

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860243

研究課題名(和文) 6 4インテグリンによる癌の生存戦略機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of alpha6beta4 integrin-dependent cancer cell survival

研究代表者

苅谷 慶喜 (Kariya, Yoshinobu)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00458217

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、4インテグリンに付加されたN結合型糖鎖の癌細胞増殖および悪性化への影響を調べるため、野生型およびN結合型糖鎖欠損4インテグリンを発現させた癌細胞株を樹立し、それらを用いた検討をおこなった。その結果、4インテグリンのN結合型糖鎖は癌細胞の増殖や生存、運動、浸潤、腫瘍形成、またそれらに関わるPI3Kシグナル活性化に関与していることを見出した。さらに、4インテグリン上の1,6GlcNAc糖鎖とガレクチン3の結合がそれらシグナルに重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, to investigate the contribution of N-glycosylation to 4 integrin-dependent growth of cancers, we established MDA-MB435S cancer cells expressing a full-length wild-type 4 integrin and a 4 integrin mutant lacking all five N-glycosylation sites. N-glycan deletion on the 4 integrin impaired 4-dependent cancer cell growth, survival, motility, and invasion in vitro, and diminished tumorigenesis and proliferation in vivo, suggesting that N-glycosylation of 4 integrin is associated with these 4-dependent activities. In addition, a defect of N-glycan on 4 integrin attenuated activation of PI3K signaling pathway. Furthermore, disruption of the galectin-3-1,6GlcNAc axis by a neutralizing antibody against galectin-3, a defect of N-glycan, or introduction of bisecting GlcNAc on 4 integrin revealed that galectin-3-mediated crosslinking of 4 integrin via 1,6GlcNAc-branched N-glycans played an important role in tumor development and progression.

研究分野：医歯薬学

キーワード：インテグリン 癌 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

$\alpha 6 \beta 4$ インテグリンは膜貫通型の細胞表面受容体であり、そのリガンドとして細胞外マトリックスであるラミニン 332 (旧名ラミニン 5) が知られている。両者の結合はヘミデスマソームと呼ばれる皮膚の接着構造維持に重要である。そのため $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンは接着構造の単なる構成因子と捉えられてきた。しかしながら近年、皮膚癌や乳癌を初めとする様々な癌における過剰発現と患者の予後不良との相関性が多数報告され、癌の形成や浸潤・転移への関与が考えられるようになった。ごく最近、その概念は *in vitro* 浸潤アッセイやマウスモデルにより実証された。すなわち $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンは接着構造体としての静的役割のみならず、腫瘍形成や癌の浸潤・転移の促進という動的役割も果たしている。 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンは PI3K や ERK などのシグナルを活性化して癌細胞の運動や増殖、生存の促進をするが、そのメカニズムについては不明な点が多い。そうしたメカニズムの理解は、 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンによる癌の形成や浸潤・転移に対する分子標的治療薬の開発に必要不可欠である。

申請者はこれまで、ラミニン 332 が誘導する細胞運動にラミニン 332 および $\alpha 6 \beta 4$ インテグリン上の N 型糖鎖が影響することを明らかにしてきた (Kariya et al., 2008, *J. Biol. Chem.*; Kariya et al., 2011, *PLoS One*)。さらに、 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンが細胞外ドメインの N 型糖鎖を介して EGFR、ラミニン 332 と超分子複合体を形成し、細胞内シグナルを誘導することを明らかにした (Kariya et al., 2010, *J. Biol. Chem.*; Kariya et al., 2011, *PLoS One*)。予備実験において $\alpha 6 \beta 4$ インテグリン上の N 型糖鎖が癌細胞の増殖や生存に関与していることを示唆するデータが得られた。一方で、 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンによる細胞増殖や生存には細胞運動と同じ PI3K や ERK のシグナルの活性化が重要であることが知られている。これらのことから、 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンによる癌細胞の増殖や生存は N 型糖鎖を介した他分子との相互作用によって制御されている可能性が考えられる。しかしながら、これまで $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンの糖鎖とそれらのシグナルとを結びつける直接的な報告はない。

2. 研究の目的

本研究は腫瘍形成に関与する $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンが、どのように癌細胞を維持するのか、その分子メカニズムを糖鎖に着目して明らかにするとともに、それら知見による癌治療薬開発の研究基盤を確立することが目的である。

3. 研究の方法

(1) $\beta 4$ インテグリンの野生型および N 型糖鎖欠損変異型の cDNA 発現ベクターを、ヒトメラノーマ細胞株 MDA-MB435S に導入し、それぞれを発現する細胞を樹立した。樹立した

細胞における $\beta 4$ インテグリンの細胞表面発現量を FACS により解析した。また、 $\alpha 6$ インテグリン抗体免疫沈降物に対する $\beta 4$ インテグリン抗体を用いたウェスタンブロット解析により、 $\alpha 6$ と $\beta 4$ インテグリンサブユニット間のダイマー形成について調べた。

(2) (1) で樹立した細胞のラミニン 332 上での接着能を接着アッセイにより解析した。増殖能の解析は MTT アッセイをおこなった。運動能と浸潤能についてはボイデンチャンバーを用いてマトリゲルなし、ありの条件でそれぞれ解析をおこなった。腫瘍形成能についてはヌードマウスの皮下に細胞を移植し、6 週間後の腫瘍の体積を測定することで決定した。

(3) PI3K シグナルは各細胞の細胞抽出液に対して Akt の抗体およびそのリン酸化型を認識する抗体を用いたウェスタンブロットをおこない、バンド強度からリン酸化 Akt/全 Akt を算出することで測定した。

(4) スクロース/ラクトース処理をおこなった表皮癌細胞株 A431 細胞、GnT-III を強制発現させた細胞の細胞抽出液から、 $\beta 4$ 抗体を用いた免疫沈降により $\beta 4$ インテグリンを分離した。それら沈降物に対してガレクチン 3 の抗体を用いたウェスタンブロットをおこなうことで、 $\beta 4$ の糖鎖欠損による複合体形成能への影響を調べた。野生型、糖鎖欠損型、野生型+GnT-III 発現 MDA-MB435S 細胞にガレクチン 3 を添加した際の細胞運動能を調べた。また、野生型および糖鎖欠損型発現 MDA-MB435S 細胞にガレクチン 3 抗体を処理した際の細胞運動についても調べた。

4. 研究成果

本研究は、 $\beta 4$ インテグリンに付加された N 型糖鎖の癌細胞増殖および悪性化への影響を調べるために、以下の検討をおこなった。

(1) 野生型および N 型糖鎖欠損 $\beta 4$ インテグリンを発現させた MDA-MB435S 癌細胞株を樹立した。FACS および $\beta 4$ インテグリン抗体を用いた免疫沈降による解析より、糖鎖欠損は $\beta 4$ インテグリンの細胞表面での発現や $\alpha 6$ インテグリンとのダイマー形成に影響を与えないことを明らかにした。

(2) (1) で樹立した細胞を用いた解析により、 $\beta 4$ インテグリンの N 型糖鎖が癌細胞の増殖や生存、接着、運動、浸潤、腫瘍形成に関与することを明らかにした。

(3) $\beta 4$ インテグリンの N 型糖鎖は、PI3K シグナル活性化に関与しており、(2) で解析した癌細胞の増殖や悪性化の促進に関与することを見出した。

(4) $\beta 4$ インテグリン抗体を用いた免疫沈降解析より、ガレクチン 3 と $\beta 4$ が 1,6GlcNAc 糖鎖を介して結合していることが明らかとなった。更に、ガレクチン 3 添加、ガレクチン 3 阻害抗体処理で $\beta 4$ インテグリン糖鎖依

存的細胞運動がそれぞれ促進、阻害されたことより、ガレクチン3とβ4インテグリンのβ1,6GlcNAc糖鎖を介した結合がβ4の機能に重要であることが示唆された。

本研究結果および以前の研究結果を総合すると、β4インテグリン、ラミニン332、EGFR上のβ1,6GlcNAc糖鎖をガレクチン3が架橋することで、超分子複合体が形成される。その結果、癌の生存シグナルであるPI3Kシグナルが活性化され、癌の悪性を促進していることが考えられた(図1)。現在まで、4インテグリンが糖鎖を介して癌の悪性を促進するという事は知られておらず、本研究が世界で初めての報告となる。本研究は、これまでタンパク質中心に考えられてきた癌の悪性の分子メカニズムにおいて“糖鎖”の重要性を示唆するものであり、癌研究に新たな視点を取り入れるきっかけとなると思われる。今後はこれらの結果についてさらに詳細に検討をおこない、癌治療薬開発へと結びつけていきたい。

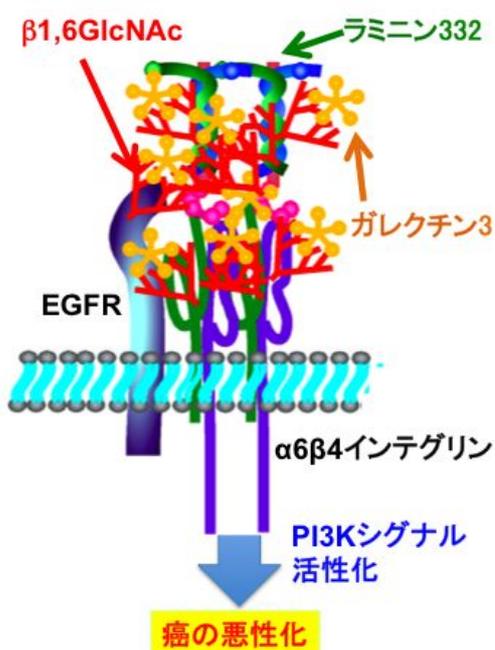


図1.本研究結果から考えられるβ4インテグリン糖鎖を介した癌の悪性のモデル図

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 5件)

1. Yukiko Kariya, Takeo Tatsuta, Shigeki Sugawara, Yoshinobu Kariya, Kazuo Nitta, Masahiro Hosono: RNase activity of sialic acid-binding lectin from bullfrog eggs drives antitumor effect via the activation of

p38MAPK to caspase3/7 signaling pathway in human breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* 49(4), 1334-1342, 2016. doi: 10.3892/ijo.2016.3656. (査読あり)

2. Yoshinobu Kariya*, Yukiko Kariya, Toshie Saito, Shuhei Nishiyama, Takashi Honda, Keiko Tanaka, Mari Yoshida, Kazuo Fujihara, Yasuhiro Hashimoto: Increased cerebrospinal fluid osteopontin levels and its involvement in macrophage infiltration in neuromyelitis optica. *BBA Clinical*, 3, 126-134, 2015. doi: 10.1016/j.bbacli.2015.01.003. (*corresponding author) (査読あり)
3. Yuka Matsumoto, Toshie Saito, Kyoka Hoshi, Hiromi Ito, Yoshinobu Kariya, Masamichi Nagae, Yoshiki Yamaguchi, Yoshiaki Hagiwara, Noriaki Kinoshita, Ikuo Wada, Kiyoshi Saito, Takashi Honda, Yasuhiro Hashimoto: *In situ* visualization of α2,6-sialylated transferrin in the liver. *J. Biochem.* 157(4), 211-216, 2015. doi: 10.1093/jb/mvu071. (査読あり)
4. Yoshinobu Kariya*, Mayumi Kanno, Kana Matsumoto-Morita, Midori Konno, Yoshiki Yamaguchi, Yasuhiro Hashimoto*: Osteopontin O-glycosylation contributes to its phosphorylation and cell adhesion properties. *Biochem. J.* 463 (1), 93-102, 2014. doi: 10.1042/BJ20140060. (*corresponding author) (査読あり)
5. Yoshinobu Kariya*, Yukiko Kariya and Jianguo Gu: Laminin-332 and Integrins: Signaling Platform for Cell Adhesion and Migration and its Regulation by N-glycosylation. *Laminins: Structure, Biological Activity and Role in Disease*. Nova Science Publishers, Inc. P29-51, 2013 (*corresponding author)(査読なし) URL: https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=43147

[学会発表](計 12件)

1. 苅谷慶喜、今野翠、顧建国、4 integrin Signaling Promotes Tumor Progression through Galectin-3-N-glycan Complex、第75回日本癌学会学術総会(神奈川県横浜市)、2016年10月8日(口頭発表)
2. 今野翠、苅谷慶喜、苅谷由貴子、菅野真由美、橋本康弘、部位特異的O-結合型糖鎖修飾がオステオポンチンの細胞接着活性に与える影響、第89回日本生化学会(宮城県仙台市)2016年9月25日
3. 苅谷慶喜、4インテグリン糖鎖による癌悪性のメカニズム、第4回マトリセラムフォーラム(東京、飯田橋)、2016年9月3日(口頭発表)
4. 苅谷慶喜、顧建国、N型糖鎖を介した 4

インテグリンシグナルは腫瘍の悪性化を促進する、第 74 回日本癌学会学術総会（名古屋県名古屋市）、2015 年 10 月 9 日（口頭発表）

5. 今野翠、苅谷慶喜、O-結合型糖鎖欠損によるオステオポンチン細胞接着活性調節は複数ヶ所の O-結合型糖鎖付加部位の欠失が必要である、第 74 回日本癌学会学術総会（名古屋県名古屋市）、2015 年 10 月 9 日（ポスター発表）
6. 苅谷慶喜、ラミニン 332 による癌の悪性進展メカニズム、第 37 回水疱症研究会（福島県福島市）、2015 年 9 月 27 日（招待講演）
7. 今野翠、苅谷慶喜、苅谷由貴子、菅野真由美、橋本康弘、糖鎖クラスター欠損によるオステオポンチンの細胞接着活性とリン酸化への影響、第 3 回マトリセルフォーラム（三重県津市）、2015 年 9 月 13 日（口頭発表）
8. 今野翠、苅谷慶喜、菅野真由美、苅谷由貴子、橋本康弘、糖鎖欠損によるオステオポンチンの細胞接着活性とリン酸化修飾への影響、第 47 回日本結合組織学会（東京、品川）、2015 年 5 月 16 日（口頭発表）
9. 苅谷由貴子、苅谷慶喜、斉藤利江、西山修平、本多たかし、田中恵子、吉田眞里、藤原一男、橋本康弘、脳脊髄液中オステオポンチンの視神経脊髄炎病態への関与、第 47 回日本結合組織学会（東京、品川）、2015 年 5 月 15 日（口頭発表）
10. 苅谷慶喜、O-結合型糖鎖を介したオステオポンチンの機能調節、第 2 回マトリセルフォーラム（東京、飯田橋）、2014 年 9 月 6 日（口頭発表）
11. 今野翠、苅谷慶喜、菅野真由美、松本（森田）加奈、山口芳樹、橋本康弘、オステオポンチンの O-結合型糖鎖による細胞接着活性およびリン酸化への影響、第 46 回日本結合組織学会学術大会・第 61 回マトリックス研究会大会（名古屋県名古屋市）、2014 年 6 月 6 日（口頭発表）
12. 苅谷慶喜、菅野真由美、橋本康弘、オステオポンチン上 O 型糖鎖のリン酸化および細胞接着活性に及ぼす影響、第 86 回日本生化学会大会（神奈川県横浜市）、2013 年 9 月 11 日（口頭発表およびポスター）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

苅谷 慶喜 (KARIYA Yoshinobu)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00458217