

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：72690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09091

研究課題名(和文) 腹膜播種における胃癌細胞の糖鎖変化と、糖鎖結合分子ガレクチンによる制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of peritoneal metastasis of poorly differentiated gastric cancer by galectin-4 and the alteration of glycosylation

研究代表者

井手尾 浩子 (Ideo, Hiroko)

公益財団法人野口研究所・研究部・研究員

研究者番号：90180322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：低分化型胃癌細胞に高発現するガレクチン-4の発現をノックアウト(KO)またはノックダウンにより抑制することで、マウス腹膜播種モデルでの腫瘍形成が大きく低下した。ガレクチン-4の発現抑制と相関して増殖能が低下し、活性化cMET、CD44等が低下した。近接ライゲーションアッセイ及び近接依存性標識法により、それらの分子とガレクチン-4が細胞の膜近傍で近接しており、その相互作用に糖鎖が関与することが明らかとなった。

腹膜播種能が低下したKO株での発現糖鎖の変化を質量分析で調べた結果、N結合型糖鎖には変化がみられなかった一方で、中性糖脂質の組成に大きな差異が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移・再発例に多く見られ胃がんの死亡率上昇の大きな原因である腹膜播種をおこす様な悪性度の高い癌に対する治療は未だ不十分である。本研究の様に糖鎖の変化と糖鎖認識分子の両方を調べる研究は他になく、従来の研究では見出しえなかった腹膜播種制御機構の一端を解明できた。単一タンパク質分子をターゲットとする場合と比べて、ガレクチン-4は糖鎖を介し多くの関連分子をコントロールする制御出来る点で有望であり、診断・治療標的分子としての可能性は少なくないと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Suppression of galectin-4, which is highly expressed in poorly differentiated gastric cancer cells, by knockout (KO) or knockdown greatly reduced tumor formation in a mouse peritoneal seeding model. In correlation with the suppression of galectin-4 expression, proliferative capacity was decreased, and activated cMET, CD44, etc. were downregulated. Proximity ligation assay and proximity-dependent labeling revealed that these molecules and galectin-4 interact in close proximity to the cell membrane. Since this interaction was inhibited with the presence of galectin-4 inhibitory sugar or glycosylation inhibitor, glycans on the cells were analyzed by mass spectrometry. KO strain with reduced peritoneal seeding ability showed no change in N-linked glycans, while a large difference in the composition of neutral glycolipids was observed.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：ガレクチン-4 腹膜播種 転移 低分化型胃癌 糖鎖

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腹膜播種は胃癌の転移・再発形式で最も多くみられ、死亡率上昇の大きな原因であるが、手術による治療が難しく、十分に効果のある治療法は未だ確立されていない。その為、未解決の問題である胃癌の腹膜播種に関与する分子及びメカニズムを解明することは重要である。腹膜播種は癌細胞の近接細胞からの離脱、腹膜への接着等の過程を経る為、細胞間相互作用に関わる分子への理解が必要である。癌化により細胞は異常増殖能や転移性を獲得するが、この時多くの糖転移酵素群が変化することにより糖タンパク質や細胞表面糖鎖の変化が観察され、それにより細胞の機能が大きく変化する。その為腫瘍マーカーの多くは糖鎖が抗原であり、多くの癌の診断に用いられている。

一方、レクチンの一種でガラクトースを認識し14種類存在するガレクチンは様々な組織の癌化に伴いその発現の変動が報告されているが、それぞれのガレクチンで癌の進展に促進的あるいは抑制的に働くかは異なっている。この一因は癌組織・細胞の糖鎖構造の違いによるものであると考えられるが、癌の進展に伴う糖鎖の変化とガレクチンをセットにして調べる研究は今までなされてこなかった。糖鎖は癌の転移において重要な役割を果たすと言われているが、腹膜播種に関与する糖鎖やその糖鎖認識分子であるレクチンの解明は重要であるにも関わらず、腹膜播種に伴う糖鎖の変化とその認識分子であるレクチンの発現を同時に解析する研究は今までなされてこなかった。ガレクチン-4が癌関連分子であるMUC1、CEA等に結合すること、腹膜転移をおこす胃癌細胞で発現の上昇する複数の遺伝子の中にガレクチン-4が存在することが報告されていたことから、本研究では特にガレクチン-4に注目した。

### 2. 研究の目的

本研究では、腹膜播種をおこす低分化型胃癌細胞を研究対象として、その細胞に特異的な糖鎖構造とその糖鎖構造を認識するレクチンとしてガレクチン-4を研究することで、新たな腹膜播種制御機構を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) ガレクチン-4発現が腹膜播種に与える影響

ガレクチン-4の発現を変化させる為に、ガレクチン-4が高発現しているNUGC4細胞に対して、i)Crispr/Cas9ゲノム編集を行いガレクチン-4の発現をノックアウト(KO)、ii)ガレクチン-4特異的siRNAの添加でその発現をノックダウン(KD)、iii)KO細胞にガレクチン-4発現用プラスミドを導入しガレクチン-4の再発現を行った。

ガレクチン-4発現が増殖能に与える影響を調べる為に、生細胞数をMTT assayあるいはATP assayで測定し、接着非依存性増殖能は、超低吸着プレート及び細胞培養用プレートでの増殖能の比較で評価した。

接着能に関しては、腹膜細胞及び細胞外マトリックスに接着する癌細胞を計数することにより評価した。

動物モデルでの腹膜播種能の測定の為に、各細胞をマウス腹腔内に投与後(KDでは細胞投与後複数回siRNAの投与後)一定期間の後、腹腔内を剖検、腫瘍重量の測定を行った。

ガレクチン-4の発現と相関して変化する分子を調べる為に、Western blotting後、各種抗体で検出を行った。

近接ライゲーションアッセイ(PLA)あるいは近接標識法により、ガレクチン-4と関連分子との近接を調べた。

#### 2) 腹膜播種能に関連する糖鎖構造

細胞の膜画分を抽出し、糖タンパク質のN型糖鎖を質量分析法(MALDI-MS)で解析した。

細胞から糖脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィー(TLC)或いはEGCase処理で糖鎖を切り出し後、糖切断酵素消化を併用してMS測定することにより糖脂質糖鎖構造解析を行なった。

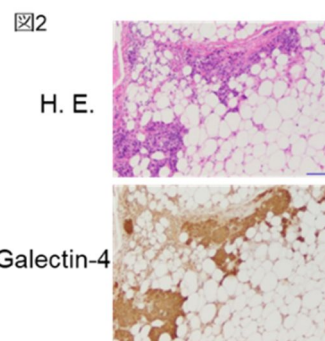
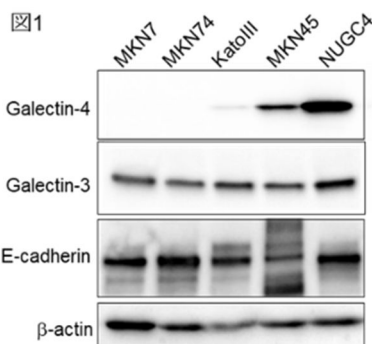
各種細胞に対してrealtime-PCR法で各種糖転移酵素の発現解析を行った。

### 4. 研究成果

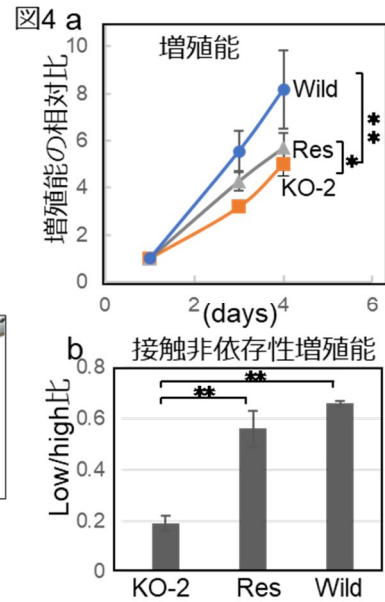
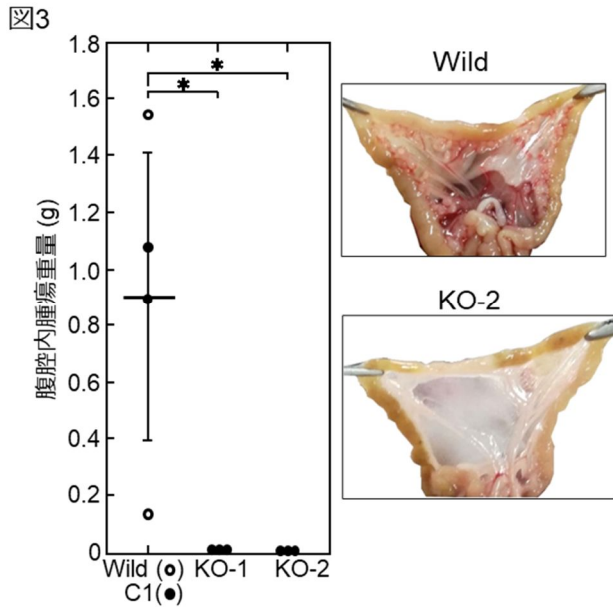
#### 1) ガレクチン-4発現が腹膜播種に与える影響

低分化型胃癌細胞に発現する分子

各種胃癌細胞で種々の発現分子の発現を調べた所、腹膜播種をおこす低分化型胃癌細胞(NUGC4、MKN45)にガレクチン-4が高発現していることが明らかになった(図1)。また、胃癌の腹膜播種部位の免疫染色(図2)でもガレクチン-4の高発現が明らかになった。



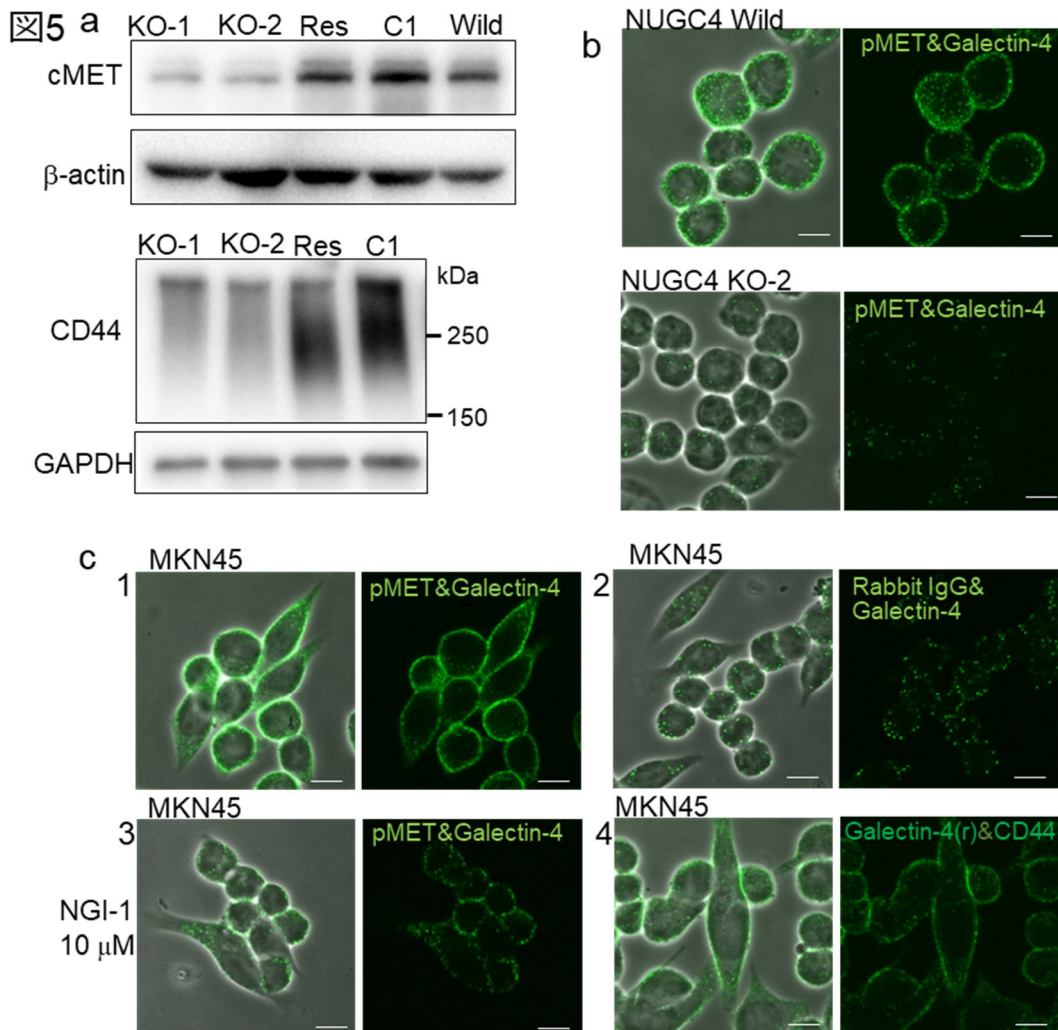
ガレクチン-4のKOによる腹膜播種の抑制  
 ガレクチン-4をKOした細胞株(KO-1、-2)をマウス腹腔内に投与した結果、Wild株やKO株作製時のコントロール株(C1)に比べ、癌形成能の大きな抑制が認められた(図3)。



KO細胞株の接着能はWild株に比べて大きな違いはなかったが、増殖能及び接着依存性増殖能に大きな低下が見られ、ガレクチン-4再発現株(Res)では回復が見られた(図4)。

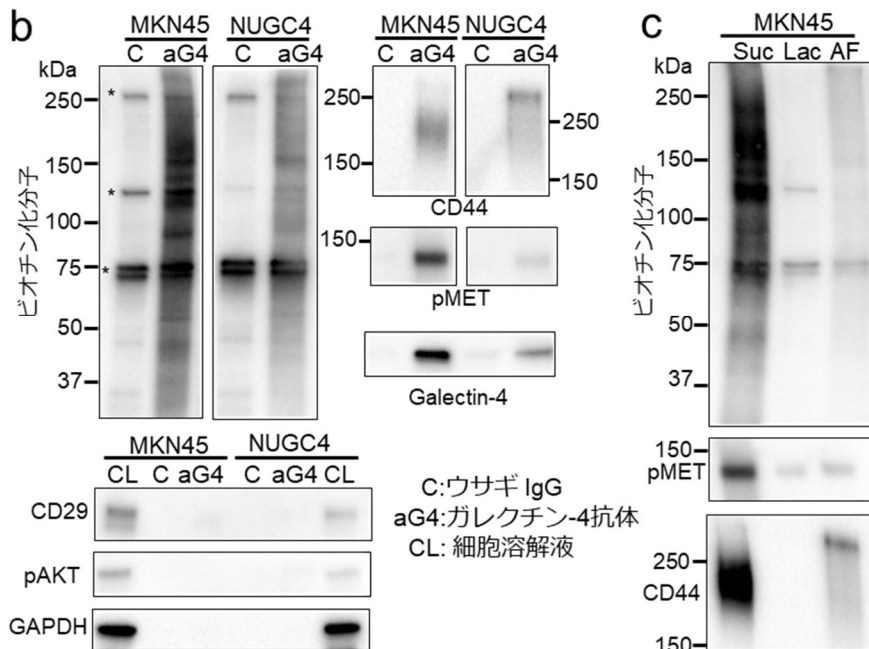
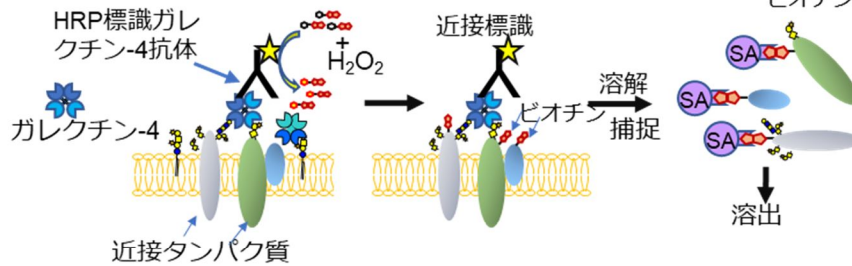
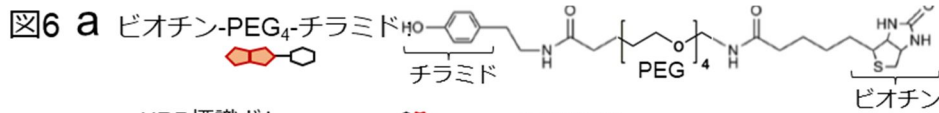
#### ガレクチン-4の発現と相関する分子

ガレクチン-4の発現と相関して、KO株ではcMET及びCD44の発現が低下していた(図5a)。さらにPLA法により、ガレクチン-4はcMETの活性化体(pMET)、またはCD44と膜近傍で近接していることが明らかになった。また、NGI-1(N型糖鎖合成阻害剤)の添加で、PLAシグナルが抑制されたことから、その近接に糖鎖が関与していることが示唆された(図5b,c)。



近接標識法は、ガレクチン-4 と近接している分子をガレクチン-4 抗体(aG4)に結合する HRP によってビオチン化し、そのビオチン化分子をストレプトアビジン(SA)ビーズにより捕捉し分析する方法である(図 6a)。近接標識法によって、細胞表面の数多くのガレクチン-4 の近接分子がビオチン標識され、その中に pMET や CD44 が存在したが、細胞内分子である GAPDH や pAKT、細胞外分子でも CD29 等は標識されなかった(図 6b)。ガレクチン-4 抗体をウサギ IgG(C)に置き換えた場合はガレクチン-4 抗体非依存的に SA ビーズに結合する分子(\*)のみ検出された(図 6b)。

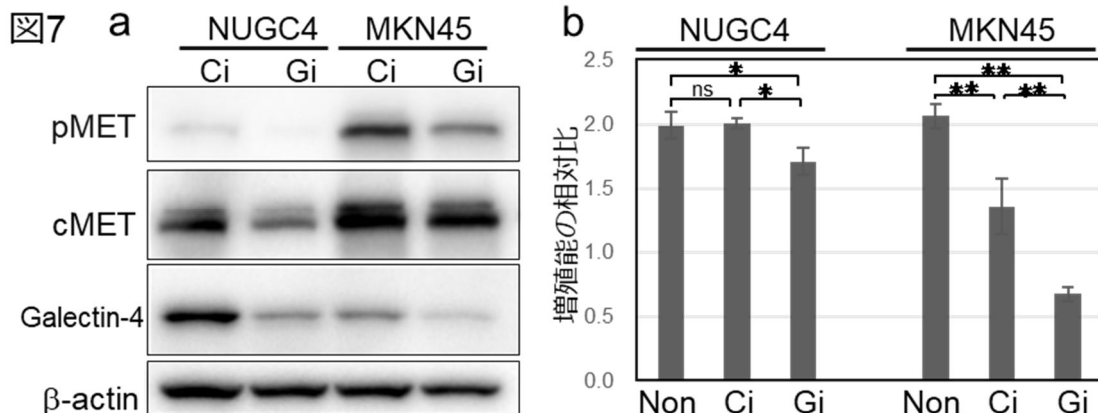
抗体の代わりに HRP 標識ガレクチン-4 を使用した場合にも多くの分子が標識され、その標識分子がガレクチン-4 の結合を阻害する糖(Lac:ラクトース)や糖タンパク質(AF:アシアロフェツイン)の共存で減少し、阻害しない糖(Suc:スクロース)では減少が見られなかったことから、近接分子への結合は糖鎖を介していることが明らかになった(図 6c)。

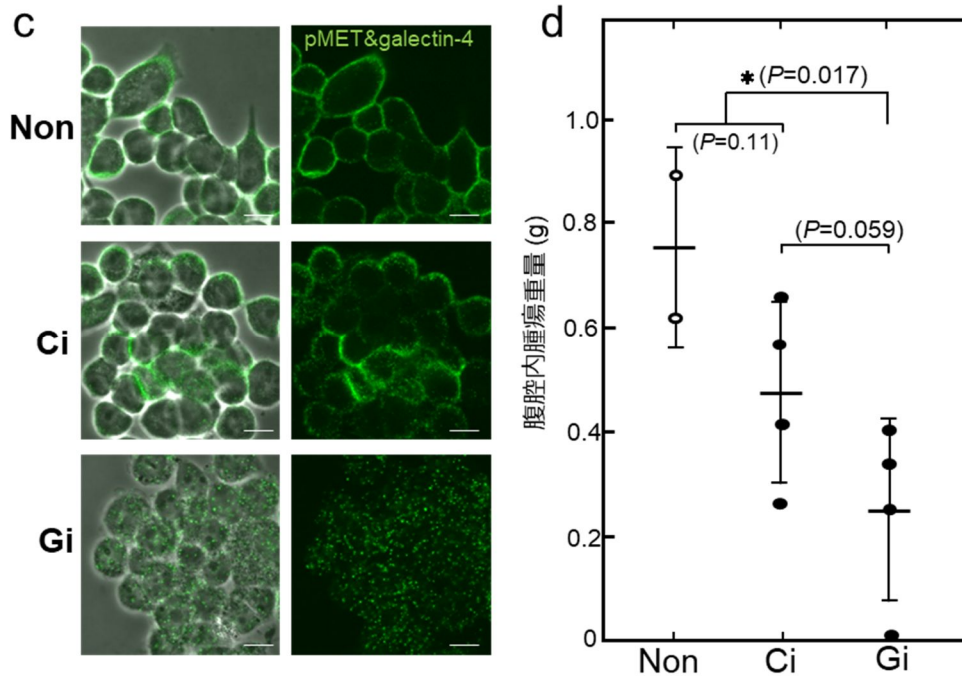


#### ガレクチン-4 の発現抑制

ガレクチン-4 特異的 siRNA(Gi)の導入によりガレクチン-4 の発現を KD すると、cMET の活性化体(pMET)や増殖能、さらには細胞膜近傍のガレクチン-4 と pMET の近接が、コントロール siRNA(Ci)を導入した場合に比べて減少した(図 7a-c)。

また、siRNA 投与により、マウスマウス腹膜播種モデルでの癌形成能の大きな抑制が見られたことから、ガレクチン-4 発現抑制による腹膜播種治療への可能性が示された(図 7d)。





## 2) 腹膜播種能に関連する糖鎖構造

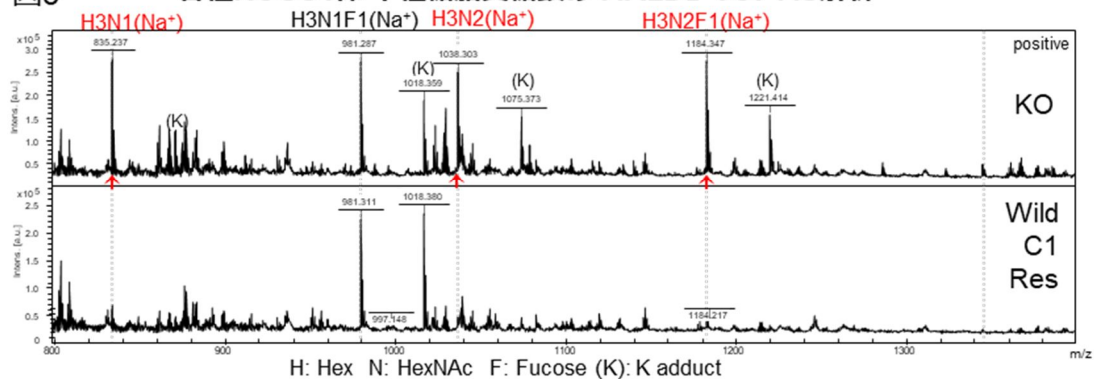
### 腹膜播種能の異なる細胞株膜糖タンパク質のN型糖鎖

膜糖タンパク質のN型糖鎖を解析した結果、高度にフコシル化されバイセクト構造を持ち、シアリル化が見られず還元末端がガラクトースの高分岐コンプレックス型糖鎖が確認されたが、その糖鎖プロファイルは腹膜播種能の異なる細胞株間で顕著な違いは認められなかった。

### 腹膜播種能の異なる細胞株の中性糖脂質

我々は過去の研究でガレクチン-4が糖脂質、中でも硫酸化糖脂質へ結合することを明らかにしていることから、硫酸化糖脂質を調べたが、大きな差異は認められなかった。しかしながら、TLC及びMALDI-MS解析で、KO株にwild株と比べ一部の中性糖脂質の有意な上昇が見られ(図8)、この糖脂質糖鎖を解析した所、 $\beta$ 1-3Galが付加したラクト系糖鎖であることが明らかになった。(論文準備中)

図8 各種NUGC4株 中性糖脂質糖鎖のMALDI-TOF MS解析



ラクト系糖脂質の $\beta$ 1-3Galを付加する糖転移酵素の発現をReal time-PCR法で調べた所、B3GALT5の発現が上昇していた。この糖脂質糖鎖の変化と腹膜播種能との関連を調べる為にB3GALT5を導入した細胞を作製し、さらなる実験を行なっている。

腹膜播種に関与するとして報告される多くの分子の発現は必ずしも癌特異的ではなく、正常でも生体内で様々な役目を担っている為、その阻害には副作用のリスクを伴う。またその分子の発現の有無が有効性を左右すること、長期投与による耐性の出現等、解決すべき点が多い。糖鎖は癌特異的な変化が観察されており、分子の細胞内局在や働きを制御する役目が知られている。しかしながら、糖鎖発現は複雑で、様々な種類の糖鎖合成酵素、糖鎖分解酵素の作用した結果完成する為、転移や腹膜播種における糖鎖の役割についての理解は遅れているのが現状である。本研究の様に糖鎖の変化と糖鎖認識分子の両方を調べることにより、従来の研究では見出しえなかった腹膜播種制御機構の一端が明らかになってきた。単一タンパク質分子をターゲットとする場合と比べて、ガレクチン-4は糖鎖を介し多くの関連分子を制御出来る点で有利であり、診断・治療標的分子としての可能性は高いと考えられる。

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 Ideo Hiroko, Tsuchida Akiko, Takada Yoshio, Kinoshita Jun, Inaki Noriyuki, Minamoto Toshinari	4. 巻 26
2. 論文標題 Suppression of galectin-4 attenuates peritoneal metastasis of poorly differentiated gastric cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 352-363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10120-023-01366-5	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井手尾浩子、土田明子、八須和子、高田美生
2. 発表標題 ガレクチン-4による低分化型胃癌細胞の腹膜播種の制御
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井手尾浩子、土田明子、八須和子、高田美生
2. 発表標題 ガレクチン-4は低分化型胃癌細胞の腹膜播種を制御する
3. 学会等名 第95回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井手尾浩子、土田明子、八須和子、高田美生、木下淳、稲木紀幸、源利成
2. 発表標題 低分化型胃癌細胞の腹膜播種転移に糖鎖結合分子ガレクチン-4が関与する
3. 学会等名 第32回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井手尾浩子、土田明子、八須和子、高田美生、木下淳、稲木紀幸、源利成
2. 発表標題 Galectin-4 plays a vital role in the peritoneal dissemination of poorly differentiated gastric cancer cell
3. 学会等名 26th International Symposium on Glycoconjugates (Glyco26) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ガレクチン - 4 陽性胃癌治療用医薬組成物	発明者 井手尾浩子、土肥明子、高田美生	権利者 野口研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-122649	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
研究分担者	土田 明子  (Tsuchida Akiko)  (70378024)	公益財団法人野口研究所・研究部・研究員   (72690)	
研究分担者	八須 和子 (広瀬和子)  (Hachisu Kazuko)  (30625447)	公益財団法人野口研究所・研究部・研究員   (72690)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------