

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：72690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08722

研究課題名(和文) スキルス胃癌の微小環境構築・腹膜播種を阻止するためのレクチン含有細胞外小胞の開発

研究課題名(英文) Lectin-containing extracellular vesicles to prevent microenvironment establishment and peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma

研究代表者

土田 明子 (Tsuchida, Akiko)

公益財団法人野口研究所・研究部・研究員

研究者番号：70378024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：当初、高転移性胃癌細胞が分泌する細胞外小胞の機能解析を行い腹膜転移を促進させるメカニズムの解明を目指したが、細胞外小胞の特性解析からは有益な情報が得られなかった。そこで、細胞内で腹膜播種を促進させるメカニズム解明を目指した。ガレクチン-4と結合する分子として細胞膜上の糖脂質に着目し、異なる腹膜播種能を持つ細胞株では中性糖脂質の発現パターンに大きな変化があることを見出した。この特徴的な変化は糖転移酵素B3GALT5によって制御されることからB3GALT5安定発現株を樹立し、マウスを用いた動物実験を行い、B3GALT5安定発現する細胞株では腹腔内の腫瘍形成が強く抑制されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹膜転移は、転移性または再発胃癌にしばしば伴い、有効な治療法がないために患者の予後を悪化させる難治性の病態である。従って、腹膜転移を引き起こすメカニズムや分子についての理解を深めることが急務である。本研究の結果から、B3GALT5安定発現する細胞株では腹腔内の腫瘍形成が強く抑制されたことから、腹腔内に散らばった癌細胞に対して本酵素遺伝子を送達させることであれば、腹膜転移の治療に結びつく可能性が高い。高転移性胃癌の腹膜転移を阻止し、将来的に腹膜転移先の癌を治療できる新規治療薬を創製することで低分化癌の予後を大きく改善でき、治療困難な患者を少しでも減らすことが可能になるであろう。

研究成果の概要(英文)：The study initially aimed to elucidate the mechanisms that promote peritoneal metastasis by analysing the function of extracellular vesicles secreted by highly metastatic gastric cancer cells, but no useful information was obtained from the characterisation of the extracellular vesicles. As a next step, we aimed to elucidate the mechanisms that promote intracellular peritoneal dissemination. We investigated glycolipids on the plasma membrane as galectin-4-binding molecules in detail and found that the expression pattern of neutral glycolipids changed significantly in cell lines with different peritoneal seeding potential. Since this characteristic change is regulated by the expression of the glycosyltransferase B3GALT5, we established a stable expression line of B3GALT5 and conducted in vivo experiments. We found that B3GALT5 stable expressed-clones strongly suppressed intraperitoneal tumour formation.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：胃癌 腹膜転移 細胞外小胞 腹膜中皮細胞 糖脂質 糖転移酵素

1. 研究開始当初の背景

癌が腹腔内に散らばった形で転移を形成する腹膜播種は、胃癌、膵臓癌、大腸癌などの消化器癌や卵巣癌、尿管癌などの癌腫において頻りにみられる難治性の病態であり、近年の抗癌剤の進歩により切除不能進行癌患者の予後は著しく向上したが、通常の全身化学療法だけでは腹膜播種に対する効果は乏しく、その予後は極めて不良である。なかでも胃癌は、肝臓や肺への遠隔転移よりも腹膜へ転移しやすい性質を持つため、腹膜播種に対する有効な治療が行われれば、予後は大きく変わる可能性がある。

一方、ガレクチンはβ-ガラクトシド糖鎖を認識する動物レクチンで、細胞間接着など多様な生物機能が知られており、特に癌の転移・線維化に關与する報告が多くあるが、そのリガンドやメカニズムについてはあまり解明されていない。なかでも、ガレクチン-4は通常消化管に特異的に発現しており、これまでの解析結果から、高転移性低分化型のスキルス性胃癌細胞株にガレクチン-4が高発現していることを確認している。

我々は、ガレクチン-4を発現する高転移性胃癌細胞 NUGC4 を用いてガレクチン-4 をノックアウトした KO 株を樹立し、マウス腹腔に投与して腹膜播種能を解析して、ガレクチン-4 を発現する細胞株を投与すると腹膜播種が起こるものの、KO 株の投与では腹膜播種は認められないことを見出していた。動物実験の結果から、NUGC4 細胞における腹膜播種能にガレクチン-4 が何らかの役割を果たしていることが推察されたが、腹膜播種の過程には、細胞の近接細胞からの離脱、腹膜への接着など、細胞間相互作用に關わる分子への理解が必要であり、微小環境、認識リガンド、糖鎖などの関連分子を総合的に解析しなければならない。腹膜播種における微小環境の形成には、胃癌だけでなく他臓器由来の腹膜播種においても細胞外小胞の關与が報告されていることから、胃癌の腹膜転移において細胞外小胞の役割解明および標的細胞への集積阻止は重要な課題の一つと考えた。

2. 研究の目的

ガレクチン-4 が高転移性胃癌細胞株において発現が亢進し、細胞外小胞上に局在することを見出していたことから、本研究では、糖鎖認識レクチンであるガレクチン-4 が転移性の高い胃癌細胞由来細胞外小胞の指向性に寄与するか否かを明確にし、標的細胞への集積を阻止することを目的とした。集積の指向性にガレクチン-4 の關与を明らかにできれば、最終的にはDDSの開発により新しい治療法を確立する予定であった。しかしながら、細胞外小胞の特性解析からは有益な情報が得られなかった。そこで次の展開として、細胞内で腹膜播種を促進させるメカニズム解明を目指した。

3. 研究の方法

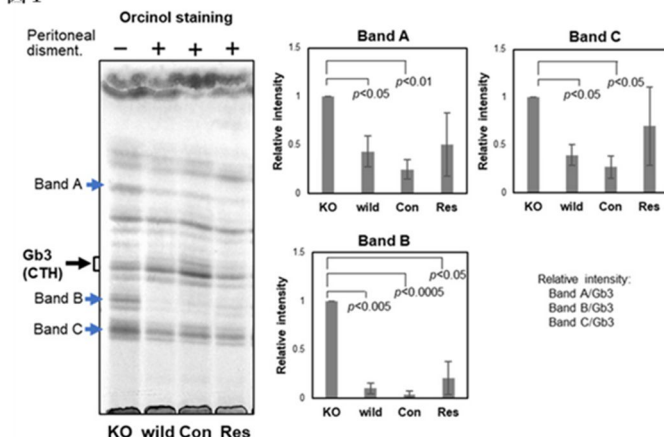
ガレクチン-4 と結合する分子として細胞膜上および脂質ラフト上の糖脂質に着目し、腹膜播種能の高い細胞に特徴的な糖鎖構造について調べた。腹膜播種を起こす細胞株および起こさない細胞株から糖脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーおよびMS解析により特徴的な発現パターンの変化を見出すことができたため、real-time PCR による糖転移酵素の発現解析を行い責任遺伝子と推測される糖転移酵素を同定した。その後、同定した糖転移酵素の強制発現株を樹立しマウスを用いた動物実験を行い、強制発現させた細胞株の腹腔内での腫瘍形成能について検討した。そして糖鎖構造の変化がガレクチン-4 と共に胃癌腹膜転移に關与するメカニズムを解明するため、細胞膜上での各分子の局在変化についてもシヨ糖密度勾配法や免疫蛍光染色によりアプローチした。

4. 研究成果

1) 腹膜播種能の異なる NUGC4 細胞株の中性糖脂質発現パターンの変化

これまでに、ガレクチン-4 ノックアウト (KO)、Mock コントロール (Con)、ガレクチン-4 レスキュー (Res) クローンを樹立し、野生型細胞と比較して腹膜腫瘍形成能を調べてきた。その結果、これらのガレクチン-4 の発現量の異なる細胞株は、腹膜播種能に大きな違いが見られ、KO 細胞株では腹膜播種が強く抑制されることが分かった。

図 1



そこで、これらの細胞株から抽出した糖脂質を HPTLC にて解析した結果、KO 細胞株では野生型 (wild)、Con 細胞株、Res 細胞株に比べて中性糖脂質のいくつかのバンドが有意に増加した (図 1)。バンド A、B、C の棒グラフは Gb3 のバンドの濃さをもとにノーマライズした結果を表す (n = 3)。

図 2 は NUGC4 細胞における糖脂質の生合成経路である。中性糖脂質はラクト型 (Lc)、ネオラクト型 (nLc)、グロボ型 (Gb)、イソグロボ型 (isoglobo) に分けられ、それぞれ生合成経路に参与する糖転移酵素が異なる。

図 3

MALDI-TOF MS 解析を行った結果、下の図 3 に示すように、KO 細胞は nLc 系列だけでなく Lc 系列の糖鎖も発現していた。また、Res 細胞の糖鎖プロファイルは野生型細胞株と KO 細胞株の間のものであった。この構造変化は、 β 1-3 galactose を転移する糖転移酵素の増加によって引き起こされるのではないかと考えた。

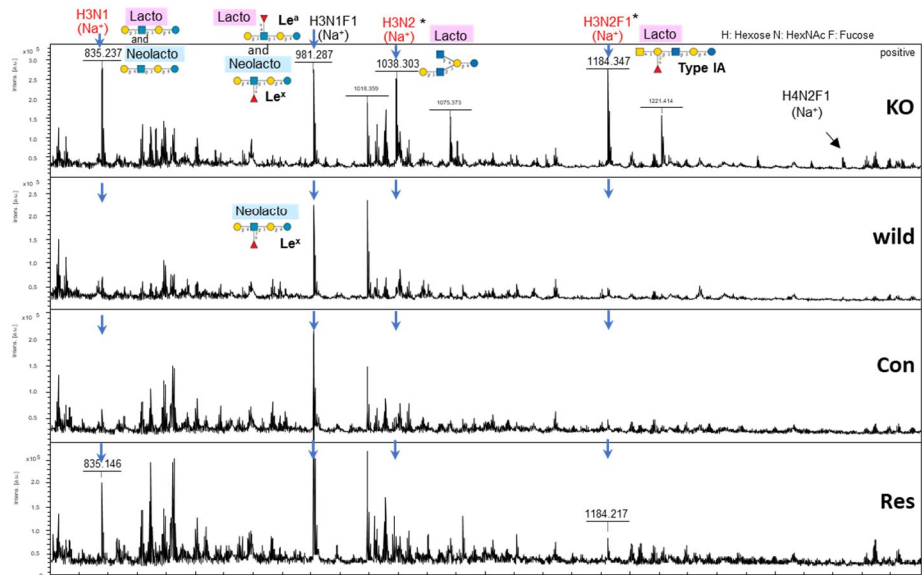
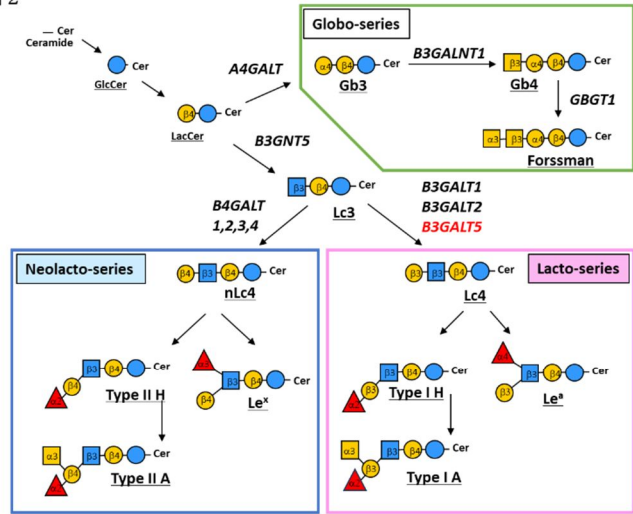


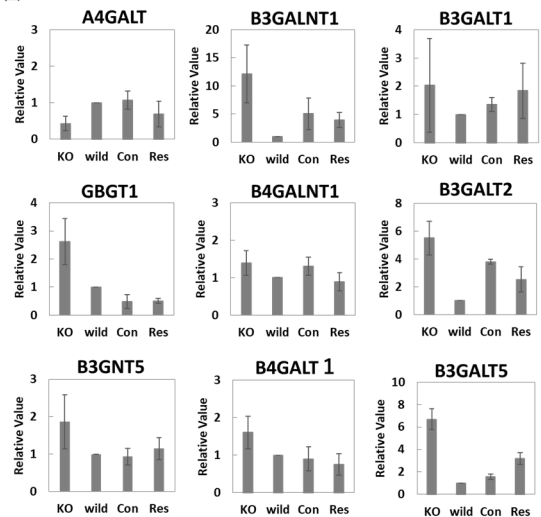
図 2



2) KO 細胞における Lc 系列糖脂質の合成に参与する候補遺伝子の同定

次に、B3GALT1、B3GALT2、B3GALT5 など、 β 1-3 ガラクトースを転移する糖転移酵素および B4GALT1、B4GALT2、B4GALT3、B4GALT4、A4GALT、B3GALNT1、GBGT1 などの Lc 系列糖脂質の合成に参与する遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法で調べた。(図 4)。糖脂質の糖鎖プロファイルから、候補となる糖転移酵素の発現は KO 細胞で高く、野生型細胞や Con 細胞で低いことが予測された。その結果、B3GALT5 の発現は KO 細胞で高く、野生型細胞、Con 細胞では低く、Res 細胞では中間的であったので、KO 細胞で Lc 系列糖脂質を合成する最も有望な糖転移酵素として B3GALT5 に注目した。

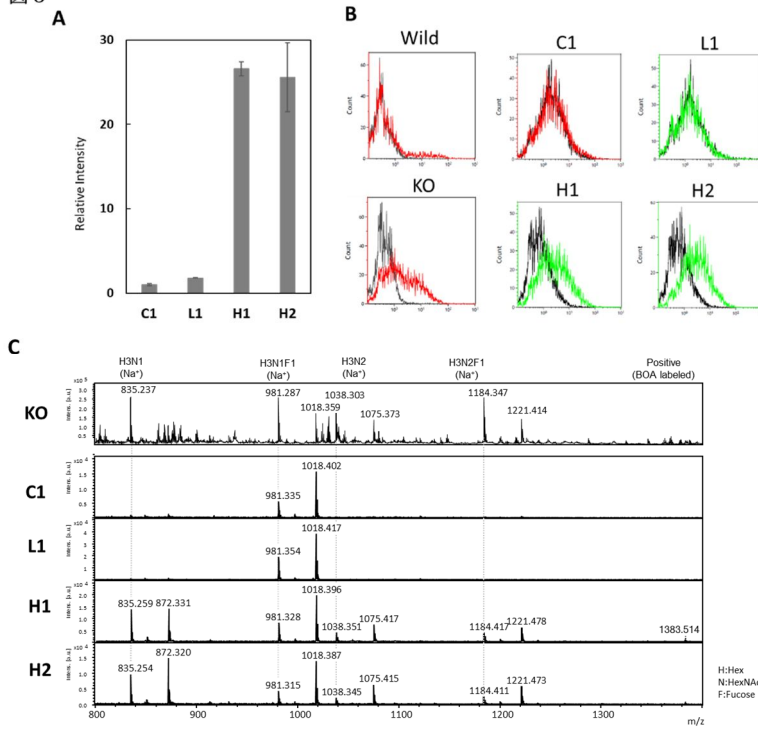
図 4



3) B3GALT5 遺伝子を導入した安定発現株の樹立および糖脂質の糖鎖プロファイル

B3GALT5 が Lc シリーズの糖脂質を合成するかどうかを調べるために、B3GALT5 遺伝子発現ベクター (pRP-hB3GALT5-EGFP/Puro-CMV) を NUGC4 細胞に導入した。コントロールベクターのみでトランスフェクトしたクローンも単離した。B3GALT5 発現量の異なる 3 つの安定発現株とコントロール株 C1 における B3GALT5 遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR を用

図 5



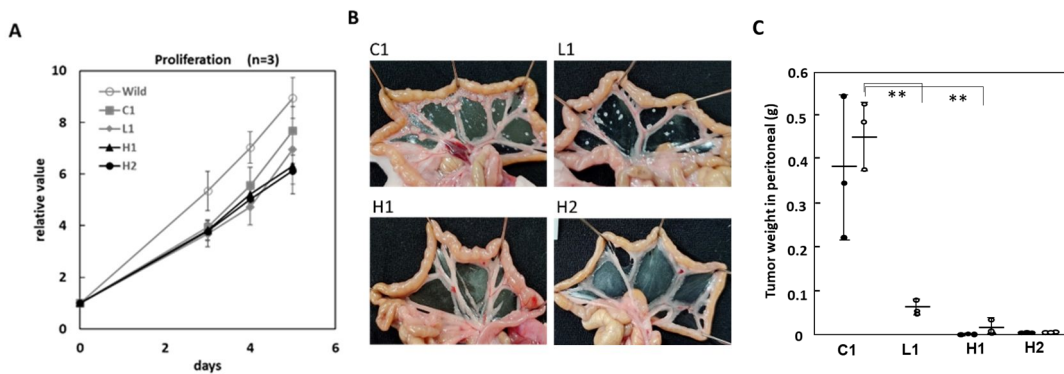
いて定量し、以下のように命名した(低発現株: L1、高発現株 1: H1、高発現株 2: H2: H2)と命名した(図 5A)。得られた細胞株を用いて、表現型を比較することにより、B3GALT5 発現の意義を明らかにした。B3GALT5 遺伝子導入株は Lc 系列の糖鎖抗原の発現が亢進すると予想されたので、B3GALT5 遺伝子導入株における Lea 抗原の発現をフローサイトメトリーを用いて調べた(図 5B)。Lea 抗原の発現は KO 細胞で観察されたが、野生型細胞では観察されなかった。さらに、Lea 抗原の発現は H1 と H2 株で観察されたが、コントロール株 C1 では観察されなかった。各細胞株における中性糖脂質の発現パターンを MALDI-TOF MS を用いて

調べたところ、H1 と H2 株は C1 株と L1 株に比べて Lc 系列の糖脂質の発現が有意に高く、その糖鎖プロファイルは KO 株のものと非常に類似していた(図 5C)。

4) B3GALT5 発現クローンにおける増殖抑制と腹膜播種の抑制

増殖曲線から、H1 および H2 株は C1 株、L1 株および野生型細胞と比較して増殖能が低下していることが示された(図 6A)。マウスモデルにおいて、B3GALT5 の発現が腹膜播種に影響するかどうかを調べるため、コントロール株 C1、低発現株 L1、高発現株 H1、H2 をマウスに腹腔内注射した。40 日後にマウスを解剖して腹腔内における腫瘍形成について調べたところ、H1 および H2 株を接種したマウスでは腸間膜への腫瘍形成が抑制されていたが、C1 接種マウスでは有意な腫瘍形成が観察された(図 6B)。低発現 L1 クローンも腫瘍形成を示したが、C1 細胞と比較して、卵膜および腸間膜腫瘍の形成は有意に減少した。この *in vivo* 実験から、NUGC4 細胞の腹膜播種には、B3GALT5 遺伝子の高発現と糖脂質の変化が重要であることが強く示唆された(図 6C)。

図 6



4) B3GALT5 安定発現クローンにおける pAKT(S473)のリン酸化レベルの低下

次に、B3GALT5 発現クローンで発現が異なる分子を同定するために、ウェスタンブロッティングを行った。図 7A に示すように、H1 および H2 株は、C1 株および L1 株に比べて cMET の発現がわずかに低かった。さらに、AKT(S473)のリン酸化は、野生型および L1 株に比べ、コントロールベクターのみでトランスフェクトしたクローンも単離した。これらの結果は、B3GALT5 の発現がガレクチン-4 の発現といくつかのシグナル伝達分子の活性化に影響を与えていることを示唆している。

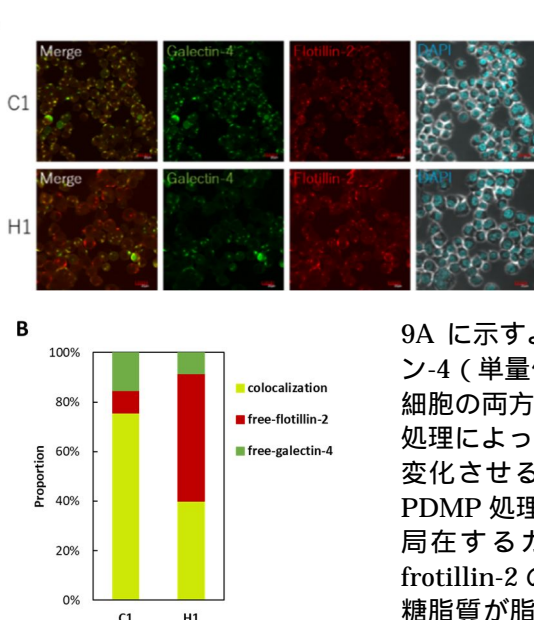
5) ガレクチン-4 の脂質ラフトにおける局在について免疫蛍光染色を用いた検討

ガレクチン-4 のラフト局在を調べるために、共焦点レーザー顕微鏡を用いてガレクチン-4 と

flotillin-2 (脂質ラフトマーカー) の二重免疫染色を行った (図 8A)。C1 株と H1 株におけるフリーのガレクチン-4、フリーの flotillin-2、共同在ガレクチン-4/flotillin-2 の比率を計算し、グラフ化した (図 8B)。H1 株では、ガレクチン-4 染色 (緑) と flotillin-2 との二重染色 (黄色) の比率が有意に減少しており、ガレクチン-4 の発現が低下し、細胞表面で flotillin-2 と共同在していることが示唆された。

7) ガレクチン-4 の脂質ラフトにおける局在についてシヨ糖密度勾配法を用いた検討

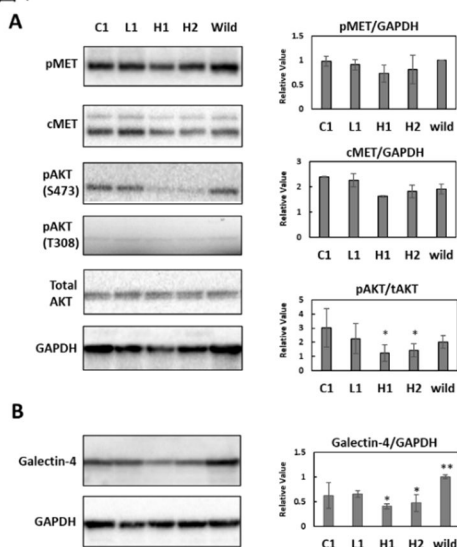
図 8



<まとめ>

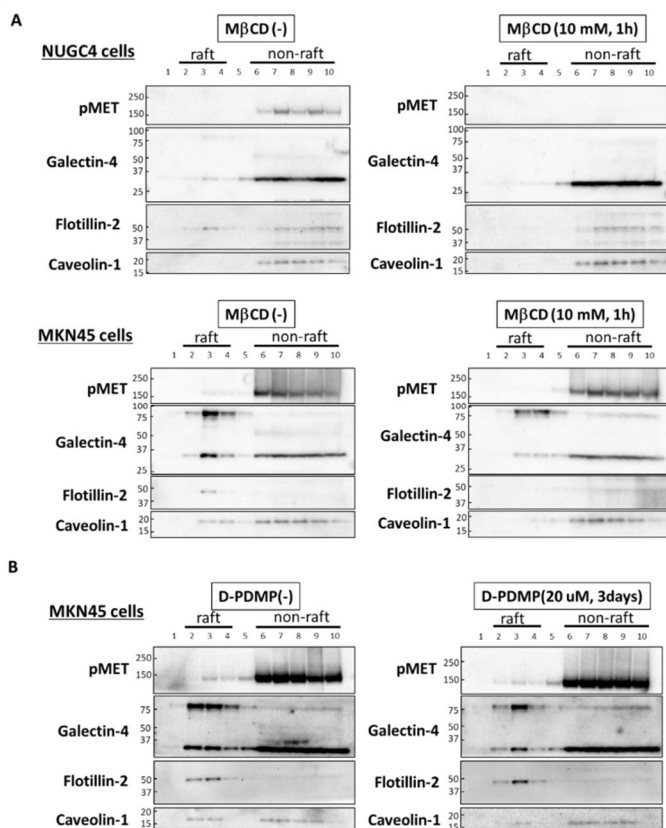
我々は、転移能の異なる細胞の糖脂質の糖鎖プロファイルに構造変化を引き起こす酵素を探索し、B3GALT5 が Lc 系列糖脂質の増加に関与していることを見出した。B3GALT5 を導入した細胞の詳細な解析から、低分化胃癌細胞において、糖脂質の糖鎖構造の変化がガレクチン-4 の局在と転移能に影響を及ぼすことを明らかにした。結論として、我々の結果は、B3GALT5 が脂質ラフト、AKT、ガレクチン-4などを調節することにより、細胞増殖やその他の未知の機序を抑制することによって、胃癌悪性細胞の腹膜播種に関与していることを示しており、B3GALT5 が腹膜転移の新たな制御因子であることを示唆している。糖脂質は脂質ラフトの重要な構成要素であることから B3GALT5 による変化は、ガレクチン-4 を含むシグナル伝達分子のプラットフォームとしての機能に影響を与える可能性がある。今回の知見は、胃癌における腹膜播種の治療に新たなアプローチを提供するものである。

図 7



免疫染色の結果から、Lc 系列抗原の発現は脂質ラフトにおけるガレクチン-4 の発現を低下させることが示されたので、シヨ糖密度勾配遠心分離分析を用いた。図 9A に示すように、脂質ラフト (fr.2,3,4) へのガレクチン-4 (単量体と二量体) の局在は、NUGC4 と MKN45 細胞の両方で、メチル-β-シクロデキストリン (MβCD) 処理によって減少した。また、細胞膜上の糖脂質組成を変化させるグルコシルセラミド合成阻害剤である D-PDMP 処理によっても、MKN45 細胞では脂質ラフトに局在するガレクチン-4 の量は有意に変化したが、flotillin-2 の量は変化しなかった (図 9B)。この結果は、糖脂質が脂質ラフトへのガレクチン-4 の局在に影響を与えるという仮説を支持するものである。

図 9



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 Hachisu Kazuko, Tsuchida Akiko, Takada Yoshio, Mizuno Mamoru, Ideo Hiroko	4. 巻 24
2. 論文標題 Galectin-4 Is Involved in the Structural Changes of Glycosphingolipid Glycans in Poorly Differentiated Gastric Cancer Cells with High Metastatic Potential	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12305 ~ 12305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms241512305	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土田明子、八須和子、井手尾浩子、高田美生
2. 発表標題 ガレクチン-4が関与する未分化胃癌細胞の腹膜播種メカニズムの解明
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土田明子、八須和子、水野真盛、高田美生、井手尾浩子
2. 発表標題 胃癌細胞の腹膜転移におけるガレクチン-4とスフィンゴ糖脂質の役割
3. 学会等名 第83回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2024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 腹膜播種転移をおこす低分化型胃癌細胞の糖鎖変化による転移制御
3. 学会等名 第33回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 土田明子、八須和子、水野真盛、高田美生、井手尾浩子
2. 発表標題 低分化型胃癌細胞の腹膜播種におけるガレクチン-4とスフィンゴ糖脂質の役割
3. 学会等名 第43回日本糖質学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 土田明子、八須和子、水野真盛、高田美生、井手尾浩子
2. 発表標題 腹膜播種を起こす低分化型胃癌細胞の糖脂質とガレクチン-4による転移制御
3. 学会等名 第97回日本生化学会大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 腫瘍の治療または転移抑制用医薬組成物	発明者 土田明子、井手尾浩子、高田美生	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-007757	出願年 2024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	八須 和子 (Hachisu Kazuko) (30625447)	公益財団法人野口研究所・研究部・研究員 (72690)	
研究分担者	井手尾 浩子 (Ideo Hiroko) (90180322)	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
---------	---------