

平成 30 年 4 月 17 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08288

研究課題名(和文) 低酸素誘導因子HIFによる糖鎖関連遺伝子の転写誘導とその病態的意義の総合的解明

研究課題名(英文) Comprehensive study on transcriptional induction mechanisms and pathological significance of glycan-related genes by hypoxia inducible factor, HIF

研究代表者

神奈木 玲児 (Kannagi, Reiji)

愛知医科大学・私立大学の部局等・その他

研究者番号：80161389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素抵抗性を獲得した癌細胞は悪性度が高く、高転移性で治療抵抗性を示す。我々は以前から低酸素抵抗性の獲得において鍵となる転写因子HIFが多数の糖鎖関連遺伝子の転写調節に関わることを解明してきた。本研究では癌細胞で重要な細胞接着分子CD44のリガンドであるヒアルロン酸の分解酵素遺伝子のうちHYAL1が低酸素により転写誘導されることを見だし、これが癌治療の有力なターゲット遺伝子であることを明らかにした。またmicroRNAが調節する糖鎖関連遺伝子をMiaTrap法で調べ、GCNT2がmiR-199によって調節されることを見だし、これも癌治療の有力なターゲット遺伝子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Hypoxia-resistant cancer cells are known to have highly malignant characteristics, frequently undergo metastasis, and are resistant to chemotherapy. We are long studying induction mechanisms of glycan-related genes by a transcription factor HIF, which plays a key role in acquisition of hypoxia resistance. In this project we clarified that HYAL1, which encode a degradation enzyme for hyaluronic acid, the CD44 ligand, is induced by hypoxia and is a good target for cancer therapy. We also identified GCNT2 gene to be regulated by microRNA miR-199 under hypoxia, and is also a good target for cancer therapy.

研究分野：生化学、腫瘍学

キーワード：低酸素 糖鎖関連遺伝子 CD44 ヒアルロン酸 micro-RNA 転写調節 HIF-1

1. 研究開始当初の背景

癌細胞が増殖して癌病巣を形成するようになると、病巣中には血管形成が十分でないため低酸素領域が生じる。この条件下では遺伝子変異を蓄積して低酸素抵抗性を獲得するに至った癌細胞クローンが優勢に増殖する。ここで重要なのは低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor, HIF) と呼ばれる転写因子である。HIF はほんらい正常上皮細胞が低酸素状態となった際に働く転写因子であり、正常条件下で可逆的かつ一時的に誘導される。低酸素抵抗性を獲得した癌細胞では、可逆的な活性の亢進に加えて、HIF の活性がしばしば恒常的・構成的に亢進している。

HIF によって転写誘導される遺伝子は、大きく分けて二つのグループに属しており、そのなかには糖鎖の発現に関与する遺伝子が多数見いだされる。ひとつは、なるべく酸素消費を節約する代謝偏倚を実現するための遺伝子群であり、その大部分は嫌氣的解糖系にかかわる遺伝子である。グルコース代謝は生体内における最も大規模な糖の代謝系であり、その変化は、グルコース以外の単糖の代謝にも大きな影響を及ぼす。

HIF によって転写誘導される遺伝子のもうひとつのグループは、血管形成と赤血球産生の促進によって、酸素の供給を増加させるための遺伝子である。糖鎖関連遺伝子としては、血管内皮細胞に発現する細胞接着分子であるセレクチンとの結合性をもつ糖鎖の発現が低酸素によって誘導されることが知られている。この糖鎖の発現誘導は、HIF による一連の糖鎖合成遺伝子の転写誘導によりもたらされると考えられている。

2. 研究の目的

低酸素抵抗性の獲得は代謝偏倚の実現という点からも、また酸素の供給を増加という点からも細胞の癌化にとって重要であることから、HIF によって転写誘導される低酸素抵抗性をもたらし遺伝子は、癌治療の有力なターゲットであると考えられる。それらの遺伝子のうち、糖鎖の発現に関与する遺伝子は、遺伝子産物が細胞表層に発現され、治療応用が容易であると考えられる。そこで、我々は、これまでの我々の研究において行ったスクリーニングの結果、低酸素によって誘導されることが判明した糖鎖関連遺伝子について、これらをターゲットとした癌治療の可能性を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

はじめ我々は、癌細胞を低酸素下で培養すると、セレクチンの特異的な糖鎖リガンドの発現が亢進することを認め、その背後に、転写因子 HIF による一連の糖鎖合成遺伝子の転写誘導があることを見いだした (*Cancer Sci*, 101: 586-593, 2010; *PNAS*, 101: 8132-8137, 2004 など)。この研究の際に我々は DNA マイクロアレイを用い、HIF が多数の糖鎖合成遺

伝子を転写誘導することを見いだした。その後も我々は糖鎖の合成・発現に関与する糖鎖関連遺伝子の転写調節機構を解析してきたが、これまでに検討した転写因子のうち、HIF はとりわけて多数の糖鎖関連遺伝子の転写を誘導する点で際立っている。我々は既に、フコース転移酵素、シアル酸転移酵素、UDP-ガラクトーストランスポーター、シアル酸トランスポーター、ヒアルロン酸合成酵素や分解酵素遺伝子などの遺伝子の転写を強く誘導することを見いだしてきた (*Cancer Res*, 66: 2937, 2006; *BBRC*, 357: 537, 2007; *FEBS Lett.* 584: 1872, 2010, および未発表データなど)。そこで、我々は DNA マイクロアレイをはじめとするこれまでのスクリーニング法により、HIF によって転写誘導されることが判明した一連の糖鎖合成遺伝子を癌治療のターゲットの候補として研究を進めることとした。

また近年、microRNA が遺伝子発現の重要な調節機構であることが判明してきており、低酸素による遺伝子の発現を調節する一連の microRNA が知られるようになった。こうした microRNA のスクリーニング法として最近導入された MirTrap 法を用いて、低酸素の際に microRNA によって調節される糖鎖関連遺伝子についてもスクリーニングを行い、低酸素に関連した新しい治療のターゲットの候補の発見を試みることにした。

4. 研究成果

癌細胞で重要な役割を演じる細胞接着分子 CD44 のリガンドであるヒアルロン酸の合成酵素遺伝子、HAS1, HAS2, HAS3 のうち HAS3 が低酸素により転写誘導され、またヒアルロン酸の分解酵素遺伝子のうち HYAL1 もまた低酸素により転写誘導されることを見いだした。レポーターアッセイおよび ChIP アッセイにより、この転写誘導が HIF によるものであることを実験的に確認した。さらに癌細胞において HAS3 および HYAL1 を shRNA によってノックダウンした安定的クローンを得てマウスを用いて *in vivo* の腫瘍成長実験を行ったところ、HYAL1 のノックダウンによって腫瘍の増生が統計的に有意に抑制されることを見いだした。一方、HAS3 のノックダウンでは腫瘍の増生には低下が見られなかった。この結果は、HYAL1 が癌治療の有力なターゲット遺伝子であることを示唆する。

また最近、低酸素による転写誘導に microRNA による調節が関与していることが知られ始めたので、癌細胞において低酸素で誘導される糖鎖関連遺伝子について microRNA の関与を検出するために MiaTrap アッセイによるスクリーニングを行ったところ、糖鎖関連遺伝子のうちポリラクトサミン糖鎖に分枝構造を形成する酵素の遺伝子である GCNT2 が miR-199 という microRNA によって強く調節されていることを見いだ

した。GCNT2 遺伝子の 3'-UTR 部のレポーターコンストラクトを作成してレポーターアッセイを行うと、この結果が再確認された。糖鎖関連遺伝子 GCNT2 は低酸素により誘導され、また癌細胞の上皮-間葉転換においても有意に誘導され、CD44-ヒアルロン酸系と同じく癌細胞の運動能や浸潤能に深く関与している事も判明した。上皮-間葉転換においても多数の糖鎖関連遺伝子が誘導されることが知られており(PNAS, 109: 7776-7781, 2012)、その一部は低酸素により誘導される遺伝子と重なり合うことが知られている。上皮間葉転換を起こした癌細胞は癌幹細胞に近い性質を持つことも知られている。こうしたことから、糖鎖関連遺伝子 GCNT2 も癌治療の有力なターゲット遺伝子のひとつである可能性がある。

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 12 件)

- Lin, Y. C., Liu, C. Y., Kannagi, R., and Yang, R. B.: Inhibition of endothelial SCUBE2 (Signal peptide-CUB-EGF domain-containing protein 2), a novel VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) coreceptor, suppresses tumor angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, [Epub ahead of print] 査読有. 10.1161/ATVBAHA.117.310506
- Chao, C. C., Wu, P. H., Huang, H. C., Chung, H. Y., Chou, Y. C., Cai, B. H., and Kannagi, R.: Downregulation of miR-199a/b-5p is associated with GCNT2 induction upon epithelial-mesenchymal transition in colon cancer. *FEBS Lett.*, **591**: 1902-1917, 2017. 査読有. 10.1002/1873-3468.12685
- Chen, J. Y., Huang, H. H., Yu, S. Y., Wu, S. J., Kannagi, R., and Khoo, K. H.: Concerted mass spectrometry-based glycomic approach for precision mapping of sulfo sialylated N-glycans on human peripheral blood mononuclear cells and lymphocytes. *Glycobiology*, **28**: 9-20, 2017. 査読有. 10.1093/glycob/cwx091.
- Hebert, K. S., Seidman, D., Oki, A. T., Izac, J., Emani, S., Oliver, L. D., Jr., Miller, D. P., Tegels, B. K., Kannagi, R., Marconi, R. T., and Carlyon, J. A.: Anaplasma marginale outer membrane protein A is an adhesin that recognizes sialylated and fucosylated glycans and functionally depends on an essential binding domain. *Infect. Immun.*, **85**: e00968-16, 2017. 査読有. 10.1128/IAI.00968-16
- Lin, Y. C., Chao, T. Y., Yeh, C. T., Roffler, S. R., Kannagi, R., and Yang, R. B.: Endothelial SCUBE2 interacts with VEGFR2 and regulates VEGF-Induced angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **37**: 144-155, 2017. 査読有. 10.1161/ATVBAHA.116.308546
- Tu, C. F., Wu, M. Y., Lin, Y. C., Kannagi, R., and Yang, R. B.: FUT8 promotes breast cancer cell invasiveness by remodeling TGF- β receptor core fucosylation. *Breast Cancer Res.*, **19**: 111, 2017. 10.1186/s13058-017-0904-8
- Cai, B. H., Chao, C. F., Lin, H. C., Huang, H. Y., Kannagi, R., and Chen, J. Y.: A/T gap tolerance in the core sequence and flanking sequence requirements of non-canonical p53 response elements. *J. Biochem.*, **159**: 563-572, 2016. 査読有. 10.1093/jb/mvw005
- Wu, N. L., Huang, D. Y., Wang, L. F., Kannagi, R., Fan, Y. C., and Lin, W. W.: Spleen tyrosine kinase mediates EGFR signaling to regulate keratinocyte terminal differentiation. *J. Invest. Dermatol.*, **136**: 192-201, 2016. 査読有. doi:10.1038/jid.2015.381
- Macauley, M. S., Kawasaki, N., Peng, W., Wang, S. H., He, Y., Arlian, B. M., McBride, R., Kannagi, R., Khoo, K. H., and Paulson, J. C.: Unmasking of CD22 on germinal center B-cells occurs by alternative mechanisms in mouse and man. *J. Biol. Chem.*, **290**: 30066-30077, 2015. 査読有. 10.1074/jbc.M115.691337
- Miyara, M., Chader, D., Sage, E., Sugiyama, D., Nishikawa, H., Bouvry, D., Claer, L., Hingorani, R., Balderas, R., Rohrer, J., Warner, N., Chapelier, A., Valeyre, D., Kannagi, R., Sakaguchi, S., Amoura, Z., and Gorochoy, G.: Sialyl Lewis x (CD15s) identifies highly differentiated and most suppressive FOXP3high regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **112**: 7225-7230, 2015. 査読有. 11.1073/pnas.1508224112
- Tanaka, K., Tamiya-Koizumi, K., Yamada, M., Murate, T., Kannagi, R., and Kyogashima, M.: Hypoxia remodels the composition of the constituent ceramide species of HexCer and Hex2Cer with phytosphingosine and hydroxy fatty acids in human colon cancer LS174T cells. *Glycoconj. J.*, **32**: 615-623, 2015. 査読有. 12.1007/s10719-015-9607-5
- Yaji, S., Manya, H., Nakagawa, N., Takematsu, H., Endo, T., Kannagi, R., Yoshihara, T., Asano, M., and Oka, S.: Major glycan structure underlying expression of the Lewis X epitope in the developing brain is O-mannose-linked glycans on phosphacan/RPTP β . *Glycobiology*, **25**: 376-385, 2015. 査読有. 13.1093/glycob/cwu118

[学会発表] (計 3件)

1. 神奈木玲児: 胚性幹細胞の糖鎖マーカーとがん. 箱守仙一郎糖鎖科学シンポジウム, 仙台, 11月10日, 2017.
2. Kannagi R: Genetic and epigenetic mechanisms involved in abnormal glycan expression in cancers. [Invited Lecture] IUBMB Special Meeting: Frontiers in Glycoscience II: Oncology (Chaired by Liu FT and Wang AHJ), Taipei, December 4-6, 2017.
3. 狩野芳信, 奥野恭史, 神奈木玲児, 岡昌吾, 竹松弘: P-selectin リガンド糖鎖発現を負に制御するppGalNAc転移酵素. 東京医科歯科大学難治疾患共同研究拠点研究集会「糖鎖免疫 Glycoimmunology 2018」, 東京, 2月19-20日, 2018.

[図書] (計 5件)

1. Kannagi, R., Cai, B. H., Huang, H. C., and Sakuma, K. Regulation of cell surface glycan expression in cancer stem cells. *In* T. Kawaguchi (ed.), Cancer metastasis and cancer stem cell/niche, pp. 24-60. Sharjah, UAE: Bentham Science Publishers, 2017.
2. Varki, A., Kannagi, R., Toole, B. P., and Stanley, P. Glycosylation changes in cancer. *In* A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, and P. H. Seeberger (eds.), Essentials of Glycobiology, 3rd ed, pp. 597-609. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
3. Kannagi, R., Sakuma, K., and Ohmori, K. Sialyl sulfoglycans in immune regulation and their clinical applications. *In* N. Taniguchi, T. Endo, G. W. Hart, P. H. Seeberger, and C. H. Wong (eds.), Glycoscience: Biology and Medicine, pp. 617-625. Tokyo: Springer, 2015.
4. Kannagi, R., Sakuma, K., Cai, B. H., and Yu, S. Y. Tumor-associated glycans and their functional roles in the multi-step process of human cancer progression. *In* T. Suzuki, K. Ohtsubo, and N. Taniguchi (eds.), Sugar Chains, Decoding the Functions of Glycans, pp. 139-158. Tokyo: Springer, 2015.
5. Kannagi, R. and Kimura, N. Monoclonal antibodies for glycans as tools for identifying endogenous glycan ligands for human carbohydrate-recognition molecules. *In* N. Taniguchi, T. Endo, G. W. Hart, P. H. Seeberger, and C. H. Wong (eds.), Glycoscience: Biology and Medicine, pp. 1551-1556. Tokyo: Springer, 2015.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神奈木 玲児 (KANNAGI REIJI)

愛知医科大学・公私立大学の部局等・客員教授

研究者番号:80161389