

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17218

研究課題名（和文）MET糖鎖による肺がん細胞増殖シグナル抑制メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of suppression of lung cancer cell proliferation signals by N-glycan of MET

研究代表者

齋藤 淳（SAITOU, ATSUSHI）

札幌医科大学・医学部・訪問研究員

研究者番号：90836446

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：N型糖鎖合成阻害薬はMETのプロセッシングと細胞表面への輸送を抑制した。METのN型糖鎖の11か所のうち5か所は糖鎖付加率が100%であり、いずれも複雑型糖鎖でありコアフコースやシアル酸が付加する傾向にあった。MET糖鎖欠損はMETのプロセッシングを抑制し、METのSEMAドメインの糖鎖はシグナルを正に制御し、SEMAドメイン以外の糖鎖はシグナルを負に制御した。全ての糖鎖を欠損させるとHGF依存の細胞増殖は抑制され、また細胞表面のMET発現は完全には消失しないものの著明に減少したが、*in vitro* ではリガンドとの結合親和性に影響を与えなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

METの部位特異的な糖鎖構造解析や糖鎖欠損変異体を用いた糖鎖機能解析についての報告は本研究が初めてであり、糖鎖がMETの機能制御に関与していることが示唆された。糖鎖がMETを制御する詳細な機序を解明することは、肺がんの主要治療薬であるEGFR-TKIの薬剤耐性に関与する重要な分子であるMETの機能を制御する新しい方法を確立するための手がかりとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we show that N-glycans have essential roles in MET processing and downstream signaling. By using N-glycan deletion mutants, we demonstrated that N-glycans are involved in the processing of MET. The findings also suggest that the N-glycans of the SEMA domain of MET positively regulate HGF signaling, and the N-glycans of the region other than the SEMA domain negatively regulate HGF signaling. In the all-N-glycan deletion mutant, processing and signaling were significantly suppressed. The cell surface expression levels of the all-N-glycan deletion mutant were significantly reduced, and the phosphorylation levels of the receptors expressed on the cell surface were also suppressed. We also identified the structures of the N-glycans of MET and demonstrated that the occupancy of most of the N-glycosylation sites was considerably high, and the dominant population were complex type with sialic acids and core fucoses.

研究分野：糖鎖

キーワード：糖鎖 MET HGF 肺癌 EGFR-TKI耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MET は肝細胞増殖因子(HGF)をリガンドとする受容体型チロシンキナーゼ(RTK)であり、MET の増幅は肺がん治療の主要薬剤である上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)の耐性と関連している。MET を標的とし臨床応用されている薬剤はわずかであり、それらも副作用により治療中止を余儀なくされることも多い。

また糖鎖付加は最も代表的な翻訳後修飾でありタンパク質の機能制御に関与している。MET には 11 か所の N 型糖鎖付加部位があり、N 型糖鎖が受容体の機能制御に関与していることを示唆する報告がある。

2. 研究の目的

より効果的な薬剤開発のためには MET の詳細な物性を明らかにする必要があるが、MET の部位特異的な N 型糖鎖の構造や機能についてはこれまで検討されてこなかった。本研究では、N 型糖鎖が MET を制御する機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MET 安定発現細胞の樹立

CHO-K1 細胞、Flp-In CHO 細胞の内在性の MET をノックアウトし(CHO-METKO、Flp-In CHO-METKO)、それぞれにヒト MET 発現ベクターをトランスフェクションし、安定発現細胞を樹立した(CHO-MET、MET WT)。

(2) 糖鎖合成阻害薬が MET プロセッシングと細胞膜表面 MET 発現に与える影響

ヒト肺腺がん細胞株の H1975 細胞、ヒト肺扁平上皮がん細胞株の EBC-1 細胞、CHO-MET を用いた。糖鎖合成阻害薬(ツニカマイシン、NGI-1)で処理し、Western Blotting を用いて MET のプロセッシングと細胞膜表面の MET の発現を評価した。

(3) MET 細胞外ドメイン(sMET)の精製と部位特異的糖鎖構造の解析

CHO-K1 細胞を用いて発現させたヒト MET の細胞外ドメインを CHO-K1 細胞を用いて調製し、精製 sMET の部位特異的糖鎖構造を質量分析(LC-MS/MS)を用いて解析した。

(4) MET 糖鎖欠損変異体の作製

MET WT の各 N 型糖鎖付加部位のアスパラギンをグルタミンに置換することで、部位特異的に糖鎖を欠損させた。具体的には、 α サブユニットの 4 か所の糖鎖を欠損させた変異体(4N α 4Q)、SEMA ドメインの 6 か所の糖鎖を欠損させた変異体(6N SEMA 6Q)、SEMA ドメイン以外の領域の 5 か所の糖鎖を欠損させた変異体(5N not SEMA 5Q)、 β サブユニットの 7 か所の糖鎖を欠損させた変異体(7N β 7Q)、11 か所全ての糖鎖を欠損させた変異体(11N all 11Q)、N399 と N405 の糖鎖を欠損させた変異体(N399Q/N405Q)を Flp-In CHO-METKO に安定発現させた。

(5) 糖鎖欠損が MET の発現や機能に与える影響の解析

MET WT もしくは各糖鎖欠損変異型 MET 発現細胞を用いた。Western Blotting で MET のプロセッシング・HGF シグナル伝達を、WST-1 で細胞増殖を、フローサイトメトリー・共焦点顕微鏡・細胞表面ビオチン化で細胞膜表面の MET 発現を評価した。

(6) MET 糖鎖欠損が HGF と MET との結合に与える影響の検討

野生型と PNGase F で処理し糖鎖を除去した sMET を用いて、表面プラズモン共鳴センサーで結合速度定数(k_a)および解離速度定数(k_d)を算出した。

4. 研究成果

(1) 糖鎖合成阻害薬は MET プロセッシングと細胞膜表面への輸送を抑制する

H1975 細胞、EBC-1 細胞および CHO-MET において、ツニカマイシン・NGI-1 いずれの処理によっても MET プロセッシングが抑制された。ツニカマイシン処理によって細胞膜表面への MET 輸送が阻害された。

(2) sMET の部位特異的糖鎖構造の解析

N149、N405、N635、N785、N879 の糖鎖付加率はほぼ 100%であった。構造は bi-antennary 構造を持つ complex 型が主であった。ほとんどの部位で 99%以上の N 型糖鎖がフコシル化されていた。

(3) MET 糖鎖欠損は MET プロセッシングと HGF シグナル伝達に影響を与える

6N SEMA 6Q、5N not SEMA 5Q、7N β 7Q、11N all 11Q で特に MET プロセッシングが抑制された。HGF シグナルは SEMA ドメインの N 型糖鎖欠損で減弱し、SEMA ドメイン以外の領域の N 型糖鎖欠損で増強した。N399Q/N405Q ではプロセッシングおよびシグナル伝達に有意な変化は見られなかった。

(5) 11N all 11Q では細胞増殖が抑制され、細胞表面の MET 発現が減弱

11N aII 11Q の細胞膜表面の MET 発現は著明に減弱したが完全には消失しなかった。同時に細胞膜表面に発現した MET のリン酸化も著明に減弱した。

(7) *in vitro* における MET 糖鎖欠損はリガンドとの結合親和性に影響を与えない

糖鎖を除去した sMET は野生型と比較して HGF に対する結合速度定数・解離速度定数には有意差はなかった。

糖鎖合成阻害薬によってヒト肺がん細胞株の内在性 MET および CHO-K1 細胞を用いて発現させた MET の MET プロセッシングと細胞膜表面への MET 輸送が阻害された。MET の部位特異的糖鎖欠損変異体では、作製したすべての変異体で MET へのプロセッシングが抑制された。

SEMA ドメインの N 型糖鎖は HGF シグナルを正に制御し、SEMA ドメイン以外の領域の N 型糖鎖はシグナルを負に制御した。下流シグナルが増強する変異体では、他の分子を含むシグナル伝達経路が関与していると考えられる。SEMA ドメイン以外の領域の N 型糖鎖は、他のシグナル分子との過剰な相互作用を抑制している可能性がある。

11N aII 11Q では HGF シグナルは有意に減弱し細胞増殖も抑制された。11N aII 11Q の細胞膜表面における MET 発現レベルは著しく減弱し、細胞膜表面での MET のリン酸化も有意に減弱していたことが一因と考えられた。N 型糖鎖欠損は MET の細胞表面発現だけでなく機能にも影響を及ぼすと考えられる。

in vitro で N 型糖鎖を欠損させても HGF の MET への結合は抑制されないことが示唆された。SEMA ドメインは MET の二量体化に重要であることが報告されており、SEMA ドメインの N 型糖鎖欠損変異体で下流のシグナル伝達が抑制されたことから、SEMA ドメインの N 型糖鎖は二量体化に適した構造をとるために必要である可能性がある。

MET の N 型糖鎖の構造については、コアフコース、bisecting GlcNAc、シアル酸が MET の制御に関与していることが過去に示唆されている。CHO-K1 細胞における MET の N 型糖鎖の多くはシアル酸とコアフコースを含む bi-antennary complex 型 N 型糖鎖であり、シアル酸とコアフコースが MET の機能制御に関与している可能性がある。

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 1件）

1. 著者名 Saitou Atsushi, Hasegawa Yoshihiro, Fujitani Naoki, Ariki Shigeru, Uehara Yasuaki, Hashimoto Ukichiro, Saito Atsushi, Kuronuma Koji, Matsumoto Kunio, Chiba Hirofumi, Takahashi Motoko	4. 巻 113
2. 論文標題 <i>glycosylation regulates MET processing and signaling</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1292 ~ 1304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15278	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 A. Saitou, M. Takahashi, S. Yokoyama, N. Fujitani, S. Ariki, A. Saito, K. Kuronuma, H. Chiba, H. Takahashi.
2. 発表標題 Analysis of the structures and functions of N-glycans of MET.
3. 学会等名 European Respiratory Society International Congress 2020 virtual.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤淳, 横山早織, 藤谷直樹, 齋藤充史, 有木茂, 千葉弘文, 高橋弘毅, 高橋素子.
2. 発表標題 METの部位特異的糖鎖構造の解析.
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会.
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------