Bmi-1 controls cancer cell motility and invasion through the glycosyltransferase C2GnT2. International Cell Senescence Association, 2018.

Iida M, Matsuno Y, Watanabe A, Maruyama M, Kameyama A, Yamakoshi K. A sialo-oligosaccharides rich mucin-like molecule is specifically detected in the submandibular glands of aged mice. 第 41 回日本基礎老化学会大会, 2018.

Yamakoshi K, Iida M, Kimura H, Kameyama A, Maruyama M. Bmi-1 controls cancer cell motility and invasion through the glycosyltransferase C2GnT2. Gordon Research Conferences (Aging), 2017.

Yamakoshi K, Iida M, Kimura H, Kameyama A, Maruyama M. Bmi-1 controls cancer cell motility and invasion through the glycosyltransferase C2GnT2. 第 40 回日本基礎老化学会大会, 2017.

Yamakoshi K, Iida M, Kimura H, Kameyama A, Maruyama M. Bmi-1 controls cancer cell motility and invasion through the glycosyltransferase C2GnT2. Keystone Symposia, 2017.

## 6 . 研究組織

(1)研究協力者

亀山 昭彦 (KAMEYAMA, Akihiko)