

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07924

研究課題名(和文)大腸癌特異的糖転移酵素の機能と転写制御の解明による新規薬剤スクリーニング系の構築

研究課題名(英文) Analysis of function and transcriptional mechanism of glycosyltransferase, which is associated with colon cancer, and development of novel drug screening system

研究代表者

佐藤 武史 (Sato, Takeshi)

長岡技術科学大学・工学研究科・准教授

研究者番号：30291131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸癌の悪性形質と関係する糖転移酵素 β -1,4-ガラクトース転移酵素 (β 4GalT) 4に着目し、この酵素の機能と転写制御機構を解析した。 β 4GalT4遺伝子の転写は、転写因子Sp1で制御されていることを見出した。次に、 β 4GalT4遺伝子の転写制御機構に着目して、この酵素遺伝子の発現をモニターするセンサー細胞を樹立した。Sp1のDNAへの結合を阻害するMithramycin AやMAPKを阻害するU0126を用いて、樹立したセンサー細胞の薬剤スクリーニングへの有用性を明らかにした。さらに、樹立したセンサー細胞が大腸癌幹細胞の薬剤スクリーニングへと応用が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this grant, we examined the function and transcriptional mechanism of beta-1,4-galactosyltransferase (B4GalT) 4, which is associated with poor prognosis of human colon cancer. Analysis of the transcriptional mechanism showed that the Sp1-binding site in the promoter region plays an important role for the transcription of the B4GalT4 gene in SW480 human colon cancer cells. To develop a novel drug screening system for colon cancer, the sensor cells containing the luciferase reporter controlled by the B4GalT4 gene promoter were established from SW480 cells. Upon treatment with mithramycin A, which inhibits the Sp1-binding to its binding site, or U0126, which inhibits MAPK, the promoter activities of the sensor cells decreased significantly. These results suggest that the sensor cells are useful for the drug screening. Furthermore, we showed that the application of the sensor cells to the drug screening for colon cancer stem cells. This study provides the novel drug screening system.

研究分野：医歯薬学

キーワード：癌 糖転移酵素 転写制御 センサー細胞 薬剤スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は癌の治療法の開発には、癌細胞に特異的に発現する糖鎖を作る糖転移酵素の発見が必要であると考えた。 β -1,4-ガラクトース転移酵素(β 4GalT)をコードする遺伝子は長年、生体内に1つしか存在しないと考えられていたが、研究代表者の佐藤は乳癌細胞から新しい遺伝子 β 4GalT5を単離した[Sato, T., *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 442.]. その後、次々と新しい β 4GalT 遺伝子が単離され、生体内には6種類の β 4GalT 遺伝子が存在することが明らかにされた[Furukawa, K. and Sato, T. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 54.].

これらの中で、 β 4GalT2と β 4GalT5の遺伝子発現は細胞の癌化に伴って顕著に変化することを見出した[Shirane, K., Sato, T., *et al.* (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 434.; Sato, T., *et al.* (1999) *Recent Res. Devel. Cancer* **1**, 105.]. また、細胞の癌化で増大する β 4GalT5遺伝子の発現は、転写因子Sp1やEts-1によって制御されていることを明らかにした[Sato, T. and Furukawa, K. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 39574.; Sato, T. and Furukawa, K. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 27702.]. さらに、癌細胞において β 4GalT2や β 4GalT5の遺伝子発現を制御することで、癌細胞の増殖、転移能や造腫瘍能を抑制できることを示した[Shirane, K., Kuji, R., Tareyanagi, C., Sato, T., *et al.* (2014) *Glycobiology* **24**, 532.; Tagawa, M., Shirane, K., Yu, L., Sato, T., *et al.* (2014) *Cancer Gene Ther.* **21**, 219.].

大腸癌は近年になって患者数が急速に増加している癌であるが、臨床研究によって β 4GalT4の発現量の増大は大腸癌の予後と相関することが報告された[Chen, W.-S., *et al.* (2006) *Clin. Cancer Res.* **11**, 8615.]. しかし、大腸癌における β 4GalT4の機能や、その遺伝子発現の制御メカニズムは未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

癌組織のごく一部を占める癌幹細胞の存在が、癌の完全な治療を困難にしている。細胞の表面を覆う糖鎖の構造は、細胞の癌化に伴って変化することが知られている。糖鎖は癌のマーカーとして使用されているが、詳細な糖鎖構造の解析によって、特定の癌の糖鎖の癌性変化をモニターするには時間がかかる。従って、糖鎖構造の解析に代わる高感度で簡便な新しい技術が必要である。本研究では、大腸癌に特異的に発現する糖転移酵素に着目し、この酵素の機能と転写制御機構を明らかにする。さらに、糖転移酵素遺伝子の発現を高感度且つハイスループットにモニターするセンサー細胞を大腸癌細胞及び癌幹細胞から樹立して、大腸癌を根治する薬剤のスクリーニングシステムの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) β 4GalT4の機能解析

SW480ヒト大腸癌細胞から、 β 4GalT4遺伝子を導入した細胞を樹立した。レクチンブロット解析とTLCにより、この細胞の糖タンパク質糖鎖及び糖脂質組成を解析した。 β 4GalT4の機能を解析するために、樹立した細胞を用いて足場非依存的増殖能を評価するソフトアガーアッセイや、癌幹細胞性を評価するスフェロイドアッセイを行った。

(2) β 4GalT4遺伝子の転写制御機構の解析

β 4GalT4遺伝子の転写開始点を決定するために、オリゴキャッピング法によりSW480細胞由来の完全長cDNAを作製し、5'-RACE-PCRを行い、特異的に増幅した遺伝子の塩基配列を解析した。ヒトゲノムDNAを用いて、 β 4GalT4遺伝子の転写開始点から5'-上流1.8kbの領域を単離した。この領域をルシフェラーゼ遺伝子の5'-上流に組み込んだレポータープラスミドと、各種デリベーションコンストラクトを作製し、SW480細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。

(3) センサー細胞の樹立

薬剤耐性遺伝子を含み、(2)で特定した β 4GalT4遺伝子の転写制御領域をルシフェラーゼ遺伝子の5'-上流に組み込んだレポータープラスミドを新たに作製した。このプラスミドをGene Pulser Xcell CE system (Bio-Rad社)を用いてSW480細胞に導入し、薬剤存在下で培養することでレポーター遺伝子が安定的に導入されたセンサー細胞を樹立した。

(4) 化合物に対するセンサー細胞の応答性の解析

センサー細胞をDNAへのSp1への結合を阻害するMythramycin A、mitogen-activated protein kinase (MAPK)を阻害するU0126、epidermal growth factor receptor (EGFR)のリン酸化を阻害するTyrphostin AG1478で処理し、ルシフェラーゼアッセイによりセンサー細胞のプロモーター活性を評価した。

(5) 薬剤スクリーニングシステムの構築

96-well plateにセンサー細胞を播種し、薬剤をスクリーニングするためのハイスループットスクリーニング系を構築した。

(6) 化合物ライブラリーのスクリーニング

ハイスループットスクリーニング系を用いて、食品関連化合物ライブラリーからヒット化合物のスクリーニングを行った。

(7) センサー細胞からの癌幹細胞の選別

Ultra-Low Attachment Surface (6-well)を用いたスフェア形成法により、センサー細胞から癌幹細胞を選別した。選別した細胞における大腸癌幹細胞マーカーCD44の発現を、RT-PCRにより解析した。

4. 研究成果

(1) β 4GalT4 の機能解析

SW480 ヒト大腸癌細胞に β 4GalT4 遺伝子を導入し、薬剤処理することにより β 4GalT4 遺伝子を安定的に導入した細胞を樹立した。この細胞における β 4GalT4 遺伝子の発現を定量的 PCR により解析した結果、対照細胞に比べて発現が 2 倍高かった。樹立した細胞の糖タンパク質糖鎖及び糖脂質組成を、レクチンブロット解析と TLC により解析した。その結果、対照細胞と比べて糖タンパク質糖鎖は変化しなかったが、糖脂質組成は変化する傾向が見られた。従って、SW480 細胞において β 4GalT4 は糖脂質の生合成に関わっていることが示唆された。

樹立した細胞の癌細胞の悪性形質を、足場非依存的増殖能を評価するソフトアガーアッセイや癌幹細胞性を評価するスフェロイドアッセイにより解析した。その結果、いずれのアッセイでも対照細胞と β 4GalT4 遺伝子高発現細胞との間で悪性形質に有意な変化は見られなかった。糖鎖修飾の変化が軽微であったこと考え併せると、遺伝子発現が 2 倍程度高いだけでは悪性形質に影響を与えない可能性が考えられる。

(2) β 4GalT4 遺伝子の転写制御機構の解析

オリゴキャッピング法によって作製した cDNA を用いた 5' -RACE-PCR により転写開始点を決定した結果、この遺伝子の転写開始点は翻訳開始コドンから 5' -上流 10 kb 付近に複数存在することが判明した。また、ヒト β 4GalT4 mRNA には選択的スプライシングによって、構成されるエクソンが異なる 2 種類の 5' -UTR が存在した。従って、ヒト β 4GalT4 遺伝子には、5' -UTR が異なる 2 種類の mRNA が存在することが初めて明らかになった。

次に、SW480 細胞で多く使われる転写開始点を含み、転写開始点から 5' -上流 1.8 kb の領域を単離した。この領域を含むレポータープラスミドを SW480 細胞に導入すると、高いプロモーター活性が検出された。各種のデリベーションコンストラクトを用いて解析した結果、転写開始点から 5' -上流 0.17 kb に転写を制御する領域が存在することが判明した。同定した β 4GalT4 遺伝子のプロモーター領域に存在する 1 カ所の転写因子 Sp1 結合部位に変異を導入すると、プロモーター活性が著しく低下した。一方、Sp1 遺伝子を導入すると、プロモーター活性が有意に増加することが判明した。従って、 β 4GalT4 遺伝子は Sp1 によって制御されていることが判明した。さらに、この領域の上流に存在し、大腸癌との関連が報告されている転写因子 Runx1 に着目して解析を進めた。その結果、Runx1 遺伝子を導入すると、プロモーター活性が有意に増加することが判明した。以上の結果から、Sp1 や Runx1 は β 4GalT4 遺伝子の転写を正に制御する転写因子であると考えられる。

(3) 薬剤スクリーニングへのセンサー細胞の有用性の検討

β 4GalT4 遺伝子の転写制御配列 0.3 kb をルシフェラーゼ遺伝子の上流に繋いだプラスミドを、大腸癌細胞に恒常的に導入しセンサー細胞を樹立した。この細胞に DNA への Sp1 への結合を阻害する Mithramycin A を添加すると、薬剤濃度依存的にプロモーター活性は著しく低下した。また、MAPK を阻害する U0126 を添加すると、Mithramycin A の場合と同様に薬剤濃度依存的にプロモーター活性は低下した。しかし、EGFR のリン酸化を阻害する Tyrphostin AG1478 を添加した場合はプロモーター活性に変化は見られなかった。これらの結果から、樹立したセンサー細胞は β 4GalT4 遺伝子の転写を抑制する薬剤のスクリーニングに有用であると考えられる。

(4) 化合物ライブラリーのスクリーニング

構築した薬剤スクリーニングの効率化を図る目的で、96-well plate を用いたハイスループット系の構築を行った。ハイスループット系を Mithramycin A や U0126 で処理した場合は、薬剤濃度依存的にプロモーター活性は低下し、(3) で得られた結果をよく反映していた。次に、 β 4GalT4 遺伝子の発現を抑制する薬剤を探索するために、このハイスループット系を用いて食品関連化合物ライブラリーをスクリーニングした。その結果、40 種類の化合物の中で 1 種類の化合物によってプロモーター活性が著しく低下したことから、この化合物は β 4GalT4 遺伝子の発現を抑制することが考えられた。予備的な実験では、この化合物でヒト大腸癌細胞を処理すると細胞増殖能が著しく低下したことから、この化合物は腫瘍形成能などの癌の悪性形質を抑制することが示唆された。

(5) センサー細胞の大腸癌幹細胞の薬剤スクリーニングへの応用

樹立したセンサー細胞が、大腸癌幹細胞に対する薬剤スクリーニングに応用できるかどうかを検討した。センサー細胞から、スフェア形成法により癌幹細胞を選別した。RT-PCR により解析した結果、元のセンサー細胞では CD44 遺伝子の発現は検出されなかったが、選別した細胞は大腸癌幹細胞マーカーである CD44 遺伝子を発現していた。さらに、ルシフェラーゼアッセイにより、選別した大腸癌幹細胞のプロモーター活性を評価した結果、センサー細胞と同様に高いプロモーター活性を有していた。従って、センサー細胞が大腸癌幹細胞に対する薬剤スクリーニングに応用できることが示された。

本研究から、 β 4GalT4 遺伝子の転写制御機構に着目した大腸癌に対する薬剤スクリーニングの有用性を明らかにし、大腸癌幹細胞の薬剤スクリーニングへの応用が可能であることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- Muramoto, K., Tange, R., Ishii, T., Miyauchi, K., and Sato, T. (2017) Downregulation of transcription factor Sp1 suppresses malignant properties of A549 human lung cancer cell line with decreased β 4-galactosylation of highly branched N-glycans. *Biol. Pharm. Bull.*, **40** (8), 1282-1288.
- Sugiyama, A., Fukushima, N., and Sato, T. (2017) Transcriptional mechanism of the β 4-galactosyltransferase 4 gene in SW480 human colon cancer cell line. *Biol. Pharm. Bull.*, **40** (5), 733-737.

〔学会発表〕(計 19 件)

- 福島直道、杉山あてな、佐藤武史、 β 4-ガラクトース転移酵素 4 のプロモーター領域を組込んだ大腸癌センサー細胞の薬剤応答性、日本薬学会第 138 年会、2018.3.26、金沢
- 齋藤健吾、杉山あてな、福島直道、佐藤武史、ヒト β 4-ガラクトース転移酵素 4 遺伝子の転写活性化への転写因子 Runx の関与、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017.12.6、神戸
- 川口沙織、新田美春、佐藤武史、マウス β 4-ガラクトース転移酵素 6 遺伝子の転写メカニズムの解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017.12.8、神戸
- 加藤大志、丹下梨穂、佐藤武史、転写因子 N-myc による β 4-ガラクトース転移酵素 3 遺伝子プロモーターの活性化機構の解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017.12.6、神戸
- 福島直道、杉山あてな、齋藤健吾、佐藤武史、大腸癌薬剤スクリーニングのための β 4-ガラクトース転移酵素 4 遺伝子プロモーターを用いたセンサー細胞、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017.12.6、神戸
- 石井孝幸、丸山拓朗、佐藤武史、マウス前駆脂肪細胞の分化過程での β 4-ガラクトース転移酵素 5 のプロモーター活性と転写因子 Sp1 の発現との相関、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017.12.7、神戸
- 丹下梨穂、佐藤武史、ヒト肺癌細胞と神経芽腫において異なる β 4-ガラクトース転移酵素 3 遺伝子の転写制御、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017.12.7、神戸
- 新田美春、川口沙織、金子兼大、佐藤武史、細胞の癌化に伴うラクトシルセラミド合成酵素 (β 4GalT5 及び β 4GalT6) の遺伝子発現と転写制御、日本薬学会第 137 年会、2017.3.25、仙台
- 石井孝幸、金子兼大、宮内香那、佐藤武

- 史、3T3-L1 マウス前駆脂肪細胞の分化における β 4-ガラクトース転移酵素 5 遺伝子の発現制御、第 39 回日本分子生物学会年会、2016.11.30、横浜
- 福島直道、杉山あてな、佐藤武史、 β 4-ガラクトース転移酵素 4 遺伝子の SW480 ヒト大腸癌細胞における転写制御、第 39 回日本分子生物学会年会、2016.12.1、横浜
- 川口沙織、新田美春、佐藤武史、マウス及びヒト・ラクトシルセラミド合成酵素 (β 4GalT6) 遺伝子のプロモーター領域の解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016.12.1、横浜
- 塚原康之、杉山あてな、福島直道、佐藤武史、正常ヒト培養細胞における β 4-ガラクトース転移酵素 4 遺伝子の 5' -非翻訳領域の解析、第 89 回日本生化学会大会、2016.9.26、仙台
- 杉山あてな、佐藤武史、SW480 ヒト大腸癌細胞におけるヒト β 4-ガラクトース転移酵素 4 遺伝子のプロモーター領域の解析、第 89 回日本生化学会大会、2016.9.26、仙台
- 宮内香那、佐藤武史、ヒト前駆脂肪細胞の分化に伴う糖転移酵素遺伝子の発現動態の解析、日本薬学会第 136 年会、2016.3.29、横浜
- 丹下梨穂、佐藤武史、ヒト β 4-ガラクトース転移酵素 3 遺伝子の転写制御の肺癌細胞と神経芽細胞腫における比較解析、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、2015.12.1、神戸
- 宮内香那、高橋映莉乃、佐藤武史、3T3-L1 マウス前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化に伴う β 4-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現動態の解析、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、2015.12.1、神戸
- 杉山あてな、佐藤武史、ヒト β 4-ガラクトース転移酵素 4 遺伝子の 5' -非翻訳領域及び転写開始点の解析、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、2015.12.1、神戸
- 新田美春、川口沙織、佐藤武史、ラクトシルセラミド合成酵素 (β 4GalT5 及び β 4GalT6) 遺伝子の転写制御、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、2015.12.1、神戸
- 宮内香那、佐藤武史、3T3-L1 マウス前駆脂肪細胞の分化における N-型糖鎖修飾の解析、第 34 回日本糖質学会年会、2015.8.1、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 武史 (SATO Takeshi)
長岡技術科学大学・工学部・准教授
研究者番号：30291131