

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860240

研究課題名(和文) 機能未知糖転移酵素GTUFによる乳癌細胞増殖機構の解明と臨床応用への展開

研究課題名(英文) Identification and characterization of a novel unknown glycosyltransferase GTUF in breast cancer cells

研究代表者

松尾 泰佑 (Matsuo, Taisuke)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：70533222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロアレイ解析により乳癌特異的に高発現している遺伝子として同定した機能未知糖転移酵素GTUFの乳癌細胞における役割について以下のことを明らかにした。GTUFは乳癌の中でも特に悪性度の高いトリプルネガティブ乳癌において高発現している。GTUFはアポトーシスを制御することにより乳癌細胞の生存に重要な役割を果たしている。GTUF自身も糖鎖修飾を受け、その修飾はGTUFの細胞外分泌に重要な役割を果たしている。以上の結果は、GTUFは有効な治療法が確立されていないトリプルネガティブ乳癌の新規治療薬の標的分子となるだけでなく、新たな乳癌マーカーとなり得ることを示している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we report the critical role of an unknown glycosyltransferase GTUF (GlycosylTransferase of Unknown Function) in breast cancer cells. Although GTUF was frequently up-regulated in breast cancer cells, including triple negative breast cancer (TNBC) cells, it was not significantly expressed in normal tissues. Knockdown of GTUF by siRNA significantly suppressed cell growth and induced apoptosis in both TNBC and non-TNBC cells. GTUF has two glycosylated sites and its glycosylation is important for secretion into culture medium from cells. These results suggested that GTUF might be a novel therapeutic target and molecular marker of breast cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：乳癌 糖転移酵素

## 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い。また、乳癌の中でも悪性度の高いトリプルネガティブ乳癌は、有効な治療法が確立されていない。そのため、新たな乳癌治療薬の開発が望まれている。申請者は新たな乳癌治療薬の候補遺伝子を探索することを目的として、マイクロアレイ法にて乳癌における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機能未知糖転移酵素 GTUF (Glycosyltransferase of Unknown Function) を同定した。siRNA 法による GTUF 遺伝子の発現抑制解析を行ったところ、GTUF の発現を抑制することにより乳癌細胞の増殖が顕著に抑制されたことから、GTUF は乳癌細胞の増殖に重要な役割を果たしていることを証明している。また、データベース解析により GTUF は N (Asn) 結合型糖鎖修飾部位を有していることが確認されているものの、その生理的意義は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、GTUF の乳癌細胞における詳細な発現様式および乳癌細胞増殖機構を解明することを目的とする。特に、GTUF は糖転移酵素であるため、GTUF 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明らかにすることを試みる。さらに、GTUF が受ける糖鎖修飾の生理的意義を明らかにすることにより GTUF による乳癌細胞増殖機構の全貌を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) GTUF の乳癌における発現

まず、GTUF の乳癌細胞における詳細な発現様式を明らかにするために、我々が過去に施行したマイクロアレイ解析データを用いて、乳癌の中でも特に悪性度の高いトリプルネガティブ乳癌 (triple negative breast cancer: TNBC) における GTUF の発現を調べた。その後、real time PCR 法によりマイクロアレイ解析結果の検証を行い、さらに Northern blot 解析により複数の乳癌細胞株および正常組織における GTUF 遺伝子の発現を確認した。

### (2) GTUF の乳癌細胞における役割の解明

#### GTUF の発現抑制解析

GTUF の乳癌細胞における役割を明らかにするために、複数の乳癌細胞株に対して RNA 干渉法により GTUF 遺伝子の発現を抑制したときの細胞増殖に及ぼす影響を調べた。同時に、FACS 解析により細胞周期の変化、免疫細胞染色により細胞形態の変化を調べた。

#### GTUF の過剰発現解析

乳癌細胞において過剰発現している GTUF の役割を調べるために、GTUF を NIH3T3 マウス胎児繊維芽細胞および HEK293 ヒト胎児腎細胞に過剰発現させたときの細胞増殖に及ぼす影響を調べた。

### (3) GTUF の糖鎖修飾部位の同定

データベース解析により GTUF は Asn-116 および Asn-174 が N 結合型糖鎖修飾されることが推測された。そこで、Asn-116 および Asn-174 を Ala 残基に置換した N116A、N174A および N116A+N174A 変異体を HEK293T 細胞に発現させ、Western blot 解析により分子量の変化を調べた。

### (4) GTUF の糖鎖修飾の乳癌細胞における役割の解明

まず、GTUF の N 結合型糖鎖修飾が細胞内局在に及ぼす影響を明らかにするために、GTUF の Wild type (WT) および N116A、N174A、N116A+N174A 変異体を HEK293T 細胞に発現させたときの細胞内局在を免疫細胞染色により調べた。さらに、GTUF の WT および変異体を HEK293T 細胞に発現させたときの細胞外分泌量を比較し、GTUF の糖鎖修飾が細胞外分泌に及ぼす影響を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) GTUF の乳癌における発現

まず、我々が過去に施行したマイクロアレイ解析データを用いて TNBC (30 例) および正常乳腺 (13 例) における GTUF の発現を調べたところ、GTUF は TNBC において高発現していることが確認された。そこで、この結果を検証するために、real time PCR 法により TNBC、正常乳腺および正常組織 (心臓、肺、腎臓、肝臓) における GTUF の発現を調べたところ、GTUF は TNBC 特異的に発現しており、正常組織における発現は非常に低いことが確認された。続いて、Northern blot 解析により乳癌細胞株における発現を調べたところ、GTUF は複数の乳癌細胞株において高発現していることが示された。

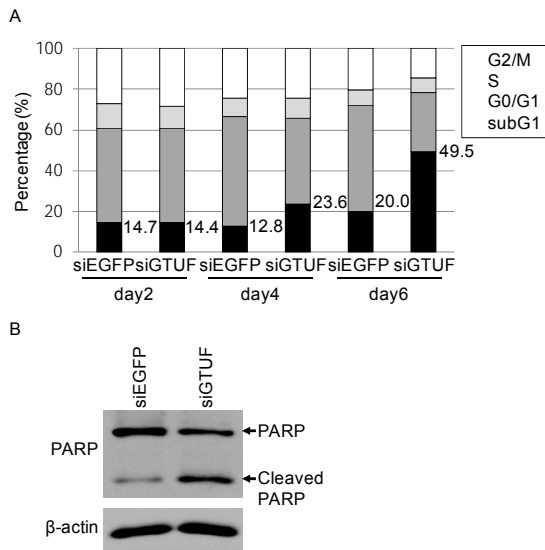
### (2) GTUF の乳癌細胞における役割の解明

#### GTUF の発現抑制解析

TNBC 乳癌細胞および非 TNBC 乳癌細胞において、siRNA により GTUF 遺伝子の発現を抑制したところ、どちらの乳癌細胞株においても細胞増殖が抑制された。そこで、FACS 解析により細胞周期の変化を調べたところ、GTUF の発現を抑制することにより、sub G1 の増加が認められた (図 1A)。また、sub G1 の増加に伴い、アポトーシスのマーカーである PARP の切断が確認された (図 1B)。従って、GTUF はアポトーシスを制御することにより細胞の生存に重要な役割を果たしてい

ることが示唆された。さらに、GTUF が細胞形態に及ぼす影響をファロイジン染色により調べたところ、GTUF の発現を抑制することにより乳癌細胞の細胞骨格に異常が生じることが確認された。

続いて、GTUF の基質タンパク質を明らかにするために、2013 年にジストログリカノパチーにおいて GTUF の基質タンパク質として同定された  $\alpha$ -ジストログリカンに対する影響を調べた。 $\alpha$ -ジストログリカンは GTUF によって糖鎖修飾を受けることでタンパク質の安定性が高まることが明らかにされている。そこで、GTUF の発現を抑制した際の  $\alpha$ -ジストログリカンのタンパク質安定性について調べたところ、GTUF の発現を抑制しても  $\alpha$ -ジストログリカンのタンパク質安定性は変化しなかった。現在、乳癌細胞において GTUF が  $\alpha$ -ジストログリカンの機能に及ぼす影響および  $\alpha$ -ジストログリカン以外の GTUF の基質タンパク質の同定を試みている。



**図 1 GTUF の発現抑制によるアポトーシスの誘導**

BT-20 トリプルネガティブ乳癌細胞において GTUF 遺伝子の発現抑制による影響を調べた。A. FACS 解析により GTUF 発現抑制時に subG1 が増加することが確認された。B. Western blot 解析により subG1 の増加に伴い、PARP の切断が認められた(day 6)。

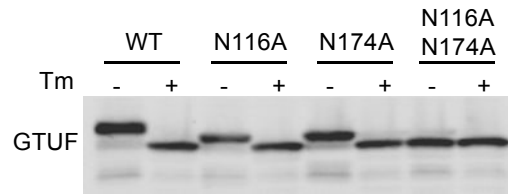
#### GTUF の過剰発現解析

GTUF を NIH3T3 細胞および HEK293 細胞に過剰発現させたときの細胞増殖の変化を調べた。その結果、どちらの細胞についても GTUF の過剰発現により細胞増殖は変化しなかった。従って、GTUF は細胞の増殖よりも生存に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

#### ( 3 ) GTUF の糖鎖修飾部位の同定

GTUF の WT および N116A、N174A、N116A+N174A 変異体を HEK293T 細胞に発

現させ、Western blot 解析により分子量の変化を調べた。その結果、N116A、N174A では WT よりも低分子量側に移動し、N116A+N174A では N116A、N174A よりもさらに低分子量側に移動することが確認された。また、N 結合型糖鎖修飾阻害剤であるツニカマイシンで細胞を処理したところ、WT および N116A、N174A では N116A+N174A と同じ大きさまで分子量が低下したのに対し、N116A+N174A はツニカマイシン処理による分子量の変化は見られなかった ( 図 2 )。従って、GTUF は Asn-116 および Asn-174 の両方のアミノ酸残基が N 結合型糖鎖修飾されることが明らかになった。

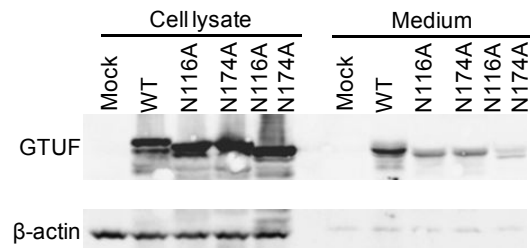


**図 2 GTUF の N 結合型糖鎖修飾部位の同定**

Western blot 解析により、GTUF の WT および変異体の分子量の変化を調べた。また、GTUF の N 結合型糖鎖修飾はツニカマイシン(Tm:tunicamycin)により阻害した。

#### ( 4 ) GTUF の糖鎖修飾の乳癌細胞における役割の解明

GTUF が受ける糖鎖修飾の細胞内での役割を明らかにするために、まず GTUF の細胞内局在に及ぼす影響を調べた。GTUF の WT および変異体を HEK293T 細胞に発現させ、免疫細胞染色を行ったところ、WT と変異体のどちらもゴルジ体に局在していることが確認された。続いて、ゴルジ体に局在する糖転移酵素の中には細胞外に分泌するものが存在するため、その点について検証したところ、WT では細胞外への分泌が見られたのに対し、変異体では細胞外分泌量が減少しており、さらにその割合は N116A+N174A で最も大きかった ( 図 3 )。従って、GTUF の糖鎖修飾は細胞外分泌を制御していることが示された。現在、細胞外に分泌された GTUF の役割については明らかにできておらず、今後の解析が必要である。



**図 3 GTUF の細胞外分泌量の評価**

Western blot 解析により、GTUF の WT および変異体の細胞外分泌量の変化を調べた。cell lysate は細胞内、

medium は細胞外に分泌した GTUF 量を示している。

以上の結果から、GTUF は有効な治療法が確立していないトリプルネガティブ乳癌の新規治療薬の標的分子となるだけでなく、新たな乳癌マーカーとなり得ることが期待される。

#### 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)

Matsuo T, Dat le T, Komatsu M, Yoshimaru T, Daizumoto K, Sone S, Nishioka Y, Katagiri T.

Early growth response 4 is involved in cell proliferation of small cell lung cancer through transcriptional activation of its downstream genes.

PLoS One., 査読有り, 20, 2014: e113606, doi: 10.1371

Matsuo T, Komatsu M, Yoshimaru T, Kiyotani K, Miyoshi Y, Sasa M, Katagiri T.

Involvement of B3GALNT2 overexpression in the cell growth of breast cancer.

Int J Oncol., 査読有り, 44, 2014:427-34, doi: 10.3892

Yoshimaru T, Komatsu M, Matsuo T, Chen YA, Murakami Y, Mizuguchi K, Mizohata E, Inoue T, Akiyama M, Yamaguchi R, Imoto S, Miyano S, Miyoshi Y, Sasa M, Nakamura Y, Katagiri T.

Targeting BIG3-PHB2 interaction to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells., Nat Commun., 査読有り, 4, 2013: 2443, doi: 10.1038

[学会発表](計7件)

小松正人、悪性度の高いトリプルネガティブ乳癌における核内 19S-proteasome 関連遺伝子(nPAG1)の役割、第 73 回日本癌学会学術集会、2014 年 9 月 25 日~2014 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

金南希、乳癌細胞における癌抑制分子 PHB2 のエストロゲン依存性核内移行機構の解明、第 73 回日本癌学会学術集会、2014 年 9 月 25 日~2014 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

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構成因子のプロテアソーム活性非依存的な役割、第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2014 年 6 月 25 日~2014 年 6 月 27 日、仙台市情報・産業プラザ、ホテルメトロ

ポリタン仙台、TKP ガーデンシティ仙台(宮城)

吉丸哲郎、エストロゲン受容体制御分子 BIG3 を標的とした新規 ER 陽性乳がん治療法の創製、第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2014 年 6 月 25 日~2014 年 6 月 27 日、仙台市情報・産業プラザ、ホテルメトロポリタン仙台、TKP ガーデンシティ仙台(宮城)

松尾泰佑、がん特異的糖転移酵素 BCGT1 による小胞体ストレス制御を介した新規乳癌細胞増殖機構の解明、第 72 回日本癌学会学術集会、2013 年 10 月 3 日~2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

小松正人、19S プロテアソーム構成遺伝子 PAG1 の核内過剰発現はトリプルネガティブ乳癌の増殖に關与する、第 72 回日本癌学会学術集会、2013 年 10 月 3 日~2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

吉丸哲郎、エストロゲン受容体活性化制御分子 ERAP1 と腫瘍抑制因子 REA の相互作用を標的とした内分泌療法耐性乳癌の治療法の開発、第 72 回日本癌学会学術集会、2013 年 10 月 3 日~2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

松尾 泰佑 (MATSUO TAISUKE)

岩手医科大学・薬学部・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)

とくしまプレストケアクリニック