

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590921

研究課題名(和文) STn synthaseを標的とした転移性胃癌に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) A novel approach in the treatment of metastatic gastric cancer: targeting the STn synthase

研究代表者

佐藤 康史 (Sato, Yasushi)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：80343383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：STnは正常細胞には発現せず胃癌など様々な癌腫で強く発現し、癌の浸潤や転移とも強く相関すると報告されている。STnの生成はST6GalNAc によって行われる。そこで、ST6GalNAc に着目しこれを標的とする胃癌の抗転移治療を開発するため、ST6GalNAc の発現をsiRNAで抑制し、転移関連遺伝子の網羅的な解析を行うとともに、その増殖能、遊走能、浸潤能を検討し、マウスの胃癌細胞腹膜播種モデルを用いた転移抑制効果を検討したところ、ST6GalNAc は転移性胃癌に対する有望な治療標的となる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：ST6GalNAc I is a sialyltransferase controlling the expression of sialyl-Tn antigen (STn), which is overexpressed in several epithelial cancers, including gastric cancer, and is highly correlated with cancer metastasis. However, the functional contribution of ST6GalNAc I to development or progression of gastric cancer remains unclear. We investigated the effects of suppression of ST6GalNAc I on gastric cancer in vitro and in vivo. ST6GalNAc I siRNA inhibited gastric cancer cell growth, migration, and invasion in vitro. Furthermore, intraperitoneal administration of ST6GalNAc I siRNA-liposome significantly inhibited peritoneal dissemination and prolonged the survival of xenograft model mice with peritoneal dissemination of gastric cancer. Therefore, ST6GalNAc I may be a potential target for treatment of metastasizing gastric cancer.

研究分野：消化器病

キーワード：胃癌 転移

## 1. 研究開始当初の背景

本邦における胃癌死亡率は減少傾向にあるが依然として男性では第3位、女性では第2位と高い。すなわち、切除による局所制御の向上はみられるが、切除不能な遠隔転移、特に腹膜播種性転移を来した症例の予後は極めて不良であり、本邦の標準治療であるS-1+CDDPレジメやHerceptinなどの分子標的薬を加えた抗癌剤治療を行っても生存中央値は約13ヶ月程度であり、申請者らが開発したS-1+CDDP+Docetaxel (DCS)レジメにおいても20ヶ月程度と十分とは言えない。以上のことから胃癌治療成績の向上には、腹膜播種を代表とする胃癌転移のコントロールが極めて重要な課題となっている。一般に癌細胞は、悪性化に伴い糖鎖合成不全を生じその前駆体が蓄積することが知られている。消化器癌において、単純ムチン糖鎖抗原であるシアリルTn抗原 (STn) が発現することが知られ、STn (S i a 2 6 G a l N A c S e r / T h r ) は、serineあるいはthreonineと糖鎖がO-glycoside結合したムチン性糖蛋白の前駆体構造の末端(Tn抗原)にシアリル酸が付加されたものである。癌細胞においては、Tn抗原末端がシアリル酸に修飾されると正常細胞に見られるようなその後の糖鎖合成が伸展せずにSTnが細胞内に蓄積する。STnは、CA19-9やシアリルLe<sup>x</sup>-i抗原(SLX)などの従来臨床応用が進められてきたN-glycoside結合型の糖鎖抗原に比べ、より初期段階の糖鎖合成異常に由来する腫瘍関連抗原であり、良性疾患における偽陽性率が低く、癌特異性の高い点で注目される。実際、正常胃粘膜においては、STnはほとんど認められないが胃癌粘膜に高く発現することが多数の研究から明らかとなっている(Yonezawa et al. 1992)。臨床的には、STnの発現は、独立した予後不良因子であり(Victorzon M et al. 1996)、リンパ節転移、深達度が進むにつれて陽性率が高くなる。特に、STn陽性例はdiffuse typeの胃癌が多いこ

とから腹膜転移陽性例において高率に陽性となり、しかもその血清値が極めて高値をとることが示されている(Nagata et al. 1995)。しかし、不完全に合成された糖鎖とそのシアリル化された糖鎖の機能は今もって不明であり、その転移増強の機序も未解明である。一方、STnの発現は、synthaseであるST6GalNAc-Iにより制御されている(Marcos NT et al. 2004)。よってST6GalNAc-IをsiRNAによりknock downすることによりSTの発現を制御することで転移能の抑制が可能となることが報告されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、STn発現胃癌細胞の浸潤・転移能獲得の機序を検討するとともに、そのsynthaseであるST6GalNAc-Iを制御することで転移を抑制する新規の抗転移治療法を考案することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) 細胞株

胃癌細胞株であるMKN45、MKN74は独立行政法人 医薬基盤研究所より購入し、JRST、HSC-39は免疫生物研究所、KATOとNUGC4は理研細胞バンクより購入した。また、ルシフェラーゼを遺伝子導入したMKN45-lucについても医薬基盤研究所より購入した。

### 2) siRNAの調整と導入

ST6GalNAc siRNA HSS125080; (5'-CCUGAACACUUUGCACCACCCUUU-3')、コントロールとしてstealth RNAi negative control high GC (random siRNA)をinvitrogenより購入した。遺伝子導入についてはLipofectamine RNAiMAXを使用し、Invitrogenのプロトコールに準じて行った。

### 3) RT2 profiler PCR array

TRIzol reagentを使用しRNAを抽出した。RT2 profiler PCR arrayを使用し、96 wellのプレートで89種類の転移と細胞運動能に関連する遺伝子と5種類のhousekeeping geneのmRNAをSABioscienceのプロトコールに従い測定した。ST6GalNAc siRNAを導入したMKN45とrandom siRNAを導入したMKN45のCt値の差は、Ct法で計算した； $Ct=Ct-Ct$  (HK),  $Ct=Ct$  (ST6GalNAc siRNA導入細胞) -  $Ct$  (random siRNA導入細胞)。

#### 4) ウェスタンブロットと免疫沈降法

MKN45 に各種 siRNA を導入し、72 時間後にタンパク質を抽出した。一次抗体は、抗 ST6GalNAc I 抗体、抗 IGF-1 抗体、抗  $\beta$ -actin 抗体を使用した。その後、二次抗体反応を行い、LAS-4000UV mini で測定した。免疫沈降法には抗 STAT5b 抗体、抗 phospho-STAT5 抗体を使用した。

#### 5) ST6GalNAc plasmid の導入

pCMVNeo vector に ST6GalNAc cDNA クローンを導入したプラスミド発現ベクターを OriGene より購入し、MKN45 に Lipofectamin LTX & PULS reagent を用いて遺伝子導入した。

#### 6) 蛍光免疫染色

各胃癌細胞株を chamber slide で培養し、FITC-conjugated STn 抗体 (STn219) と FITC-conjugated anti-mouse IgG 抗体を反応後、蛍光顕微鏡で観察した。

#### 7) フローサイトメトリー

各胃癌細胞株 ( $1 \times 10^6$  個) を FITC-conjugated STn 抗体 (STn219) と FITC-conjugated 抗 mouse IgG 抗体を反応させ、FACS calibur instrument で測定した。

#### 8) 細胞増殖アッセイ

24well のプレートの各 well に  $5 \times 10^4$  個の細胞を培養し、各種 siRNA を導入後、それぞれ 24、48、72 時間後に WST-1 法で検討した。

#### 9) 細胞遊走アッセイ

Boyden chamber 法で評価した。  $3 \times 10^4$  個の細胞をチャンバー内で培養し、24 時間後にチャンバー内の細胞を除去した。残った細胞をメタノールで固定し、メチレンブルーで染色した。洗浄後、ランダムに 5 視野を低倍率で観察し細胞数をカウントした。

#### 10) 細胞浸潤アッセイ

マトリゲルを敷いた Boyden chamber 法で評価した。  $3 \times 10^4$  個の細胞をチャンバー内に撒き、48 時間後にチャンバー内の細胞を除去した。残った細胞をメタノールで固定し、メチレンブルーで染色した。洗浄後、ランダムに 5 視野を低倍率で観察し細胞数をカウントした。

#### 11) 腹膜播種モデルでの ST6GalNAc siRNA の抗腫瘍効果の検討

すべての動物実験は札幌医大動物実験委員会の承認を得て行った。7-8 週の BALB/c ノードマウスに  $1 \times 10^7$  個の MKN45-luc を腹腔内投与し腹膜播種モデルを作成後、第 2 日目より各群それぞれに PBS、random siRNA ( $70 \mu\text{g}$  siRNA)、ST6GalNAc ( $70 \mu\text{g}$  siRNA) を週 2 回、4 週間 (計 7 回) 腹腔内投与した。腹膜播種に対する抗腫瘍効果について、IVIS システムを用いて経時的に評価した。第 26 日目に解剖し、各群の腹膜結節を

採取し 10%ホルマリンで固定した。また、血清を採取し STn 抗原を測定した。同様に 7-8 週の BALB/c ノードマウスに  $1 \times 10^7$  個の MKN45 を腹腔内投与し腹膜播種モデルを 3 群 (N=6) で作成し、同様のスケジュールで治療し生存率を検討した。今回の検討では、各 siRNA は Invivofectamine 2.0 Reagent と 1 対 1 で混合し計  $200 \mu\text{l}$  (siRNA  $70 \mu\text{g}$ ) としたものを腹腔投与した。

#### 12) 腹膜結節の免疫染色

パラフィン固定された腹膜結節に対して抗 TAG72 抗体 (B72.3) を用いて免疫染色を施行した。

### 4. 研究成果

1) ST6GalNAc siRNA を導入した MKN45 細胞を用いた転移関連遺伝子の PCR array の検討  
ST6GalNAc が転移のメカニズムにどのように関わるかを調べるために、転移関連遺伝子の mRNA の発現を PCR array で検討した。Random siRNA 導入 MKN45 細胞と ST6GalNAc siRNA 導入 MKN45 細胞を PCR array で比較したところ、最も大きな変化を認めたのは insulin-like growth factor-1 (IGF-1) でありその発現は ST6GalNAc 群で 2.126 倍減少していた。ウェスタンブロットでの検討でも、IGF-1 の発現は ST6GalNAc siRNA を導入した細胞で低下していた。逆に ST6GalNAc plasmid を用いて強制発現させた細胞では、IGF-1 の発現は増加していた。これらの結果より、MKN45 細胞において ST6GalNAc が IGF-1 の発現を調節している可能性が示唆された。

#### 2) ST6GalNAc siRNA が IGF-1 の発現を抑制するメカニズムの検討

ST6GalNAc siRNA が IGF-1 の発現を抑制するメカニズムを検討するために、IGF-1 の発現を制御する signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b) シグナル経路について検討した。ウェスタンブロットでの検討では、リン酸化 STAT5b は ST6GalNAc 導入 MKN45 細胞で random siRNA 導入 MKN45 細胞に比べ発現が低下していた。また、ST6GalNAc plasmid を用いて強制発現させた MKN45 細胞では、random siRNA 導入 MKN45 細胞に比べ、よりリン酸化 STAT5b の発現が増強していた。この結果より ST6GalNAc は、IGF-1 の発現を制御する STAT5b シグナル経路を調節していることが示された。

#### 3) ST6GalNAc siRNA の細胞増殖抑制効果についての検討

ST6GalNAc siRNA を導入した胃癌細胞株の細胞増殖能を検討するために WST-1 法を行った。フローサイトメトリーと蛍光免疫染色

により STn 高発現を確認した MKN45、JRST、HSC-39 細胞において、ST6GalNAc siRNA 導入細胞でコントロールの細胞 (No treat、random siRNA 導入細胞) に比べ有意に細胞増殖が抑制された。同様に STn 低発現を確認した MKN74 では、ST6GalNAc 導入によって増殖は抑制されなかった。

4) ST6GalNAc siRNA を導入した MKN45 細胞を用いた遊走、浸潤抑制効果についての検討  
遊走能の検討では、ST6GalNAc 導入 MKN45 細胞はコントロール群 (No treat, random siRNA) に対し有意に低下していた。また、浸潤能も同様に ST6GalNAc 導入 MKN45 細胞で有意に低下していた。これらの結果から ST6GalNAc 遺伝子の発現を抑制することにより、遊走能と浸潤能が抑制されることが示唆された。

5) マウスの腹膜播種モデルにおける ST6GalNAc siRNA の腫瘍抑制効果の検討  
MKN45-luc で腹膜播種を作成し、ST6GalNAc siRNA-liposome を腹腔内投与した。IVIS システムにより腹膜播種結節の経過を day7、14、21、26 で評価したところ ST6GalNAc siRNA-liposome 投与群では、コントロールの PBS 投与群、random siRNA-liposome 投与群に比べ有意に腫瘍の増殖は抑制されていた。次に、day26 に解剖し各群の腹膜結節と血清を採取したところ、腹膜結節の総重量についても ST6GalNAc siRNA-liposome 投与群でコントロール投与群に比べ有意に減少していた。血清 STn 抗原値は、ST6GalNAc siRNA-liposome 投与群 ( $45 \pm 4U/ml$ ) であり、random siRNA-liposome 投与群 ( $120 \pm 38U/ml$ ) と比べ有意に減少していた。各群の腹膜結節を抗 STn 抗体で免疫染色したところ、STn 抗原の発現はコントロール群に比べ ST6GalNAc siRNA-liposome 投与群で著明に低下していた。

6) マウスの腹膜播種モデルにおける ST6GalNAc siRNA 治療による生存率の検討  
腫瘍抑制効果の検討と同様な方法で腹膜播種モデルを作成、治療を行い生存率を検討した。マウスの生存率は、ST6GalNAc siRNA-liposome 投与群で PBS 投与群、random siRNA-liposome 投与群より有意に延長していた。マウスの体重については、ST6GalNAc siRNA-liposome 投与群で、PBS 投与群、random siRNA-liposome 投与群と比べ有意な体重減少の抑制が確認された。

#### 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1件)

Tamura F, Sato Y, Hirakawa M, Yoshida M, Ono M, Osuga T, Okagawa Y, Uemura N, Arihara Y, Murase K, Kawano Y, Iyama S, Takada K, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Kobune M, Takimoto R, Kato J. RNAi-mediated gene silencing of ST6GalNAc I suppresses the metastatic potential in gastric cancer cells. Gastric Cancer. 2014 Dec 23.

査読あり DOI 10.1007/s10120-014-0454-z

#### 〔学会発表〕(計0件)

#### 〔図書〕(計0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:

出願年月日:

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

札幌医科大学 医学部 講師

佐藤康史 (SATO YASUSHI)

研究者番号: 80343383

##### (2) 研究分担者

札幌医科大学 医学部 准教授

瀧本理修 (TAKIMOTO RISYU)

研究者番号: 10336399

##### (3) 研究分担者

札幌医科大学 医学部 教授

加藤淳二 (KATO JYUNJI)

研究者番号: 20244345

(4)研究分担者

札幌医科大学 医学部 助教

平川昌宏 (HIRAKAWA MASAHIRO)

研究者番号： 50561023