

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：72690

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791796

研究課

分岐型ジシアル糖鎖抗原による腎癌悪性化メカニズムの解明

研究課題名（英文）

Roles of branched-type disialyl- antigen in malignant conversion in renal cell cancer

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

研究成果の概要（和文）：

腎癌細胞株に発現している糖脂質糖鎖の解析により、Disialyl糖鎖の発現パターンの変化が腎癌での悪性化や転移性に関連していることが推測されている。本研究では、Disialyl Lc4(DSLc4)の末端にGalNAcが β 1-4結合したDisialyl糖鎖 (GalNAc-DSLc4) の合成機構と機能の解析を行ってきた。GalNAc-DSLc4の合成に関わる糖転移酵素遺伝子 β 4GalNAc-T2を、GalNAc-DSLc4糖鎖抗原をほとんど発現していない腎癌細胞株に遺伝子導入し、糖鎖リモデリングの結果惹起される表現型の変異を解析した結果、樹立したGalNAc-DSLc4安定発現株の増殖能および浸潤能が、コントロール細胞株よりも亢進していることを明らかにした。また、リアルタイム細胞形態計測システム(RT-CES)を用いて、細胞外基質をコーティングした表面に対する細胞の接着形態を調べたところ、GalNAc-DSLc4安定発現株がラミニンコーティングプレートに特異的に接着することを見出した。これらの表現型は、いずれもAktのリン酸化レベルがコントロール細胞株よりも高いことが関与しており、PI3K阻害剤であるLY294002を添加することで、その浸潤能やラミニンへの接着能は抑制された。GalNAc-DSLc4安定発現株のさまざまな悪性形質はPI3K-Aktシグナル経路が活性化されていることに起因することが考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Flow cytometric analysis of RCCs revealed that GalNAc-DSLc4 is presented on the cell surface in 70% of RCC lines. To investigate the roles of GalNAc-DSLc4 antigen in RCC, we prepared GalNAc-DSLc4-overexpressing transfectant cells using VMRC-RCW cells. They showed increased proliferation and invasion activities, and specific adhesion onto laminin-coating plates. These results suggest that GalNAc-DSLc4 is, at least partly, involved in the malignant properties of RCCs.

And recently, we found that PI3K inhibitor (LY294002) suppresses malignant phenotype in GalNAc-DSLc4-overexpressing transfectant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腎癌 糖脂質 糖転移酵素 ジシアル糖鎖 腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

腎癌の多臓器転移症例は、5年生存率 25～40%と予後不良であり、現在も免疫療法（インターフェロン、インターロイキン2療法）が行われているが、奏功率は 20%前後と治療効果が乏しいため、今後の新規治療薬の開発に期待がもたれている。また、未だ確立した鋭敏な腫瘍マーカーが無いため、早期癌の発見が遅れ、既に進行癌に至っているケースも少なくない。このため、新しい腫瘍マーカーの開発が期待される。

これまでに我々が行った Flow cytometry による細胞表面の糖鎖抗原の発現パターンの解析から、GalNAc-disialyl Lc4 糖鎖抗原が多くの腎癌細胞株に発現していることを確認した。GalNAc-disialyl Lc4 糖鎖抗原は、前立腺癌の癌化においても、その発現が上昇してくることが確認されており、臨床的に泌尿器系の腫瘍マーカーとして期待される抗原である。

GalNAc-disialyl Lc4 糖鎖抗原の機能を解明するため、この糖鎖抗原の合成に関わる糖転移酵素遺伝子 $\beta 4\text{GalNAc-T2}$ を、GalNAc-disialyl Lc4 糖鎖抗原をほとんど発現していない腎癌細胞株に遺伝子導入し、糖鎖リモデリングの結果惹起される表現型の変異について解析を進めてきた。

これまでに、リアルタイム細胞計測システム (RT-CES) を用い、細胞外マトリックス存在下での接着変化について細胞の形態を経時的にモニタリングしたところ、コラーゲン (I, IV)、フィブロネクチンを金電極表面に固定化した表面に対しては穏やかな接着挙動を示したが、ラミニンを金電極表面に固定化した場合においては、細胞を播種した後、早期に強い接着が観察された。そこでラミニンと結合する接着分子インテグリンの発現と分布を調べたところ、安定発現株ではインテグリン $\beta 1$ がラフトに存在することが明らかとなり、GalNAc-DSLc4 糖鎖の発現量が細胞膜上でのインテグリンの局在に影響している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

(1) 糖鎖リモデリングの結果惹起される表

現型の変異を解析し、腎癌が悪性化する過程における GalNAc-disialyl Lc4 糖鎖抗原の発現意義を具体的に明らかにしていく。GalNAc-disialyl Lc4 糖鎖抗原の腫瘍マーカーとしての可能性を探る。

(2) ラミニン固定化表面に対する接着が強いことが明らかになっているので、ラミニンと細胞表面上に存在する接着分子との結合に GalNAc-disialyl Lc4 糖鎖抗原がどのように関与しているかを調べる。

(3) GalNAc-disialyl Lc4 抗原を提示する糖脂質もしくはタンパク質を同定することで、悪性形質の発現に直接関与していると思われる会合分子を見出すことが可能となり、その挙動を把握することができれば悪性化促進を抑制することが可能になると思われる。

(4) 肺転移への関与およびそのメカニズムについて解析し、新規治療法の開発のための基礎データを構築する。また本抗原に対する良質な抗体を作製することで、抗体治療への可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) RM2 糖鎖抗原が糖脂質として発現していると推測されたが、糖脂質以外の GalNAc-disialyl Lc4 抗原を提示しているキャリアータンパク質の存在の有無を明らかにする。そのために、RM2 抗体を用いた免疫沈降より同定を試み、マーカーとしての応用を検討する。具体的には O-グリカンの合成阻害を行って、本抗原の発現への影響をみる。

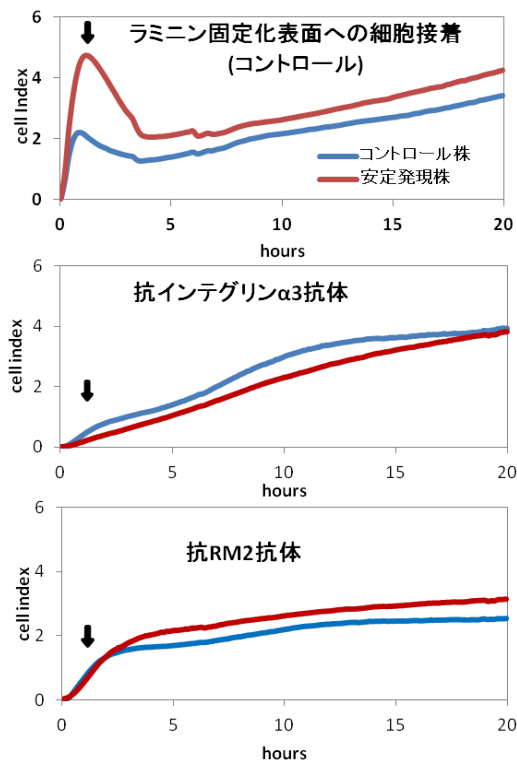
(2) リアルタイム細胞計測システム (RT-CES) を用いた細胞形態の経時的モニタリングの結果、細胞外基質ラミニンに対して強く接着することが明らかになったので、GalNAc-disialyl Lc4 発現細胞がラミニンコーティング表面に接着する際の、接着分子インテグリンの挙動および局在、FAK のリン酸化レベルの変化などについて検討する。抗インテグリン抗体および GalNAc-disialyl Lc4 抗原に対する抗体 (RM2) によるブロッキング実験で特異性を検討する。

(3) 悪性化の増強のメカニズム、特に細胞内シグナル分子の変化と悪性化に關与する分子を同定するため、抗リン酸化抗体を用いて細胞接着時のリン酸化レベルに変化がみられる分子を探索する。(關与するシグナル分子として、FAK, ERK1/2, Akt, p38, Paxillin, p130cas などが考えられる。) さらに、GalNAc-disialyl Lc4 抗原に対する抗体(RM2)により、糖鎖が接着に直接關与するかを検討する。

4. 研究成果

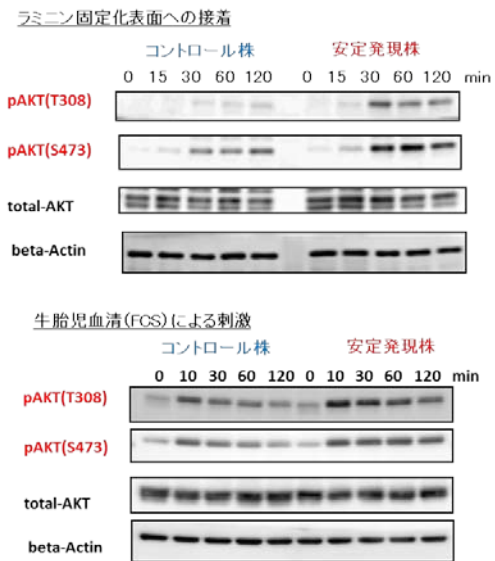
(1) GalNAc-T2 安定発現株について、ラミニン固定化表面へ接着する様子をリアルタイム細胞計測システムによりモニタリングした結果、ラミニン固定化表面に対して、牛胎児血清(FCS)存在下、安定発現株はコントロール細胞株よりも強く接着することが分かった。また抗インテグリン抗体およびRM2抗体によるブロッキング実験で、特異的なラミニンへの強い接着は、RM2抗体によっても少し抑制されるが、抗インテグリン $\alpha 3$ 抗体により顕著に抑制されることが明らかとなった(図1)。すなわち、ラミニンとの結合に、GalNAc-disialylLc4抗原は直接的には關与しないことが予測された。

図1 GalNAc-DSLc4発現株の接着挙動



(2) ラミニン固定化表面へ接着する際の細胞内シグナル変化を調べた結果、Aktシグナル(T308 および S473)のリン酸化が亢進していることが分かった。さらに細胞培養時に、牛胎児血清(FCS)の添加によってもAktシグナル(T308 および S473)のリン酸化が亢進していることから、PI3K/Aktシグナル経路がコントロール細胞株よりも活性化しており、細胞の増殖能や運動能が亢進している可能性が示唆された(図2)。

図2 細胞内のシグナル変化



(3) GalNAc-disialylLc4抗原に対する抗体(RM2)を用いた免疫共沈降によりGalNAc-DSLc4抗原と細胞表面で共局在している分子の探索も行なったところ、一部のEGF receptor(上皮成長因子受容体)が共沈降することが分かった。細胞膜上に存在しているEGF receptorがRM2抗体と結合し沈降したものと考えられた。

(4) PI3K/Aktシグナル経路の阻害剤として知られるLY294002を用いて、PI3K/Aktシグナル経路を阻害することで、悪性化によって獲得した表現型がどのように変化するかを、それぞれMTTアッセイ、Invasionアッセイ、リアルタイム細胞計測システムによりモニタリングによって調べた。その結果、増殖能(a)および浸潤能(b)の亢進、ラミニン固定化表面への特異的な接着(c)は著しく抑制されることが確認できた(図3 a,b,c)。

図3-a PI3K阻害剤(LY294002)の効果

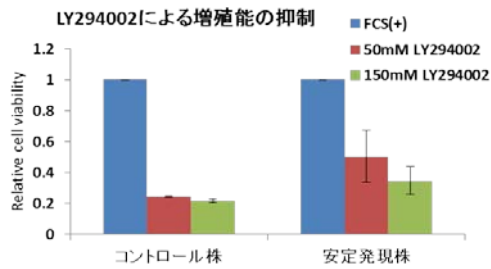


図3-b PI3K阻害剤(LY294002)の効果

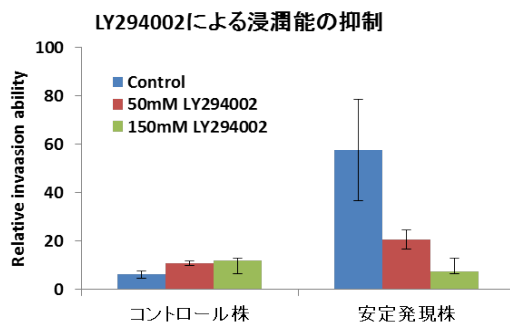
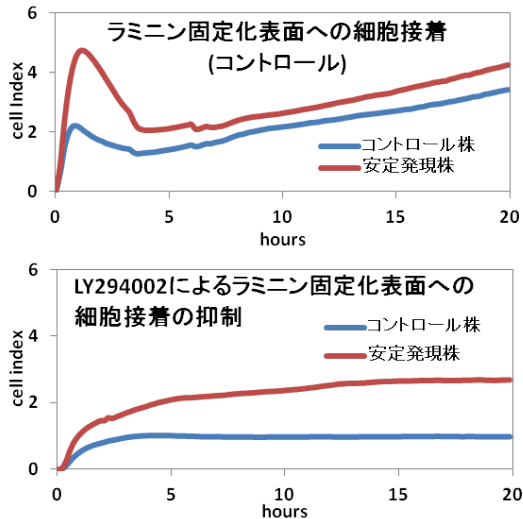


図3-c PI3K阻害剤(LY294002)の効果



以上の結果より、GalNAc-DSLc4 安定発現株のさまざまな悪性形質はPI3K-Akt シグナル経路が活性化されていることに起因することが考えられた。

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 2 件)

1. Matsumoto Y, Zhang Q, Akita K, Nakada H, Hamamura K, Tokuda N, Tsuchida A, Matsubara T, Hori T, Okajima T, Furukawa K, Urano T, Furukawa K.

“pp-GalNAc-T13 induces high metastatic potential of murine Lewis lung cancer by generating trimeric Tn antigen.”

Biochem Biophys Res Commun. (2012) 419(1), 7-13 査読有,
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.086.

2. 野口研究所時報 (2013 年度) 査読無

[学会発表] (計 2 件)

①第 8 6 回日本生化学学会大会

発表演題：腎癌細胞株における分岐型ジシアル糖鎖抗原の役割

発表者 (代表)：土田明子

発表年月日：平成 25 年 9 月 12 日 (横浜)

②第 3 2 回日本糖質学会年会

発表演題：腎癌細胞における GalNAc-Disialyl Lc4 糖鎖抗原の役割

発表者 (代表)：土田明子

発表年月日：平成 25 年 8 月 6 日 (大阪)

6. 研究組織

(1) 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：7 0 3 7 8 0 2 4

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：