

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590371

研究課題名(和文) スフィンゴ糖脂質による癌性形質の増強に関わる分子群の生細胞膜上での時空間的解析

研究課題名(英文) Spatio-temporal analysis of cell membrane molecules involved in the enhancement of malignant properties by glycosphingolipids

研究代表者

古川 圭子 (FURUKAWA, Keiko)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：50260732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：酸性スフィンゴ糖脂質GD3が発現するヒトメラノーマ細胞では、メラノーマの増殖に重要なHGF刺激と接着刺激を同時に加えることにより、Akt及びErkの著明なリン酸化の増強が認められた。よって、GD3発現細胞膜上では接着と増殖刺激によるPI3K-Akt及びRas-Erkシグナルが収斂し、癌性形質が相乗的に増強すると推察された。また、EMARS反応により生細胞膜のGD3近傍にNeogeninやIntegrin等が同定され、GD3とこれらの分子の相互作用が示唆された。1分子観察では、酸性糖脂質GM1発現細胞においてGM1分子同士の会合が示され、GD3についても1分子観察の動態解析が進行中である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed effects of GD3 expression on the cell signals triggered by hepatocyte growth factor (HGF)/Met interaction and by adhesion to collagen type I. The simultaneous treatment with both of them resulted in markedly increased activation of Akt and Erk in GD3+ cells. These results suggested that GD3 plays a crucial role in the convergence of PI3K-Akt and Ras-Erk signals, leading to the synergistic effects of those signals on malignant properties of melanomas. To search molecules existing in the vicinity of GD3 in living cells, enzyme-mediated activation of radical sources (EMARS) combined with mass spectrometry was performed. Neogenin and Integrin were identified to be interacting molecules with GD3 on lipid rafts of the cell membrane. We also tried spatio-temporal analysis of cell membrane molecules by single molecule observation, showing that glycosphingolipid GM1 specifically forms homodimer on the cell surface. Single molecule observation of GD3 on the membrane is now on-going.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：スフィンゴ糖脂質 メラノーマ EMARS反応 1分子観察 HGF刺激 接着刺激 convergence

1. 研究開始当初の背景

癌、神経変性および代謝異常における糖脂質の機能と作用機序に関する私達の研究から、細胞膜のマイクロドメインに存在する糖脂質が種々の細胞シグナルの質と量を調節しており、時に、増殖、分化、死などの細胞運命を決定することが分かった。更に、マイクロドメインの構築および機能が、糖脂質の糖鎖構造によって制御されるとともに、その異常によって癌細胞の異常増殖や浸潤、転移などの悪性形質が増強されること、また脳神経組織では補体系の活性化に基づく炎症反応と、それに引き続く神経変性が誘発されることが明らかになった。

特に、ヒトメラノーマについては、従来から酸性スフィンゴ糖脂質 (ガングリオシド) である GD3 が発現増強することが知られていたが、私達は、GD3 がヒトメラノーマ細胞の癌性形質に深く関与することを分子レベルで明らかにしてきた。即ち、GD3 の発現により、増殖因子受容体とインテグリンからのシグナルが細胞膜上のマイクロドメイン (脂質ラフト) 近傍で収斂し、より効果的に細胞内シグナルが活性化される可能性を提示してきた。

しかし、これまでの生化学的脂質ラフトの調製は細胞や組織を溶解した後、比重遠心を用いて分離する手法に拠っており、以下のような限界と問題点を含むことが指摘されてきた。即ち、

- ・ 脂質ラフト局在分子として同定された分子群の空間的位置関係が不明である、
- ・ 脂質ラフトの実体が可視化されていない、
- ・ 細胞膜上における分子動態が観察されていない、等である。

これらの問題点を克服して、新規の手法を用いた解析を行うことにより、脂質ラフトのリアルな観察と正確な理解が必須であり、また可能となってきた。

2. 研究の目的

本研究では、癌細胞の悪性形質の増強における酸性スフィンゴ糖脂質 GD3 の作用機構を分子レベルで解析するために、

(1) GD3 発現細胞膜上で、接着シグナルと収斂する増殖因子及びその増殖シグナルの解析、

(2) 生存細胞の膜上で GD3 と会合する分子の同定と解析、

(3) 1分子観察によりスフィンゴ糖脂質が局在する細胞膜の脂質ラフトの動態解析、

(4) focal adhesion などにおける膜タンパク質および糖脂質の局在動態の観察を行う。

従来の生化学的解析結果と合わせて生細胞膜上における各分子の動態を解析することにより、脂質ラフトの実体をより明確にし、正常と癌細胞の膜動態の差異を明らかにする。

3. 研究の方法

私達は、ヒトメラノーマにおいて酸性スフィンゴ糖脂質の GD3 が増殖因子受容体およびインテグリンを介するシグナル伝達分子を活性化することを生化学的に解明してきた

(Hamamura *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2005, Ohkawa *et al.* *J. Biol. Chem.* 2010)。本研究では、生化学的解析に加えて、糖脂質糖鎖の脂質ラフト膜上での動的構造と機能について解析する。特に、GD3 (+) 及び GD3 (-) ヒトメラノーマ細胞の差異について比較検討する。具体的には、

(1) メラノーマの増殖や悪性化に関与する HGF/Met シグナルが、接着シグナルの増強に関与するかを生化学的及び細胞生物学的に検討する。

(2) Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) 反応により、生きた細胞膜上の GD3 に近接する分子を同定し、分子間の相互作用を検討する。

(3) 1分子観察により細胞膜脂質ラフト上での糖脂質の相互作用を解析し、糖脂質糖鎖の違いによる脂質ラフト局在分子の動態を検討する。

4. 研究成果

(1) 私達はこれまでに、GD3 発現ヒトメラノーマ細胞株 SK-MEL-28 の亜株で GD3 非発現細胞株 SK-MEL-28-N1 (N1 細胞) に GD3 合成酵素遺伝子を導入して GD3 を強発現させた GD3 (+)N1 細胞、及びコントロール細胞の GD3 (-)N1 細胞を作成し、GD3 (+)N1 細胞では GD3 (-)N1 細胞に比べて、I 型コラーゲンに対する接着刺激により Akt のリン酸化が増強することを明らかにしたが、その強度は強くなかった。また、Erk のリン酸化は差異が認められなかった。しかし、HGF 刺激と接着刺激を同時に加えることにより、GD3 (+)N1 細胞では、Akt と Erk の顕著なリン酸化の増強が認められ、更にアポトーシスの抑制効果の増大および細胞増殖能の亢進が認められた。また、GD3 発現ヒトメラノーマ細胞株 SK-MEL-28 に

GD3 合成酵素遺伝子の shRNA を導入して本遺伝子をノックダウンした GD3 抑制細胞においては、HGF と CL-I による同時刺激を与えても Akt と Erk のリン酸化の増強が起こらないことを示した。

(2) GD3(+)/N1 細胞について、細胞膜の GD3 近傍の分子群を EMARS 反応により解析した結果、Neogenin, Netrin, Integrin 等の分子が同定された。更に、Neogenin が GD3 と結合することも生化学的に示した。また、Neogenin を強発現させた細胞においては浸潤性の亢進も認められることから、Neogenin は細胞膜上で GD3 と相互作用することにより細胞の浸潤性を増強すると推察された。

(3) 糖脂質糖鎖の違いによる細胞膜脂質ラフトの構造と機能の異同を 1 分子観察により解析するために、N1 細胞に種々の糖鎖合成酵素遺伝子を導入して① GD3 発現 N1 (GD3(+)/N1) 細胞、② GD2 発現 N1 細胞、③ GM2 発現 N1 細胞、及び④ GM1 発現 N1 細胞を樹立し、これらの細胞を 1 分子観察による脂質ラフト解析のために連携研究者 (京大、鈴木) に提供した。そして、蛍光標識 GM1 を N1 細胞 (GM3 のみ発現)、GM2 発現 N1 細胞、および GM1 発現 N1 細胞に添加し、蛍光標識 GM1 の細胞膜上での動態を検討した。その結果、GM1 発現細胞膜上の蛍光標識 GM1 の会合時間は、N1 細胞および GM2 発現細胞上の蛍光標識 GM1 の会合時間の約 1/2 となり、細胞膜上での GM1 同士の会合が示唆された。現在、GD3 についても 1 分子観察の動態解析が進行中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

- ① Ohmi Y., Ohkawa Y., Tajima O., Sugiura Y., Furukawa K., Furukawa K.: Ganglioside deficiency causes inflammation and neurodegeneration via the activation of complement system in the spinal cord. *J Neuroinflammation*. 11, 61, 2014 査読有り DOI: 10.1186/1742-2094-11-61.
- ② Miyata M., Ichihara M., Tajima O., Sobue S., Kambe M., Sugiura K., Furukawa K., Furukawa K.: UVB-irradiated keratinocytes induce melanoma-associated ganglioside

GD3 synthase gene in melanocytes via secretion of tumor necrosis factor α and interleukin 6. *Biochem Biophys Commun.* 445, 504-10, 2014 査読有り DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.038.

- ③ Furukawa K., Kambe M., Miyata M., Ohkawa Y., Tajima O., Furukawa K.: Ganglioside GD3 induces convergence and synergism of adhesion and hepatocyte growth factor/Met signals in melanomas. *Cancer Sci.* 105, 52-63, 2014 査読有り DOI: 10.1111/cas.12310.
- ④ Sabit I., Hashimoto N., Matsumoto Y., Yamaji T., Furukawa K., Furukawa K.: Binding of a sialic acid-recognizing lectin Siglec-9 modulates adhesion dynamics of cancer cells via calpain-mediated protein degradation. *J Biol Chem.* 288, 35417-27, 2013 査読有り DOI: 10.1074/jbc.M113.513192.
- ⑤ Tokuda N., Numata S., Li X, Nomura T., Takizawa M., Kondo Y., Yamashita Y., Hashimoto N., Kiyono T., Urano T., Furukawa K., Furukawa K.: β 4GalT6 is involved in the synthesis of lactosylceramide with less intensity than β 4GalT5. *Glycobiology.* 23, 1175-83, 2013 査読有り DOI: 10.1093/glycob/cwt054.
- ⑥ Matsumoto Y., Zhang Q., Akita K., Nakada H., Hamamura K., Tsuchida A., Okajima T., Furukawa K., Urano T., Furukawa K.: Trimeric Tn antigen on syndecan 1 produced by ppGalNAc-T13 enhances cancer metastasis via a complex formation with integrin α 5 β 1 and matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem.* 288, 24264-76, 2013 査読有り DOI: 10.1074/jbc.M113.455006.
- ⑦ Kondo Y., Ikeda K, Tokuda N., Nishitani C., Ohto U., Akashi-Takamura S., Ito Y., Uchikawa M., Kuroki Y., Taguchi R., Miyake K., Zhang Q., Furukawa K., Furukawa K.: TLR4-MD-2 complex is negatively regulated by an endogenous ligand, globotetraosylceramide. *Proc Natl Acad Sci.* 110, 4714-4719, 2013 査読有り DOI: 10.1073/pnas.1218508110.

- ⑧ Furukawa K., Hamamura K., Ohkawa Y., Ohmi Y., Furukawa K.: Disialyl gangliosides enhance tumor phenotypes with differential modalities. *Glycoconj J.* 29, 579-584, 2012 査読有り
DOI: 10.1007/s10719-012-9423-0.
- ⑨ Hashimoto N., Hamamura K., Kotani N., Furukawa K., Kaneko K., Honke K., Furukawa K.: Proteomic analysis of ganglioside-associated membrane molecules: Substantial basis for molecular clustering. *Proteomics.* 12, 3154-3163, 2012 査読有り
DOI: 10.1002/pmic.201200279.
- ⑩ Shibuya H., Hamamura K., Hotta H., Matsumoto Y., Nishida Y., Hattori H., Furukawa K., Ueda M., Furukawa K.: Enhancement of malignant properties of human osteosarcoma cells with disialyl gangliosides GD2/GD3. *Cancer Sci.* 103, 1656-1664, 2012 査読有り
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02344.x.
- ⑪ Furukawa K., Ohkawa Y., Yamauchi Y., Hamamura K., Ohmi Y., Furukawa K.: Fine tuning of cell signals by glycosylation. *J. Biochem.* 151, 573-578, 2012 査読有り
DOI: 10.1093/jb/mvs043.
- ⑫ Ohmi Y., Ohkawa Y., Yamauchi Y., Tajima O., Furukawa K., Furukawa K.: Essential roles of gangliosides in the formation and maintenance of membrane microdomains in brain tissues. *Neurochem. Res.* 37, 1185-1191, 2012 査読有り
DOI: 10.1007/s11064-012-0764-7.
- ⑬ Hamamura K., Tsuji M., Hotta H., Ohkawa Y., Takahashi M., Shibuya H., Nakashima H., Yamauchi Y., Hashimoto N., Hattori H., Ueda M., Furukawa K., Furukawa K.: Functional activation of Src family kinase yes protein is essential for the enhanced malignant properties of human melanoma cells expressing ganglioside GD3. *J Biol Chem.* 286, 18526-18537, 2011 査読有り
DOI: 10.1074/jbc.M110.164798.
- ⑭ Ohkawa Y., Ohmi Y., Tajima O., Yamauchi Y., Furukawa K., Furukawa K.: Wisp2/CCN5 up-regulated in the central nervous system of GM3-only mice facilitates neurite formation in Neuro2a cells via integrin-Akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 411, 483-489, 2011 査読有り
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.118.
- ⑮ Yamauchi Y., Furukawa K., Hamamura K., Furukawa K.: Positive feedback loop between PI3K-Akt-mTORC1 signaling and the lipogenic pathway boosts Akt signaling: induction of the lipogenic pathway by a melanoma antigen. *Cancer Res.* 71, 4989-4997, 2011 査読有り
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4108.
- ⑯ Miyata M., Kambe M., Tajima O., Moriya S., Sawaki H., Hotta H., Kondo Y., Narimatsu H., Miyagi T., Furukawa K., Furukawa K.: Membrane sialidase NEU3 is highly expressed in human melanoma cells promoting cell growth with minimal changes in the composition of gangliosides. *Cancer Sci.* 102, 2139-2149, 2011 査読有り
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02086.x.
- [学会発表] (計 24 件)
- ① 伊力哈木江：シグレック 9 の結合はカルパインによりタンパク質分解に基づいて癌細胞の接着動態を調節する。第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3~5 日、パシフィコ横浜
- ② 金子 慶：GD3 発現ヒトメラノーマ細胞における Neogenin の役割。第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3~5 日、パシフィコ横浜
- ③ 大川 祐樹：PDGFB によって発現誘導されるガングリオシド GD3 はグリオーマ細胞の悪性形質を増強する。第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3~5 日、パシフィコ横浜
- ④ 古川 鋼一：複合糖質と糖鎖認識分子との相互作用の時空間的ダイナミクス。第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11~13 日、パシフィコ横浜

- ⑤ 大海 雄介：アストロサイトにおけるガンクリオシド糖鎖の機能. 第86回日本生化学会大会、2013年9月11~13日、パシフィコ横浜
- ⑥ 山口 世堯：ガングリオシドによる amyloid β precursor protein (APP) の切断パターンの制御及びAPP切断断片が細胞の健全性に与える影響. 第86回日本生化学会大会、2013年9月11~13日、パシフィコ横浜
- ⑦ 姫 しゅうてい：脂肪細胞のレプチン分泌と褐色脂肪細胞におけるb細胞列ガングリオシドの調節機構. 第86回日本生化学会大会、2013年9月11日~13日、パシフィコ横浜
- ⑧ 田島 織絵：糖鎖変異による脂質吸収障害の分子メカニズム. 第86回日本生化学会大会、2013年9月11~13日、パシフィコ横浜
- ⑨ 古川 圭子：TNF α 及び紫外線によるメラノサイトとメラノーマのGD3合成酵素遺伝子の発現誘導. 第86回日本生化学会大会、2013年9月11~13日、パシフィコ横浜
- ⑩ 古川 圭子：GD3発現細胞での接着とHGF刺激によるAktの相乗的活性化とアポトーシス抑制. 第85回日本生化学会大会、2012年12月14~16日、福岡国際会議場
- ⑪ 田島 織絵：腸管上皮細胞におけるスフィンゴ糖脂質の役割. 第85回日本生化学会大会、2012年12月14~16日、福岡国際会議場
- ⑫ 古川 圭子：メラノーマ特異的酸性スフィンゴ糖脂質によるc-Met機能の増強メカニズム. 第84回日本生化学会大会、国立京都国際会館、2011年9月21~24日
- ⑬ 田島 織絵：Gut abnormalities during postnatal development in GM3-only mice. 第84回日本生化学会大会、国立京都国際会館、2011年9月21~24日
- ⑭ Miyata Maiko：Expression profiling of glycosyltransferase genes in human melanocytes and melanoma cells. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19~21日、ロイトン札幌
- ⑮ 田島 織絵：糖鎖変異による小腸機能障害の分子メカニズム. 第31回日本糖質学会年会、2012年9月17~20日、鹿児島市民文化ホール
- ⑯ Furukawa Keiko：Convergence and enhancement of the growth and adhesion signals by ganglioside GD3 in human melanomas. 21st International Symposium on Glycoconjugates, Austria, 2011年8月21~26日
- ⑰ Tajima Orié：Molecular mechanisms for the growth disorders in GM3-only mice. 21st International Symposium on Glycoconjugates, Austria, 2011年8月21~26日
- [図書] (計 2件)
- ① Koichi Furukawa, Yusuke Ohmi, Yuji Kondo, Yuki Ohkawa, Noboru Hashimoto, Orié Tajima and Keiko Furukawa., Nova Science Publishers Inc., Lipid Rafts (Editor: Dan Sillence), The Role of Glycosphingolipids in Lipid Rafts, 2013, p. 1-19.
- ② 古川鋼一、浜村和紀、大川祐樹、大海雄介、古川圭子、羊土社、実験医学(増刊) Vol. 30、シグナル伝達 研究最前線 2012 糖鎖修飾によるシグナル伝達の制御、2012、p. 111-116.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
古川 圭子 (FURUKAWA, Keiko)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号：50260732
- (2) 連携研究者
鈴木 健一 (SUZUKI, Kenichi)
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・准教授
研究者番号：50423059