

機関番号：12605

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580369

研究課題名 (和文) 酸化ストレスによる細胞膜糖脂質修飾を介した
癌細胞増殖・浸潤制御の機構解析研究課題名 (英文) Regulatory mechanisms for the proliferation and invasion under
oxidative stress via modulation of membranous glycolipids.

研究代表者

三浦 豊 (MIURA YUTAKA)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：10219595

研究成果の概要 (和文)：酸化ストレス下で観察される癌細胞の増殖および浸潤能の変化に細胞膜脂質の質的、量的変化がどのように関与しているかを明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、低酸素条件下で観察されるマウスメラノーマ細胞の浸潤能亢進に細胞膜中 ganglioside GM3 含量の増加とそれによる細胞接着因子関連タンパク質複合体の変化が関与していることが明らかとなった。この成果により癌細胞の悪性化機構の一端が明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：The regulatory mechanisms for the protentiation of mouse melanoma cell invasion under hypoxic condition were investigated. The increase in membranous ganglioside GM3 contents and the modulation of proteins-glycolipids complex in cell membrane were proved to be deeply involved in this phenomenon. This result indicates novel mechanisms for cancer aggravation under hypoxia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,900,000	570,000	2,470,000
21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
22年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：境界農学・細胞分子生物学

キーワード：癌細胞浸潤、酸化ストレス、細胞膜糖脂質、ganglioside

1. 研究開始当初の背景

癌細胞が生体内で増殖し、固型癌を形成する際には血管新生が間に合わず、また形成された血管も細くて脆弱なものである場合が多い。そのため固型癌内部はしばしば低酸素状態に陥ることが多い。低酸素状態に陥った癌細胞内では酸化ストレスが高まっていることが知られている。癌細胞はその高い増殖能ゆえに正常細胞よりも多くの活性酸素種が細胞内で発生していることも報告されており、上記と併せて考えると癌細胞は常に酸化ストレスにさらされていると予想される

ことから、癌細胞の悪性化に酸化ストレスが関与していると指摘する説もある。本研究を開始する以前に研究代表者は、活性酸素存在下でラット肝癌細胞の浸潤能が亢進することを見出し報告していた。また癌細胞の細胞膜糖脂質含量を変化させることで癌細胞増殖能が変化することも見出し、報告していた。さらに活性酸素種の処理により細胞膜タンパク質の糖鎖構造が変化し、細胞機能の修飾が誘導されるという報告が他のグループから行われていた。そこで本研究では酸化ストレス下に置かれた癌細胞において細胞膜中

の糖脂質に質的または量的な変化が誘導され、それが契機となって癌細胞の増殖能または浸潤能に変化が起きるのではないかという仮説を立て、その検証を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究は酸化ストレスにより癌細胞膜糖脂質にどのような変化が起きるか、またその変化が癌細胞の機能にどのような影響を及ぼすかを明らかにし、さらにその機構を解析することを目的とした。具体的には、酸化ストレスとして癌細胞を低酸素条件下で培養し、その際の癌細胞増殖能および浸潤能を測定し、それらの変化に細胞膜中の糖脂質の質的、量的変化がどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用した癌細胞と培養条件

本研究ではモデル癌細胞としてマウスメラノーマ細胞 B16F10 細胞を用いた。B16F10 はマウスメラノーマ細胞 B16 より樹立された高転移性の亜株であり、転移研究でしばしば使用される細胞である。B16F10 は ATCC より購入し、10%の牛胎児血清を添加した RPMI 1640 培地で維持培養を行った。

1%O₂ 条件下で 96 時間培養した癌細胞を低酸素培養群とした。

(2) 癌細胞増殖能・接着能・浸潤能測定法

通常酸素条件 (Normoxia) および低酸素条件 (Hypoxia) であらかじめ 96 時間培養した癌細胞を用いて、増殖能・接着能・浸潤能を比較した。癌細胞の増殖能の測定は WST-8 法を用いて行った。各種マトリックスタンパク質をあらかじめコートした細胞培養プレートに前培養した癌細胞を播種し、2 時間後に接着した癌細胞数を位相差顕微鏡下でカウントすることで接着能を測定した。運動能はコンフルエント状態の癌細胞を前培養した後、チップを用いて細胞層に傷をつけ、無血清条件下で経時的に傷の修復速度を測定することで算出した。浸潤能に関しては腸管膜由来中皮細胞との共培養系を用いて測定した。

(3) 細胞膜糖脂質分析

前培養した細胞を回収後、ヘキサソール・イソプロパノールにより総脂質を抽出し、減圧乾固後、Folch 抽出を行い、糖脂質画分を分離した。抽出した糖脂質の分析は HPTLC および immuno TLC により行った。

(4) 細胞膜脂質およびタンパク質分析

前培養した癌細胞を溶解後、総タンパク質中の各種接着因子および関連タンパク質量を Western Blot 法により測定した。細胞膜

マイクロドメインはショ糖密度勾配超遠心法により分離し、各画分におけるタンパク質の存在量は Western Blot 法により測定した。

また免疫細胞染色を行い、GM3、CD9、インテグリンの細胞膜上での局在を蛍光顕微鏡により観察した。

細胞膜上の GM3 および CD9 含量の変化は Flow cytometer により測定した。

4. 研究成果

(1) 低酸素培養により浸潤能が亢進する

Normoxia 培養群と Hypoxia 培養群の増殖能と浸潤能を測定した結果、図 1 に示すように両者ともに Hypoxia 群で低下していたが、その低下の度合いは増殖能に比べて浸潤能で小さく、低酸素条件下で培養することで相対的に浸潤能が上昇していることが明らかとなった。

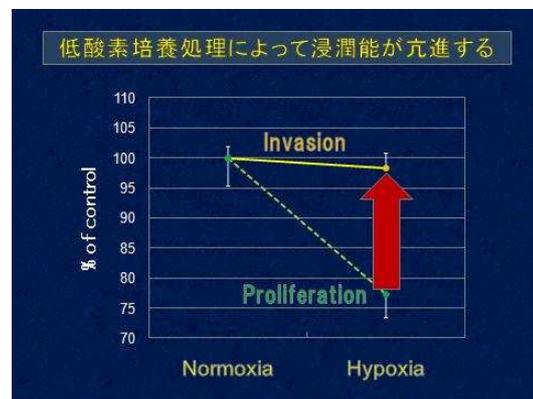


図 1 増殖能・浸潤能への Hypoxia の影響

(2) Hypoxia により接着能、運動能が変化する

Hypoxia 群での浸潤能亢進の機構を明らかにするため、接着能および運動能の変化を解析した。図 2 に示すように Hypoxia 群ではフィブロネクチンへの接着は増加するが、プラスチックディッシュおよびコラーゲンへの接着能が低下していた。

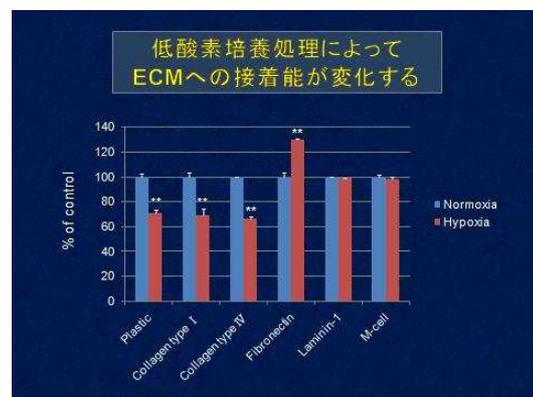


図 2 各種タンパク質への接着能の変化

さらに運動能の変化を傷つけアッセイにより測定したところ、Hypoxia 群では細胞運

動能が有意に亢進していることが明らかとなった (図 3)。

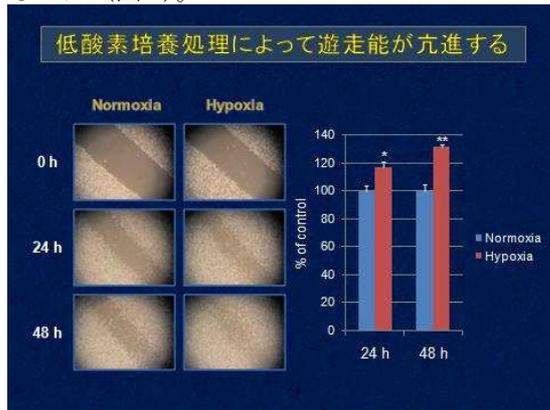


図 3 Hypoxia の細胞運動能への影響

以上の結果は、低酸素条件で B16F10 を培養することにより、接着が下がり運動能が上がる、すなわち癌細胞が動きやすくなっていることを示しており、これらの変化が低酸素条件下で観察された浸潤能亢進の機構の一つであることを示唆する結果と考えられる。

(3) Hypoxia 群において細胞膜糖脂質および接着因子の局在が変化する

上記の結果から明らかになった Hypoxia 群での接着能と運動能の変化を介した浸潤能の亢進に細胞膜糖脂質がどのように関与しているかを明らかにするため、まず細胞膜糖脂質量の変化を検討した。その結果、Hypoxia 群において細胞膜上の GM3 含量が顕著に増加することが明らかになった。その際、GM3 と相互作用することが報告されている CD9 の含量も同時に測定したが、CD9 含量に関しては大きな変化は見られなかった (図 4)。

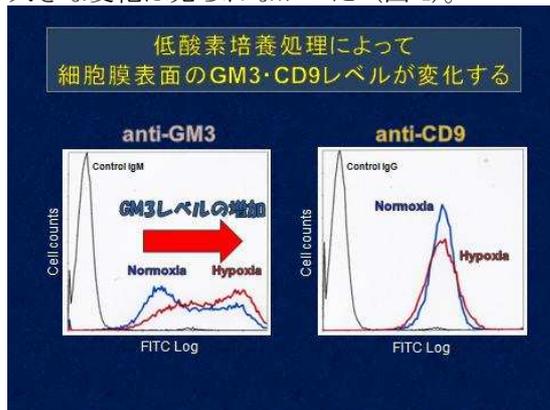


図 4 細胞膜上の GM3 および CD9 含量の変化

細胞膜上の GM3 含量の増加が観察されたため、次いで細胞内の総 GM3 含量を測定したが、細胞内の総 GM3 含量には Normoxia 群と Hypoxia 群の間で大きな差は見られなかった (図 5)。なお低酸素条件下で GM3 の TLC 上での移動度には大きな差はなく構造上の修飾が起

きている可能性は低いと考えられた。

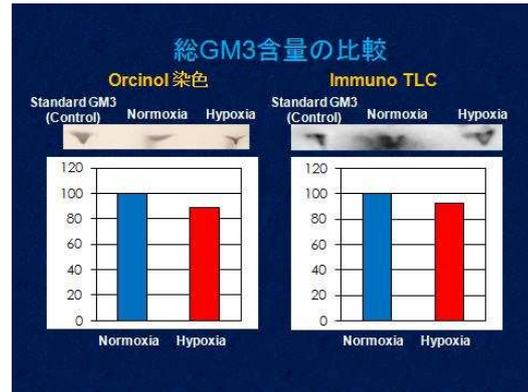


図 5 細胞内総 GM3 含量への Hypoxia の影響

GM3 は主として細胞膜の外葉に存在し、CD9 などのタンパク質と相互作用することでマイクロドメインを形成することが知られている。上記の結果は低酸素培養により細胞内において GM3 合成量が増加し、その結果細胞膜上の GM3 含量が増加したのではなく、GM3 の細胞内局在が変化したことを示唆している。そこで、次に免疫細胞染色により、細胞内での GM3、CD9、インテグリン $\beta 1$ ならびにインテグリンの裏打ちタンパク質の一つである Focal Adhesion Kinase (FAK) の局在変化を検討した (図 6 および図 7)。

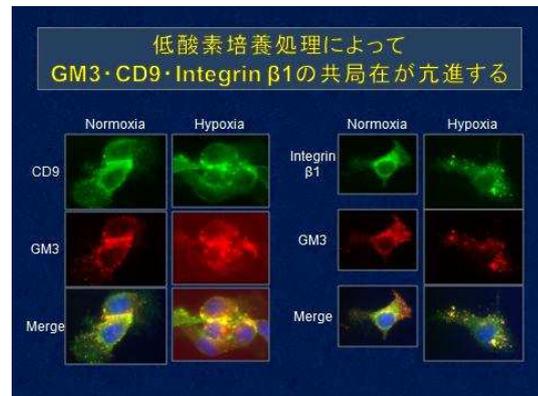


図 6 GM3、CD9、Integrin $\beta 1$ の局在変化

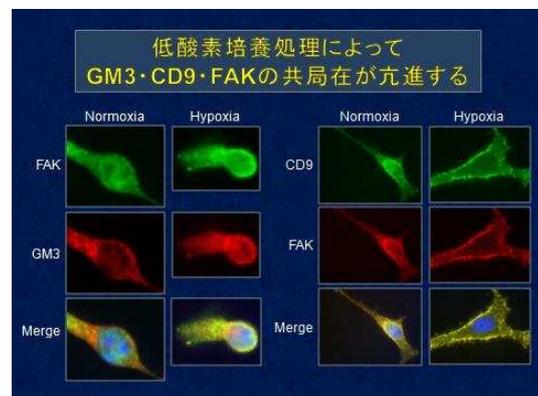


図 7 GM3、CD9、FAK の局在変化

その結果、Hypoxia 群では明らかに GM3、

CD9、Integrin $\beta 1$ 、FAK の局在が亢進しており、低酸素条件下では、細胞膜上で増加した GM3 が CD9、インテグリンおよび FAK と大きな複合体をマイクロドメインとして形成していることが予想された。この結果をさらに確認するため、細胞膜マイクロドメインをシヨ糖密度勾配超遠心法により分離し、マイクロドメイン画分と可溶性画分におけるインテグリン存在量を測定したところ、図 8 に示したように低酸素培養条件下ではマイクロドメイン画分へのインテグリン $\alpha 5$ および $\beta 1$ の局在が明らかに亢進していることが明らかとなった。



図 8 マイクロドメイン画分への Integrin $\alpha 5 \beta 1$ の局在
PNF は細胞質総タンパク質に相当する。

以上の結果より低酸素条件下では、細胞内の糖脂質や接着因子の総量はほとんど変化しないものの、それら因子が局在を変化させることで、細胞膜上のマイクロドメイン構造が大きく変化し、その結果接着能と運動能が変化し、浸潤能亢進、すなわち悪性化につながっていることが明らかとなった。

(4)まとめと今後の展望

以上の結果より、低酸素培養によりマウスメラノーマ細胞 B16F10 は浸潤能の亢進という悪性化を示すことが明らかとなり、その機構には接着能の低下と運動能の亢進が関与していることが明らかとなった。さらに接着能の低下および運動能の亢進が起きる分子機構の一つに細胞膜マイクロドメインへの GM3 の局在の亢進と GM3-CD9-Integrin $\alpha 5 \beta 1$ -FAK という糖脂質・タンパク質複合体形成の増加が関与していることが明らかとなった。

本研究開始時に予想していた低酸素条件という酸化ストレス下における細胞膜糖脂質の質的变化(糖鎖切断や官能基の変化などの分子構造変化)に関しては明らかな変化を見出すことはできなかったが、細胞膜糖脂質の細胞膜上での量的変動(総量は変化せず、

細胞膜への局在が増加する)を見出し、それに伴う細胞膜マイクロドメイン中でのタンパク質複合体の変化を見出すことができた。

さらに結果として示すまでの明確なデータを得ることはできなかったが、Hypoxia 群より調製した細胞膜マイクロドメインを材料として、抗 GM3 抗体を用いた免疫沈降実験を行い、GM3 が形成している糖脂質・タンパク質複合体中のタンパク質をプロテオミクスにより解析したところ、細胞運動に関わることが報告されている低分子量 G タンパク質の調節因子である GAP (GTPase activating protein) の一種が含まれていることを示唆するデータも得ている。この結果からも低酸素条件下でマイクロドメイン中に形成される糖脂質・タンパク質複合体は細胞運動の調節に深く関与している可能性が考えられ、低酸素条件下における癌細胞の悪性化過程において細胞膜糖脂質が重要な役割を果たしていることは明らかであると考えられる。

今後、細胞膜中の GM3 および GM3 が形成するタンパク質との複合体をより詳細に解析することで、癌細胞悪性化の新たな機構を明らかにすることが可能となると予想され、それらの研究成果をもとに癌細胞の悪性化抑制法の開発を行うための基盤が形成されていくものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Minakawa M, Kawano A, Miura Y, Yagasaki K Hypoglycemic effect of resveratrol in type 2 diabetic model db/db mice and its actions in cultured L6 myotubes and RIN-5F pancreatic β -cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 48, 237-244, 2011、査読有
- ② Yoshida S, Hirakawa N, Ito K, Miura Y, Yagasaki K Anti-Invasive Activity of α -Tocopherol against Hepatoma Cells in Culture via Protein Kinase C Inhibition.. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 48, 251-257, 2011、査読有
- ③ Kawasaki M, Miura Y, Yagasaki K Effects of sulfur amino acids, L-cysteine on lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in differentiated mouse 3T3-L1 adipocytes. *Cytotechnology*, 62, 225-233. 2010、査読有
- ④ Kawasaki M, Miura Y, Funabiki R, Yagasaki K Effects of simultaneous dietary fish oil ingestion and sulfur amino acid

supplementation on the lipid metabolism in hepatoma-bearing rats with hyperlipidemia. *J Nutr. Sci. Vitaminol.*, 56, 247-254. 2010、査読有

⑤ Fujiyama-Nakamura S, Yoshikawa H, Homma K, Hayano T, Tsujimura, Takahashi T, Izumikawa K, Ishikawa H, Miyazawa N, Yanagida M, Miura Y, Shinkawa T, Yamauchi Y, Isobe T, Takahashi N. Parvulin (Par14), a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, is a novel rRNA processing factor that evolved in the metazoan lineage. *Molecular and Cellular Proteomics*, 8, 1552-1565. 2009、査読有

⑥ Kawano A, Nakamura H, Hata S, Minakawa M, Miura Y, Yagasaki K. Hypoglycemic effect of aspalathin, a rooibos tea component from *Aspalathus linearis*, in type 2 diabetic model db/db mice. *Phytomedicine*, 16(5), 437-443. 2009、査読有

⑦ 三浦 豊 「糖脂質、とくにガングリオシドによる抗がん・免疫調節作用について」、オレオサイエンス、第9巻、第10号、473-481. 2009年、査読無

⑧ Komatsu W, Nagata J, Kaneko M, Yamada T, Moriya D, Miura Y, Yagasaki K. Effect of dietary soy protein on tumor necrosis factor productivity in macrophages from nephritic and hepatoma-bearing rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 54, 435-439. 2008、査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

① Yosuke Oikawa, Manami Miyake, Kazumi Yagasaki, Yutaka Miura, Regulation of mouse melanoma invasion by membranous ganglioside GM3. JAACT2010, 2010/09/03, Sapporo, Japan

② 三村真吾、矢ヶ崎一三、三浦 豊、低酸素培養条件下における癌細胞浸潤能亢進の機構解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京

③ Yutaka Miura, Boonchoo Wannachanok, Shingo Mimura, Kazumi Yagasaki, O-linked N-acetylglucosamine modification plays the important roles in tumor phenotypes under hypoxia. The 19th International Congress of Nutrition, 2009/10/06, Bangkok, Thailand

④ 三村真吾、Wannachanok Boonchoo、矢ヶ崎一三、三浦 豊、低酸素状態下での癌細胞浸

潤能亢進への細胞内タンパク質 O-GlcNAc 修飾の関与、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 豊 (MIURA YUTAKA)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：10219595

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし