

令和元年6月5日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07123

研究課題名(和文) がん関連糖鎖による腫瘍内不均一性構築メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidating the mechanism of construction of intratumor heterogeneity by tumor-associated glycan

研究代表者

高宮 里奈 (Takamiya, Rina)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任助教

研究者番号：70365419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：sialyl-Tn糖鎖抗原の発現は、ペントースリン酸回路の活性化、2-ヒドロキシグルタル酸の産生の亢進に関与していることを見出した。ゲノム全体のDNAメチル化にはsialyl-Tn糖鎖抗原発現による影響は認められなかったが、細胞内代謝やがんの悪性化に関わる因子の発現に影響が認められた。以上よりがん細胞におけるsialyl-Tn糖鎖の発現は、細胞内代謝をペントースリン酸回路に迂回させることにより変化させ、がんの悪性化に影響を与える機能分子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、がん糖鎖は腫瘍マーカーとして役割のみ捉えられていた。しかしながら、sialyl-Tn糖鎖抗原は、腫瘍マーカーとしての役割だけではなく、がん転移や酸化ストレスへの耐性への機能、さらに未だ不明な点が多いがん細胞内の代謝変化に関わる機能分子であることがわかった。このようながん細胞の代謝変化に影響を与える糖鎖はこれまで報告がなく、この研究成果の学術的意義は非常に高いと考える。

研究成果の概要(英文)：Sialyl-Tn antigen, which is synthesized by a glycosyltransferase ST6GalNAc-I and abnormally expressed in malignant types of cancers. To elucidate whether sialyl-Tn antigen contribute to metabolic reprogramming, we performed metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry (CE-MS). Sialyl-Tn antigen induced pentose phosphate pathway and nucleotide synthesis in H157 cells. Sialyl-Tn antigen expressed on H157 cells also induced the production of oncometabolite, 2-hydroxyglutarate, but did not affect genome-wide alterations in DNA methylation. These findings indicate that sialyl-Tn antigen may be a key player of metabolic reprogramming in the processes of tumor progression.

研究分野：腫瘍生化学

キーワード：がん糖鎖 メチル化 メタボローム

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

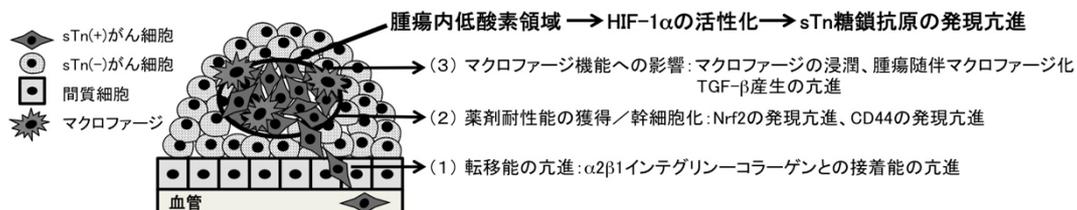
1. 研究開始当初の背景

腫瘍は異なった性質の細胞が集った不均一な集合体で、この複雑性のがん診断や治療を困難にしている。不均一な集団の中で、特に抗がん剤への抵抗性をもつ“がん幹細胞”が、再発・転移の原因と考えられていることから、がん不均一性の構築機構の解明や、がん幹細胞を標的とする新規検査/治療法の開発が喫緊の課題である。この腫瘍内不均一性の原因として、腫瘍内部の“低酸素環境”が、がん悪性化/幹細胞化に寄与することが報告されている。しかしながら、腫瘍形成過程におけるがん細胞個々の“酸素消費のバランス”や、腫瘍をとりまく“がん微小環境”は千態万状であり、がん細胞の低酸素応答機構の全容解明には至っていない。最近申請者らは、腫瘍内低酸素で、HIF-1 を介し糖転移酵素 ST6GalNAc-I (ST6) の発現が誘導され、がん関連糖鎖 sialyl-Tn 糖鎖抗原が合成される事を明らかにした。そして sialyl-Tn 糖鎖抗原が (1) 転移能、(2) 薬剤耐性能、(3) マクロファージ機能に影響を与える機能分子であることを示した。申請者らのこれらの発見は、腫瘍内低酸素により誘導される sialyl-Tn 糖鎖抗原が、がん細胞自身の機能及びがん微小環境を制御し、腫瘍内不均一性に関与する機能分子であることを意味しており、sialyl-Tn 糖鎖抗原の機能メカニズムの解明に焦点を当てた本研究案は、いまだ黎明期にあるがん不均一性の調節機構の解明に大きく貢献できると考える。(1) sialyl-Tn 糖鎖抗原は、 $\alpha 2\beta 1$ インテグリン上に発現し、この発現がコラーゲンとの接着を高め、細胞浸潤能を亢進させ、がん転移を促進させることを明らかとした。(2) ST6 高発現肺がん細胞では、がん幹細胞マーカーである CD44 上に sialyl-Tn 糖鎖抗原が発現し、その細胞表面上の発現レベルを亢進させた。また、薬剤耐性に関わる転写因子 Nrf2 の活性化、その標的遺伝子である抗酸化酵素 Heme oxygenase (HO)-1 の発現を亢進させ、薬剤耐性能を獲得した。(3) sialyl-Tn 糖鎖抗原発現領域には特異的にマクロファージの浸潤が認められ、 $\alpha 2\beta 1$ インテグリン上の sialyl-Tn 糖鎖抗原を介しマクロファージを腫瘍随伴マクロファージ様に変化させた。さらに、腫瘍随伴マクロファージ上の Siglec-15 は、sTn 糖鎖抗原と特異的に相互作用し、TGF- β を放出させることにより、がん悪性化に寄与する可能性を見いだした。(図1)

申請者らのこれらの発見は、腫瘍内低酸素により誘導される sialyl-Tn 糖鎖抗原が、がん細胞自身の機能及びがん微小環境を制御し、腫瘍内不均一性に関与する機能分子であることを意味しており、sialyl-Tn 糖鎖抗原の機能メカニズムの解明に焦点を当てた本研究案は、いまだ黎明期にあるがん不均一性の調節機構の解明に大きく貢献できると考える。

2. 研究の目的

腫瘍内不均一性形成過程における sialyl-Tn 糖鎖抗原の役割を解明し、がん悪性化/幹細胞化の分子機構を詳らかにすることを目的とする。そして、腫瘍形成過程の微小環境変化により選択的に出現する、特異的な糖鎖を持ったがん細胞機能に着目することにより、がん幹細胞治療戦略の提案につながる基盤研究を行う。



3. 研究の方法

(1) sialyl-Tn 糖鎖抗原発現がん細胞の作成

ヒト飛翔細胞肺がん細胞株 H157 にヒト ST6GalNAc-I 発現プラスミドを導入し樹立した sialyl-Tn 糖鎖抗原発現がん細胞、およびそのコントロール細胞を作成し、実験に使用した。

(2) sialyl-Tn 糖鎖抗原発現がん細胞におけるゲノム-エピゲノム解析

sialyl-Tn 発現アレイ-ビードアレイ (DNA メチル化アレイ: Infinium HumanMethylation450 BeadChip (HM450 アレイ)) データの比較解析を行い、DNA のメチル化が関係している分子の特定を行った。また同時に、メチル化レベルの解析を行なった。

(3) sialyl-Tn 糖鎖抗原発現がん細胞の細胞周期解析

細胞を血清フリーで 24 時間培養後、10% 血清でさらに 24 時間培養を行ない、propidium iodide (PI) で染色を行いフローサイトメーターを用い解析を行なった。

(4) 三次元培養下における sialyl-Tn 糖鎖抗原発現がん細胞の挙動

細胞接着阻止材コート処理 (poly-Hema コート処理) を行い、sphere の形成をタイムラプス顕微鏡を用い検証を行なった。また、細胞の状態は WST-1 assay で検証を行なった。

(5) 細胞内糖代謝解析 (メタボローム解析)

キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) を用いメタボローム解析を行なった。

4. 研究成果

(1) エピゲノム解析による sialyl-Tn 糖鎖抗原発現による DNA メチル化への影響

HM450 アレイの結果より、全プローブをメチル化なし (β -value 0~0.2)、中程度 (β -value 0.2~0.8)、メチル化あり (β -value 0.9~1.0) の3群に分けて、それぞれのプローブ数をカウントしてみたところ、sialyl-Tn 糖鎖抗原発現がん細胞では、mock がん細胞に比べ、中程度のメチル化を示すシトシン減り、メチル化、非メチル化のシトシンが増えていた。しかしながら、sialyl-

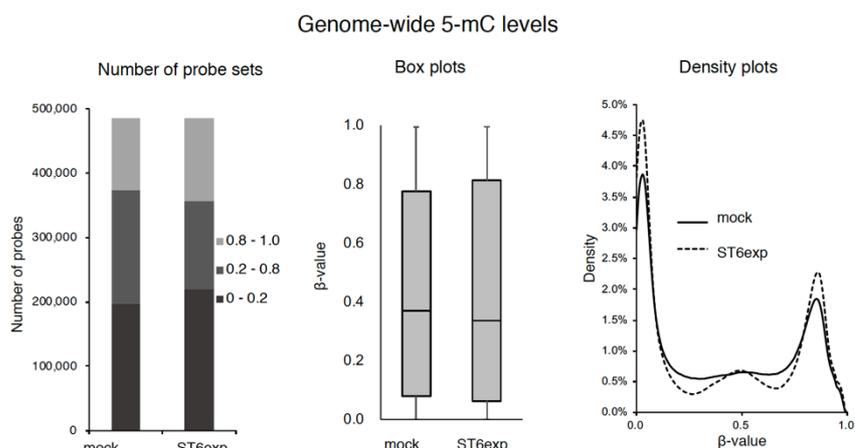


図2 sialyl-Tn糖鎖抗原発現がん細胞でのゲノムワイドなメチル化解析

Tn 発現による DNA メチル化、非メチル化への傾向的な影響は認められなかった (図2)。

(2) sialyl-Tn 糖鎖抗原発現によるがん細胞の細胞周期への影響

sialyl-Tn 糖鎖抗原は発現細胞では、細胞増殖の遅延が認められたことから、細胞周期について PI で染色を行いフローサイトメーターで検証した。その結果、sialyl-Tn 糖鎖抗原発現がん細胞では、mock がん細胞に比べ G1 期から S 期への移行に遅延が起きることがわかった。また、HM450 アレイの結果と発現アレイの結果を比較検討を行なったところ、G1/S 期に関わる Cyclin D2 のメチル化の亢進、発現の低下が認められた。

(3) sialyl-Tn 発現がん細胞の三次元培養下での性状変化

細胞接着阻止コート処理 (polyHema コート) したプレートを用い、タイムラプス顕微鏡で観察を行なったところ、sialyl-Tn 糖鎖抗原発現がん細胞では三次元培養下でみられるがん細胞の sphere 形成が低下していたが、この細胞を用い細胞の三次元培養下での増殖を WST-1 assay で検証を行なったところ、増殖能は mock がん細胞に比べ優位に亢進していた (図3)。

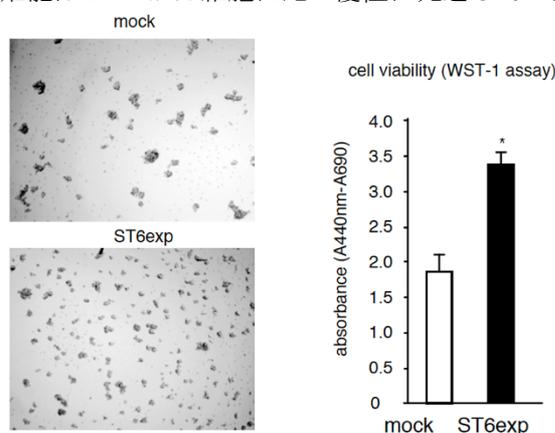


図3 : 三次元培養下におけるsialyl-Tn糖鎖抗原発現がん細胞の挙動

(4) sialyl-Tn 糖鎖抗原発現が、がん細胞内の代謝に与える影響

最近、がん細胞における Nrf2 の発現ががん細胞の代謝シフトを起こすことが報告されていることから、sialyl-Tn 糖鎖抗原発現がん細胞内の代謝に影響を及ぼすか、CE-MS を用い検証を行なった。その結果、mock 細胞に比べ sialyl-Tn 糖鎖抗原を発現したがん細胞ではペントースリン酸回路とそれに続く核酸合成経路の活性化、脂肪酸の構成成分となるアセチル CoA、オンコメタボライトである 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) の産生が亢進していることを見出した。しかしながら、sialyl-Tn 糖鎖抗原発現は①の結果のように、ゲノムワイドな高メチル化には影響を与えていなかった。

(5) ゲノム-エピゲノム比較解析による sialyl-Tn 糖鎖抗原発現が細胞内発現分子に与える影響

ゲノム-エピゲノム比較解析より、DNA メチル化と遺伝子の発現量が一致する分子について検討を行なった。その結果脂質代謝に関係する酵素である PNPLA3 や、PLA2G4A のメチル化の低下、および遺伝子発現の亢進が認められた。また、sialyl-Tn 糖鎖抗原の発現は上皮間葉転換に関わる分子である SOX4 のメチル化の低下、遺伝子発現の亢進も認められた。一方で、がん転移の増殖や転移抑制に関与する IL-18 はメチル化の亢進、遺伝子発現の低下が認められ、sialyl-Tn 糖

鎖抗原の発現はがんの悪性化に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- ① Takamiya R, Uchida K, Shibata T, Maeno T, Kato M, Yamaguchi Y, Ariki S, Hasegawa Y, Saito A, Miwa S, Takahashi H, Akaike T, Kuroki Y, Takahashi M, Disruption of the structural and functional features of surfactant protein A by acrolein in cigarette smoke, *Sci. Rep.*, 査読有り, 7, 2017, 8304, 10.1038/s41598-017-08588-5
- ② Hasegawa Y, Takahashi M, Ariki S, Saito A, Uehara Y, Takamiya R, Kuronuma K, Chiba H, Sakuma Y, Takahashi H, Kuroki Y, Surfactant protein A down-regulates epidermal growth factor receptor by mechanisms different from those of surfactant protein D, *J. Biol. Chem.*, 査読有り, 292, 2017, 18565-18576, 10.1074/jbc.M117.800771
- ③ Umeda Y, Hasegawa Y, Otsuka M, Ariki S, Takamiya R, Saito A, Uehara Y, Saijo H, Kuronuma K, Chiba H, Ohnishi H, Sakuma Y, Takahashi H, Kuroki Y, Takahashi M, Surfactant protein D inhibits activation of non-small cell lung cancer-associated mutant EGFR and affects clinical outcomes of patients, *Oncogene*, 査読有り, 36, 2017, 6432-6445, 10.1038/onc.2017.253
- ④ Hashimoto J, Takahashi M, Saito A, Murata M, Kurimura Y, Nishitani C, Takamiya R, Uehara Y, Hasegawa Y, Hiyama Y, Sawada N, Takahashi S, Masumori N, Kuroki Y, Ariki S, Surfactant Protein A Inhibits Growth and Adherence of Uropathogenic *Escherichia coli* To Protect the Bladder from Infection, *J. Immunol.*, 査読有り, 198, 2017, 2898-2905, 10.4049/jimmunol.1502626.
- ⑤ Uehara Y, Takahashi M, Murata M, Saito A, Takamiya R, Hasegawa Y, Kuronuma K, Chiba H, Hashimoto J, Sawada N, Takahashi H, Kuroki Y, Ariki S. Surfactant protein A (SP-A) and SP-A-derived peptide attenuate chemotaxis of mast cells induced by human β -defensin 3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有り, 485, 2017, 107-112, 10.1016/j.bbrc.2017.02.028.

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① 高宮里奈、癌糖鎖によるがん細胞内代謝リプログラミング機構の解明、第77回日本癌学会学術総会、2018
- ② 高宮里奈、がん糖鎖によるがん細胞内代謝調節機構、第91回日本生化学会大会、2018
- ③ 高宮里奈、がん糖鎖による腫瘍内低酸素環境におけるがん悪性化機構、第76回日本癌学会学術総会、2017
- ④ 高宮里奈、がん関連糖鎖 Sialyl-Tn 糖鎖抗原によるがん悪性化構築メカニズムの解明、第69回日本酸化ストレス学会学術集会、2016

〔図書〕(計 1 件)

- ① 高宮里奈、前野敏孝、有木茂、齋藤充史、高橋弘毅、黒木由夫、高橋素子、先端医学社、分子呼吸病、2019, 68-72

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：鈴木 拓

ローマ字氏名：(SUZUKI, Hiromu)

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：20381254

研究分担者氏名：大坪 和明

ローマ字氏名：(OHTSUBO, Kazuaki)

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院生命科学研究部（保）

職名：教授

研究者番号（8桁）：30525457

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。