

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430153

研究課題名(和文) 脂質ラフトをターゲットとした腎癌に対する新規分子標的治療の構築

研究課題名(英文) Development of a new molecular targeted therapy focused on lipid rafts for renal cell carcinoma

研究代表者

川崎 芳英 (Kawasaki, Yoshihide)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80722256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：腎癌細胞の増殖、浸潤および転移の過程において、転移と関係が示唆されるDSGb5糖鎖を同定してきた。この糖鎖は腎癌細胞表面に単独で存在するのではなく、細胞二重膜に浮かぶ脂質を多く含んだ筏(lipid raft)の構成分子として存在する。このlipid raftが腎癌の新規治療のターゲットなり得るかを検証した。その結果、DSGb5糖鎖の発現により腎癌細胞が増殖能を亢進させることを明らかにした。また、臨床検体を用いた検証にて、DSGb5高発現症例で血管侵襲が多く、予後不良であることを明らかにした。以上から、DSGb5糖鎖を含むlipid raftが治療のターゲットなり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have focused on the role of glycolipid on renal cancer cells in terms of their ability of proliferation and motility. And in our past study, we have identified new glycolipid DSGb5 which was associated to cancer metastasis. Our past data also showed that DSGb5 was one of elements of lipid rafts (like floating) on lipid bilayer membrane of renal cancer cells. However, it was not known that lipid rafts including DSGb5 could be the therapeutic target of renal cancer. In this study we demonstrated that the high expression of DSGb5 promoted proliferation of renal cancer cells. Moreover, we elucidated that the high expression of DSGb5 was associated to vessel invasion of renal cancer caused to poor prognosis by investigating clinical specimens. According to our results lipid rafts including DSGb5 could be the therapeutic target with new mechanism employing glycobiological approach for advanced renal cancer.

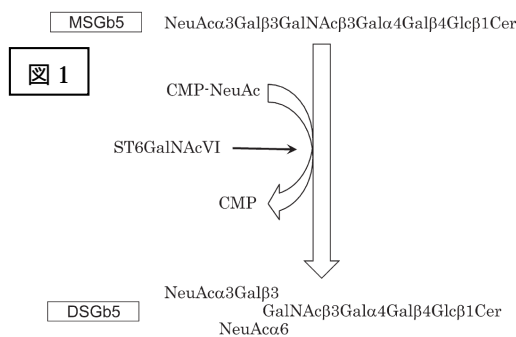
研究分野：泌尿器生殖器癌

キーワード：DSGb5 腎癌 糖脂質 糖鎖

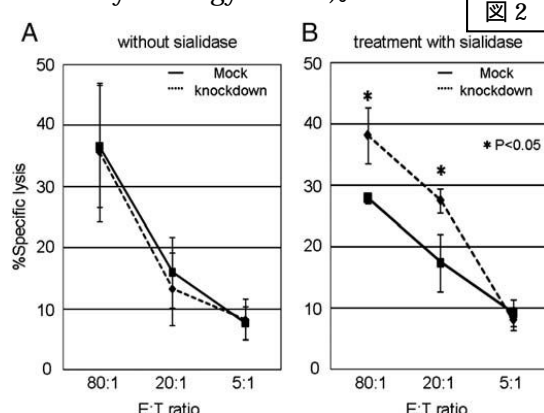
1. 研究開始当初の背景

細胞に発現する糖鎖は、細胞間相互認識・接着・運動など多岐にわたって重要な役割を担っており、癌細胞の増殖・浸潤・転移のプロセスにおいて、Key molecule として果たす糖鎖の役割が、近年注目されている。申請者らの行ってきた泌尿器癌での糖鎖抗原の研究から、腎癌において GM3 よりも長鎖のガングリオシドの発現増加が転移と関連があるというデータを得ていくつかのガングリオシドを同定してきている(Saito S. J Biol Chem. 1994, Ito A. J Biol Chem. 2001)。DSGb5 糖鎖も新規構造物として報告した糖鎖の一つであり、この糖鎖に対するモノクローナル抗体を作成して、腎癌組織免疫染色を行った結果、腎癌の転移との関連を示唆するデータが得られている (Ito A. Glycoconjugate J. 2001)。

糖鎖は、糖鎖を付加する酵素によって伸長・合成されており、申請者らは、DSGb5 糖鎖合成酵素遺伝子(ST6GalNAcVI)を同定している (Senda M, Ito A. Biochem J.2007) (図1)。



この ST6GalNAcVI に対する siRNA を腎癌細胞に導入することで、DSGb5 糖鎖 Knock down 細胞が作成可能となり、これを用いることで、DSGb5 糖鎖の機能的役割を解析することが可能となった。その結果、細胞表面上の DSGb5 糖鎖が natural killer(NK)細胞上の糖鎖認識蛋白(Siglec7)と作用して、NK 細胞の障害活性を抑制しているという知見が得られている(Kawasaki Y, Ito A. Glycobiology. 2010)。



ただ、NK 細胞の制御にはシアル酸の制御が必要であることがわかった。図2に示すように、NK 細胞にシアリダーゼ処置を施すこ

とにより、DSGb5 を Knock down した腎癌細胞に対する殺細胞効果の増強が得られることを証明した。さらに、Knock down 細胞とコントロール(mock)細胞とを比較検討したところ、DSGb5 糖鎖発現によって、細胞運動と細胞増殖が亢進していることが判明した。すなわち、DSGb5 糖鎖は、細胞外においてはNK 細胞活性を抑制し、細胞内では、増殖・運動に関与していることが明らかとなった。

2. 研究の目的

これまで行ってきた糖鎖抗原発現と腎癌の臨床像との比較検討の結果、DSGb5 糖鎖の発現が腎癌の転移と関連するデータが得られ、DSGb5 糖鎖が、腎癌細胞の Glucose uptake を調節し、細胞運動能や増殖能に影響を及ぼすという知見が得られている。もともと腎癌では、Glucose transporter の中でも Glut-1 を強く発現しており、Glut-1 が腎癌悪性化進展に関与していることが知られていることから、DSGb5 糖鎖が Glut-1 による Glucose uptake に関与しているものと推察される。そこで本研究では DSGb5 糖鎖と Glut1 の相互作用を詳細に解明し、DSGb5 糖鎖と Glut-1 の機能を制御することで、今までにない新しい機序から腎癌治療にアプローチすることが可能と考えられ、腎癌の新しい分子標的治療に向けた可能性が期待される。

3. 研究の方法

- (1) DSGb5 糖鎖と Glut1 の相互作用を詳細に解明するために、細胞膜脂質ラフト上での DSGb5 と Glut1 発現解析し、脂質ラフト上での DSGb5 発現変化による Glut1 の機能変化を調べる。
- (2) DSGb5 糖鎖合成酵素遺伝子 (ST6GalNAcVI) に対する siRNA を腎癌細胞に導入して作成した DSGb5 糖鎖 Knock down 細胞を用いて、Glut-1 の細胞表面での発現状態の変化を調べる。
- (3) ノードマウスに DSGb5 発現腎癌細胞を移植して、腎癌マウスモデルを作成し、DSGb5 糖鎖 Knock down 細胞でのマウスでの増殖および浸潤状態を比較検討する。さらに、Glut-1 を siRNA 法で Knockdown するか抑制抗体などを添加することで、腎癌マウスモデルでの抗腫瘍効果を検討し、将来の新しい分子標的治療への応用の可能性を探る。

DSGb5 糖鎖合成酵素遺伝子 (ST6GalNAcVI) に対する siRNA を腎癌細胞に導入して作成した DSGb5 糖鎖 Knock down 細胞では、Glucose uptake の低下が観察されている。そこで、DSGb5 糖鎖 Knock down 細胞と control 細胞を比較して、Glut-1 発現の変化および Glut-1 の細胞表面での発現状態の変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、細胞膜から脂質ラフト分画を分離して、ラフト上での変化を解析する。DSGb5 糖鎖 Knock down 細胞では、何らかの機序により Glut-1 による Glucose

uptake の低下を来していると予想される。そこで、DSGb5 糖鎖発現低下による Glut-1 の glucose uptake 低下経路の詳細を解析し、さらに、glucose uptake 低下による細胞運動の低下について解析する。

4. 研究成果

これまでの研究で、腎癌細胞の増殖、浸潤および転移の過程において、糖鎖の果たす役割に着目してきた。腎癌の転移と関連が示唆される糖鎖が、本研究の key molecule である DSGb5 である。DSGb5 糖鎖が細胞表面にリピッドラフト (lipid raft) を構成する重要な molecule であり、DSGb5 糖鎖の発現と腎癌細胞のふるまいについて検証してきた。

昨年度、論文報告をし (Kawasaki Y. Tohoku Journal of Experimental Medicine 2015)、腎癌細胞における DSGb5 の役割とその発現目力ニズムについて詳細を解析した。

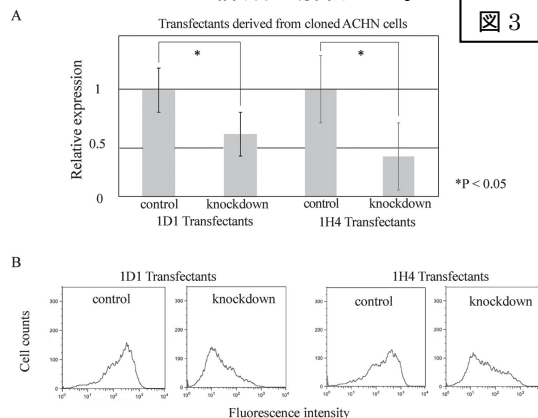
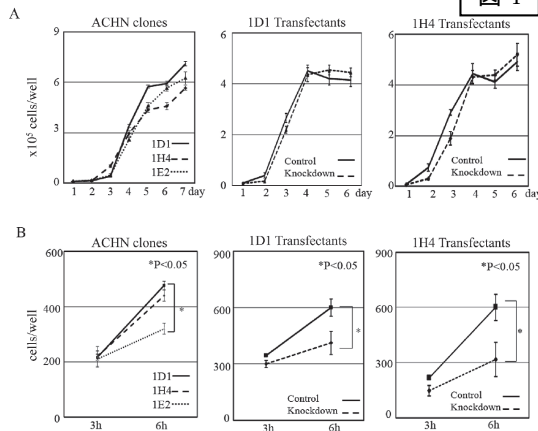


図 3

図 3 の A では、DSGb5 を高発現している腎癌細胞株の 2 つを Knock down し、DSGb5 の発現の低下を確認している。図 3 の B では、DSGb5 の Knock down により、MSGb5 の発現が増強していることを示している。つまり、図 1 で示す DSGb5 の合成経路からわかるように DSGb5 の Knock down 細胞は MSGb5 高発現細胞ということになる。DSGb5 高発現 MSGb5 低発現細胞と MSGb5 高発現 DSGb5 低発現細胞にて、増殖と運動の解析結果を図 4 (図 4A は proliferation assay、図 4B は motility assay) に示す。

図 4

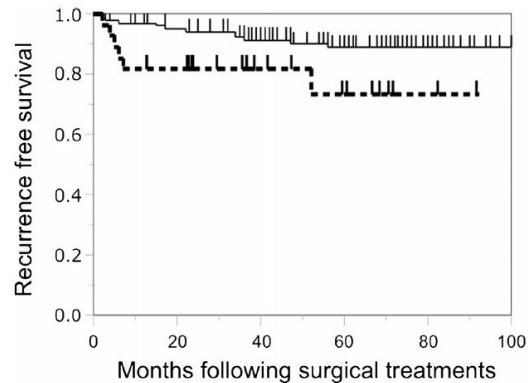


MSGb5 の発現の高低は腎癌細胞の増殖や運動に影響を与えず、DSGb5 の高低は運動に影

響を与えることが確認された。この論文の結果に基づき、さらに検証のため臨床検体を用いた研究をおこなった。パラフィンブロックにおける DSGb5 による免疫染色を確立し、対象症例の免疫染色において、DSGb5 高発現と低発現では、組織型・腫瘍径・pT stage・Grade などに差がないことを確認した。しかし、DSGb5 高発現症例で有意に血管侵襲を多く認めた。このデータは、DSGb5 の高発現は腎癌細胞の運動能亢進させることを示した図 4 のデータが裏付けるものであった。術後平均観察期間 51 か月において、対象症例のうち 18 例 (12%) に転移を認めた。転移発現までの中央値は、DSGb5 低発現症例で 51 ヶ月であったが、高発現症例で 38 ヶ月と早期に転移を認めた。5 年無増悪生存率は DSGb5 低発現症例で 89%、高発現症例で 73%であり、高発現症例で予後不良であることが明らかになった (図 5)。この結果を論文報告した (Itoh J. Glycoconj J. 2017)。基礎実験と臨床検体を用いた研究より、DSGb5 糖鎖を含む腎癌細胞上のリピッドラフトが新規治療のターゲットなりうることを明らかとした。

現在、リピッドラフトに含まれる DSGb5 以外の糖脂質やタンパク質を定量しており、動物実験モデルの作成も計画している。さらに、リピッドラフトのターゲットとなり得る、抗 DSGb5 抗体を含め、いくつかの抗体の同定をしており、本研究の発展により根治切除不能および転移性腎癌の診療に貢献できることを願っている。

図 5



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 2 件)

Jun Itoh, Akihiro Ito, Shuichi Shimada, Yoshihide Kawasaki, Narihiko Kakoi, Hideo Saito, Koji Mitsuzuka, Mika Watanabe, Makoto Satoh, Seiichi Saito and Yoichi Arai: Clinicopathological significance of ganglioside DSGb5 expression in renal cell carcinoma. Glycoconj J (2017) 34:267–273 (査読あり) DOI: 10.1620/tjem.236.1.

Yoshihide Kawasaki, Akihiro Ito,

Narihiko Kakoi, Shuichi Shimada, Jun Itoh, Koji Mitsuzuka and Yoichi Arai: Ganglioside, Disialosyl Globopentaosylceramide (DSGb5), Enhances the Migration of Renal Cell Carcinoma Cells. Tohoku J. Exp. Med., 2015, 236, 1-7 (査読あり) DOI: 10.1007/s10719-017-9763-x

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 伊藤淳、伊藤明宏、嶋田修一、川崎芳英、梶井成彦、佐藤友紀、三塚浩二、齋藤英郎、佐藤信、齋藤誠一、渡辺みか、荒井陽一：「腎癌における DSGb5 糖鎖発現の臨床的意義」、第 26 回泌尿器科分子・細胞研究、2017/03/11、大分市(ソレイユ大分)
- (2) 伊藤淳、伊藤明宏、嶋田修一、川崎芳英、梶井成彦、渡辺みか、佐藤信、荒井陽一：「Clinicopathological significance of Ganglioside DSGb5 expression in renal cell carcinoma」、Advancements in Urology 2017、2017/01/12、San Diego, USA
- (3) 伊藤淳、伊藤明宏、嶋田修一、川崎芳英、梶井成彦、佐藤友紀、三塚浩二、渡辺みか、荒井陽一：「腎癌における DSGb5 糖鎖発現の臨床病理学的意義」、第 54 回日本癌治療学会学術集会、2016/10/21、横浜市(パシフィコ横浜)
- (4) 伊藤淳、伊藤明宏、嶋田修一、川崎芳英、梶井成彦、佐藤友紀、三塚浩二、渡辺みか、荒井陽一：「腎癌における DSGb5 糖鎖発現の臨床的意義」、第 81 回日本泌尿器科学会東部総会、2016/10/8、青森市(ホテル青森)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

6. 研究組織
(1) 研究代表者
川崎 芳英 (KAWASAKI, Yoshihide)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：80722256

(2) 研究分担者
伊藤 明宏 (ITO, Akihiro)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：70344661
三塚 浩二 (MISTUZUKA Koji)
東北大学・病院・講師
研究者番号：80568171
佐藤 信 (SATO Makoto)
東北大学・医学系研究科・非常勤講師
研究者番号：70282134

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者
伊藤 淳 (ITO, Jun)
東北大学・医学系研究科・大学院生