

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：31305

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14408

研究課題名(和文) コアフコースでがんを制す

研究課題名(英文) Anticancer effects based on core fucose

研究代表者

顧 建国 (GU, Jianguo)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40260369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：コアフコースはフコース転移酵素(Fut8)により生合成され、肝がんの特異的バイオマーカーや抗体医療とも深く関わっており、注目されている糖鎖の一つである。また、コアフコースの発現は、多くのがん細胞や組織において上昇すると報告されているが、その意義に関しては全く不明である。本研究では、コアフコース糖鎖の発現は肝癌の誘導や細胞の増殖に寄与し、その分子機序を明らかにした。更にある化合物によるコアフコースの抑制で肝癌や膵癌などの癌細胞の増殖、移動および腫瘍形成能の低下が確認された。

研究成果の概要(英文)：The expression of core fucose catalyzed 1,6-fucosyltransferase (Fut8) has been known to be elevated in both liver and serum during the process of hepatocarcinogenesis (HCC) or in other cancers. However, functions of the increased core fucose in cancers remain poorly understood. In the present study, we used a well-established HCC model to investigate the functions of Fut8 in HCC, found that tumor incidence was greatly inhibited in Fut8-KO mice compared to wild-type mice, and the responses to growth factors such as EGF and HGF were decreased in Fut8 deficient cells compared to wild-type cells. Furthermore, inhibition of core fucose by a small compound suppressed cancer cell proliferation and integrin-mediated cell migration, as well as colony formation and tumor xenograft efficacy. These results clearly described the importance of core fucose in cancer progression, suggesting the small compound might be a novel candidate for cancer therapy.

研究分野：生化学

キーワード：コアフコース N型糖鎖 がん 細胞膜受容体 細胞内シグナル 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

がんは、いくつかの要因が重なり合い、正常な細胞が徐々に“がん化”していくと考えられているが、その要因ははっきり解明されていない。がん細胞は、異常に増殖し続け、周囲の組織に浸潤し、さらに遠くの臓器に転移する。これまで、多くの研究者により、細胞増殖、血管新生あるいは細胞死抑制に関与する多くの成長因子やサイトカインなどの個々の働きに注目して精力的に研究が進められてきた。しかし、その個々の分子機構が解明され、その機能を抑制しても、がん治療へは至らない。その一因としては、がん治療に対してがん細胞の増殖・浸潤・転移に関わる多くの分子機能を同時に抑制しなければならぬためと考えられる。一方、それら成長因子やサイトカインの受容体及びほとんどの液性因子は糖タンパク質である。これまで、糖鎖修飾は複雑であるため、糖鎖修飾による機能変化に注目した研究が少ない。申請者らは、世界に先駆けて糖鎖のリモデリングによって、受容体の機能が激変すること、また、受容体上の特定の糖鎖構造がその発現や機能を制御することを証明してきた。

以前、申請者らは、コアフコースの生理機能を調べるため、その触媒酵素である Fut8 の欠損マウスを作製し、機能解析を行った。その欠損マウスに見られた肺気腫様の組織変化は TGF- 受容体や VEGF 受容体の機能低下に起因するという分子メカニズムを明らかにした (PNAS. 102: 15791-6, 2005; JB.145: 643-51, 2009)。また、細胞増殖と深く関わる EGFR の機能発現にも Fut8 による修飾が必要であることも明らかとなった (JBC 281: 2572-7, 2006)。一方、肝がんにおいてはコアフコースの発現は上昇すると報告されたが、その意義に関しては全く不明である。近年、申請者らは、Fut8 と肝細胞増殖との関連性についての研究を行い、肝再生

においても Fut8 の発現が重要であることを明らかにした (Wang Y., et al., *Sci. Rep.* DOI: 10.1038/srep08264, 2015)。その研究において、肝再生の初期に Fut8 の発現が強く誘導され、野生型マウスに比べ Fut8 ヘテロ欠損マウスの肝再生能が有意に低下し、さらに L-フコースを投与することでその低下した肝再生能が回復するという結果が得られた。これらの結果は、コアフコースの発現が肝細胞の増殖に機能的に寄与することを初めて示した。

2. 研究の目的

がんに関係した遺伝子は大きく分けるとがん遺伝子とがん抑制遺伝子があり、それらの主なタンパク質が細胞質または核で働く。当初、それらの生物機能が解明されれば、新しいがん治療法が開発されるであろうと思われていたが、期待されるほどの成果は見られなかった。その一因として、それらだけに注目してもがん細胞の本質が十分には解明されていないためと考えられる。本研究は、「コアフコースでがんを制す」という課題を掲げ、糖タンパク質を普遍的に修飾する糖鎖によるがん細胞の機能制御という新しい視点から、がん細胞におけるコアフコースの発現およびその意義を明らかにするとともに、新規ながん治療法の開発に貢献する新知見の提示を目指す。

3. 研究の方法

がんにおける Fut8 およびその産物であるコアフコース糖鎖の機能を明らかにするため、化学誘導性肝がんの実験モデルマウスにおける Fut8 の役割を検討する。また、肝がん細胞に加え、膵がん細胞と大腸がん細胞を用いて、コアフコースの発現有無で細胞増殖や腫瘍形成能を検討するとともに、コアフコースの糖鎖修飾と標的分子の機能解析を行う。特にがん細胞の増殖や浸潤・転移と深く

関わる増殖因子受容体や接着分子の活性化と Fut8 の発現との関連性に注目し解析する。

(1) N-diethylnitrosamine(DEN)を用いた化学誘導性肝発がん過程における Fut8 の発現変動と役割

(2) コアフコースによる受容体の機能解析

(3) コアフコースの欠損によるがん細胞の性質変化

(4) 小化合物によるコアフコースの抑制とがん細胞の機能変化

4. 研究成果

(1)申請者は、コアフコースが肝がんの形成に重要な役割を果たしているとの仮説を立て、Fut8 欠損マウスを用いて検証した。その結果、化学誘導性肝がんの実験モデルマウスでは、野生型に比べ Fut8 欠損マウスの肝がん誘発が著しく抑制されることを見出した。一方、Fut8 ヘテロ欠損マウスにおいてもがんの誘発能が低下していた。また、Ki-67 免疫染色の結果も野生型に比べ Fut8 欠損マウスの肝がん細胞の増殖が抑制されていると示した。面白いことに、がん誘発の初期（炎症期 12 週）では、Fut8 の発現が有意に誘導されたのに対して、中期（28 週）に一旦下がって、後期（腫瘍形成期 36 週以降）ではその発現が再び上昇した(Wang, Y., et al. *FASEB J.*, 29:3217, 2015)。それらの結果から、Fut8 発現は、肝がん形成に重要であることが強く示唆された。

(2)CRISPR/Cas9 を用いて、Fut8 の遺伝子欠損肝がん HepG2 細胞株を樹立した。Fut8 欠損および野生型細胞に対して、肝がん重要と言われている EGF および HGF で刺激を行い、EGFR と c-Met 受容体の活性化を比較した。その結果、Fut8 欠損細胞においた活性化が、野生型細胞に比べ低下していた。それは、コアフコースの付加は EGFR と c-Met 受容体の機能発揮に重要であることを証明した。その機序において、リガンドとその受容体の結合に

コアフコースが必要であることを明らかにした。

(3)Fut8 欠損した肝がん細胞の細胞増殖やヌードマウスにて腫瘍形成能が著しく低下することを見出した(Wang, Y., et al. *FASEB J.*, 29:3217, 2015)。他のがん細胞に対しても検討し、同様の結果が得られている。また、コアフコースはインテグリンを介した細胞運動にも重要であることを解明した。

(4)糖転移酵素の阻害剤の開発に関しては、化合物が *in vitro* での活性阻害が認められでも、細胞あるいは *in vivo* での実験ではその阻害効果はあまり認められない。その主要な原因は、糖転移酵素の多くはゴルジ体の内腔側に局在するため、阻害剤がそこに到達し難いと考えられた。最近、ある小化合物（フコースの類似体）により内在性の GDP-フコースの生合成が抑えられたため、コアフコースの発現が強く抑制されることを確認した。予備的な実験において HepG2 細胞を低濃度のその小化合物を処理することによってコアフコースの発現が劇的に抑えられ、そして細胞の増殖能や細胞の浸潤性も抑制されることを見出した。

以上の結果は、初めてコアフコースの発現が肝がんの形成やがん細胞の増殖に直接に寄与することを証明した。がん治療に対する新たな治療法の開発に繋がる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

(1) The importance of membrane-proximal N-glycosylation on integrin 1 in its activation and complex formation. Hou, S., Hang, Q., Isaji, T., Lu, J., Fukuda, T. and Gu, J. 査読有 *FASEB J.* 30, 4120-31, 2016

(2) Expression of N-acetylglucosaminyltransferase III suppresses 2,3 sialylation and its

distinctive functions in cell migration are attributed to 2,6 sialylation levels. Lu, J., Isaji, T., Im, S., Fukuda, T., Kameyama, A. and Gu, J. 査読有 *J. Biol. Chem.* 291, 5708-20, doi: 10.1074/jbc.M115.712836, 2016

(3) Distinct effects of α 1 integrin on cell proliferation and cellular signaling in MDA-MB-231 breast cancer cells. Hou, S., Isaji, T., Hang, Q., Im, S., Fukuda, T. and Gu, J. 査読有 *Sci. Rep.* Doi: 10.1038/srep18430, 2016

(4) Loss of α 1,6-fucosyltransferase decreased hippocampal long-term potentiation: implications for core fucosylation in the regulation of AMPA receptor heteromerization and cellular signaling. Gu, W., Fukuda, T., Isaji, T., Hang, Q., Lee, H., Sakai, S., Morise, J., Mitoma, J., Higashi, H., Taniguchi, N., Yawo, H., Oka, S. and Gu, J. 査読有 *J. Biol. Chem.* 290, 17566-75, doi: 10.1074/jbc.M114.579938, 2015

(5) Loss of α 1,6-fucosyltransferase inhibits chemical-induced hepatocellular carcinoma and tumorigenesis by down-regulating multiple cellular signaling. Wang, Y., Fukuda, T., Isaji, T., Lu, J., Im, S., Hang, Q., Gu, W., Hou, S., Ohtsubo, K. and Gu, J. 査読有 *FASEB J.*, 29, 3217-27, doi: 10.1096/fj.15-270710, 2015

〔学会発表〕(計 18 件)

(1) Core fucose in liver and HCC, Jianguo Gu, 2016 Annual Symposium of Hubei Province Key Laboratory of Allergy and Immunology, 武漢市(中国), 2016年8月

(2) 肝がんおよび肝再生におけるコアフコースの機能、福田 友彦、王 玉琴、伊左治 知

弥、顧 建国、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, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 2015年12月

(3) Loss of FUT8 inhibits chemical-induced hepatocellular carcinoma and tumorigenesis by down-regulating multiple cellular signaling, Jianguo Gu, 23rd International Symposium on Glycoconjugates, Split (Croatia) 2015年9月

(4) Hepatocellular carcinoma and core fucose、顧 建国、復旦大学生物医学研究院セミナー、上海(中国)、2015年8月

〔図書〕(計 2 件)

1,6 フコース転移酵素(Fut8)欠損による行動異常とその機序について、福田 友彦、顧 建国、日本生物学的精神医学会誌 26:95-101, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 抗コアフコシル化ヒト免疫グロブリン G抗体

発明者: 谷口 直之、顧 建国、小野 達也、椎田 真史、真木 賢太郎

権利者: 国立研究開発法人理化学研究所と協和メデックス株式会社

種類: 特許願

番号: 2016P00030

出願年月日: 平成 28 年 9 月 14 日

国内外の別: 日本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

顧 建国 (GU, Jianguo)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 40260369

(2) 連携研究者

福田 友彦 (FUKUDA, Tomohiko)

東北医科薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 40433510