

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 6月 18日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790369

研究課題名（和文）新規0結合型糖転移酵素 BCGT1 による乳癌発症・進展機構の解明と臨床応用への展開

研究課題名（英文）Functional roles of a novel glycosyltransferase BCGT1 in breast cancer cells

研究代表者 松尾 泰佑（MATSUO TAISUKE）

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・特任助教

研究者番号：70533222

研究成果の概要（和文）：本研究では、網羅的遺伝子発現解析を通じて乳癌特異的に発現亢進している遺伝子として同定した新規0結合型糖転移酵素 BCGT1 の乳癌細胞での役割を解明することを試みた。RNA 干渉法により、BCGT1 は乳癌細胞の増殖に重要な遺伝子であることを明らかにした。さらに、この増殖制御は、BCGT1 が癌細胞の生存や増殖に重要である小胞体ストレス応答制御因子 IRE1 を糖鎖修飾することにより引き起こされていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we report the critical role of a novel glycosyltransferase BCGT1 which was frequently up-regulated in breast cancers cells. Knockdown of BCGT1 expression by siRNA significantly suppressed breast cancer cell growth. We detected the commonly down-regulation of the several endoplasmic reticulum (ER) chaperons, which is important for cell survival and growth of cancer cells, at protein and mRNA levels in BCGT1-depleted cells. These alterations were caused through the glycosylation of ER stress sensor IRE1 protein by BCGT1. These results indicate that BCGT1 regulates cell growth through glycosylation of IRE1.

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：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：糖転移酵素、乳癌

1. 研究開始当初の背景

乳癌は1996年以降、日本人女性が罹患する癌のトップとなり、死亡者数も増加の一途をたどっている。現在の乳癌治療は、手術療法、放射線療法、薬物療法を組み合わせた集学的治療により行われているものの、十分な効果が認められない患者も多く、新たな治療薬の開発が望まれている。そこで申請者らは、マイクロアレイ解析により乳癌の遺伝子発現を網羅的に解析し、乳癌特異的に発現が亢進している遺伝子として新規0結合型糖転移酵素 BCGT1 (Breast Cancer

GlycosylTransferase 1) を同定した。RT-PCR 法によりマイクロアレイ解析の検証を行ったところ、BCGT1 は乳癌臨床検体で高発現しており、正常組織ではほとんど発現していないことが確認された。また、Western 解析により乳癌細胞株における BCGT1 の発現を調べたところ、正常乳腺上皮細胞 MCF-10A では発現していなかったのに対し、多くの乳癌細胞株において BCGT1 の発現亢進が認められた。そこで、BCGT1 高発現乳癌細胞株を用いて、RNA 干渉法による BCGT1 遺伝子の発現抑制解析を行ったところ、BCGT1 の発現を抑制する

ことにより、乳癌細胞の増殖制御が確認された。以上の結果は、乳癌細胞において高発現している BCGT1 が乳癌細胞の増殖に関与していることを示すものである。

2. 研究の目的

本研究では、BCGT1 がどのような分子メカニズムにより乳癌細胞の増殖を制御しているかを解明することを目的とする。特に BCGT1 は糖転移酵素であるため、BCGT1 により糖鎖修飾を受ける基質タンパク質の同定ならびにその基質タンパク質を介した乳癌細胞増殖機構を解析する。

3. 研究の方法

(1) BCGT1 の基質タンパク質の同定

RNA 干渉法により BCGT1 の発現を抑制した際に発現が変化するタンパク質を 2DICAL (2 Dimensional Image Converted Analysis of LCMS) 法により網羅的に解析し、BCGT1 により制御されているタンパク質の同定を試みる。

(2) BCGT1 と小胞体ストレス応答機構 ((1) で同定した変化) との関連

(1) で同定したタンパク質の変化から BCGT1 の基質タンパク質を推定し、BCGT1 によりその基質タンパク質が糖鎖修飾を受けるか解析する。今回の解析では、小胞体ストレス応答因子が多数同定されたため、小胞体ストレス応答因子の発現を制御する 3 つの小胞体ストレスセンサータンパク質 PERK (PRKR-like endoplasmic reticulum kinase)、ATF6 (activating transcription factor 6)、IRE1 (inositol-requiring protein 1) のうち、どの因子が関与しているのか解析する。

(3) BCGT1 による IRE1 の糖鎖修飾

(2) で IRE1 が BCGT1 の発現を抑制した際に異常が生じることが確認されたため、IRE1 が BCGT1 により糖鎖修飾されているか解析する。その方法としては、内在性 IRE1 を免疫沈降し、糖鎖を認識するレクチンで調べる。また、HEK293T 細胞に IRE1 と BCGT1 を共発現させ、IRE1 が糖鎖修飾されるか確認する。

(4) IRE1 の糖鎖修飾部位の同定

IRE1 の糖鎖修飾部位を同定するために、大腸菌で発現・精製した IRE1 に HEK293T 細胞で発現・精製した BCGT1 を反応させ、2DICAL 法により IRE1 の糖鎖修飾部位を同定する。

(5) BCGT1 の乳癌における発現亢進機構

ZR-75-1 細胞に小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンを処理した際に BCGT1 の発現亢進が認められたことから、小胞体ストレスと BCGT1 の発現との関係を調べる。

(6) BCGT1 の発現と乳癌の臨床病理学的所

見との関連

BCGT1 の発現と乳癌の臨床病理学的所見 (予後、悪性度、抗癌剤感受性など) との関連を解析するために、数百例の乳癌臨床検体を用いた大規模な調査を行う。すでに特異性の高い抗 BCGT1 ウサギポリクローナル抗体を作製できているため、BCGT1 エピトープペプチドを用いて抗 BCGT1 抗体を精製し、その後、乳癌臨床検体の免疫組織染色を行う。

4. 研究成果

(1) BCGT1 の基質タンパク質の同定

まず、ZR-75-1 乳癌細胞に対して、RNA 干渉法により BCGT1 の発現抑制した際のタンパク質変化を 2DICAL 法により解析したところ、BCGT1 の発現を抑制することにより、GRP78 (78 kDa glucose-regulated protein)、GRP94、PDIA3 (Protein disulfide-isomerase A3)、PDIA4、Calreticulin など多数の小胞体分子シャペロンの発現が低下していることが示された。そこで、この変化がタンパク質の安定性に起因するのか、転写レベルの低下により引き起こされているのか明らかにするために、real time PCR 法により、mRNA の発現変化を解析した。その結果、全ての遺伝子が転写レベルで発現低下していることが確認されたため、BCGT1 が小胞体分子シャペロン遺伝子の発現を抑制している可能性が示唆された。

(2) BCGT1 と小胞体ストレス応答機構 ((1) で同定した変化) との関連

BCGT1 の発現を抑制した際に認められた小胞体分子シャペロンの発現低下が小胞体ストレスセンサータンパク質 PERK、ATF6、IRE1 のどの分子を介して引き起こされたのか明らかにするために、RNA 干渉法により BCGT1 の発現を抑制した ZR-75-1 細胞に対して、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを処理した際の影響を解析した。PERK は下流遺伝子 CHOP の発現変動、ATF6 は活性化により生じるプロテアーゼによる切断、IRE1 は XBP1 遺伝子のスプライシング変化を調べた。その結果、PERK および ATF6 に関しては、ツニカマイシン刺激による活性化は、BCGT1 の発現を抑制してもコントロール (siEGFP 処理) と同程度であった。一方、IRE1 に関しては、BCGT1 の発現を抑制することにより、ツニカマイシン刺激による XBP1 のスプライシングの抑制ならびにその下流遺伝子であるタンパク質分解関連遺伝子 EDEM の発現低下が認められたことから、BCGT1 の発現抑制は、IRE1 の機能低下を引き起こすことが示唆された。また、癌細胞におけるストレス環境下を模倣した低酸素および低グルコースによるストレスにおいても同様の結果が得られた。

(3) BCGT1によるIRE1の糖鎖修飾

BCGT1は糖転移酵素であるため、IRE1がBCGT1により糖鎖修飾されているか明らかにするために、ZR-75-1細胞を用いて抗IRE1抗体によりIRE1の免疫沈降を行い、糖鎖を特異的に認識するレクチンにより、IRE1の糖鎖修飾を確認した。その結果、IRE1が糖鎖修飾されていることが認められた。さらに、RNA干渉法によりBCGT1を抑制した際には、この糖鎖修飾が低下することが示された。また、HEK293T細胞にIRE1とBCGT1を共発現させた際にも、IRE1のBCGT1による糖鎖修飾が確認された。以上の結果から、IRE1はBCGT1により糖鎖修飾されていることが明らかとなった。

(4) IRE1の糖鎖修飾部位の同定

IRE1の糖鎖修飾部位を同定するために、IRE1とBCGT1を*in vitro*で反応させ、2DICAL法によりIRE1の糖鎖修飾部位を解析したところ、複数の糖鎖修飾部位が同定された。現在、それらの糖鎖修飾部位のAla変異体を作製し、ZR-75-1細胞に発現させ、内在性IRE1を発現抑制した際に、機能をレスキューできるか解析を行っている。

(5) BCGT1の乳癌における発現亢進機構

上記解析過程において、ツニカマイシン刺激により、BCGT1の発現亢進が認められたことから、小胞体ストレス応答機構がBCGT1の乳癌の発現亢進に関与している可能性が示唆された。そこで、*in silico*解析によりBCGT1のプロモーター領域を調べたところ、小胞体ストレス応答機構の転写因子の結合領域が同定された。現在、引き続き解析を進めている。

(6) BCGT1の発現と乳癌の臨床病理学的所見との関連

まず、BCGT1エピトープペプチドを用いて抗BCGT1抗体の精製を行った。Western解析および免疫細胞染色により、抗体の特異性を確認したところ、BCGT1のみを強く認識する非常に特異性の高い抗体が精製できた。現在、この抗体を用いて臨床検体の免疫染色を行っている。

以上、本研究により、BCGT1がIRE1を糖鎖修飾することにより、その機構を制御していることが明らかになった。乳癌などの固形癌内部では血管形成不良により、低酸素、低グルコース、低pHといった微小環境ストレスに曝されている。このようなストレスは小胞体内における異常タンパク質の蓄積を引き起こし、それにより小胞体ストレス応答機構が活性化される。小胞体ストレス応答機構の活性化は、癌細胞の生存や増殖に関与することがこれまでに明らかにされている。

小胞体ストレスセンサータンパク質IRE1は小胞体分子シャペロンおよびタンパク質

分解関連遺伝子の発現を誘導することが報告されている。従って、BCGT1によるIRE1機能の活性化は乳癌細胞がストレスを受けた際に生じる異常タンパク質の蓄積を防ぎ、乳癌細胞の生存や増殖を引き起こしていると考えられる。

今後、IRE1の糖鎖修飾部位を明確にすることにより、BCGT1によるIRE1の糖鎖修飾を介した乳癌細胞増殖機構を解明する予定である。

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3件)

- ① Komatsu M, Yoshimaru T, Matsuo T, Kiyotani K, Miyoshi Y, Tanahashi T, Rokutan K, Yamaguchi R, Saito A, Imoto S, Miyano S, Nakamura Y, Sasa M, Shimada M, Katagiri T, Molecular features of triple negative breast cancer cells by genome-wide gene expression profiling analysis, *Int J Oncol*, 査読有り, 42, 2013: 478-506, doi: 10.3892
- ② Fukawa T, Ono M*, Matsuo T*, Uehara H, Miki T, Nakamura Y, Kanayama H, Katagiri T (*:equal contribution), DDX31 regulates the p53-HDM2 pathway and rRNA gene transcription through its interaction with NPM1 in renal cell carcinomas, *Cancer res*, 査読有り, 72, 2012: 5867-5877, doi: 10.1158
- ③ Dat LT, Matsuo T, Yoshimaru T, Kakiuchi S, Goto H, Hanibuchi M, Kuramoto T, Nishioka Y, Sone S, Katagiri T, Identification of genes potentially involved in bone metastasis by genome-wide gene expression profile analysis of non-small cell lung cancer in mice, *Int J Oncol*, 査読有り, 40, 2012: 1455-1469, doi: 10.3892

[学会発表] (計7件)

- ① 松尾泰佑、新規糖転移酵素BCGT1による小胞体ストレス応答制御を介した乳癌細胞増殖機構の解明、第71回日本癌学会学術総会、2012年09月19日～2012年09月21日、ロイトン札幌、さっぽろ芸文館、札幌市教育会館(北海道)
- ② 片桐豊雅、乳癌における新規分子標的治療薬開発戦略、第71回日本癌学会学術総会、2012年09月19日～2012年09月21日、ロイトン札幌、さっぽろ芸文館、札幌市教育会館(北海道)

- ③ 吉丸哲郎、ER 陽性乳癌において、ERAP1 は腫瘍抑制因子 REA との結合を介してエストロゲンシグナルの恒常的活性化を導く、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 09 月 19 日～2012 年 09 月 21 日、ロイトン札幌、さっぽろ芸文館、札幌市教育会館（北海道）
- ④ 小松正人、トリプルネガティブ乳癌におけるプロテアソーム関連遺伝子 PAG1 を介した発癌・増殖機構の関与、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 09 月 19 日～2012 年 09 月 21 日、ロイトン札幌、さっぽろ芸文館、札幌市教育会館（北海道）
- ⑤ 清谷一馬トリプルネガティブ乳がんのエクソーム解析、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 09 月 19 日～2012 年 09 月 21 日、ロイトン札幌、さっぽろ芸文館、札幌市教育会館（北海道）
- ⑥ 松尾泰佑、乳癌に関与する新規糖転移酵素 BCGT1 の同定と機能解析、2011 年がん若手研究者ワークショップ、2011 年 8 月 31 日-9 月 3 日、アートランドホテル 蓼科（長野）
- ⑦ 松尾泰佑、新規糖転移酵素 BCGT1 の乳癌における機能解析、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日-5 日、名古屋国際会議場（愛知）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 泰佑 (MATSUO TAISUKE)
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・特任助教
研究者番号：70533222

(2) 研究協力者

片桐 豊雅 (KATAGIRI TOYOMASA)
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・教授
研究者番号：60291895
尾野 雅哉 (ONO MASAYA)
国立がんセンター研究所・化学療法部・室長
研究者番号：00270900
三好 康雄 (MIYOSHI YASUO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：50283784
坂東 良美 (BANDO YOSHIMI)
徳島大学・病院・准教授
研究者番号：00238239
笹 三徳 (SASA MITSUNORI)
とくしまブレストケアクリニック