

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：33910

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670141

研究課題名(和文)細胞膜スフィンゴ糖脂質と転写制御のリンクによる膜マイクロドメインの動的機能の解明

研究課題名(英文) Analysis of dynamic functions of membrane microdomains by linkage of glycosphingolipids on the cell membrane and transcriptional regulation

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：悪性メラノーマ細胞に特異的に発現するガングリオシドGD3と膜上で会合するネオジェニンとの相互作用が生成する、メラノーマの悪性形質増強機構を、ネオジェニンの細胞内ドメイン(Ne-ICD)に焦点化して解析した。プロテアーゼ阻害剤の添加時に、GD3+細胞で著明なNe-ICD発現が見られたが、このNe-ICDは、gamma-secretaseの阻害剤を加えると検出不能になったことから、GD3発現がgamma-secretaseを脂質raftにリクルートして、Ne-ICD産生を促進することが示唆された。ChIP-シーケンスにより、Ne-ICD標的遺伝子を同定し、Ne-ICDによる発現亢進を確認した。

研究成果の概要(英文)：Regulatory mechanisms by which interaction between GD3 and its associating molecule, neogenin on the cell surface of melanoma cells were analyzed with focus on the intracytoplasmic domain of neogenin (Ne-ICD). When a protease inhibitor was added to the culture medium, increased levels of Ne-ICD was detected in GD3+ cells, while it was hard to detect when a gamma-secretase inhibitor was added, suggesting that Ne-ICD was generated by recruiting gamma-secretase to lipid rafts by GD3 expression.

By ChIP-sequencing, target genes that are driver by Ne-ICD have been identified, and those genes have been up-regulated by the introduction of Ne-ICD cDNA.

研究分野：生化学、糖鎖生物学

キーワード：ガングリオシド 転写因子 セクレターゼ ミクロドメイン 脂質ラフト

1. 研究開始当初の背景

癌関連糖鎖抗原が多く同定されてきたが、その癌細胞における役割や作用機構の解析は不十分であった。我々は、Enzyme-mediated activation of radical sources (EMARS) 法と質量分析法を用いて、癌関連糖脂質に会合する膜分子の同定を行い、それらの作用機構の解析を進めてきた。

2. 研究の目的

悪性黒色腫(メラノーマ)細胞株を用いて、癌関連酸性糖脂質である GD3 に会合する膜分子として、neogenin が同定された。この分子は、もともと神経系細胞において repulsion 受容体として注目されてきたが、癌における役割に関しては、ほとんど知られていなかった。また、メラノーマ細胞の Triton-X100 抽出液のスクロース濃度勾配超遠心法にて分画した各フラクションを用いてイムノプロットングを行った結果、GD3 発現細胞のみで neogenin が脂質ラフトに局在することが判明した。そこで、GD3 と neogenin との分子間相互作用とそこで生成されるシグナルのメカニズムの解析を行った。とくに、neogenin の細胞内ドメインの生成と核内移行に基づく遺伝子発現の制御機能に焦点化した解析を行った。

3. 研究の方法

メラノーマ細胞株：ヒトメラノーマ SK-MEL-28 細胞株の GD3 欠損亜株である N1 細胞に、GD3 合成酵素遺伝子 (ST8SIA1) cDNA の発現ベクターを導入して G418 による選択後、GD3 発現株、GD3 非発現コントロール株を樹立した。

Neogenin 高発現株：neogenin 遺伝子の cDNA を RT-PCR にてクローニングした後、発現ベクターに挿入して、メラノーマ細胞株にリポフェクタミン 2000 を用いて導入した。

Neogenin ノックダウン：neogenin の cDNA 塩基配列から、3 種の siRNA を合成して、メラノーマ細胞に導入した。RT-qPCR、イムノプロットングにより、最も抑制効果の著明な siRNA を用いて、以下の実験を行った。

細胞増殖能の測定：

細胞増殖能は、メラノーマ細胞を 96-well plate に播種した後、MTT を添加し、数時間後に基質を加えて OD を測定して、相対的細胞数を測定した。

細胞浸潤能の測定：

メラノーマ細胞を 6-cm dish に播種して、ノックダウン、または cDNA 発現ベクター等を導入した後、ハーベストして細胞数の計測を行い Boyden chamber 法にてチャンバーの裏側に移動した細胞数を計測した。通常、上側チャンバーにマトリゲルを添加した後、細胞を加えて一日後に移動細胞の染色・カウントを行った。

Ne-ICD の検出、比較検討：

GD3+細胞、GD3-細胞における Ne-ICD の発現レベルを、イムノプロットングにより比較

検討した。その時に、1. プロテアソーム阻害剤及び/あるいはガンマセクレターゼ阻害剤を培養液に添加した条件下で、Ne-ICD の発現レベルを検討した。

GD3、ガンマセクレターゼ、neogenin の免疫細胞染色：

GD3、ガンマセクレターゼ、neogenin が脂質ラフトに共局在することを検討するために、GD3+、GD3- 細胞株を固定後、各々の抗体を用いて同時染色を行い、共焦点顕微鏡により観察を行った。

GD3 と Neogenin の会合の有無の検討：

GD3 と neogenin が、膜上で物理的に会合するか否かを、免疫沈降実験により解析した。GD3+細胞、GD3-細胞からの lysate に対し、抗 GD3 抗体、あるいは抗 neogenin 抗体により免疫沈降を行った後、沈降物を SDS-PAGE で分離して PVDF 膜にプロットした。次に、抗 neogenin 抗体あるいは抗 GD3 抗体を用いてイムノプロットングを行った。免疫沈降用の抗体のコントロールとして、正常 IgG を用いた。また、抗 neogenin 抗体による沈降物に対して、抗 GM3 抗体を用いたイムノプロットングを行い、GD3-neogenin の会合の特異性の対照とした。

Ne-ICD の過剰発現の影響の検討：

Ne-ICD の機能解析のため、Ne-ICD の cDNA 発現ベクターを作製して、メラノーマ細胞に導入した時の細胞形質を比較検討した。

Ne-ICD の標的遺伝子の同定：

Ne-ICD の転写因子としての標的遺伝子を明らかにするために、ChIP-シーケンス実験を行った。メラノーマ細胞からゲノム DNA を抽出して、超音波処理による断片化を行った。その後、抗 Ne-ICD 抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降物から DNA を分離後、TA クローニングを行った。得られクローンの塩基配列を解析して、Ne-ICD が結合する DNA を同定した。標的遺伝子の Ne-ICD による発現制御：

GD3+細胞、GD3-細胞に対して、Ne-ICD を導入した時の上記遺伝子の発現レベルを、RT-qPCR により比較検討を行った。

4. 研究成果

GD3+メラノーマ、GD3-メラノーマ細胞株の形質確認実験では、GD3+ 2 株、GD3- 2 株の細胞増殖能、浸潤能を比較して、GD3 発現がメラノーマの悪性形質を増強することを確認した。

これらの細胞株を用いて、neogenin の発現レベルを解析したところ、mRNA、タンパク質のレベルともに、GD3+細胞、GD3-細胞間に Neogenin レベルの差がないことが明らかになった。

次に Neogenin ノックダウンを行い、著明な発現抑制効果を示す siRNA を同定した。これを用いて neogenin をノックダウンした時のメラノーマ悪性形質を比較検討したところ、neogenin ノックダウン細胞は有意に増殖の抑制と浸潤能の低下を示した。とくに細胞浸

潤能においては、neogenin のノックダウンで著明な低下が認められた。

GD3+細胞、GD3-細胞における Ne-ICD の発現の検出、比較検討を行った。1. プロテアソーム阻害剤及び/あるいはガンマセクレターゼ阻害剤を培養液に添加した時の、Ne-ICD の発現レベルを検討したところ、無処置細胞では Ne-ICD を検出することが困難であったが、プロテアーゼ阻害剤による処置ではじめて neogenin の明確なバンドが現れ、GD3+細胞で明らかに強いバンドが認められた。一方、細胞をガンマセクレターゼ阻害剤で処理した時には、Ne-ICD のバンドは全く検出できなかった。即ち、Ne-ICD がガンマセクレターゼで切断されて本分子から遊離することが示唆された。また、GD3 の発現下で、ガンマセクレターゼが脂質ラフトに移動して、脂質ラフトに移行した neogenin からの Ne-ICD 遊離に働くことが示唆された。

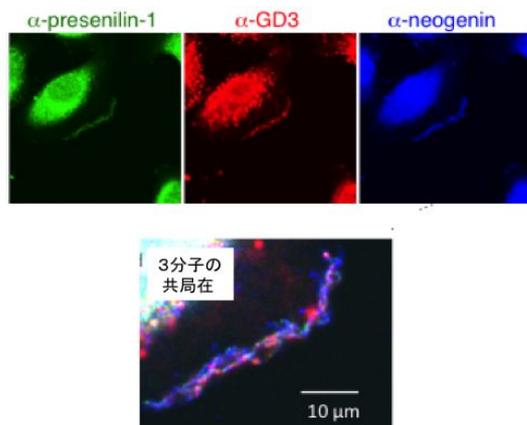


図 1. GD3、プレセニリン、neogenin の細胞膜での共局在を、同時免疫染色で示す。

これらの結果は、GD3、プレセニリン(ガンマセクレターゼ)、neogenin の同時免疫染色でも明瞭に示された(図 1)。

次に、GD3 と Neogenin の会合の有無を検討した。

GD3 と neogenin が、膜上で物理的に会合するか否かを、免疫共沈降実験により解析した。即ち、GD3+細胞、GD3-細胞からの lysate に対し、抗 neogenin 抗体により免疫沈降を行った後、沈降物を SDS-PAGE で分離して PVDF 膜にプロットした膜を用いて、抗 GD3 抗体によるイムノプロットングを行った。正常 IgG による沈降物に GD3 は検出されなかったが、neogenin 抗体を用いた沈降物には GD3 が検出された。GM3 は検出されず、neogenin と会合する糖脂質は GD3 のみであることが示された。

Ne-ICD の過剰発現の影響の検討：

Ne-ICD の機能解析のため、Ne-ICD の cDNA 発現ベクターを作製して、メラノーマ細胞に導入した時、明らかな増殖能の亢進、浸潤能の増強が示され、Ne-ICD 自身がメラノーマ細胞の悪性形質を正に制御することが示唆された。

Ne-ICD の標的遺伝子の同定：

Ne-ICD の転写因子としての標的遺伝子を探るために、ChIP-シーケンスを行った。メラノーマ細胞から抽出したゲノム DNA を断片化した後、抗 Ne-ICD 抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降物中の DNA を TA クローニングした。ここで得られたクローンのシーケンスの結果、Ne-ICD が結合する DNA を 20 種以上同定した。

標的遺伝子の Ne-ICD による発現制御：

GD3+細胞、GD3-細胞に対して、Ne-ICD を導入した時の各遺伝子の発現レベルを、RT-qPCR により比較検討したところ、約半数の遺伝子で明らかな発現レベルの上昇を認めた。

結論：

以上の結果、EMARS 法で同定した GD3 近傍膜分子 neogenin が、実際にガングリオシド GD3 に会合して、neogenin そしてガンマセクレターゼを脂質ラフトにリクルートすることが、強く示唆された。さらにその結果、GD3 発現によってガンマセクレターゼの活性亢進が誘導され、neogenin の細胞質ドメイン (Ne-ICD) を切断・遊離することで、Ne-ICD が核内移行して転写因子として種々の遺伝子の発現誘導に働くことが示唆された(図 2)。これらの結果は、これまでメラノーマ関連糖脂質として知られてきた GD3 の、メラノーマの悪性形質増強における具体的な作用メカニズムの一端を明らかにした点で画期的な成果である。

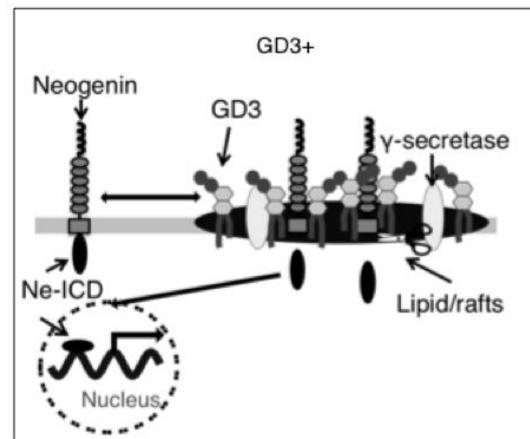


図 2. GD3 発現によって neogenin が脂質ラフトに移行すると同時にガンマセクレターゼの移動、活性化を誘導して、Ne-ICD の生成と転写活性亢進に至るプロセスを示した。

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 7 件)

1. Furukawa K, Ohkawa Y, Matsumoto Y, Ohmi Y, Hashimoto N, Furukawa K: Regulatory Mechanisms for Malignant

Properties of Cancer Cells with Disialyl and Monosialyl Gangliosides. In Glyco-signals in Cancer, 査読有、Eds by K. Furukawa, and M. Fukuda, Springer, 2016

2. Yamamura, Y., Asai, N., Enomoto, A., Kato, T., Mitsui, S., Kodo, Y., Ushida, K., Ichihara, S., Furukawa, K., Maeda, K., Murohara, T., Takahashi, M.: Akt signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression via Girdin phosphorylation. *Cancer Res.* 査読有、75, 813-823, 2015 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1317.

3. 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 doi: 10.1074/jbc.M114.635755.

4. Furukawa, K., Ohmi, Y., Kondo, Y., Ohkawa, Y., Hashimoto, N., Tajima, O., Furukawa, K.: The role of glycosphingolipids in lipid rafts: lessons from knockout mice. In **Lipid Rafts: Properties, controversies and roles in signal transduction.** 査読有、Ed. by Dan Sillence, pp1-20, Nova Science Publishers, London, 2014

5. 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.

6. 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.

7. 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.

〔学会発表〕(計 10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 BMB2015 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 2015, 12月4日、神戸ポートアイランドホテル、兵庫県、神戸市

2. 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:癌関連連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. 2015, 10月10日第74回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、愛知県、名古屋市

3. Robiul H. Bhuiyan, Yuji Kondo, Tokiaki, Yamaguchi, Noriyo Tokuda, Yuki ohkawa, Yuhsuke Ohmi, Yoshio Yamauchi, Keiko Furukawa, Tetsuya Okajima, Koichi Furukawa: Expression and roles of asialo-series gangliosides in human cancer cell lines. 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

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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

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, 10月18日、グランドプリンスホテル京都、京都府、京都市

9. 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：GTDC2 は α 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月17日、グランドプリンスホテル京都、京都府、京都市

10. 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月17日、グランドプリンスホテル京都、京都府、京都市

〔図書〕(計 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〕
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：