

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22651083

研究課題名（和文） がん転移の分子機構の解析を目指した糖鎖プライマー法による比較グライコミクス

研究課題名（英文） Comparative glycomics toward the analysis of molecular mechanism of tumor metastasis using saccharide primer method.

研究代表者

佐藤 智典（SATO TOSHINORI）

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：00162454

研究成果の概要（和文）：

肺腺がん細胞や骨肉腫細胞において、転移性の異なる細胞株で発現している糖鎖を糖鎖プライマーにより解析した。硫酸化糖鎖やグリコサミノグリカン鎖などの発現が細胞間で異なっていることが見いだされ、当該の糖鎖合成遺伝子をノックダウンすることで細胞の運動性を抑制することが可能であった。これにより、糖鎖プライマー法による比較グライコミクスにより、癌転移に関わる糖鎖解析が可能であり、転移抑制方法の創出に寄与できることが示された。

研究成果の概要（英文）：

The development of “comparative glycomics” to analyze the glycans in cells and to compare the glycans between the cells having different metastasis using saccharide primer method is the purpose of this study. The major products obtained by saccharide primer methods from highly metastatic human A549 lung adenocarcinoma cells were sulfonated glycans. Knockdown of the sulfotransferase genes using siRNA showed the suppression of cell motility, and it was indicated that sulfonated glycans are related with the metastasis of lung carcinoma cells. The major products obtained by saccharide primer methods from low metastatic murine FBJ-S1 osteosarcoma cells compared to highly metastatic FBJ-LL cells were gangliosides such as GD1a and glycosaminoglycans such as heparan sulfate. It was indicated that the expression of heparan sulfate suppressed the metastasis of osteosarcoma cells. In this study, it was shown that saccharide primer method was useful to analyze the glycans related with the metastasis of tumor cells. And the new molecular mechanisms for tumor metastases were found by saccharide primer method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	360,000	2,860,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

癌細胞の転移のメカニズムとして1)原発部位からの遊離と浸潤、2)脈管内の移動と血小板凝集、3)内皮細胞への接着、4)脈管外への脱出と浸潤のプロセスに分けられる。それぞれのプロセスには異なった糖鎖が関与していることが知られている。このような糖鎖の発現は、抗体による検出や内在性糖鎖の解析により見いだされている。しかしながら、抗体法では検出できる糖鎖の種類が限定される。内在性糖鎖の検出では、多様な複合糖質の構造の全てを解析するのは、サンプルの供給量や糖鎖の分離技術等の点で困難である。そこで、本申請研究では、糖鎖プライマー法を用いて、細胞に発現する糖鎖構造を迅速かつ簡便に測定する手法の確立とその糖鎖の機能解析について検討する。糖鎖プライマーとは細胞内の糖転移酵素の基質となるアルキルグルコシドである。細胞の培養液に糖鎖プライマーを投与しておくことで細胞内に取り込まれ、細胞固有の糖鎖合成経路に従った糖鎖伸長生成物が細胞外に分泌される。糖鎖プライマー法により、転移性の癌細胞に発現する糖鎖構造を明らかにすることで、転移の阻害剤の開発に役立つ。

2. 研究の目的

糖鎖プライマー法を用いて、転移性の異なる癌細胞により得られた糖鎖伸長生成物を比較解析する手法の確立を行う。そのために、高速液体クロマトグラフィーと質量分析装置がオンラインで接続した LC-MS での分析技術を確立する。転移性の異なる癌細胞での発現糖鎖の違いを明らかにして、該当する糖鎖合成遺伝子の特定を行う。これにより、癌転移に関わる糖鎖合成経路と糖鎖合成遺伝子のネットワーク解析を行い、癌転移に関わる新たな糖鎖の探索を行う。また、糖鎖プライマー法により得られた糖鎖伸長生成物と血管内皮細胞との相互作用の解析、さらに、糖鎖合成遺伝子を siRNA によりノックダウンし、転移に関わる糖鎖の特定を行う。

3. 研究の方法

1) 糖鎖プライマーの合成：Lac-C12、GlcNAc-C12、GalNAc-Thr-C12 および Xyl-Ser-C12 などの糖鎖プライマーを合成した。

2) 各細胞に発現する糖鎖の解析：糖鎖プライマーの細胞への投与と生成物の構造解

析：糖鎖プライマーを添加した細胞培養液を用いて転移性の異なる細胞を2日間培養する。細胞としては転移性の異なる骨肉腫細胞 FBJ-LL(高転移性)と FBJ-S1(低転移性)さらには肺腺がん細胞である A549(高転移性)と HLC-1(転移性なし)を用いる。培地中に分泌された生成物は逆相カラムを用いて回収する。回収された糖鎖伸長生成物は薄層クロマトグラフィー(HPTLC)法、マトリックス支援飛行時間型質量分析装置(MALDI-TOF-MS)あるいは液体クロマトグラフィーを接続したエレクトロスプレーイオン化イオントラップ型質量分析装置(LC-MS)を用いて分析した。

3) 糖鎖パネルの作成：高転移性と低転移性の細胞で得られた糖鎖構造および生成量を表示した糖鎖パネルを作成して、硫酸化糖鎖や O-グリカン型の糖鎖の発現などの比較解析を行った。

4) 糖鎖の機能解析：癌細胞の転移性に関わっていることが示唆された糖鎖の合成遺伝子をリアルタイム PCR 法により検出した。これにより、糖鎖構造の発現と、遺伝子の発現レベルとの関連性を解析した。転移性に関連する推察される糖鎖に関しては、糖鎖合成遺伝子を siRNA でノックダウンし、細胞運動性などへの影響を評価した。

4. 研究成果

A549細胞に糖鎖プライマー(Lac-C12、GlcNAc-C12、GalNAc-Thr-C12)を投与することで得られた糖鎖伸長生成物を、転移性のない肺腺がん細胞HLC-1と比較した。その結果、表1に示すような硫酸化糖鎖の発現が大きく異なることが示された。

表1 高転移性A549細胞と転移性のないHLC-1細胞での糖鎖プライマー由来生成物の比較解析

プライマー	硫酸化糖鎖伸長生成物	高転移性 A549	転移性なし HLC-1
Lac-C12	(HSO ₃ -)Galβ1-4Glc-C12	+++	-
	HexNAc-(HSO ₃ -)Galβ1-4Glc-C12	+++	-
GlcNAc-C12	(HSO ₃ -)Galβ1-4GlcNAc-C12	+++	+
	(HSO ₃ -)Galβ1-4(Fuc1-3)GlcNAc-C12	+++	-
GalNAc-Thr-C12	HSO ₃ +Gal-GalNAc-Thr-C12	++	-
	HSO ₃ +Gal-(NeuAc-)GalNAc-Thr-C12	++	-

質量分析計による糖鎖構造の解析により、A549細胞で発現が高かった硫酸化糖鎖ではGalの3位に結合しており、Lac-C12由来の生成物はSM3型とSM2型、GlcNAc-C12由来の生成物は硫酸化ラクトサミン型と硫酸化Le^x型であることがわかった。さらには、

GalNAc-Thr-C12由来の生成物は、硫酸化T抗原と硫酸化シアリルT抗原であった。

次に、Galの3位に硫酸基を転移させる4種類の硫酸基転移酵素Gal3ST-1～4をRT-PCRにより発現解析を行った。その結果、A549細胞では、HLC-1に比較して全ての酵素の発現量が高いことを明らかにした。

硫酸基転移酵素Gal3ST-3に注目し、リアルタイムRT-PCRによる発現解析およびRNAiを利用したノックダウンを行い、Gal3ST-3とがんの転移性との関連性について検討した。転移性の指標である細胞の運動性はwound healing アッセイ法およびトランスウエルアッセイ法により評価した。siRNAとしては2種類の配列を用いた。高転移性のA549細胞においてGal3ST3をノックダウンすると、細胞の運動性が抑制された(図2)。

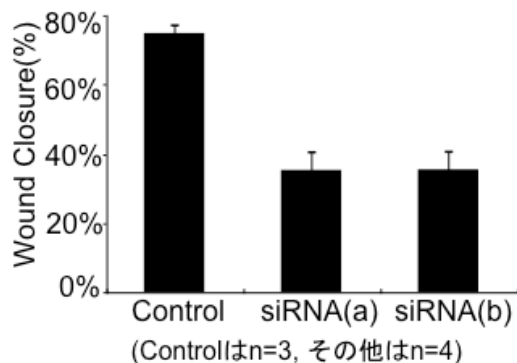


図2 A549細胞におけるGal3ST3のノックダウンによるWound healing アッセイ法での細胞運動能の評価

次に、骨肉腫細胞を対象として、転移に関与する糖鎖を探索し、がん細胞の転移のメカニズムおよび糖鎖の果たす役割の解明を目指した。転移能が異なる骨肉腫細胞としてFBJ-S1とFBJ-LL細胞を用いて、両者での発現糖鎖の違いと細胞の運動性との関係を検討した。

マウス骨肉腫細胞での発現糖鎖の解析には、糖鎖プライマーLac-C12およびXyl-Ser-C12を用いた。FBJ-S1とLL細胞に投与して得られた糖鎖伸長生成物をLC/MSにより解析した。Lac-C12で得られた生成物ではガングリオ系列の糖鎖に大きな違いが見られていた。特に、低転移性のFBJ-S1細胞ではGM2, GM1およびGD1a型の糖鎖を有する生成物の発現が高かった。内在性の糖脂質の解析でも両細胞でGM2, GM1およびGD1aの発現量が異なっていた。

一方、Xyl-Ser-C12由来の生成物からはグリコサミノグリカン型の糖鎖が得られており、低転移のFBJ-S1細胞において高発現し

ていた。構造解析によりグリコサミノグリカン型の糖鎖はヘパラン硫酸型であると推察された。また、FBJ-S1細胞での抗ヘパラン硫酸抗体の結合性および糖鎖合成酵素の遺伝子であるExt1とExt2の発現量も高いことも示された。そこで、ヘパラン硫酸型GAGの発現量と遊走能の関係について検討した。Ext1に対するsiRNAをFBJ-S1細胞を作用させると、Ext1 mRNAの発現および細胞表面のヘパラン硫酸の発現が抑制された。そのような細胞の運動性をトランスウエルアッセイで評価したところ、運動性の向上が確認された(図3)。

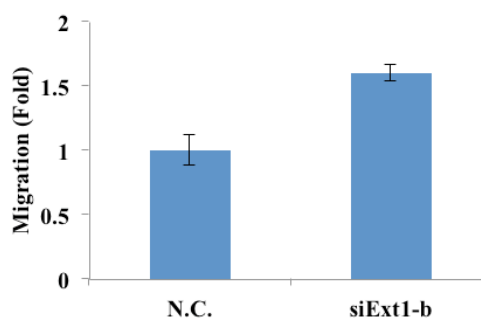


図3 FBJ-S1細胞におけるExt1のノックダウンによるトランスウエルアッセイ法での細胞運動能の評価

以上の様に、糖鎖プライマー法を用いて、転移性の異なる細胞での発現糖鎖の比較解析を簡便に実施できることが示された。これにより、肺腺がん細胞と骨肉腫細胞の転移性に関与する糖鎖を明らかにして、運動性との関連を証明することにも成功した。本知見は、細胞の転移性における糖鎖の関わる分子機構として新しい知見であり、今後の創薬ターゲットとなることが期待される。

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0件)

〔学会発表〕(計9件)

- 糖鎖プライマー法を用いた転移性の癌細胞での比較グライコミクス、佐藤 智典・王 毅楠・古市 悠・山形 達也、第4回バイオ関連化学シンポジウム、2010年9月25日、大阪大学
- Studies on metastasis-related molecules regulated by GD1a in murine FBJ Osteosarcoma Cells and Analysis of Glycan Structures in FBJ Cells Revealed by the

Saccharide Primer Method, Y. Wang, T. Sato, L. Wang, S. Yamagata, T. Yamagata, Pacificchem 2010, 2010 Dec.16. Honolulu

- 3 糖鎖プライマー法を用いた比較グライコミクスにより肺がん細胞の転移性に関与する糖鎖を明らかにする、佐藤 智典・古市 悠・今野 友輔、第13回生命化学研究会シンポジウム、2011年1月7日、仙台
- 4 糖鎖プライマー法によるがん細胞の転移に関わる糖鎖の解析、今野 友輔・古市 悠・佐藤 智典、日本化学会第91春季年会、2011年3月27日、横浜
- 5 糖鎖プライマー法を用いた転移性癌細胞での発現糖鎖およびその機能の解析、佐藤 智典、王 毅楠、古市 悠、今野 友輔、熊澤 知祥、水野 真盛、山形 達也、第29回日本糖質学会年会、2011年7月13日、長岡
- 6 糖鎖プライマー法を用いたヒト肺腺がん細胞の転移に関わる糖鎖の解析、今野 友輔・古市 悠・佐藤 智典、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011年9月13日、つくば
- 7 糖鎖プライマー法を用いたヒト肺腺がんA549細胞の転移に関与する糖鎖の構造と機能の解析、今野友輔、古市悠、佐藤智典、GlycoTOKYO2011シンポジウム、2011年12月9日、理研（和光）
- 8 糖鎖プライマー法によるヒト肺腺癌細胞の転移性に関連する糖鎖構造と機能の解析（慶大理工）今野 友輔・古市 悠・佐藤 智典、日本化学会第91春季年会、2012年3月26日、横浜
- 9 糖鎖プライマー法を用いたマウス骨肉腫細胞に関わる糖鎖および糖転移酵素の解析（慶大理工・瀋陽薬科大）王 毅楠・山形 貞子・山形 達也・佐藤 智典、日本化学会第91春季年会、2012年3月26日、横浜

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 智典 (SATO TOSHINORI)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：00162454

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし