

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590070

研究課題名(和文) 転写因子を用いた糖鎖シグナルの制御によるがん悪性形質の抑制

研究課題名(英文) Regulation of transcription factor suppresses malignant properties of cancer cells with changes in glycosylation

研究代表者

佐藤 武史 (SATO, Takeshi)

長岡技術科学大学・工学部・准教授

研究者番号：30291131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、転写因子Sp1の発現制御による細胞膜糖タンパク質の糖鎖修飾の変化と、がん細胞の悪性形質の発現との関係を分子レベルで解析した。本研究から、Sp1をヒト肺がん細胞でノックダウンすると接着分子E-カドヘリンの糖鎖修飾の変化に加えて、EGFレセプターからMAPキナーゼへのシグナル伝達が減弱することが初めて明らかになった。また、Sp1のノックダウンによる糖鎖修飾の変化をもたらす糖転移酵素を同定し、その機構を転写レベルで明らかにした。さらに、Sp1のノックダウンによる糖鎖修飾とシグナル伝達の変化が、がんの悪性形質である腫瘍形成能や細胞運動能の抑制に寄与するという新しい知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this grant, we established the Sp1-knockdown cells from A549 human lung carcinoma cells by RNAi technique, and examined the relationship between protein glycosylation and malignant properties. Lectin blot analysis showed that decreased galactosylation of N-glycans is observed for E-cadherin in the Sp1-knockdown cells. The gene expression level of beta-1,4-GalT I decreased significantly by knockdown of Sp1. Analysis of the promoter region of the human beta-1,4-GalT I gene revealed that the Sp1-binding site are critical for the expression of the gene. Moreover, knockdown of Sp1 resulted in suppression of the tumorigenic potential and migratory activity of A549 cells. Furthermore, the EGF receptor signaling was reduced by knockdown of Sp1. The study indicates that the malignant properties of cancer cells can be suppressed by regulating Sp1 through changes in protein glycosylation, and suggests that Sp1 may be a potential target for cancer therapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：転写因子 がん 悪性形質 腫瘍形成 細胞運動 糖鎖 糖タンパク質 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

細胞膜糖タンパク質に結合した N-型糖鎖は細胞のがん化に伴って著しく構造が変化し、がん細胞の腫瘍形成や転移に関わっている。研究代表者の佐藤は、がんの病態の解明や治療法の開発にとって、がん細胞に特徴的に見られる糖鎖を作る糖転移酵素遺伝子を見つけることが必要であると考えた。 β -1,4-ガラクトース転移酵素(GalT)をコードする遺伝子は生体内に1つしか存在しないと長年考えられていたが、新しい糖転移酵素遺伝子の探索の過程で β -1,4-GalT V 遺伝子の単離に成功した[Sato, T., *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 442.]. 現在までに、複数の β -1,4-GalT 遺伝子が単離されている[Furukawa, K. and Sato, T. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1473, 54.].

β -1,4-GalT V 遺伝子の発現は、細胞のがん化で増大した[Shirane, K., Sato, T., *et al.* (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 434.; Sato, T., *et al.* (1999) *Recent Res. Devel. Cancer* 1, 105.; Sato, T., *et al.* (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 1019.]. さらに、がん細胞では β -1,4-GalT V 遺伝子は転写因子 Sp1 や Ets-1 によって制御されることを見出した[Sato, T. and Furukawa, K. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 39574.; Sato, T. and Furukawa, K. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 27702.]. また、がん細胞に β -1,4-GalT V 遺伝子のアンチセンス cDNA を導入すると、がん細胞の腫瘍形成や転移が抑制された[Shirane, K., *et al.* *Glycobiology* 24, 532.].

転写因子 Sp1 はハウスキーピング分子の制御のみならず、種々のがん細胞で発現が増大し、がん関連分子の発現を制御する。一例として、腫瘍の成長に必要な新生血管を誘導する血管内皮細胞増殖因子(VEGF)や浸潤に関わるマトリックス分解酵素の遺伝子発現を増大させる。臨床的には、Sp1 は膵臓がんや胃がんの悪性度の指標となることが示されている。

2. 研究の目的

細胞表面に存在するタンパク質や脂質に結合した糖鎖の構造は、細胞のがん化で一変する。この糖鎖シグナルは、がん細胞の悪性形質の発現に深く関わっている。一方、転写因子は特定の DNA 配列に結合して様々な遺伝子の発現を制御する分子である。本研究では、細胞のがん化に関わる糖転移酵素を制御する転写因子 Sp1 に着目し、この転写因子を制御することで生じる糖鎖修飾の変化とがん細胞の悪性形質の発現との関係を分子レベルで明らかにし、転写因子を用いた糖鎖シグナルの制御システムをがん悪性形質の抑制へと応用する。

3. 研究の方法

(1) Sp1 ノックダウン細胞の樹立

A549 ヒト肺がん細胞から、RNA 干渉法により Sp1 をノックダウンした細胞を樹立した。

(2) 糖鎖修飾の解析

対照細胞と Sp1 ノックダウン細胞から、糖タンパク質試料を調製した。糖タンパク質試料を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後に、ウエスタンブロットを行ないポリビニリデンジフルオリド膜に糖タンパク質を転写した。この転写膜を、N-型糖鎖に見られる特定の糖鎖構造と結合する種々のレクチンと反応させた。

(3) 糖鎖修飾が変化した分子の同定

Sp1 ノックダウン細胞から、レクチンを用いて糖鎖修飾が変化したタンパク質を精製した。抗体を用いたウエスタンブロットによって分子を同定し、細胞の蛍光免疫染色によって細胞内局在を解析した。

(4) 糖転移酵素遺伝子の発現の解析

Sp1 のノックダウンによる糖鎖修飾の変化の背景にある糖転移酵素遺伝子の発現の変化を、RT-PCR やリアルタイム PCR により定量的に解析した。さらに、発現が変化した糖転移酵素遺伝子のプロモーター領域を単離し、転写レベルでの解析を試みた。

(5) 足場非依存的増殖能の解析

ソフトアガーを用いて、Sp1 ノックダウン細胞の足場非依存的増殖能を解析した

(6) 腫瘍形成能の解析

対照細胞と Sp1 ノックダウン細胞を、ヌードマウスの皮下に移植し腫瘍塊の大きさや重量を経時的に測定した。また、組織化学的手法を用いて、形成された腫瘍やその内部に誘導された血管の太さ、周辺の皮下組織での血管新生の状態を観察した。さらに、腫瘍血管の新生を誘導する VEGF に着目して、Sp1 ノックダウン細胞における VEGF 遺伝子の発現量と、この細胞が培養液中に分泌する VEGF 量の変化の有無を解析した。

(7) 細胞運動能の解析

Sp1 ノックダウン細胞の運動能は、マルチウエルを用いたスクラッチアッセイにより経時的に解析した。

(8) シグナル伝達経路の解析

対照細胞と Sp1 ノックダウン細胞における c-Raf、MEK1/2 と MAP キナーゼの発現量及びリン酸化レベルを、それぞれの分子に対する抗体を用いたイムノブロットにより解析した。

4. 研究成果

(1) 糖鎖修飾が変化した分子の同定

A549 ヒト肺がん細胞において Sp1 をノックダウンすると、 β -1,4-結合したガラクトース残基と結合するレクチンである RCA-I や 2,6 分岐側鎖を含む高分岐 N-型糖鎖と結合するレクチンである L-PHA との結合性は、対照細胞に比べて分子量 80-90 K 及び 120 K の糖タンパク質で低下した。次に、レクチンを用いて糖鎖修飾が変化した糖タンパク質を精製し、A549 細胞の細胞膜に発現する接着分子や受容体に対する抗体を用いたイムノプロットによって分子の同定を行なった。その結果、分子量 80-90 K の糖タンパク質は LAMP-1、120 K の糖タンパク質は E-カドヘリンであることが判明した。蛍光標識抗体を用いて解析したところ、A549 細胞では LAMP-1 は細胞表面に発現していないことが判明した。

(2) 糖転移酵素遺伝子の発現の解析

次に、Sp1 のノックダウンによる糖鎖修飾の変化の背景を解析するため、RT-PCR により糖転移酵素遺伝子の発現を解析した。その結果、糖鎖のガラクトシル化に関与する β -1,4-GalT ファミリーの中で、 β -1,4-GalT I, III, V の遺伝子発現は、対照細胞に比べて Sp1 ノックダウン細胞において減少する傾向が見られた。リアルタイム PCR により糖転移酵素遺伝子の発現を定量的に解析した。その結果、Sp1 ノックダウン細胞では β -1,4-GalT ファミリーの中で、 β -1,4-GalT I 遺伝子の発現が対照細胞に比べて有意に低下した。

そこで、 β -1,4-GalT I 遺伝子のプロモーター領域を単離し、その塩基配列を解析した。その結果、このプロモーター領域には Sp1 結合部位が 2ヶ所存在し、これらの部位が Sp1 のノックダウンによる β -1,4-GalT I 遺伝子の発現抑制に関与している可能性が示唆された。そこで、この遺伝子のプロモーター領域に見られる 2ヶ所の Sp1 結合部位に変異を導入すると、対照に比べてプロモーター活性が約 60%低下した。従って、 β -1,4-GalT I 遺伝子の転写活性化には Sp1 結合部位が重要な役割を果たしている。Sp1 のノックダウンによって、 β -1,4-GalT I 遺伝子の発現が低下する機構が明らかになった。

(3) 腫瘍形成能の解析

がん細胞の腫瘍形成能は、ソフトアガー中で培養することで見られる足場非依存的な増殖能力と高い相関がある。そこで、初めにソフトアガーを用いて、Sp1 ノックダウン細胞の足場非依存的増殖能を解析した。その結果、Sp1 をノックダウンすると、対照細胞に比べて形成されるコロニーの直径が有意に低下した。次に、ヌードマウスの皮下での腫瘍形成能を解析したところ、対照細胞に比べて Sp1 ノックダウン細胞では約 65%腫瘍形成が抑制された。

Sp1 ノックダウン細胞が形成する腫瘍やその周辺組織を観察した結果、対照細胞に比べて血管新生が著しく抑制されていた。さらに、腫瘍血管の新生を誘導する VEGF に着目して、Sp1 の発現制御による腫瘍形成の抑制のメカニズムの解明を試みた。その結果、VEGF の遺伝子発現及び培養液中への分泌量は、対照細胞に比べて Sp1 ノックダウン細胞で有意に低下した。

(4) 細胞運動能の解析

A549 細胞において Sp1 をノックダウンすると、EGF 存在下での細胞運動能对照細胞に比べて著しく低下した。E-カドヘリンに対する機能阻害抗体を用いた実験によって、細胞運動能の抑制に E-カドヘリンが関与することが判明した。そこで、E-カドヘリンとこの分子の裏打ちタンパク質である β -カテニンに着目して、Sp1 のノックダウンによる細胞運動能の低下のメカニズムの解明を試みた。その結果、Sp1 のノックダウンによる E-カドヘリンの N-型糖鎖修飾の変化によって、E-カドヘリン/ β -カテニン複合体形成が促進される一方、 β -カテニンのリン酸化が抑制された。従って、Sp1 のノックダウンによる糖鎖修飾が引き起こす E-カドヘリン/ β -カテニン複合体形成と β -カテニンのリン酸化の変化によって、細胞運動能が低下した可能性が考えられる。

(5) シグナル伝達経路の解析

EGF 受容体から MAP キナーゼへと伝わるシグナルは、細胞増殖、がんの浸潤や転移を制御することが知られている。そこで、Sp1 の発現をノックダウンすることで生じる糖鎖修飾の変化のがん悪性形質の抑制における意義を探るため、EGF 受容体の下流の MAP キナーゼ経路に着目し、Sp1 のノックダウンによるシグナル伝達分子の発現量及びリン酸化レベルの変化の有無を解析した。Sp1 ノックダウン細胞では、EGF レセプターの下流の c-Raf、MEK1/2 と MAP キナーゼのリン酸化が低下することが判明した。

本研究から、Sp1 のノックダウンによる糖鎖修飾の変化に加えて、EGF レセプターから MAP キナーゼへのシグナル伝達が減弱することで A549 細胞の悪性形質が抑制されるといふ新しい知見が得られた。

がん細胞における Sp1 による糖鎖シグナル制御の普遍性を検討するために、Sp1 の DNA への結合を阻害する Mithramycin A を用いて、A549 細胞とは別のヒトがん細胞における糖鎖修飾の変化の有無を解析した。その結果、A549 細胞において Sp1 をノックダウンした場合と同様の糖鎖修飾の変化が見られた。従って、Sp1 を制御することで、がんの悪性形質を普遍的に抑制できる可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- ① Tagawa, M., Shirane, K., Yu, L., Sato, T., Furukawa, S., Mizuguchi, H., Kuji, R., Kawamura, K., Takahashi, N., Kato, K., Hayakawa, S., Sawada, S., and Furukawa, K. (2014) Enhanced expression of the β 4-galactosyltransferase 2 gene impairs mammalian tumor growth. *Cancer Gene Ther.*, in press.
- ② Shirane, K., Kuji, R., Tareyanagi, C., Sato, T., Kobayashi, Y., Furukawa, S., Murata, T., Kubota, S., Ishikawa, Y., Segawa, K., and Furukawa, K. (2014) Gene expression levels of β 4-galactosyltransferase 5 correlate with the tumorigenic potentials of B16-F10 mouse melanoma cells. *Glycobiology* 24 (6), 532-541.
- ③ 佐藤武史、古川清. (2012) ヒト β -1,4-ガラクトース転移酵素V遺伝子のがん細胞における発現制御. *YAKUGAKU ZASSHI*, 132 (6), 691-697.

〔学会発表〕 (計 12 件)

- ① 丹下梨穂、古川清、佐藤武史、ヒト β 4-ガラクトース転移酵素1遺伝子のプロモーター領域における転写因子Sp1結合部位の機能解析、第36回日本分子生物学会年会、2013.12.3、神戸
- ② 丹下梨穂、佐藤武史、A549ヒト肺がん細胞における β 4-ガラクトース転移酵素3遺伝子の転写制御機構の解析、第86回日本生化学会大会、2013.9.11、横浜
- ③ 佐藤武史、丹下梨穂、古川清、A549ヒト肺がん細胞におけるEGF受容体シグナル伝達と β 4-ガラクトース転移酵素1遺伝子の発現、第86回日本生化学会大会、2013.9.13、横浜
- ④ 佐藤武史、古川清、ヒト肺癌細胞のN-型糖鎖のガラクトシル化と足場非依存的増殖、日本薬学会第133年会、2013.3.28-31、横浜
- ⑤ 佐藤武史、古川清、転写因子Sp1の発現抑制によるA549ヒト肺癌細胞のN-型糖鎖のガラクトシル化と足場非依存的増殖の変化、第85回日本生化学会大会、2012.12.14-16、博多
- ⑥ 佐藤武史、古川清、転写因子Sp1の発現制御による β -1,4-ガラクトース転移酵素I遺伝子発現の変化、第31回日本糖質学会年会、2012.9.17-20、鹿児島
- ⑦ 佐藤武史、古川清、転写因子Sp1のノックダウンによるヒト肺癌細胞のシグナル伝達の変化、日本薬学会第132年会、2012.3.28-31、札幌
- ⑧ 佐藤武史、古川清、転写因子Sp1の発現制御によるヒト肺癌細胞の増殖抑制機構の解明、第34回日本分子生物学会年

会、2011.12.13-16、横浜

- ⑨ 佐藤武史、古川清、転写因子Sp1の発現制御によるヒト肺癌細胞の糖鎖修飾の変化と細胞運動能の抑制、第5回東北糖鎖研究会、2011.12.9、仙台
- ⑩ Sato, T., and Furukawa, K. Changes in N-glycosylation and migration of A549 human lung carcinoma cells by knockdown of transcription factor Sp1. 21st International Symposium on Glycoconjugates, 2011.8.21-26, Vienna
- ⑪ Sato, T. Knockdown of transcription factor Sp1 suppresses malignant phenotypes of A549 human lung carcinoma cells with changes in N-glycosylation. Second Joint Austria/Japan Seminar on Comparative and Developmental Glycobiology, 2011.8.20, Vienna
- ⑫ 佐藤武史、古川清、転写因子Sp1の発現制御によるN-型糖鎖修飾の変化と細胞運動能の低下、第30回日本糖質学会年会、2011.7.11-13、長岡

〔図書〕 (計 3 件)

- ① Sato, T. (2014) "Lectin-probed western blot analysis" in *"Lectins/Methods in Molecular Biology"*, (Hirabayashi, J. ed), Humana Press, in press.
- ② Sato, T., and Furukawa, K. (2014) Expression and transcriptional regulation of β 4-galactosyltransferase genes in cancer. in *"Glycoscience: Biology and Medicine"*, (Taniguchi, N. et al. eds), Springer, in press.
- ③ Furukawa, K., Clausen, H., and Sato, T. (2014) UDP-Gal: β -N-Acetylglucosamine β 4-Galactosyltransferases (β 4GalT2, β 4GalT3, and β 4GalT4), UDP-Gal: Glucosylceramide β 4-Galactosyltransferases (β 4GalT5 and β 4GalT6), and UDP-Gal: Xylosylprotein β 4-Galactosyltransferase (β 4GalT7, galactosyltransferase I) in *Handbook of Glycosyltransferase and Related Genes*, (Taniguchi, N. et al. eds) Springer, in press.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 武史 (SATO, Takeshi)
長岡技術科学大学・工学部・准教授
研究者番号：30291131

(2) 研究分担者

古川 清 (FURUKAWA, Kiyoshi)
長岡技術科学大学・工学部・教授
研究者番号：10190133