

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07174

研究課題名(和文)がん糖鎖による低酸素環境下でのがん細胞の利己的転移戦略の解明

研究課題名(英文)Hypoxia-induced cancer-associated sugar chain facilitates tumor progression

研究代表者

大坪 和明(Ohtsubo, Kazuaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部(保)・教授

研究者番号：30525457

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)：がんの進展に伴って生じるがん微小環境ががん細胞に特異的な糖鎖分子の合成を誘導するが、その生物学的意義は十分には解明されていない。がん糖鎖sTn抗原の発現細胞においては、mRNAの発現上昇を伴わないインテグリンタンパク質の発現上昇が観察された。その原因が、細胞表面におけるインテグリンタンパク質の安定化によるタンパク質の増加に起因することを明らかにした。また、sTn抗原発現細胞ではエクソソーム産生レベルが上昇し、そのエクソソーム受容細胞の機能変化を惹起することを見出した。さらに、sTn抗原合成酵素の阻害剤が、がん細胞の運動能を直接抑制するメカニズムを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの進展に伴い形成されるがん微小環境はがん細胞に様々な生物学的機能を付与し、これががん治療を困難にしていることが知られている。とりわけ、低酸素環境に暴露されたがん細胞が獲得する糖鎖分子である、sTn抗原の発現はがん患者の予後の不良や転移と強く相関することが多くのがん種で報告されており、その生物学的役割を理解することは、新しいがん治療法や治療薬を開発する上で重要な意義がある。さらに、われわれはsTn抗原合成酵素の阻害剤の取得に成功しており、従前の治療法と組み合わせることで現代の多角的がん治療戦略に貢献するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Cancer associated carbohydrate epitopes are synthesized in the pathogenesis of cancers, however, their biological significance has been remained unclear. In the study, we revealed that Sialyl-Tn antigen up-regulates integrin protein expression without elevation of their transcription by stabilizing integrin protein on cell surface. The expression of sTn antigen in cancer cells facilitates production of exosome, which induces functional alterations in receiving cells. We obtained an inhibitor compound for the sTn antigen synthetic enzyme and found that it directly suppresses tumor invasion without any impact on cell growth. And we successfully revealed the pharmacological mechanism of the drug. It is suitable for developing next generation anti cancer drugs, which can be useful for multimodal therapy.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖修飾 がん糖鎖 シアリルTn抗原 転移 浸潤 低酸素 エクソソーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国のがん患者数は増加の一途をたどっており、その年間死亡者数は 368,1103 人(2014 年統計)にも達し、死亡原因の最上位に位置している。がんの予後を占う上で最も重要なのが、がん細胞の転移能であり、がんの転移抑制ががん治療の最重要課題となっている。悪性腫瘍内部の低酸素領域のがん細胞は、様々なストレスや一般的な抗がん剤に対して抵抗性を示し、さらに高い運動・遊走能を示すことから、これらががん細胞が転移細胞の供給源と考えられている。これまでの研究から、低酸素領域では転写因子 Hypoxia-inducible Factor-1(HIF-1)が活性化し、がんの進展に関わる様々な遺伝子の発現を調節することで悪性化に寄与していることが明らかになっている。しかし、HIF-1 により制御を受ける下流分子は多岐に渡るため、その詳細な分子機構を捉えるのは困難であり、未だ十分な解明には至っていない。

一方、細胞のがん化に伴い糖鎖構造が変化することは古くから知られており、数多くのがん糖鎖が、腫瘍マーカーとして臨床の現場で利用されている。シアリル Tn 糖鎖(sTn)抗原は様々な進行がんにおいて検出され、その発現が予後の不良やがん転移と関連することから、がん患者の経過観察に利用される腫瘍マーカーである。しかし、sTn 抗原を含め、これらががん糖鎖の生物学的機能はほとんど明らかになっていないのが現状である。最近、申請者らは腫瘍組織深部の低酸素領域において HIF-1 を介して糖転移酵素 ST6GalNAc-I が発現し、sTn 抗原が形成されることを見出した。さらに、これら腫瘍組織内 sTn 抗原発現細胞では $\alpha 2\beta 1$ インテグリン上に sTn 抗原が発現し、これによりコラーゲンへの接着とコラーゲンを介した細胞浸潤能が亢進し、高い血管浸潤能及び転移能を獲得することを発見した。加えて、sTn 抗原発現がん細胞は sTn 抗原を介して腫瘍随伴マクロファージ(TAM)と相互作用し、TGF- β 産生を促進することで上皮間葉転換 (EMT) を惹起し、がん転移を促進することを突き止めた。以上の結果は sTn 抗原が単なる腫瘍マーカーではなく、低酸素環境下にあるがん細胞の転移を促進する機能分子であることを明示するものであり、従来にない新しいがん転移の概念である。しかし、sTn 抗原によるインテグリンシグナル活性化の分子メカニズムや sTn 抗原を介して周辺細胞を使役するメカニズムは全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

上述のとおり sTn 抗原によるインテグリンシグナル活性化の分子メカニズムや sTn 抗原を介して周辺細胞を使役するメカニズムの解明ががんの転移メカニズムを解明する上で重要な課題となっている。申請者らは予備的研究から、これら課題の解決の糸口となる実験結果を得ている。①sTn 抗原が細胞表面における $\alpha 2$ インテグリンタンパク質を増加させ、これが下流シグナルである Focal adhesion kinase (FAK) の活性化につながる。②sTn 抗原発現がん細胞のエクソソーム分泌レベルは非発現細胞に比べ著しく上昇する。③sTn 抗原により抗酸化酵素 Hemo oxygenase-1 (HO-1)の発現が誘導され、酸化ストレス耐性を獲得する。以上の結果は、申請者らが実施した sTn 抗原発現がん細胞および低酸素曝露がん細胞の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルと符合していた。申請者らのこれまでの知見は低酸素環境により誘導される sTn 抗原が、がん細胞自身の浸潤能の活性化や酸化ストレス耐性を惹起するとともに、エクソソームを介して周辺細胞を使役し、自身の EMT の誘導や周辺がん細胞の浸潤を抑制することで、自己の転移を優位に促進する『利己的因子』であると考えた。本研究では、既に樹立している sTn 抗原発現/非発現がん細胞株および、確立している腫瘍形成・癌転移マウスモデル等を用いて、A) インテグリン発現上昇メカニズムの解明、B) エクソソーム産生亢進メカニズムの解明、C) エクソソーム受容細胞の機能的性状解析、D) sTn 抗原合成阻害剤の作用メカニズムの解析を目的とする。

3. 研究の方法

研究目的に列挙した A) から D) までの課題について以下の研究方法により解析を行った。

A) インテグリン発現上昇メカニズムの解明

転写レベルの増加を伴わずに、細胞表面でのインテグリン分子の増加することは、タンパク質の合成後の制御機構に、その原因があると考えられた。そこで、細胞表面のタンパク質をビオチン化し、経時的なビオチン化インテグリンタンパク質量の減衰を解析することで、細胞表面でのインテグリンタンパク質の分子寿命（安定化レベル）を解析した。

B) エクソソーム産生亢進メカニズムの解明

予備的解析から、sTn 抗原発現細胞は、老化の表現系を示すことを見出しており、それと符合して p53 の発現レベルが上昇していることが観察された。TSAP6 は p53 によってその発現が制御されており、エンドソーム内でのエクソソームの産生量を制御する因子として知られている。そこで、sTn 抗原発現細胞における TSAP6 の発現レベルの解析および、そのノックダウンによるエクソソーム産生への影響を解析することで、sTn 抗原によるエクソソーム産生促進メカニズムを解析する

C) エクソソーム受容細胞の機能的性状解析

sTn 抗原発現細胞は非発現細胞と比較しておよそ 10 倍ものエクソソームを産生することが観察されている。また、sTn 抗原発現細胞から産生されるエクソソーム自体に sTn 抗原が発現していることも判明している。そこで、sTn 抗原発現細胞及び非発現細胞から取得したエクソソームを培養細胞系に導入し、受容細胞の増殖能及び浸潤能を解析した。

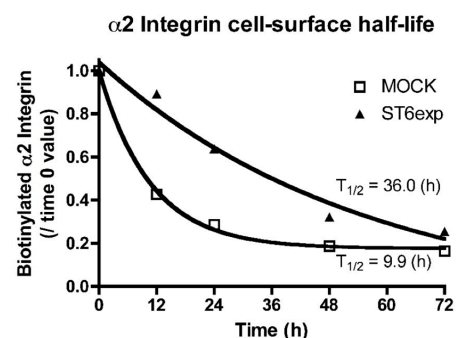
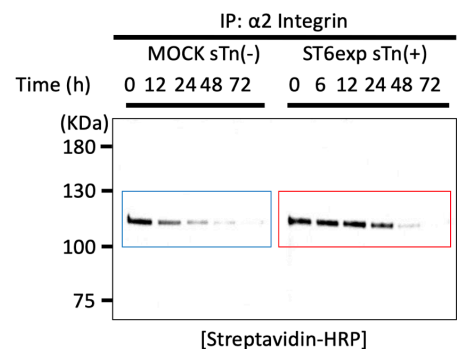
D) sTn 抗原合成阻害剤の作用メカニズムの解析

FAK はインテグリンシグナルにおいて重要な機能を果たしており、細胞の運動を司る。我々は sTn 抗原合成阻害剤が FAK の分解を促進することで、細胞の浸潤能を低下させることを発見した。そこで、sTn 抗原合成阻害剤による FAK の即時的分解メカニズムを解明するため、FAK の分解に関与するプロテアーゼに着目して解析を行った。本研究では、H157 細胞(ヒト非小細胞肺癌細胞株)を Calpain 阻害剤及び P2X4 受容体阻害剤、P2X7 受容体阻害剤で処理したのち、sTn 抗原合成阻害剤を作用させ、western blot で細胞内の FAK タンパク質量を解析するとともに、Boyden chamber assay によって細胞浸潤能を評価した。また、細胞内の Ca²⁺ と結合して蛍光を発する蛍光試薬 Fluo-4AM を検出プローブとして sTn 抗原合成阻害剤処理細胞内の Ca²⁺濃度の変化を解析した。

4. 研究成果

A) インテグリン発現上昇メカニズムの解明

Sulfo-NHS-LC-Biotin により標識した細胞表面の $\alpha 2$ インテグリンの経時的な減衰を解析した結果、sTn 抗原発現細胞である ST6exp 細胞において分子寿命の顕著な延長が観察された(右図)。その半減期を解



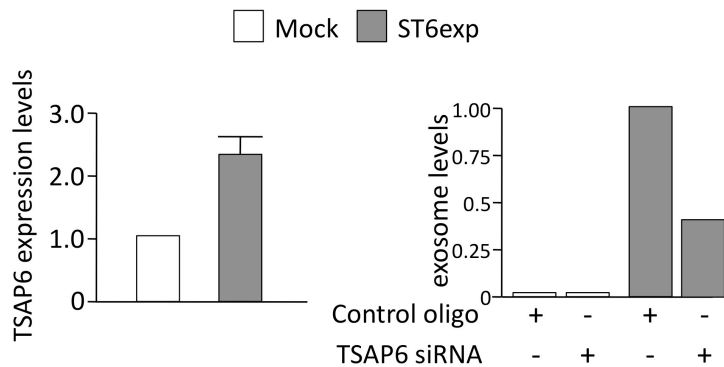
析した結果、MOCK コントロール細胞では、9.9 時間であるのに対し、ST6exp 細胞では 36 時間となっていた。先行研究から、定常的な $\alpha 2$ インテグリンの産生レベルは同等であるため、結果、ST6exp 細胞表面には MOCK 細胞と比較して $\alpha 2$ インテグリンの発現レベルが高くなると考えられる。この結果は ST6exp 細胞においてインテグリンシグナルが増強され、これまで観察されていた高い浸潤能を裏付けることとなった。

B) エクソソーム産生亢進メカニズムの解明

エクソソーム産生量の調節に深く

関与する TSAP6 遺伝子の発現レベル及び、TSAP6 遺伝子のノックダウンによるエクソソーム産生レベルを MOCK 細胞及び ST6exp 細胞において解析した結果、ST6exp 細胞では TSAP6 遺伝子の発現が優位に上昇しており、その

結果と符合して、TSAP6 遺伝子のノックダウンにより、エクソソームの産生量が著しく低下することが観察された (右図)。TSAP6 遺伝子の発現が p53 により制御されることは周知の事実であり、かつ、ST6exp 細胞が老化形質を示すことから、sTn 抗原によって誘導される細胞老化が ST6exp 細胞におけるエクソソーム分泌促進の引金になっていると考えられた。



C) エクソソーム受容細胞の機能的性状解析

sTn 抗原発現細胞は非発現細胞と比較しておよそ 10 倍ものエクソソームを産生することが観察されている。また、sTn 抗原発現細胞から産生されるエクソソーム自体に sTn 抗原が発現していることも判明していることから、まず、蛍光標識したエクソソームを用いて細胞への取り込み効率を解析した。その結果、ST6exp 細胞由来のエクソソームは MOCK コントロール細胞由来のエクソソームと比較して、有意に高効率に受容細胞へ取り込まれることが判明した (右図 A)。

さらに、受容細胞の増殖能を解析した結果、ST6exp 細胞由来のエクソソームを受容した細胞

と比較して有意に低い増殖活性を示すことが判明した。さらに、

受容細胞の浸潤能を Boyden

chamber assay により解析した結果、ST6exp 細胞由来のエクソソームを受容した細胞は MOCK

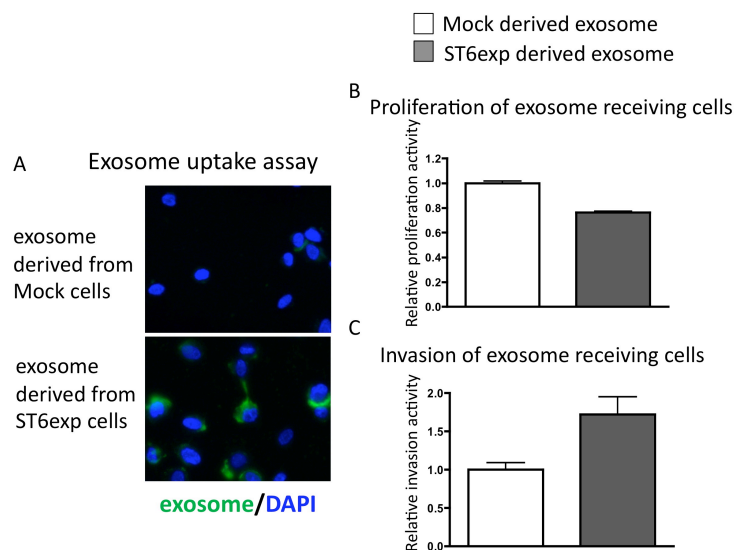
コントロール細胞由来のエクソソームを受容した細胞と比較して有意に高い浸潤活性を示すことが

判明した。さらに、ST6exp 細胞

由来のエクソソームと MOCK コントロール細胞由来のエクソソームの質的変化を解析するため、

エクソソーム内に包含される FAK タンパク質量をウエスタンブロットにより解析した結果、

ST6exp 細胞由来のエクソソームが豊富に FAK タンパク質を含有していた、この結果は、ST6exp



由来のエクソソームと MOCK コントロール細胞由来のエクソソームの質的変化を解析するため、エクソソーム内に包含される FAK タンパク質量をウエスタンブロットにより解析した結果、ST6exp 細胞由来のエクソソームが豊富に FAK タンパク質を含有していた、この結果は、ST6exp

細胞由来のエクソソームがエクソソーム受容細胞の浸潤能に大きな影響を及ぼしたことをよく説明している。

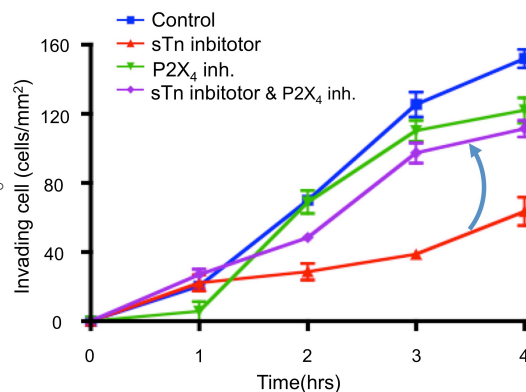
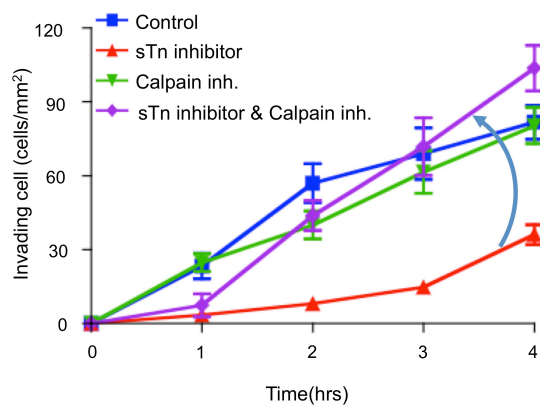
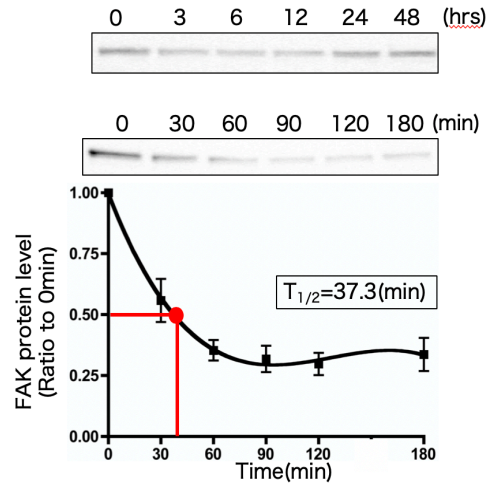
D) sTn 抗原合成阻害剤の作用メカニズムの解析

我々は、取得した sTn 抗原合成阻害剤が ST6exp 細胞の浸潤能を低下させることを確認していたが、通常 sTn 抗原が消失するまで5日を要することを確認していた。しかし、sTn 抗原合成阻害剤処理後数時間で細胞浸潤能が低下することが観察された。これと符合して、FAK タンパク質が2時間以内に約25%まで減少することが判明した(右図上)。

この結果は、sTn 抗原合成阻害剤が FAK の分解を促進することを意味している。そこで、FAK の分解を担うプロテアーゼとして、Calpaine が想定された。事実、sTn 抗原合成阻害剤処理細胞では細胞の浸潤能が低下するが、Calpaine 阻害剤処理により浸潤能が回復することが観察されたことから、FAK の分解は Calpaine によって行われることが判明した(右図中)。

Calpaine は細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇によって活性化するプロテアーゼである。そこで、sTn 抗原合成阻害剤処理細胞内のカルシウムイオン濃度を解析した結果、sTn 抗原合成阻害剤処理により有意にカルシウムイオン濃度が上昇することが観察された。しかも、そのカルシウムイオンは細胞外からの流入であることが判明した。そこで、さらに、sTn 抗原合成阻害剤処理により活性化し、カルシウムイオンの細胞内への流入を担っている受容体の探索を行った。その結果、P2X4 受容体とその機能を担っていることが判明した(右図下)。

以上の結果から、sTn 抗原合成阻害剤は P2X4 受容体を活性化し、細胞内へのカルシウムイオンの流入を惹起し、それにより Calpaine が活性化することで FAK の分解が起こり、細胞の浸潤能が短時間に抑制されることが明示された。また、sTn 抗原合成阻害剤ががん細胞の浸潤能を即時的に抑制することから、従前のがん治療法との併用による多角的がん治療戦略の構築に貢献できるものであると期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kento Maeda, Kazuaki Ohtsubo	4. 巻 31
2. 論文標題 Galectin Lattice Regulates Nutrition Sensor Functions in Pancreatic Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E27-E29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4052/tigg.1760.4E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大坪和明
2. 発表標題 低酸素による転移を駆動するSialyl-Tn糖鎖抗原を狙った新規がん治療の可能性
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川上ゆうか、甲斐勝伍、日和田拓也、田嶋彩香、前田賢人、大坪和明
2. 発表標題 Sialyl-Tn抗原はがん細胞の生存戦略のキープレイヤーである
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田賢人、田崎雅義、安東由喜雄、大坪 和明
2. 発表標題 膵臓 細胞でのインスリン分泌におけるガレクチンラティスの役割
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大坪和明
2. 発表標題 がん進展過程におけるSialyl-Tn抗原による酸化ストレス耐性誘導の意義
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高宮里奈、曾我朋義、鈴木拓、大坪 和明
2. 発表標題 がん糖鎖によるがん細胞内代謝リプログラミング機構
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田 賢人、高宮 里奈、田嶋 彩香、高松 真二、是金 宏昭、谷口 直 之、大坪 和明
2. 発表標題 低酸素誘導 Sialyl-Tn 糖鎖抗原によるがん細胞の転移・生存戦略
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前田 賢人、田崎 雅義、安東 由喜雄、大坪 和明
2. 発表標題 ガレクチンラティスによる輸送体タンパク質の発現・機能制御メカニズム
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kazuaki Ohtsubo
2. 発表標題 Glycosylation regulates nutrition sensor functions in pancreatic beta cells
3. 学会等名 Systems Glycobiology and Beyond-Toward a bridge between fundamental research and applied science- (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大坪和明
2. 発表標題 Sialyl-Tn糖鎖抗原による多彩ながん転移シグナルの制御機構
3. 学会等名 ConBio 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田嶋彩香、前田賢人、高宮里奈、大坪和明
2. 発表標題 Sialyl-Tn抗原発現による抗酸化酵素の誘導メカニズム
3. 学会等名 ConBio 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前田 賢人、田崎 雅義、安東 由喜雄、大坪 和明
2. 発表標題 ガレクチンラティスによる膵臓 細胞でのインスリン分泌制御
3. 学会等名 ConBio 2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大坪和明研究室 【大学院生命科学研究部 先端生命医療科学部門 医療技術科学講座 生体情報解析学】
https://www.kumamoto-u.ac.jp/kenkyuu_sangakurenkei/kenkyuu/kenkyu/laboratory-exploration/57-2015summer
大坪和明研究室 【大学院生命科学研究部 先端生命医療科学部門 医療技術科学講座 生体情報解析学】
<http://www.kumamoto-u.ac.jp/kenkyuu/laboratory-exploration/57-2015summer>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----