

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460404

研究課題名(和文) 微小環境因子による炎症反応と癌関連糖鎖合成酵素遺伝子の発現誘導機構及び意義の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms for inflammatory responses and expression of cancer-associated glycosyltransferase genes by microenvironment factors, and their implications

研究代表者

古川 圭子 (FURUKAWA, Keiko)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：50260732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：メラノサイト及びメラノーマ細胞のガングリオシド糖鎖合成酵素遺伝子の発現レベルを解析した結果、GD3合成酵素遺伝子の発現がメラノーマで高く、メラノサイトでは非常に低かった。しかし、メラノサイトではTNF α 刺激とcAMP刺激除去によりその遺伝子の発現上昇が認められ、TNF α とcAMPを介したシグナルがGD3合成酵素遺伝子の発現を正反対に制御することが示唆された。

一方、これらの処理によりメラノーマ細胞ではGD3合成酵素遺伝子発現の変動はなく、IKK阻害剤によりその発現は著しく低下した。従って、癌関連糖鎖合成酵素遺伝子の発現制御はメラノサイトとメラノーマでは異なることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： We analyzed expression and regulatory mechanisms for glycosyltransferase genes responsible for ganglioside synthesis in normal melanocytes and melanoma cells. Consequently, the expression level of GD3 synthase gene was high in melanoma cells, although very low in melanocytes. We also found that addition of TNF α into the culture medium and elimination of cAMP from the culture medium resulted in up-regulation of GD3 synthase gene, suggesting that signals mediated via TNF α and cAMP oppositely regulate GD3 synthase gene expression in melanocytes.

On the other hand, when melanoma cells were treated by these factors, no fluctuation in the expression level of GD3 synthase gene, although GD3 synthase gene expression was remarkably decreased by treatment of IKK-inhibitor, Wedelolactone. These results suggested that ganglioside synthase genes are regulated in distinct manners between melanocytes and melanomas.

研究分野：生化学

キーワード：糖鎖合成酵素遺伝子 酸性スフィンゴ糖脂質 メラノサイト メラノーマ TNF cAMP IKK阻害剤

1. 研究開始当初の背景

癌細胞の悪性形質における酸性スフィンゴ糖脂質の関与については多数の報告がある。近年ではヒト乳癌の癌幹細胞に酸性糖脂質 GD2 の発現が認められることが報告された (J. Clin. Invest. 122:2066-78, 2012)。また、ヒト乳癌や肺癌細胞では GD2 により癌細胞の悪性形質が増強することも報告されている (Oncogene 25: 6924-35, 2006; Glycobiology 22:806-16, 2012)。これまでに私達は、細胞膜に存在する癌関連糖脂質が細胞シグナルを調節して増殖、分化、死などの細胞運命決定に関わることを明らかにした。しかし、これらの研究は酸性糖脂質欠損細胞に各種の糖鎖合成酵素遺伝子を導入して、細胞形質の変化を比較検討してきたため、正常細胞から癌への発生に至る時の糖鎖およびその合成酵素遺伝子の検討はなされてこなかった。そこで、正常細胞であるヒトメラノサイトと癌細胞のメラノーマの両者間で糖脂質糖鎖と、その合成酵素遺伝子発現プロファイルを比較検討した結果、両者間で著明な差異が認められた。

一方、種々の環境因子やストレスあるいは病原体感染などによる慢性的な炎症反応が細胞癌化の要因となることが明らかになってきた。また、腫瘍の発生において、その周囲の線維芽細胞や間質細胞および基質などの微小環境との相互作用の重要性が多数報告されている。メラノサイトが存在する皮膚組織の主たる構成細胞であるケラチノサイトは紫外線 (UV) B 照射により TNF α などの炎症性サイトカインを産生することが報告されている。そこで、TNF α 含有培養液でメラノサイトを培養したところ、GD3 および GD3 合成酵素遺伝子の発現レベルが上昇した。しかし、メラノサイト自身の UV 刺激では発現変化が認められなかった。

皮膚組織ではメラノサイト周辺のケラチノサイト、線維芽細胞、免疫系細胞、間質細胞

などが環境ストレスに対する応答として、細胞の活性化や炎症反応が惹起され、微小環境内に様々な刺激因子を放出している。これらの微小環境とメラノサイト自身の反応の総和として、個々の糖鎖合成酵素遺伝子の活性化/不活性化が起こり、癌化への要因の一つとなることが想定される。

2. 研究の目的

癌細胞の悪性形質における酸性スフィンゴ糖脂質の関与については多数の報告がある。近年ではヒト乳癌の癌幹細胞に酸性糖脂質 GD2 が認められることも報告された。私達は、ヒトメラノーマでは酸性スフィンゴ糖脂質 GD3 が発現し、癌性形質を増強することを分子レベルで解明してきた。これらの知見を活かし、本研究では、(1) サイトカインや増殖因子で刺激したメラノサイトとメラノーマ細胞における糖鎖と糖鎖合成酵素遺伝子群の発現レベル及び発現制御機構を比較検討し、微小環境因子による炎症から細胞癌化に至る初期過程の分子指標を明らかにする。(2) 細胞外小胞であるエクソソームに含有される糖脂質組成及び糖鎖合成酵素遺伝子群を解析し、メラノサイトと微小環境間の情報伝達と炎症及び癌化過程におけるエクソソームの意義を明らかにする。将来的には上記の知見を癌の診断応用に役立てる。

3. 研究の方法

(1) 市販のヒトメラノサイト (Thermo Fisher Scientific) は、メラノサイト用培養液で培養した後に 7.5% fetal bovine serum, penicillin-streptomycin, dibutyryl cAMP (dcAMP), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Na₃VO₄ 及び PMA を含む Ham's F-10 培養液で 1 週間以上培養した。

(2) mRNA の発現レベルは、Reverse Transcription - Real time PCR で定量した。

(3) タンパク質のリン酸化は Western Blotting を行い、Image Quant LAS4000™ (GE

Healthcare)により解析した。

4. 研究成果

(1) 私達は、UVB 照射したケラチノサイトの培養上清によりメラノサイトにおいて GD3 合成酵素遺伝子の発現が上昇することを明らかにした。また、その培養上清中の TNF α と IL-6 が GD3 合成酵素遺伝子の発現を誘導する因子であることも明らかにした。更に私達は、培養液中から dibutyryl cyclic AMP (dcAMP) を除去することによっても GD3 合成酵素遺伝子の発現レベルが上昇することを明らかにした。

(2) 細胞内の cAMP を上昇させるホルモンの α -MSH の添加により、dcAMP 除去により上昇した GD3 合成酵素遺伝子の発現は減少した。そこで、私達は、GD3 合成酵素遺伝子発現における cAMP 伝達系の下流シグナルの役割を明らかにするために、PKA 阻害剤である H89 を用いて、GD3 合成酵素遺伝子の発現レベルに及ぼす PKA の影響を検討した。その結果、H89 により GD3 合成酵素遺伝子の発現レベルは明らかに上昇し、cAMP-PKA シグナル経路により GD3 合成酵素遺伝子の発現は抑制されることが明らかになった。即ち、メラノサイトでは TNF α と cAMP を介したシグナルが GD3 合成酵素遺伝子の発現を正反対に制御していることが示唆された。

一方、これらの処理によりメラノサイトの GM2/GD2 合成酵素及び GM1/GD1b 合成酵素遺伝子の発現レベルは影響されなかった。

(3) メラノーマ細胞株では常に GD3 合成酵素遺伝子の発現レベルは高く、上記の試薬や TNF α を用いてメラノーマ細胞を処理したが、GD3 合成酵素遺伝子の発現レベルは影響されなかった。しかし、メラノーマ細胞では、TNF α 受容体の下流にある IKK の阻害剤 Wedelolactone (WDL) により GD3 合成酵素遺伝子の発現は著しく低下した。

(4) Western blotting により IKK のリン酸化を検討した結果、メラノーマ細胞では無刺激

状態でも IKK のリン酸化バンドが検出され、IKK 阻害剤の WDL によりリン酸化は抑制された。従って、メラノーマ細胞では TNF α の刺激がなくても恒常的に NF- κ B シグナル経路が活性化し、GD3 合成酵素遺伝子及び GD3 の発現が認められるものと推察された。

以上の結果から、ガングリオシドの糖鎖合成酵素遺伝子の発現制御は、メラノサイトとメラノーマでは明らかに異なることが明らかになった。また、エクソソームについては、現在、GD3 発現細胞及び GD3 非発現細胞のエクソソームを調製し、各々の構成分子を比較検討中である。

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 11 件)

1. Esaki N., Ohkawa Y., Hashimoto N., Tsuda Y., Ohmi Y., Bhuiyan R H., Kotani N., Honke K., Enomoto A., Takahashi M., Furukawa K., Furukawa K.: ASCT2 defined by enzyme-mediated activation of radical sources enhances malignancy of GD2-positive small cell lung cancer. *Cancer Science* 109, 141-153, 2018 査読有 DOI: 10.1111/cas.13448.
2. Furukawa K., Ohmi Y., Ji S., Zhang P., Bhuiyan R H., Ohkawa Y., Tajima O., Hashimoto N., Furukawa K.: Glycolipids: Essential regulator of neuro-inflammation, metabolism and gliomagenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1861, 2479-2484, 2017 査読有 DOI:10.1016/j.bbagen.2017.06.007
3. Furukawa K., Miyata M., Kambe M., Bhuiyan R. H., Zhang P., Ohmi Y., Furukawa K.: Inflammatory Reactions in Microenvironments, Leading to Melanomagenesis. *J Clin Cell Immunol* 8: 508, DOI: 10.4172/2155-9899.1000508, 2017 査読有
4. Yamaguchi T., Yamauchi Y., Furukawa K.,

- Ohmi Y., Ohkawa Y., Zhang Q., Okajima T., Furukawa K.: Expression of B4GALNT1, an essential glycosyltransferase for the synthesis of complex gangliosides, suppresses BACE1 degradation and modulates APP processing. *Sci Rep.* 6: 34505, DOI: 10.1038/srep34505, 2016 査読有
5. Ji S., Tokizane K., Ohkawa Y., Ohmi Y., Banno R., Okajima T., Kiyama H., Furukawa K., Furukawa K.: Increased a-series gangliosides positively regulate leptin/Ob receptor-mediated signals in hypothalamus of GD3 synthase-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 479, 453-460, 2016 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.077.
 6. Komura N., Suzuki K. G., Ando H., Konishi M., Koikeda M., Imamura A., Chadda R., Fujiwara T. K., Tsuboi H., Sheng R., Cho W., Furukawa K., Furukawa K., Yamauchi Y., Ishida H., Kusumi A., Kiso M.: Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. *Nat. Chem. Biol.* 12, 402-410, 2016 査読有 DOI: 10.1038/nchembio.2059.
 7. Kaneko K., Ohkawa Y., Hashimoto N., Ohmi Y., Kotani N., Honke K., Ogawa M., Okajima T., Furukawa K., Furukawa K.: Neogenin, Defined as a GD3-associated Molecule by Enzyme-mediated Activation of Radical Sources, Confers Malignant Properties via Intracytoplasmic Domain in Melanoma Cells. *J Biol Chem.* 291, 16630-16643, 2016 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M115.708834.
 8. Bhuiyan R. H., Kondo Y., Yamaguchi T., Tokuda N., Ohkawa Y., Hashimoto N., Ohmi Y., Yamauchi Y., Furukawa K., Okajima T., Furukawa K.: Expression analysis of 0-series gangliosides in human cancer cell lines with monoclonal antibodies generated using knockout mice of ganglioside synthase genes. *Glycobiology* 26, 984-998, 2016 査読有 PMID:27102283
 9. Makino Y., Hamamura K., Takei Y., Bhuiyan R.H., Ohkawa Y., Ohmi Y., Nakashima H., Furukawa K., Furukawa K.: A therapeutic trial of human melanomas with combined small interfering RNAs targeting adaptor molecules p130Cas and paxillin activated under expression of ganglioside GD3. *Biochim Biophys Acta.* 1860, 1753-1763, 2016 査読有 DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.04.005.
 10. Ohkawa Y., Momota H., Kato A., Hashimoto N., Tsuda Y., Kotani N., Honke K., Suzumura A., Furukawa K., Ohmi Y., Natsume A., Wakabayashi T., Furukawa K.: Ganglioside GD3 Enhances Invasiveness of Gliomas by Forming a Complex with Platelet-derived Growth Factor Receptor α and Yes Kinase. *J Biol Chem.* 290, 16043-16058, 2015 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M114.635755.
 11. Furukawa K., Ohmi Y., Kondo Y., Ohkawa Y., Tajima O., Furukawa K.: Regulatory function of glycosphingolipids in the inflammation and degeneration. *Arch Biochem Biophys.* 571, 58-65, 2015 査読有 DOI: 10.1016/j.abb.2015.02.007.
- [学会発表] (計 35 件)
1. 竹内理香、シグナル伝達阻害剤を用いた糖鎖合成酵素遺伝子の分別的発現調節機構の解明、生命科学系学会合同年次大会、2017 年
 2. 大海雄介、グリア細胞上の脂質ラフトにおけるガングリオシドの役割、生命科学系学会合同年次大会、2017 年
 3. 田島織絵、糖鎖改変マウスにおける肝脂肪蓄積抑制の分子メカニズム、生命科学系学会合同年次大会、2017 年
 4. 古川圭子、癌関連スフィンゴ糖脂質による細胞動態の制御: 蛍光標識糖脂質によるタイムラプス解析、生命科学系学会合同年次大会、2017 年
 5. 張 璞、ガングリオシド GD3 によるグリオーマの腫瘍微小環境の制御機構、生命科学系学会合同年次大会、2017 年
 6. 張 璞、ガングリオシド GD3/GD2 はヒト

- 由来神経膠腫 U251 細胞の悪性形質を増強する、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年
7. Robiul H. Bhuiyan, Roles of asialo-series ganglioside GD1alpha in human cancer cell lines、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年
 8. 竹内理香、メラノサイトとメラノーマでは癌関連糖鎖合成酵素遺伝子の発現制御メカニズムが異なる、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年
 9. 江崎寛季、ガングリオシド GD2 は中性アミノ酸トランスポーターASCT2 と協調的に働き小細胞肺がんの悪性形質を亢進させる、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年
 10. 古川圭子, Differential regulation of cell phenotypes by tumor associated glycosphingolipids、24th International Symposium on Glycoconjugates (Korea) 、2017 年
 11. 橋本 登、癌関連糖脂質 GD3 と Siglec-7 による腫瘍免疫監視逃避機構の解明、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年
 12. 竹内理香、cAMP によるメラノサイトの糖鎖合成酵素遺伝子の発現調節機構の解明、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年
 13. 張 璞、GD3-expressing glioma reduce M1-like phenotypes of glioma-associated microglia/macrophages via inflammatory cytokines、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年
 14. Robiul H. Bhuiyan, Expression and roles of asialo-series gangliosides in human cancer cell lines、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年
 15. 大川祐樹、グリオーマにおいて GD3 発現に伴って発現する遺伝子群の同定、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年
 16. 竹内理香、TNF α と cAMP はメラノサイトにおいてメラノーマ関連糖鎖合成酵素遺伝子の発現を分別的に制御する、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年
 17. Robiul H. Bhuiyan, Expression and roles of gangliosides GD1 α and GM1b in human cancer cell lines、第 89 回日本生化学会大会、2016 年
 18. 田島織絵、糖鎖変異に伴う脂質代謝異常の検討、第 89 回日本生化学会大会、2016 年
 19. 古川圭子、癌関連スフィンゴ糖脂質糖鎖による細胞形質の制御、第 89 回日本生化学会大会、2016 年
 20. 竹内理香、皮膚微小環境におけるメラノサイトの糖鎖合成酵素遺伝子の発現調節、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 年
 21. 田島織絵、高脂肪食負荷に対する糖鎖変異マウスの応答、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 年
 22. 橋本 登、TLC-LESA-QTRAP6500 による Siglec-7 特異的認識 gangliosideGD3 の構造解析、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 年
 23. 古川鋼一、糖脂質糖鎖によるシグナル制御のメカニズム、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 年
 24. 橋本 登、NK 細胞上 Siglec-7 を介したシアル酸含有 O 型糖鎖による癌免疫監視からの逃避機構、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年
 25. 古川圭子、メラノサイトにおける炎症性サイトカイン及び cAMP による癌関連 GD3 合成酵素遺伝子の発現抑制、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年
 26. 江崎寛季、肺がん細胞特異的に発現する酸性糖脂質抗原 GD2 と協調的な分子の同定と機能解析、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年
 27. 大川祐樹、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 年
 28. 古川鋼一、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年
29. 金子 慶、ヒト melanoma 細胞における Neogenin 細胞内ドメイン(Ne1CD) 標的遺伝子の同定、第74回日本癌学会学術総会、2015年
 30. 竹内理香、UVB 照射ケラチノサイトが分泌する炎症性サイトカインがメラノサイトにおける癌関連ガングリオシド糖鎖の糖鎖合成酵素遺伝子を発現誘導する、第37回日本分子生物学会年会、2014年
 31. 橋本 登、Siglec-7 とガングリオシド GD3 の結合における分子認識の構造特異性、第37回日本分子生物学会年会、2014年
 32. 金子 慶、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年
 33. 瀬尾庸一郎、ヒトメラノーマ細胞由来 exosome に含まれるガングリオシド GD3 の解析、第73回日本癌学会学術総会、2014年
 34. 古川圭子、UVB 照射ケラチノサイトは炎症性サイトカインを分泌してメラノサイトにおける癌関連 GD3 合成酵素遺伝子の発現を誘導する、第73回日本癌学会学術総会、2014年
 35. 古川鋼一、スフィンゴ糖脂質機能の統合的理解、第33回日本糖質学会年会、2014年

〔図書〕(計 2件)

1. 古川鋼一、近藤裕史、北村 勝、古川圭子、大川祐樹、松本康之、大海雄介、橋本 登、山内祥生、他、(株) エヌ・ティー・エス、糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック、2015年、678(150-161)
2. Koichi Furukawa, Yuhsuke Ohimi, Yuki Ohkawa, Noboru Hashimoto, Yoshio Yamauchi, Oriie Tajima, Keiko Furukawa, Springer, Glycoscience: Biology and Medicine, 2014, 1568(551-556)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 圭子 (FURUKAWA, Keiko)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号：50260732

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。

(4) 研究協力者

竹内 理香 (TAKEUCHI, Rika)
田島 織絵 (TAJIMA, Oriie)
古川 鋼一 (FURUKAWA, Koichi)
大川 祐樹 (OHKAWA, Yuki)
大海 雄介 (OHMI, Yusuke)
張 璞 (ZHANG, Pu)
Robiul H. Bhuiyan (ROBIUL H. Bhuiyan)
江崎 寛季 (ESAKI, Nobutoshi)
橋本 登 (HASHIMOTO, Noboru)
金子 慶 (KANEKO, Kei)
瀬尾 庸一郎 (SEO, Yoichiro)