

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390078

研究課題名(和文)細胞膜糖脂質とリガンド分子との相互作用により生成されるシグナルの分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms for signals generated by the interaction between glycosphingolipids on the cell membrane and their ligands

研究代表者

古川 鋼一 (FURUKAWA, Koichi)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：80211530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞等の膜表面に発現する糖脂質が近傍の膜分子と相互作用することで生成されるシグナルの分子機構を解析し、その細胞形質制御における意義を明らかにすることで、細胞膜ミクロドメインを標的にした癌細胞制御の治療戦略構築の基盤情報を得ることを目指した。

そのために、EMARS/MSにより癌関連糖脂質に会合する膜分子の同定と機能解析を行った。メラノーマ細胞ではGD3に会合するneogeninを、ヒトグリオーマではGD2に会合するEphA2を、小細胞肺癌細胞では、GD2に会合するESCT2を同定した。さらにマウスグリオーマでは、GD3に会合するPDGF受容体alphaを同定し、各々の分子機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed cell signaling generated by the interaction between glycosphingolipids expressed on cancer cells and neighboring membrane molecules expressed in the vicinity of them, and aimed to apply the results in the construction of cancer therapeutic strategies targeting membrane microdomain leading to obtain fundamental information by clarifying the implication of the signals in the regulation of cell phenotypes.

In order to do so, we used Enzyme-mediated activation of radical sources (EMARS)/mass spectrometry, to identify the interacting molecules with cancer-associated glycolipids. In melanomas, we identified neogenin as a GD3-associated molecule, in human gliomas, EphA2 as a GD2 associated molecule, and in small cell lung cancers, ESCT2 was identified as a GD2-associated molecule. Furthermore, PDGF receptor alpha was also identified as GD3-associated molecule in murine glioma cells. Then, individual molecular functions of these membrane molecules have been investigated.

研究分野：生化学、糖鎖生物学

キーワード：糖脂質 細胞膜 ミクロドメイン シグナル リガンド 癌関連抗原

1. 研究開始当初の背景

これまで、癌細胞に特異的に発現する抗原の探索が広範に展開されて、その抗原分子の実体が明らかにされてきた。興味深いことに、それらの抗原分子の多くが複合糖質であり、とくにスフィンゴ糖脂質の糖鎖がエピトープになっていることが明らかになった。一方、この間、糖脂質糖鎖の合成に関わる糖転移酵素の遺伝子の単離と解析が進展して、癌細胞における癌関連糖鎖の発現制御と糖鎖リモデリングが展開されてきた。その成果として、癌関連糖脂質の発現によって、細胞増殖、浸潤、転移などの悪性形質が、糖脂質糖鎖の微細な変化により制御されることが示された。さらに、それらの糖鎖変化による細胞内シグナルの変異に関しても、一定程度明らかにされてきた。しかしながら、細胞膜の脂質外層にアンカーする糖脂質がいかに細胞内シグナルの制御に働くのかというメカニズムに関しては、ほとんど不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、癌細胞等の膜表面に発現する糖脂質が近傍の膜分子と相互作用することで生成されるシグナルの分子機構を解析して、糖脂質糖鎖のシグナルと細胞形質制御における意義を明らかにする。よって、細胞膜マイクロドメインを標的にした癌細胞の制御に基づく癌の新規治療戦略構築のための基盤情報を得ることを目指した。

3. 研究の方法

Enzyme-mediated activation of radical sources (EMARS) / 質量分析(MS):

癌関連糖脂質に膜上で会合する膜分子の同定のために、本家らが開発した EMARS/MS 解析を行った。そのために、メラノーマ、グリオーマ、小細胞肺癌などの細胞株を用いて、おもにガングリオシド GD3 または GD2 に対するモノクローナルを HRP で標識後、培養生細胞に結合させた。その培養液にアリルアジド-FITC を添加することで、GD3 周囲の膜分子

を FITC 標識した後、抗 FITC 抗体で免疫沈降を行い、FITC 標識分子を濃縮・精製した。その産物を、Orbitrap により質量分析を行って、各々の分子を同定した。同様に、グリオーマ、小細胞肺癌などにおいても、GD3 あるいは GD2 抗体を用いて類似の検討を行い、糖脂質近傍分子を同定した。

Neogenin の細胞内ドメインの解析:

Neogenin の細胞質ドメイン (Ne-ICD) につき、その生成機構を明らかにするために、プロレアーゼ阻害剤及び/又はガンマセクレターゼ阻害剤による処理後の細胞を用いて、Ne-ICD のレベルをイムノプロットングで検討した。

膜分子のマイクロドメインへの局在の解析:

同定された膜分子群の細胞内局在の検討のために、細胞株を Triton-X100 により溶解した後、スクロース濃度勾配超遠心法による分画を行った。5mL の分離液を 0.5mL ずつ分取した後、1-10 画分を用いてイムノプロットングを行い、バンドの出現位置を同定した。

膜分子と糖脂質の共局在の検討:

メラノーマでは GD3、neogenin、ガンマセクレターゼなどの同時染色を行い、形態学的にこれらの分子が細胞膜マイクロドメインに共局在するかどうかを検討した。共焦点顕微鏡を用いて観察を行った。また、GD2 と Eph2A (グリオーマ)、GD2 と ESC2 (小細胞肺癌) などのマイクロドメインへの共局在に関しても、同様に検討した。一方、マウスグリオーマにおいては、GD3 と PDGF 受容体 alpha 及び Src ファミリーキナーゼ Yes との3者の共局在につき検討した。

膜での複合体形成の解析:

おもに免疫沈降実験とイムノプロットングによって、糖脂質と近傍分子との物理的会合の有無を検討した。

細胞シグナルの解析:

糖脂質と近傍膜分子の複合体が生成するシグナルとして、Erk1/2、Akt などのリン酸化レ

ベル、S6 キナーゼのリン酸化、FAK、paxillin、p130Cas 等のチロシンリン酸化に焦点化して解析を行った。

4. 研究成果

EMARS/MS 分析によって癌関連糖脂質に会合する膜分子の同定と機能解析を種々の細胞系で行った。メラノーマ細胞に GD3 を標的とする EMARS を実施して、neogenin を同定し、その細胞質ドメイン (Ne-ICD) が種々の遺伝子の転写促進に働くことが示唆された。

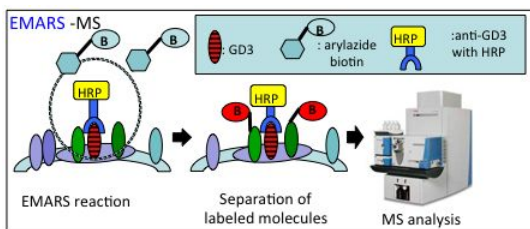


図1. EMARS/MSアプローチの概略

これらの結果から、GD3 発現がガンマセクレターゼ活性をマイクロドメインで増強して、NeICD の発現亢進と転写因子としての機能促進に働くことが明らかになった。

GEM/raft localization of neogenin

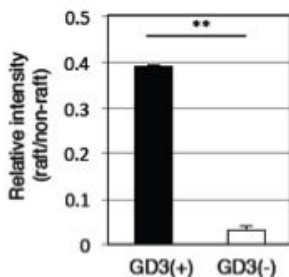


図2. Neogenin binds GD3 in GEM/rafts

また、ヒトグリオーマにおいては、GD2 に会合する EphA2 の同定、小細胞肺癌細胞においては、GD2 に会合するグルタミントランスポーター、ESCT2 を同定し、GD2 とのマイクロドメインへの共局在を明らかにした。また、ESCT2 阻害剤の添加によって、肺癌細胞の増殖度の著明な低下が観察された。さらにマウスグリオーマにおいては、GD3 に会合する PDGF 受容体 alpha を同定し、GD3、PDGFRalpha、Yes から成る 3 者複合体形成の可能性が示された。この複合体が paxillin を活性化して、グリオーマの浸潤性増強に働くことが示唆された。

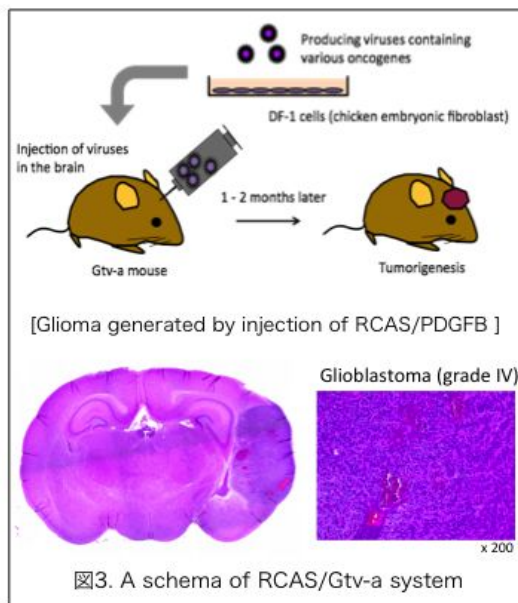


図3. A schema of RCAS/Gtv-a system

結論

京都大学の鈴木博士との共同研究により、GM1 など同種のガングリオシド糖脂質がホモダイマーを形成し易いことが、1 分子イメージングで示され、脂質ラフトの糖鎖特異的な heterogeneity と、その構築上の最小単位のスケールが示唆された。この結果は、糖鎖の差異によって、マイクロドメインの構成が異なることを示唆しており、その直接的な解明が待たれる。

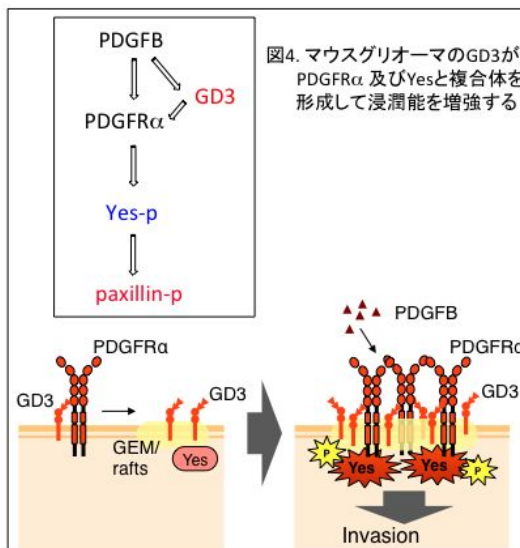


図4. マウスグリオーマの GD3 が PDGFRα 及び Yes と複合体を形成して浸潤性を増強する

これらの結果により、これまで腫瘍関連糖脂質として考えられてきたいくつかの糖鎖抗原の、具体的な作用機構が徐々に明らかになってきた。今後、これらの分子複合体を標的にした新規治療法の開発に向けて、一層の研究が求められている。

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 13 件)

1. Makino Y, Hamamura K, Takei Y, Bhuiyan RH, Ohkawa K, Ohmi Y, Nakashima H, Furukawa K, Furukawa K: A therapeutic trial of human melanomas targeting adaptor molecules activated under expression of ganglioside GD3: Combination of small interfering RNAs against p130Cas and paxillin. *Biochim. Biophys. Acta* 査読有 2016 pii: S0304-4165(16)30106-4. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.04.005.
2. Yamauchi Y, Iwamoto N, Rogers MA, Abe-Dohmae S, Fujimoto T, Chang CC, Ishigami M, Kishimoto T, Kobayashi T, Ueda K, Furukawa K, Chang TY, Yokoyama S. Deficiency in the Lipid Exporter ABCA1 Impairs Retrograde Sterol Movement and Disrupts Sterol Sensing at the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 査読有 290, 23464-23477, 2015 10.1074/jbc.M115.662668.
3. Bhuiyan RH, Kondo Y, Tokuda N, Mori R, Furukawa K, Furukawa K: Generation of monoclonal antibodies reactive with alpha-series gangliosides by immunization of complex ganglioside-deficient mice. *Glycobiology* 査読有 in press pii: cww049
4. Ohkawa Y, Momota H, Kato A, Hashimoto N, Tsuda Y, Kotani N, Honke K, Suzumura A, Furukawa K, Ohmi Y, Natsume A, Wakabayashi T and Furukawa K: Ganglioside GD3 enhances invasiveness via Yes activation by forming a complex of GD3/PDGFR α /Yes in gliomas. *J. Biol. Chem.* 査読有 290, 16043-16058, 2015 10.1074/jbc.M114.635755.
5. Ogawa M, Sawaguchi S, Kawai T, Nadano D, Matsuda T, Yagi H, Kato K, Furukawa K, Okajima T.: Impaired O-linked N-acetylglucosaminylation in the endoplasmic reticulum by mutated EGF domain-specific O-linked N-acetylglucosamine transferase found in Adams-Oliver syndrome. *J. Biol. Chem.* 査読有 290: 2137-2149, 2015 10.1074/jbc.M114.598821.
6. Ji S, Ohkawa Y, Tokizane K, Ohmi Y, Banno R, Furukawa K, Kiyama H, Furukawa K: b-series gangliosides regulate leptin secretion from adipocytes in lipid rafts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 459, 189-195, 2015 10.1016/j.bbrc.2015.01.143.
7. Furukawa K, Ohmi Y, Ohkawa Y, Tajima O, Furukawa K: Glycosphingolipids in the regulation of the nervous system. *Adv Neurobiol.* 査読有 9, 307-320, 2014 doi: 10.1007/978-1-4939-1154-7_14.
8. Ohmi Y, Ohkawa Y, Tajima O, Sugiura Y, Furukawa K, Furukawa K: Ganglioside deficiency causes inflammation and neurodegeneration via the activation of complement system in the spinal cord. *J. Neuroinflammation* 査読有 11:61. doi: 10.1186/1742-2094-11-61, 2014
9. Furukawa, K., Kambe, M., Miyata, M., Ohkawa, Y., Tajima, O., Furukawa, K.: Ganglioside GD3 induces convergence and synergism of adhesion- and hepatocyte growth factor/Met-signals in melanomas. *Cancer Science* 査読有 105, 52-63, 2014 doi: 10.1111/cas.12310.
10. Matsumoto, Y., Zhang, Q., Akita, K., Nakada, H., Hamamura, K., Tsuchida, A., Okajima, T., Furukawa, K., Urano, T., Furukawa, K.: Trimeric Tn antigen on Syndecan-1 binds to integrins and enhances cancer metastasis via dynamic changes of membrane microdomains. *J. Biol. Chem.* 査読有 288, 24264-24276, 2013 doi: 10.1074/jbc.M113.455006.
11. Kondo, Y., Tokuda, N., Nishitani, C., Ohto, U., Akashi-Takamura, S., Ito, Y., Uchikawa, M., Kuroki, Y., Miyake, K., Zhang, Q., Furukawa, K., Furukawa, K.: TLR4-MD-2 complex is negatively regulated by an endogenous ligand, globotetraosylceramide in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 査読有 110, 4714-4719, 2013 doi: 10.1073/pnas.1218508110.
12. Shibuya, H., Hamamura, K., Hotta, H., Matsumoto, Y., Nishida, Y., Hattori, H., Furukawa, K., Ueda, M., Furukawa, K.: Enhancement of malignant properties of human osteosarcoma cells with disialyl gangliosides GD2/GD3. *Cancer Science* 査読有 103, 1656-1664, 2012 doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02344.x.

13. Matsumoto, Y., Zhang, Q., Akita, K., Nakada H., Hamamura, K., Tokuda, N., Tsuchida, A., Matsubara, T., Hori, T., Okajima, T., Furukawa, K., Urano, T., Furukawa, K.: pp-GalNAc-T13 induces high metastatic potential of murine Lewis lung cancer by generating trimeric Tn antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 419, 7-13, 2012 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.086.

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 古川鋼一、大川祐樹、大海雄介、橋本登、古川圭子: 糖脂質糖鎖によるシグナルの制御のメカニズム. 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015, 12 月 4 日, 神戸ポートアイランドホテル、兵庫県、神戸
2. Nobutosi Esaki, Yuki Ohkawa, Yusuke Tuda, Kei Kaneko, Yusuke Ohmi, Noboru Hashimoto, Norihiro Kotani, Koichi Honke, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa: Functional analysis of GD2 associated molecules identified by EMARS in lung cancer cells. 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015, 12 月 2 日 神戸ポートアイランドホテル、兵庫県、神戸市
3. 古川鋼一、大川祐樹、橋本登、金子慶、小谷典弘、本家孝一、大海雄介、古川圭子: 癌関連糖鎖との協同作用により癌形質を発現する分子群の同定と作用機構. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015, 10 月 10 日、名古屋国際会議場、愛知県、名古屋市
4. 大川祐樹、百田洋介、加藤 彰、橋本登、津田雄介、江崎寛季、古川圭子、大海雄介、夏目敦至、若林俊彦、古川鋼一: ガングリオシド GD3 の発現はグリオーマの発生・進展を促進する. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015, 10 月 10 日、名古屋国際会議場、愛知県、名古屋市
5. 津田雄介、大川祐樹、橋本登、岩沢太司、古谷典弘、本家孝一、岡島徹也、古川圭子、古川鋼一: ガングリオシド GD3 と GD2 は EphA2 と関連することでヒトグリオブラストーマ細胞の悪性形質に寄与する. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015, 10 月 10 日、名古屋国際会議場、愛知県、名古屋市

6. 金子 慶、大川祐樹、橋本 登、大海雄介、山内祥生、岡島徹也、小谷典弘、本家孝一、古川圭子、古川鋼一: ヒト melanoma 細胞における Neogenin 細胞内ドメイン (NeICD) 標的遺伝子の同定. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015, 10 月 8 日、名古屋国際会議場、愛知県、名古屋市

7. 姫しゅうてい、大海雄介、大川祐樹、古川圭子、古川鋼一: レプチン分泌と脂質代謝における b 系列ガングリオシドの調節機能. 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 18 日 グランドプリンスホテル京都、京都府、京都市

8. 山口世堯、山内祥生、松本康之、橋本登、大海雄介、近藤裕史、古川圭子、古川鋼一: ガングリオシドによる APP 切断とその切断断片による酸化ストレス応答の制御. 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 18 日 グランドプリンスホテル京都、京都府、京都市

9. 金子慶、大川祐樹、橋本登、大海雄介、小川光貴、山内祥生、小谷典弘、本家孝一、古川圭子、古川鋼一: GD3 発現メラノーマにおける Neogenin の悪性形質創出メカニズム. 第 87 回日本生化学会大会 2014, 10, 17 グランドプリンスホテル京都、京都府、京都市

10. 小川光貴、澤口翔伍、中村直介、中山喜明、黒坂光、萬谷博、金川基、遠藤玉夫、古川鋼一、岡島徹也: CTDC2 はジストログリカンの O-Man に CTD110.6 抗体が認識する GlcNAc を修飾する. 第 87 回日本生化学会大会 2014, 10, 17 グランドプリンスホテル京都、京都府、京都市

11. 大川祐樹、百田洋之、加藤彰、橋本登、津田裕介、大海雄介、古川圭子、夏目敦至、若林俊彦、古川鋼一: ガングリオシド GD3 は PDGFR α と協調し Yes の活性化を介して細胞浸潤能を亢進させる. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014, 9 月 27 日、パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市

12. 津田裕介、大川祐樹、橋本登、岩沢太司、小谷典弘、本家孝一、古川鋼一: ヒトグリオーマ細胞のガングリオシド GD3 と GD2 の機能解析: EMARS 法を用いたガングリオシド関連分子の同定. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014, 9 月 27 日、パシフィコ横浜、神奈川県、

横浜市

13. 太田晃成、山内祥生、山口世堯、渡邊瑞基、古川圭子、上杉志成、古川鋼一：SREBPのプロセッシングを標的とした新規低分子化合物はメラノーマ細胞の悪性形質を抑制する。第73回日本癌学会学術総会 2014, 9月27日、パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市

14. 大川祐樹、百田洋之、加藤彰、古川圭子、夏目敦至、若林俊彦、古川鋼一：PDGFBによって発現誘導されるガングリオシドGD3はグリオーマ細胞の悪性形質を増強する。第72回日本癌学会学術総会 2013, 10, 5 パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市

15. 堀田宏司、浜村和紀、豊國伸哉、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関して、Lewis y 抗原の発現と振興期における消失。第72回日本癌学会学術総会 2013, 10, 5 パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市

16. 金子慶、大川祐樹、橋本登、大海雄介、山内祥生、小谷典弘、本家孝一、古川圭子、古川鋼一：GD3 発現ヒトメラノーマ細胞における Neogenin の役割。第72回日本癌学会学術総会 2013, 10, 4 パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市

17. 姫シュウテイ、大海雄介、大川祐樹、古川圭子、古川鋼一：脂肪細胞のレプチン分泌と褐色脂肪細胞におけるb系列ガングリオシドの調節機能。第86回日本生化学会大会 2013年9月14日 パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市

18. 土田明子、千田基弘、伊藤明宏、斉藤誠一、木曾真、安藤隆幸、アルデュイン-ルベル、水野真盛、古川圭子、古川鋼一：腎癌細胞株における分岐型ジシアリル糖鎖抗原の役割。第86回日本生化学会大会 2013年9月13日 パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市

19. 古川鋼一、近藤裕史、松本康之、古川圭子：複合糖質と糖鎖認識分子との相互作用の時空間的ダイナミクス。第86回日本生化学会大会シンポジウム 糖鎖がシグナル伝達を制御する原理 2013年9月13日 パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市

20. 金子慶、大川祐樹、橋本登、大海雄介、山内祥生、小谷典弘、本家孝一、古川圭子、古川鋼一：GD3 発現メラノーマの悪性形質における Neogenin の機能。第86回日本生化学会大会 2013年9月13日 パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市

21. 大海雄介、大川祐樹、姫シュウテイ、大平拓、田島織絵、古川圭子、古川鋼一：アストロサイトにおけるガングリオシド糖鎖の機能。第86回日本生化学会大会 2013年9月13日 パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市

〔図書〕(計 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/seika2/home.html>

or

<http://koichichubu.webcrow.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古川 鋼一 (FURUKAWA, Koichi)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号：80211530

(2)研究分担者

()
研究者番号：

(3)連携研究者

()
研究者番号：