

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07323

研究課題名(和文) RAGE膜貫通ドメインによる細胞膜ダイナミクスとがん悪性化シグナルの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of cell membrane dynamics and cancer malignant signaling through RAGE transmembrane domain

研究代表者

棟居 聖一 (Munesue, Seiichi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：10399040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫細胞HOSが示すスフェロイド形成は、パターン認識受容体として知られているRAGE(receptor for advanced glycation end-products)の発現が必須であり、この現象はRAGEの細胞膜貫通ドメイン(TM(RAGE))の存在のみで成立する。申請研究では、TM(RAGE)が細胞膜上の機能ドメインである脂質ラフトに局在すること、スフェロイド形成がTM-RAGE特異的であることを明かにした。さらに、TM(RAGE)特異的結合タンパク質Xを見出し、タンパク質Xがスフェロイド形成に必須の分子であることを明かにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、悪性化骨肉腫細胞が培養下で形成するスフェロイドの形成機構の分子メカニズムの一端を明らかにするものであり、本研究成果に基づいて新たな悪性がんの治療戦略の創出の基礎を生み出そうとするものであり学術的な意義は大きい。

また、日本の死因の第一位はがんであり、がんの治療戦略の創出に関わる研究成果の社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The expression of RAGE (receptor for advanced glycation end-products), known as a pattern recognition receptor, is essential for the spheroid formation of human osteosarcoma cells (HOS). In this study, the purpose of this research application was to clarify the intracellular signal for spheroid formation. As a result, we demonstrated that TM (RAGE) localizes to lipid rafts, which are functional domains on the cell membrane, and that the spheroid formation is specific to TM (RAGE). Furthermore, we identified a TM(RAGE)-binding protein X and clarified that protein X is an essential molecule for spheroid formation.

研究分野：生化学

キーワード：RAGE がん悪性化 細胞膜ダイナミクス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん細胞が悪性化し、がん幹細胞様のスフェロイド形成の誘導を示す現象に、パターン認識受容体として知られている RAGE (receptor for advanced glycation end-products) の発現が必須であること、およびこの現象はこれまで明らかになっている RAGE シグナルを介さず、RAGE の細胞膜貫通ドメイン TM(RAGE) の存在のみで成立する現象であることを見出した。

### 2. 研究の目的

本申請研究では、RAGE 細胞膜貫通ドメイン TM(RAGE) を導入した HOS 細胞を用いて、TM(RAGE) により誘導されるスフェロイド形成の細胞内シグナルを明らかにすることを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

RAGE 膜貫通領域 TM(RAGE) が脂質ラフトに局在するか否かの検討

N 末端に His タグを付加した His-TM(RAGE) cDNA を HOS 細胞に導入し安定発現株 HOS-TM(RAGE) 細胞を得て、この細胞から ULTRARIPA Kit for Lipid Raft 試薬を用いて脂質ラフト画分を抽出し、TM-RAGE の脂質ラフトへの局在をウエスタンブロットにより検討した。

スフェロイド形成が TM(RAGE) 特異的な現象であるか否かの検討

スフェロイド形成が TM(RAGE) 特異的であることを示す為に、RAGE の細胞膜貫通領域のアミノ酸配列の順番をランダムに変更した His-TMsc(RAGE) を HOS 細胞に導入した高発現株 (HOS-TMsc(RAGE)) 細胞を作製し、スフェロイド形成能を検討した。

TM-RAGE を bait にした RAGE 結合タンパクの探索

HOS-TM(RAGE) 細胞の抽出液をニッケル樹脂に添加し、His-TM(RAGE) を pull down し、His-TM(RAGE) と共沈してくる分子を SDS-PAGE により分離し、His-TM(RAGE) 特異的に検出された分子を MALDI-TOF MS により解析した。

結合タンパク質 X の発現の検討と発現抑制効果の検討

Pull down assay により同定した数種類の結合タンパク質のうちの一つ、結合タンパク質 X について解析を行った。HOS-RAGE 細胞のタンパク質 X の発現を qPCR により検討した。対照としてベクターのみを導入した HOS-mock 細胞を用いた。また、HOS-RAGE 細胞のタンパク質 X の発現を siRNA により抑制し、スフェロイド形成を検討した。

### 4. 研究成果

HOS-His-TM(RAGE) 細胞からの抽出液をラフト画分、非ラフト画分に分離しウエスタンブロットにより解析したところ His-TM(RAGE) は脂質ラフト画分に局在することが明らかとなった (図 1)。

そこでスフェロイド形成が TM(RAGE) 特異的であることを示す為に RAGE の細胞膜貫通領域のアミノ酸配列の順番をランダムに変更した TMsc(RAGE) を HOS 細胞に導入した HOS-TMsc(RAGE) 細胞を得て、スフェロイド形成能を検討した。その結果、HOS-TM(RAGE) で形成されるスフェロイドは、HOS-TMsc(RAGE) では観察されなかった (図 2)。このことは RAGE 発現により誘導されるスフェロイド形成は TM-RAGE 特異的であることが示された。

さらに、HOS-TMsc(RAGE) を対照として HOS-TM(RAGE) の TM(RAGE) を pull down し、共沈してくるタンパク質の解析を行った。この結果、数種類の TM(RAGE) 特異的結合タンパク質を見出した (図 3)。その中の一つタンパク質 X は RAGE 発現によりその発現が亢進した (図 4)。また、RAGE 高発現スフェロイド形成 HOS-RAGE 細胞のタンパク質 X を siRNA により抑制すると、スフェロイド形成が抑制された (図 5)。

以上の結果はがん細胞の悪性化の指標であるスフェロイド形成は RAGE とタンパク質 X との相互作用を介する現象である可能性が示唆される。

図1 His-TM(RAGE)は脂質ラフトに局在する

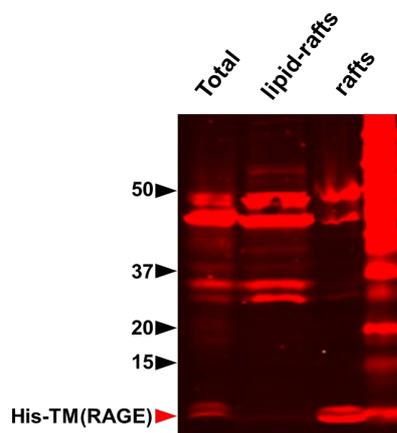


図2 スフェロイド形成はRAGE細胞膜貫通領域特異的に誘導される

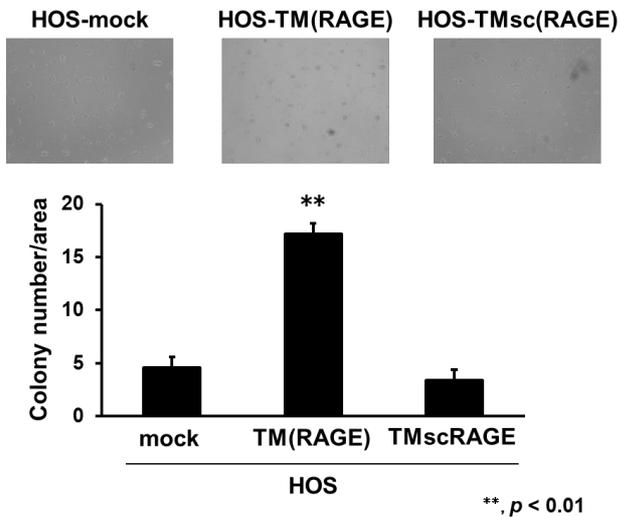


図3 TM(RAGE)特異的な結合タンパク質の検出

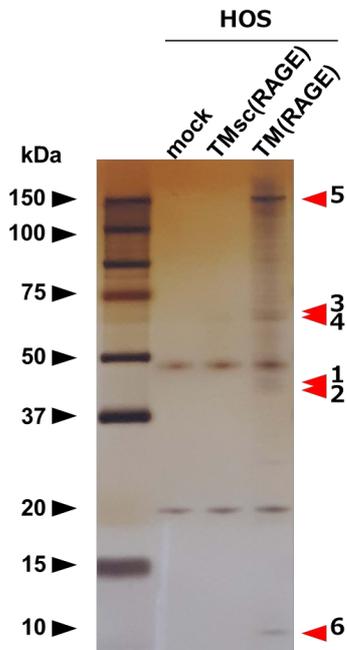


図4 ProteinXの発現はRAGE発現により亢進する

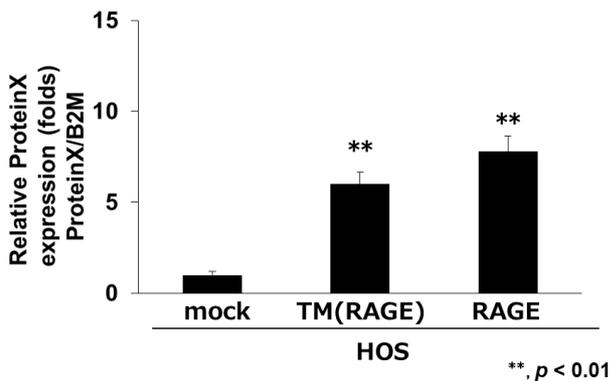
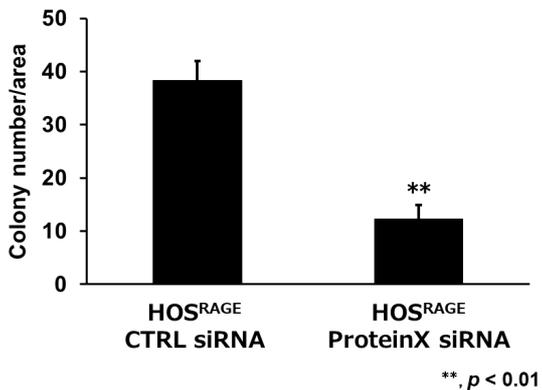


図5 ProteinXの発現抑制はスフェロイド形成を抑制する



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 12件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Gerasimenko M, Lopatina O, Munesue S, Harashima A, Yokoyama S, Yamamoto Y, Higashida H.	4. 巻 235
2. 論文標題 Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) plays a critical role in retrieval behavior of mother mice at early postpartum.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiol Behav.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.physbeh.2021.113395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamamoto Y, Harashima A, Munesue SI, Higashida H.	4. 巻 2384
2. 論文標題 Use of Cocultures to Measure the Blood-Brain Barrier Permeability of Oxytocin.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 247-255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1759-5_15.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Oshima Y, Harashima A, Munesue S, Kimura K, Leerach N, Goto H, Tanaka M, Niimura A, Hayashi K, Yamamoto H, Higashida H, Yamamoto Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 Dual Nature of RAGE in Host Reaction and Nurturing the Mother-Infant Bond.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23042086.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Takei R, Miyashita T, Takada S, Tajima H, Ninomiya I, Takamura H, Fushida S, Harashima A, Munesue S, Yagi S, Inaki N, Ohta T, Yamamoto Y.	4. 巻 71
2. 論文標題 Dynamic switch of immunity and antitumor effects of metformin in rat spontaneous esophageal carcinogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother.	6. 最初と最後の頁 777-789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-021-03027-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyagawa T, Iwata Y, Oshima M, Ogura H, Sato K, Nakagawa S, Yamamura Y, Kamikawa Y, Miyake T, Kitajima S, Toyama T, Hara A, Sakai N, Shimizu M, Furuichi K, Munesue S, Yamamoto Y, Kaneko S, Wada T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Share Soluble receptor for advanced glycation end products protects from ischemia- and reperfusion-induced acute kidney injury.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biol Open.	6. 最初と最後の頁 bio058852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.058852.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Takei R, Miyashita T, Takada S, Tajima H, Ninomiya I, Takamura H, Fushida S, Harashima A, Munesue S, Yagi S, Inaki N, Ohta T, Yamamoto Y.	4. 巻 71
2. 論文標題 Correction to: Dynamic switch of immunity and antitumor effects of metformin in rat spontaneous esophageal carcinogenesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother.	6. 最初と最後の頁 791-793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-021-03039-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamazaki H, Tajima H, Yamamoto Y, Munesue S, Okazaki M, Ohbatake Y, Nakanuma S, Makino I, Miyashita T, Takamura H, Ohta T.	4. 巻 25
2. 論文標題 Thrombopoietin accumulation in hepatocytes induces a decrease in its serum levels in a sinusoidal obstruction syndrome model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Med Rep.	6. 最初と最後の頁 201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2022.12717.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Munesue S, Liang M, Harashima A, Zhong J, Furuvara K, Boitsova BE, Cherepanov MS, Gerasimenko M, Yuhi T, Yamamoto Y, Higashida H.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Transport of oxytocin to the brain after peripheral administration by membrane bound or soluble forms of receptors for advanced glycation end products.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neuroendocrinol.	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Leerach N, Munesue S, Harashima A, Kimura K, Oshima Y, Kawano S, Tanaka M, Nimura A, Sakulsak N, Yamamoto H, Hori O, Yamamoto Y	4. 巻 in press
2. 論文標題 RAGE signaling antagonist suppresses mouse macrophage foam cell formation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Leerach N, Harashima A, Munesue S, Kimura K, Oshima Y, Goto H, Yamamoto H, Higashida H, Yamamoto Y.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Glycation reaction and the role of the receptor for advanced glycation end-products in immunity and social behavior.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Glycoconj J.	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shimizu Y, Harashima A, Munesue S, Oishi M, Hattori T, Hori O, Kitao Y, Yamamoto H, Leerach N, Nakada M, Yamamoto Y, Hayashi Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Neuroprotective Effects of Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation End-products in Brain Ischemia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging Dis.	6. 最初と最後の頁 547-558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Oishi M, Munesue S, Harashima A, Nakada M, Yamamoto Y, Hayashi Y. Aquaporin 1 elicits cell motility and coordinates vascular bed formation by downregulating thrombospondin type-1 domain-containing 7A in glioblastoma.	4. 巻 9
2. 論文標題 Aquaporin 1 elicits cell motility and coordinates vascular bed formation by downregulating thrombospondin type-1 domain-containing 7A in glioblastoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Med.	6. 最初と最後の頁 3904-3917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 棟居聖一、山本靖彦
2. 発表標題 グリケーションとその最終産物受容体RAGE 病態形成における意義について
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原島 愛、Nontaphat Leerach、棟居聖一、木村久美、大島 由、林 謙次郎、後藤久典、田中麻莉子、新村朱子、橋本 篤、山本靖彦
2. 発表標題 RAGE細胞内シグナル伝達阻害によるマクロファージ泡沫化抑制効果
3. 学会等名 腎とフリーラジカル研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新村朱子、木下結衣、原島 愛、棟居聖一、木村久美、Nontaphat Leerach、大島 由、林 謙次郎、田中麻莉子、後藤久典、古寺哲幸、山本靖彦
2. 発表標題 原子間力顕微鏡によるタンパク質グリケーションの可視化
3. 学会等名 第30回日本メイラード学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原島 愛、棟居聖一、木村久美、Nontaphat Leerach、大島 由、林謙次郎、新村朱子、田中麻莉子、東田陽博、山本靖彦
2. 発表標題 内在性分泌型 RAGE が血中オキシトシンの脳内輸送に与える影響の検討
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第39回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 棟居聖一、武内章彦、原島愛、木村久美、Nontaphat Leerach、大島 由、田中麻莉子、新村朱子、山本 博、山本靖彦
2. 発表標題 がんの腫瘍悪性形質はRAGEによって制御される
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第39回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大島 由、田中麻莉子、Nontaphat Leerach、林謙次郎、新村朱子、棟居聖一、原島 愛、木村久美、山本靖彦
2. 発表標題 食後誘導される末梢血好中球NETosisとその意義について
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第39回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 棟居聖一、原島愛、木村久美、Nontaphat Leerach、大島由、新村朱子、東田陽博、山本靖彦
2. 発表標題 可溶性RAGEは脳血管内皮細胞上の膜型RAGEによる血中オキシトシンの脳内輸送を阻害しない
3. 学会等名 第30回日本メイラード学会（オンライン）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 棟居聖一、山本靖彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 379
3. 書名 糖化ストレス	

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学大学院・医薬保健学総合研究科・医学専攻・血管分子生物学  
<https://biochem2.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	木村 久美  (Kimura Kumi)  (60409472)	金沢大学・医学系・助教    (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------