

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23701043

研究課題名（和文）新規癌幹細胞マーカーPDPN 上の腫瘍特異的糖鎖構造の生合成機構の解明
 研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of glycosyltransferase genes which synthesize tumor specific glycan on PDPN.

研究代表者

金子 美華（MIKA KANEKO）

山形大学・医学部・講師

研究者番号：00323163

研究成果の概要（和文）：ポドプラニン（PDPN）は、種々の腫瘍に高発現している糖タンパク質で、癌幹細胞群のマーカーとしても使用され始めている。最近、申請者らは PDPN の腫瘍特異的糖鎖修飾の存在を確実に示唆するデータを得た。そこで、この腫瘍特異的糖鎖修飾を担う糖転移酵素遺伝子群を特定し、これらの遺伝子発現制御機を micro RNA 等の noncoding RNA による転写後制御という観点から解析し、腫瘍特異的糖鎖構造の生合成制御機構を解明することを目的として研究を遂行した。

研究成果の概要（英文）：Podoplanin (PDPN) is a mucin-type sialoglycoprotein associated with tumor metastasis, malignant progression, and cancer stem cells. Recently, we revealed the existence of tumor specific glycan on PDPN. In this study, we showed that several glycosyltransferase genes are involved in the tumor specific glycan on PDPN. Furthermore, we investigated the potential role of noncoding RNA such as microRNAs in glycosyltransferase gene regulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：ポドプラニン、PDPN、腫瘍特異的糖鎖構造、糖転移酵素遺伝子、miRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 【ポドプラニン（PDPN）とは】①癌細胞上に存在している血小板凝集因子（ア

グラス）として遺伝子クローニングされた。②PDPN の血小板凝集活性中心（PLAG domain）に付加された糖鎖構造

によって血小板凝集活性が惹起されることを明らかにした。③リンパ管マーカーまたは Cancer Stem Cells もしくは Tumor-Initiating cells (TIC)と言われるがん幹細胞マーカーとして利用され始めている。

- (2) 【腫瘍特異的糖鎖構造について】①脳腫瘍の臨床的悪性度と相関して発現が上昇する糖鎖構造を発見した。②脳腫瘍細胞株、脳腫瘍組織において、PDPN が腫瘍特異的糖鎖構造付加を受けることを発見した。
- (3) 【転写後制御について】①PDPN 遺伝子が脳腫瘍細胞株において特定の miRNA 分子によって発現制御を受けることが報告された。②糖転移酵素遺伝子に関しては、発現制御解析の研究はほとんど行われていない。しかし、最近の見聞から細かな発現制御は miRNA などの noncoding RNA による転写後制御が担っていることが明らかにされつつある。すなわち、細胞の状況で多様に変化する糖鎖修飾のような生理現象が機能性 RNA による転写後制御を受けている可能性は非常に高いと推察される。

2. 研究の目的

ポドプラニン (PDPN) は、種々の腫瘍に高発現している糖タンパク質で、癌幹細胞群のマーカーとしても使用され始めている。最近、申請者らは PDPN の腫瘍特異的糖鎖修飾の存在を確実に示唆するデータを得た。そこで、この腫瘍特異的糖鎖修飾を担う糖転移酵素遺伝子群を特定し、これらの遺伝子発現制御機を micro RNA 等の noncoding RNA による転写後制御という観点から解析し、腫瘍特異的糖鎖構造の生合成制御機

構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究課題にて対象とする腫瘍特異的糖鎖構造の生合成を担うと考えられる糖転移酵素遺伝子は少なくとも4種類ある。酵素活性などから類推して10遺伝子ほどが候補となり得る。脳腫瘍細胞株にてこの構造の有無と候補遺伝子の発現量を精査し、どの遺伝子が生合成を担っているかを明らかとする。

- (1) 腫瘍特異的糖鎖構造の生合成を担う糖転移酵素遺伝子特定のため、フローサイトメトリーにて当該構造を発現している細胞株と発現していない細胞株の選定に取り組む。
- (2) 細胞株の候補糖転移酵素遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法で定量解析を行い、抗原発現パターンと遺伝子発現パターンからどの遺伝子がどのように鍵となっているかを推定する。
- (3) 前述の結果を併せ、候補遺伝子として特定した糖転移酵素遺伝子を標的とする miRNA 候補分子群をデータベースより予測する。
- (4) 予測された miRNA 候補分子群について、当該構造を発現している腫瘍細胞株と欠損している細胞株における存在を定量解析する。

以上の結果から各糖転移酵素遺伝子発現制御を担う miRNA 分子 (群) の絞り込みが可能となる。

4. 研究成果

本研究課題の成果については、以下のとおりである。

- (1) 腫瘍特異的糖鎖構造の生合成を担う糖転移酵素遺伝子特定のため、細胞株にお

ける当該構造を発現の有無を選定した。

- (2) 細胞株の候補糖転移酵素遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法にて定量解析を行い、抗原発現パターンと遺伝子発現パターンからどの糖転移酵素遺伝子が鍵となっているかを特定した。
- (3) 特定した糖転移酵素遺伝子を標的とする miRNA 候補分子群について、腫瘍細胞株における存在を定量解析した。今後、miRNA 発現実験や阻害実験などを用いて制御分子を絞り込み、制御機構の解明を行う。

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) Generation of a novel monoclonal antibody WMab-1 specific for IDH2-R172W mutation. Kato Y, Kaneko MK. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Apr 19;433(4):374-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.106. Epub 2013 Mar 20. 査読有り。
- (2) A novel monoclonal antibody GMab-m1 specifically recognizes IDH1-R132G mutation. Kato Y, Natsume A, Kaneko MK. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Mar 22;432(4):564-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.049. Epub 2013 Feb 26. 査読有り。
- (3) Establishment of novel monoclonal antibodies KMab-1 and MMab-1 specific for IDH2 mutations. Kaneko MK, Morita S, Tsujimoto Y, Yanagiya R, Nasu K, Sasaki H, Hozumi Y, Goto K, Natsume A, Watanabe M, Kumabe T, Takano S, Kato Y. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Mar 1;432(1):40-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.088. Epub 2013 Jan 31. 査読有り。
- (4) Chimeric anti-podoplanin antibody suppresses tumor metastasis through neutralization and antibody-dependent cellular cytotoxicity. Kaneko MK, Kunita A, Abe S, Tsujimoto Y, Fukayama M, Goto K, Sawa Y, Nishioka Y, Kato Y. Cancer Sci. 2012 Nov;103(11):1913-1919. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02385.x. 査読有り。
- (5) Podoplanin expression in advanced atherosclerotic lesions of human aortas. Hatakeyama K, Kaneko MK, Kato Y, Ishikawa T, Nishihira K, Tsujimoto Y, Shibata Y, Ozaki Y, Asada Y. Thromb Res. 2012 Apr;129(4):70-76. doi: 10.1016/j.thromres.2012.01.003. 査読有り。
- (6) Immunohistochemical Examination of Novel Rat Monoclonal Antibodies against Mouse and Human Podoplanin. Kaji C, Tsujimoto Y, Kato Kaneko M, Kato Y, Sawa Y. Acta Histochem Cytochem. 2012;45(4):227-237. https://www.jstage.jst.go.jp/article/ahc/45/4/45_12008/_article 査読有り。
- (7) Recombinant anti-podoplanin (NZ-1) immunotoxin for the treatment of malignant brain tumors. Chandramohan V, Bao X, Kato Kaneko M, Kato Y, Keir ST, Szafranski SE, Kuan CT, Pastan IH,

Bigner DD. Int J Cancer. 2013 May 15;132(10):2339-48. doi: 10.1002/ijc.27919. Epub 2012 Nov 23. 査読有り。

- (8) Immunohistochemical detection of IDH1 mutation, p53, and internexin as prognostic factors of glial tumors. Takano S, Kato Y, Yamamoto T, Kaneko MK, Ishikawa E, Tsujimoto Y, Matsuda M, Nakai K, Yanagiya R, Morita S, Tsuboi K, Matsumura A. J Neurooncol. 2012 Jul;108(3):361-73. doi: 10.1007/s11060-012-0837-0. 査読有り。

- (9) Detection of IDH1 mutation in human gliomas: comparison of immunohistochemistry and sequencing. Takano S, Tian W, Matsuda M, Yamamoto T, Ishikawa E, Kaneko MK, Yamazaki K, Kato Y, Matsumura A. Brain Tumor Pathol. 2011 Apr;28(2):115-23. doi: 10.1007/s10014-011-0023-7. 査読有り。

[学会発表] (計1件)

- (1) 金子美華、畠山金太、浅田祐士郎、加藤幸成、「動脈硬化巣における血小板凝集因子ポドプラニンの発現解析」、第78回日本生化学会東北支部例会、2012年5月26日、山形市、山形大学医学部大講義室。

[その他]

ホームページ等

東北大学大学院医学系研究科・地域イノベーション戦略支援プログラム

<http://www.med-tohoku-antibody.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 美華 (KANEKO MIKA)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：0032316