

機関番号：13901  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20599007  
 研究課題名(和文)：スフィンゴ糖脂質による口腔癌の悪性形質制御機構  
 研究課題名(英文)：Mechanisms for the control of malignant properties of oral cancer with glyco-sphingolipids  
 研究代表者  
 浜村 和紀 ( HAMAMURA KAZUNORI )  
 名古屋大学・医学系研究科・助教  
 研究者番号：00422767

研究成果の概要(和文)：糖鎖が口腔扁平上皮癌やメラノーマの悪性形質に深く関与していることが明らかになった。口腔扁平上皮癌では、Lewis y の発現が癌の悪性形質を減弱させる。その機序として、Lewis y が EGFR のリン酸化に抑制的に関与することが示唆された。また、メラノーマでは、GD3 発現下で Yes の多くが、脂質ラフト画分に局在し、その結果、Yes の恒常的な活性化に繋がり、悪性形質を増強していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：It has been demonstrated that glycans on the cell surface was strongly involved in malignant properties of oral squamous cell carcinomas and melanomas. Expression of Lewis y in oral squamous cell carcinomas resulted in attenuation of cancer malignant properties. As a mechanism, it was suggested that Lewis y might play roles in the negative regulation of the phosphorylation of EGFR. Furthermore, it was shown that majority of Yes was localized in GEM/rafts under GD3 expression in melanomas, resulting in the enhanced malignant properties by constitutive activation of Yes.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	0	1,200,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔扁平上皮癌、メラノーマ、糖脂質、糖タンパク質、Lewis y、type 2H、ラフト、Src ファミリーキナーゼ

1. 研究開始当初の背景：糖脂質は癌関連抗原として癌の悪性度に強く関与し、癌細胞の増殖や浸潤能増強に働くことが示されてきた。ジシアル糖脂質である GD3 や GD2 が癌悪性形質増強に関与する一方、モノシアル糖脂質である GM1 は対照的な作用を示すことも明らかになってきた。しかし、糖脂質

糖鎖の違いが、どのようなメカニズムで、シグナルを調節しているのかについては、ほとんど解明されていない。一方、口腔外科領域では、扁平上皮癌やメラノーマなど、種々の癌の悪性形質における糖鎖の意義については、ほとんど不明である。

2. 研究の目的：本研究では、メラノーマ細胞を用いて、ジシアル糖脂質とモノシアル糖脂質の違いによる癌悪性形質の正負の制御メカニズムを解明する。また、口腔扁平上皮癌における特異的に発現する糖鎖を同定し、癌の悪性度への関与を明らかにすると共に、その分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法：7種類の口腔扁平上皮癌細胞株における糖鎖の発現プロファイルフローサイトメトリー(FACS)を用いて明らかにし、癌特異性の高い糖鎖を同定する。糖鎖転移酵素遺伝子改変細胞を用いて、その特異的糖鎖の発現と癌の悪性形質との関与について、*in vitro* (MTT assay および invasion assay) および *in vivo* (ヌードマウスへの癌細胞移植実験)にて明らかにした。また、口腔扁平上皮癌患者の病理組織におけるその糖鎖の発現強度や分布を免疫染色により明らかにした。また、メラノーマ細胞の糖鎖転移酵素遺伝子操作に基づく糖鎖の違いによる癌の悪性形質への関与を MTT assay および invasion assay にて検討した。また、そのシグナル調節のメカニズムを Triton X-100 抽出物をショ糖密度勾配超遠心法によって分離した後、イムノブロットングを行って、分子の細胞内局在を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 7 種類における糖脂質、糖タンパク質の発現プロファイルを FACS を用いて明らかにした。その結果、高発現で特異性の高いガングリオシドは認められなかった。一方、血液型抗原である Lewis y および type 2H が高発現していることが判明した。

(2) Lewis y 構造をもつタンパク質として、EGFR が同定され、7 種類の口腔扁平上皮癌細胞株において、EGFR 上の Lewis y 構造の有無とそのリン酸化レベルとの間に逆相関があることが判明した。

(3) ヒト口腔扁平上皮癌における Lewis y および type 2H の悪性形質への関与を明らかにするため、これらの糖鎖を発現していない口腔扁平上皮癌細胞株に fut1 ( $\alpha$ 1-2 フコース転移酵素) を発現させ、Lewis y および type 2H 安定発現細胞株を樹立した。この結果、Lewis y および type 2H の発現によって、*in vitro* 実験では、細胞増殖、浸潤能の低下、また、*in vivo* 実験では、腫瘍形成能の低下が認められた。つまり、これらの糖鎖の発現により、悪性形質が減弱することが明らかになった。

(4) Lewis y 発現(-)細胞の方が、Lewis y 発現(+)細胞より、血清刺激後の EGFR のリン酸化が強いことが判明した。このことは、(2)の結果と一致しており、Lewis y が EGFR のリン酸化に対して抑制的に関与していること

が明らかになった。

(5) 口腔扁平上皮癌患者 23 例および白板症と臨床診断され、病理診断において上皮に異形成が認められると診断された患者 14 例における Lewis y および type 2H の発現を免疫染色にて検討した。その結果、口腔扁平上皮癌患者では、type 2H が 100%、Lewis y が 91.3% 認められた。また、上皮異形成をもつ患者の病理組織では、type 2H は、92.9%、Lewis y は 78.6% 認められた。

(6) 上記の癌の病理組織を異型上皮、CIS/微小浸潤、浸潤癌の3つに分類し、Lewis y および type 2H の発現強度を比較した。この結果、Lewis y の発現強度は、異型上皮に比べて、CIS/微小浸潤において強くなり、浸潤癌になると逆に減弱する傾向が認められた。一方、type 2H に関しては、CIS/微小浸潤では、異型上皮より強いが、浸潤癌とは、ほとんど同等であることがわかった。

(7) 癌病理組織における Lewis y および type 2H の細胞内局在を検討した結果、Lewis y は、角化細胞では細胞膜に発現しているのに対して、非角化細胞では細胞膜ではなく細胞質に発現していることが判明した。また、これらの組織を Ki67 を用いて免疫染色した結果、Lewis y が細胞膜に発現している細胞では Ki67 陰性で、Lewis y が細胞質に発現している細胞では陽性である傾向が示された。つまり、ヒト病理組織の検討結果より、Lewis y は正常では発現していないが、癌になると発現し、悪性度が高くなるにつれて減弱し、増殖の速い細胞は細胞膜ではなく細胞質に発現するようになる。

(8) ヒトメラノーマ細胞では、ジシアル糖脂質 GD3 が、種々の細胞外基質(ECM)への接着能を亢進させることが明らかになった。その機序として、GD3 発現(+)細胞では、integrin が、接着前に既に脂質ラフトに存在し、その結果、FAK のリン酸化を増強しているためであることがわかった。

(9) メラノーマ細胞にモノシアル糖脂質である GM1 合成酵素遺伝子を導入し、GM1、GD1b、GA1 を発現させると、細胞浸潤能、増殖能、移動能が低下し、癌の悪性形質が減弱することが判明した。その機序として、GM1 合成酵素の発現により、脂質ラフト画分に存在していた GD3 が、非ラフト画分に拡散すること、p130Cas、FAK、paxillin といった focal adhesion pathway に関与する分子群のリン酸化レベルの低下が示された。また、ショ糖密度勾配法で分離した脂質ラフト画分と非ラフト画分の GD3 を mass 解析した結果、GM1 合成酵素の発現により、非ラフト画分に移動した GD3 では、不飽和脂肪酸が増加していることが示された。

(10) ヒトメラノーマでは、Yes が GD3 依存的に活性化し、その結果、細胞増殖および浸潤

能を亢進させること、その機序として GD3 発現下で Yes の多くが、脂質ラフト画分に局在し、その結果、Yes の恒常的な活性化に繋がっており、悪性形質を増強していることが明らかになった。

(11) リポソームを用いた再構築実験系により、糖鎖の違いが癌の悪性形質を分別的に制御するかについて検討した。GD3 発現(-)メラノーマ細胞の lysate から免疫沈降した Yes と GD3 をリポソームに包埋して、Yes の活性レベルを検討した結果、GD3 の添加により活性化が認められた。一方、GD3 発現(+ )メラノーマ細胞由来の Yes に対して、同様に GM1 を添加した場合、Yes の活性レベルが有意に抑制されることが判明した。つまり、GD3 が Yes の活性を上昇させる一方、GM1 は Yes の活性を低下させることが in vitro の系でも示され、メラノーマにおいて、糖脂質糖鎖の違いが癌の悪性形質を正負に制御するメカニズムを再構築実験系により詳細に解明しうることが明らかになった。

#### 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 4 件)

- ① Yuki Ohkawa, Sayaka Miyazaki, Kazunori Hamamura, Mariko Kambe, Maiko Miyata, Oriie Tajima, Yuhsuke Ohmi, Yoshio Yamauchi, Koichi Furukawa, and Keiko Furukawa. Ganglioside GD3 enhances adhesion signals and augments malignant properties of melanoma cells by recruiting integrins to glycolipid-enriched microdomains. *J. Biol. Chem.* 285 (35) 27213-27223 (2010) Review (+)
- ② Yu Dong, \*Kazutaka Ikeda, \*Kazunori Hamamura, Qing Zhang, Yuji Kondo, Yasuyuki Matsumoto, Yuhsuke Ohmi, Yoshio Yamauchi, Keiko Furukawa, Ryo Taguchi, and Koichi Furukawa. GM1/GD1b/GA1 synthase expression results in the reduced cancer phenotypes with modulation of composition and raft-localization of gangliosides in a melanoma cell line. *Cancer Sci.* 101 (9), 2039-2047 (2010) Review (+) \*K.I. and K.H.

contributed equally to this work.

- ③ Koichi Furukawa, Kazunori Hamamura, Hideyuki Nakashima, and Keiko Furukawa. Molecules in the signaling pathway activated by gangliosides can be targets of therapeutics for malignant melanomas. *Proteomics* 8 (16), 3312-3316 (2008) Review (+)
- ④ Yuki Ohkawa, Sayaka Miyazaki, Maiko Miyata, Kazunori Hamamura, Koichi Furukawa, and Keiko Furukawa. Essential roles of integrin-mediated signaling for the enhancement of malignant properties of melanomas based on the expression of GD3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373 (1), 14-19 (2008) Review (+)

[学会発表] (計 25 件)

1. Noboru Hashimoto, Kazunori Hamamura, Yusuke Ohmi, Yuki Ohkawa, Kunie Inagaki, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa. Proteomic profiling of gangliosides-containing microdomains in malignant melanomas. 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010 年 12 月 7-10 日
2. 浜村和紀. Roles of Src family kinase Yes in human melanomas expressing ganglioside GD3. グローバル COE 第 3 回国際シンポジウム 神経疾患とがんの共通機能分子をめぐって、名古屋、2010 年 11 月 5 日
3. 浜村和紀、堀田宏司、服部宇、上田実。ヒトメラノーマ特異的 GD3 による Src ファミリーキナーゼ Yes の活性化制御機構。第 55 回日本口腔外科学会総会・学術大会、千葉、2010 年 10 月 16-18

- 日
4. 浜村和紀、辻桃子、堀田宏司、中島英行、橋本登、古川圭子、古川鋼一。ヒトメラノーマにおける Src ファミリーキナーゼ Yes のガングリオシド GD3 依存的活性化機構。第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22-24 日
  5. 堀田宏司、浜村和紀、豊國伸哉、渋谷英伸、徳田典代、古川圭子、山本憲幸、服部宇、上田実、古川鋼一。ヒト口腔扁平上皮癌におけるマーカーとしての type 2H と Lewis Y 抗原。第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22-24 日
  6. 古川圭子、大川祐樹、神戸真理子、宮田麻衣子、章青、山森達也、高橋智絵、田島織絵、浜村和紀、古川鋼一。メラノーマ細胞のガングリオシド GD3 による細胞増殖と接着シグナルの収斂と増殖効果。第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22-24 日
  7. 董宇、池田和貴、浜村和紀、章青、近藤裕史、松本康之、大海雄介、山内祥生、古川圭子、田口良、古川鋼一。GM1 合成酵素の発現はメラノーマ細胞株のガングリオシド修飾により腫瘍形質を抑制する。第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22-24 日
  8. 大川祐樹、宮崎清香、神戸真理子、宮田麻衣子、橋本登、浜村和紀、古川圭子、古川鋼一。メラノーマにおいてガングリオシド GD3 は FAK の強い活性化を脂質ラフトで誘導する。第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22-24 日
  9. Kazunori Hamamura, Momoko Tsuji, Hiroshi Hotta, Hideyuki Nakashima, Noboru Hashimoto, Keiko Furukawa, and Koichi Furukawa. Mechanism of ganglioside GD3-dependent activation of Src family kinase Yes in human melanomas. *The 28th Naito Conference on Glycan Expression and Regulation [I] : Functions and Disease Mechanisms* (Kanagawa, Japan, 7.27-30 2010)
  10. 橋本登、浜村和紀、大川祐樹、稲垣邦江、尾高由佳、伊藤静香、古川圭子、古川鋼一。悪性メラノーマにおけるガングリオシド GD3 分子複合体の網羅的解析。第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009 年 12 月 9-12 日
  11. Kazunori Hamamura, Hiroshi Hotta, Shinya Toyokuni, Noriyo Tokuda, Keiko Furukawa, Hisashi Hattori, Minoru Ueda, and Koichi Furukawa. Expression of type 2H and Lewis y antigens in human oral squamous cell carcinomas. *Global COE Program the Second International Symposium* (Nagoya, Japan, 11.26-27, 2009)
  12. 古川鋼一、大海雄介、浜村和紀、古川圭子。スフィンゴ糖脂質による脂質ラフトの制御とその破綻。第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009 年 10 月 21-24 日
  13. 大海雄介、大川祐樹、近藤裕史、橋本登、浜村和紀、古川圭子、古川鋼一。ヒトメラノーマの悪性形質におけるガングリオシドの役割。第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009 年 10 月 21-24 日
  14. 大川祐樹、宮崎清香、浜村和紀、山内祥生、古川圭子、古川鋼一。Adhesion of melanoma cells is enhanced by GD3 via recruitment of integrins to lipid rafts. 第

- 82 回日本生化学会大会、神戸、2009 年 10 月 21-24 日
15. 堀田宏司、浜村和紀、豊國伸哉、徳田典代、古川圭子、服部宇、上田実、古川鋼一。ヒト口腔扁平上皮癌における type2H と Lewis y 抗原の発現。第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日
  16. 大海雄介、大川祐樹、近藤裕史、浜村和紀、古川圭子、古川鋼一。ヒトメラノーマにおける酸性糖脂質 GD2 の役割。第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日
  17. 浜村和紀、董宇、池田和貴、章青、近藤裕史、松本康之、大海雄介、古川圭子、田口良、古川鋼一。GM1/GD1b/GA1 合成酵素発現による SK-MEL-37 メラノーマ細胞の腫瘍形質減弱の分子メカニズム。第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日
  18. 大川祐樹、宮崎清香、浜村和紀、宮田麻衣子、大海雄介、橋本登、田島織絵、古川圭子、古川鋼一。GD3 発現メラノーマ細胞においてインテグリンが脂質ラフトでクラスター構造を形成する。第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日
  19. 浜村和紀。ヒトメラノーマにおける癌悪性形質獲得のメカニズムおよび治療戦略。グローバル COE 第 2 回国内シンポジウム がんの病態解明と新たな治療戦略、名古屋、2009 年 6 月 26 日
  20. Masataka Takahashi, Yuji Kondo, Yoshio Yamauchi, Yusuke Makino, Natsumi Hata, Kazunori Hamamura, Kenju Ko, Yasuyuki Matsumoto, Keiko Furukawa, and Koichi Furukawa. Suppression of malignant phenotypes in human melanomas by shRNAi against GD3 synthase. 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会、神戸 2008 年 12 月 9-12 日
  21. Yusuke Makino, Kazunori Hamamura, Hideyuki Nakashima, Keiko Furukawa, and Koichi Furukawa. A small interfering RNA targeting adaptor molecules, p130Cas and paxillin as novel therapeutics for human melanomas. 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2008 年 12 月 9-12 日
  22. 大川祐樹、宮崎清香、浜村和紀、宮田麻衣子、大海雄介、田島織絵、古川圭子、古川鋼一。Integrin-mediated signaling is essential in the malignant properties of human melanomas enhanced with GD3 expression. 第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、2008 年 10 月 28-30 日
  23. 牧野勇介、浜村和紀、辻桃子、中島英行、古川圭子、古川鋼一。GD3 発現により活性化されるアダプター分子 p130Cas を標的としたメラノーマの RNAi 治療の検討。第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、2008 年 10 月 28-30 日
  24. 古川鋼一、大川祐樹、浜村和紀、牧野勇介、古川圭子。癌関連抗原によるシグナル制御機構と治療応用。第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、2008 年 10 月 28-30 日
  25. 牧野勇介、浜村和紀、辻桃子、中島英行、古川圭子、古川鋼一。GD3 発現により活性化されるアダプター分子を標的としたメラノーマの RNAi 治療の検討。第 28 回日本糖質学会年会、つくば、

2008年8月18-20日

〔図書〕(計3件)

- ① 古川鋼一、浜村和紀、大川祐樹、古川圭子。分子標的薬からみた我が国における創薬。日本臨床 68(10), 1797-1802 (2010)
- ② 古川鋼一、浜村和紀、高賢樹、愛新覚羅維、古川圭子。糖鎖をターゲットにしたがん治療の試み。第3の生命鎖糖鎖の謎が今、解かる クバプロ、東京 85-94 (2009)
- ③ 古川鋼一、浜村和紀、大川祐樹、中島英行、章青、古川圭子。癌細胞の形質を創出する細胞膜近傍の分子複合体。蛋白質核酸酵素 53(12), 1547-1551 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜村和紀 (HAMAMURA KAZUNORI )

研究者番号 : 00422767

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号 :