

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501357

研究課題名(和文)糖転移酵素 LARGE を用いたジストログリカンの機能亢進による新規癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel cancer therapy by functional up-regulation of dystroglycan using glycosyltransferase LARGE

研究代表者

清水 輝夫 (Shimizu, Teruo)

帝京大学・医療技術学部・教授

研究者番号：00107666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：各種の癌では、 α -ジストログリカン(α -DG)の糖鎖修飾不全によりラミニン結合能が低下しており、糖転移酵素 LARGE は α -DG の糖鎖修飾を亢進しラミニン結合能を増強することが明らかにされてきた。そこで本研究では LARGE の癌治療への応用の可能性を検討した。その結果 LARGE による α -DG の糖鎖修飾の亢進はラミニン結合能の増強に加えて細胞遊走その他に関わる多くの遺伝子群の発現変動を介して癌細胞の増殖、浸潤能を抑制することが明らかとなった。しかし細胞種によっては分化を抑制する場合もあることから、生体への応用に際してはさらなる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：It has been demonstrated that laminin binding activity of α -dystroglycan (α -DG) is reduced in many cancer cells by the defective glycosylation of α -DG and glycosyltransferase LARGE hyperglycosylates and increases its laminin binding activity. In this study, we investigated possible therapeutic strategy for cancer using LARGE. We demonstrated that, in addition to the increment of laminin binding activity, LARGE suppresses proliferation and invasion of cancer cells by modulating gene expression pattern involved in them. However, overexpression of LARGE inhibited differentiation of non-cancer cells, such as myoblasts. Therefore, further experiments are necessary to apply LARGE for the cancer therapy.

研究分野：神経内科学

キーワード：癌 糖鎖 ジストログリカン ラミニン LARGE

1. 研究開始当初の背景

近年 α -ジストログリカン(α -DG) と癌との関連が注目されている。培養細胞を用いた実験により α -DG の欠損した細胞では基底膜の形成が欠如することや細胞の極性の決定が障害されることが示されたことから、 α -DG は正常な基底膜の形成や細胞-基底膜間の相互作用、さらには細胞の分化や極性の決定において不可欠な役割を果たしているものと考えられるようになった。さらに前立腺癌、乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、膵臓癌など多様な癌組織において α -DG の糖鎖修飾の異常による機能低下が報告されている。またこの α -DG の機能低下は悪性度の高い癌ほど顕著であることが明らかにされており、広く癌細胞に共通する特性であるとの認識が広まりつつある。

α -DG は細胞-基底膜間の相互作用、シグナル伝達を担う分子であり、その主な機能は基底膜の形成と、細胞の分化や極性の決定の2つである。そしてこれらの根幹をなすのが α -DG の持つ細胞外基底膜蛋白質ラミニンとの結合性である。 α -DG がラミニンと結合するためには α -DG の持つ特殊な糖鎖構造が必須であり、癌細胞ではこの糖鎖構造が正常に作られないためにラミニン結合能が著しく減弱する。その結果生じる α -DG を介した細胞内外のシグナル伝達の変調が細胞の癌化に大きく関与しているものと推測される。最近、糖転移酵素と考えられている LARGE がこの α -DG のラミニン結合能を著明に亢進させるとの大変興味深い報告がなされた。LARGE は α -DG にグルクロン酸とキシロースの折り返し糖鎖を負荷することでラミニン結合能を飛躍的に亢進させるものと考えられている。

2. 研究の目的

このように癌細胞は α -DG の機能低下という特徴を有していることが次第に明らかとなってきた。この特徴は癌の分子病態と深く関わっているものと考えられ、治療戦略を構築する際に格好の分子標的となる。癌は永年にわたり本邦における死亡原因第1位の疾患であり早急な対策が切望されている。この研究によって、癌組織に強固な基底膜を再構築し基底膜と癌細胞間の相互作用、シグナル伝達を正常化することにより増殖、浸潤、転移を抑制するという、全く新しい機序に基づく癌治療法の開発につながる可能性が期待される。また α -DG のラミニン結合能の亢進は単に細胞接着性を増強させるのみでなく、細胞外から細胞内へのシグナル伝達の変化にも大きく影響するものと推測される。この未知のシグナル伝達の変化を DNA マイクロアレイやリン酸化アレイを用いたバイオインフォマティクスの手法を用いて解析することで LARGE の持つ細胞生物学的な意義を明らかにしたいと考えている。申請者はこ

れまで筋ジストロフィーの分子病態や神経系における役割などに関連して幅広く DG や LARGE の研究を行ってきた経緯があり、本研究では LARGE を用いた α -DG の機能亢進による癌に対する新たな治療法の開発を目指すための基礎研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞由来の培養細胞に及ぼす LARGE の高発現の影響に関する検討

ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞に LARGE 遺伝子をトランスフェクション法により導入して、ネオマイシン耐性によるセレクションから LARGE 安定発現細胞株をクローニングした。これら安定発現株を用いて、細胞接着能、細胞増殖能、細胞浸潤能の測定を行った。についてはラミニンコートプレートおよびノンコートプレートへの 48 時間後の接着細胞数の計測を、は MTT アッセイを、または人工基底膜を通過して遊走した細胞数を計測することにより行った。

(2) LARGE の高発現がもたらす HeLa 細胞の遺伝子発現変動の網羅的解析

LARGE 遺伝子を高発現する HeLa 細胞とコントロールの HeLa 細胞から RNA を精製し、RT-PCR の後 DNA マイクロアレイ解析を行った。解析には Agilent 社 Whole Human Genom オリゴ 4 × 44k v2 を用いた。有意な遺伝子変動を示す遺伝子群の中から gene ontology search による興味深い遺伝子の抽出を行うと共に、データベース DAVID を用いた functional annotation clustering 解析を行った。

(3) α -DG のラミニン結合能の亢進に必要な LARGE の活性部位の検討

ヒト LARGE 遺伝子に対して PCR を用いた部位特異的変異導入法により、N 末端側より順次およそ 80 アミノ酸残基を欠いた欠失変異体を 9 個作製した。これらコンストラクトを HeLa 細胞に一過性に高発現した後に細胞を回収し、ラミニンプロットオーバーレイ法により α -DG のラミニン結合能を比較検討した。

(4) 培養細胞の分化能に与える LARGE の高発現の影響に関する検討

マウス筋芽細胞である C2C12 細胞へ LARGE 遺伝子をトランスフェクション法により導入して、ネオマイシン耐性によるセレクションから LARGE 安定発現細胞株をクローニングした。これら安定発現株に対して培地中の血清濃度を下げることにより筋芽細胞から筋管細胞への分化誘導を行い、その分化能を検討した。分化能の定量的な指標としてフュージョン・インデックスを用いた。

4. 研究成果

(1) 癌細胞由来の培養細胞に及ぼす LARGE の高発現の影響に関する検討

LARGE 安定発現 HeLa 細胞株を数クローン得て、

この中から高度発現株をクローン5、中等度発現株をクローン7と名付けた。細胞接着能を検討したところラミニンコートおよびノンコートのプレートに対する接着能は共にクローン5、7両者で有意に増強していた。また細胞増殖能はクローン5、7共にコントロールに比べて有意に減弱していた。さらに細胞浸潤能の測定を行ったところ LARGE の発現に用量依存的に人工基底膜の通過細胞数の著明な減少が認められた(図1)。

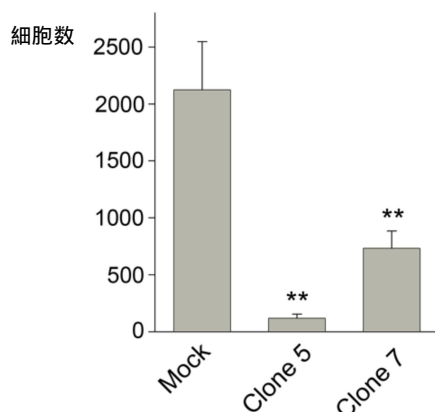


図1 人工基底膜を通過した HeLa 細胞数

これらの結果から LARGE の高発現は癌細胞の局所への接着性を高め増殖を抑制し、さらには浸潤を強く抑えることが明らかとなった。

(2) LARGE の高発現をもたらす HeLa 細胞の遺伝子発現変動の網羅的解析

LARGE 高発現 HeLa 細胞を用いた DNA マイクロアレイ解析の結果 ErbB4、nephronectin、Tie2/Tek、NROB1、retinoic acid binding protein II など癌と密接な関連があることが知られている多くの遺伝子の発現が変動することが明らかとなった。またデータベースを用いた functional annotation clustering 解析の結果、細胞接着、細胞遊走、細胞分化などに関与する遺伝子群の有意な発現変動を認めた。これらの結果から、HeLa 細胞への LARGE の高発現は単に α -DG のラミニン結合能を亢進させるのみならず、細胞内外の様々なシグナル伝達系を介して癌細胞に対して抑制的にはたらいている可能性が示された。

(3) α -DG のラミニン結合能の亢進に必要な LARGE の活性部位の検討

LARGE には糖転移酵素としての活性中心が 2カ所知られておりこの部位の変異体では α -DG の糖鎖修飾ならびにラミニン結合能の亢進が生じないことが知られていた。しかしその他の部位が糖転移酵素活性にどのような影響をおよぼすか知られていない。そこで LARGE の全領域をカバーする欠失変異体を作製し検討を行った。その結果意外なことに全ての欠失変異体で α -DG のラミニン結合能が消失した。このことから LARGE の機能が正常に発揮されるためには LARGE の全長が

必要であり、どの部分の欠失によっても立体構造が変化しその機能を喪失する事が明らかとなった。

(4) 培養細胞の分化能に与える LARGE の高発現の影響に関する検討

癌細胞以外の細胞に対する LARGE の高発現の影響を検討するために、マウスの筋芽細胞である C2C12 細胞に LARGE 遺伝子を導入した。そして培地の血清濃度を下げることにより筋芽細胞から筋管細胞への分化誘導を行った。この結果 LARGE 高発現 C2C12 細胞では筋管細胞への分化が抑制され(図2 A)、フュージョン・インデックスは 25.4%から 8.7%へと有意に低下した(図2 B)。これらの結果から LARGE の高発現は癌細胞以外の正常細胞において分化を抑制する可能性が推測され、癌治療への応用においてはさらなる検討を行う必要があるものと考えられた。

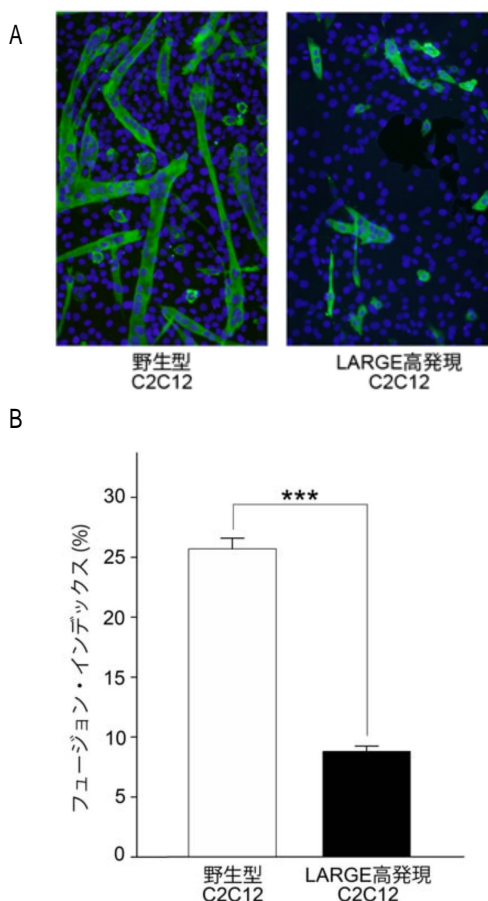


図2 C2C12 への LARGE の高発現と分化におよぼす影響

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3件)

Saito F, Kanagawa M, Ikeda M, Hagiwara H, Masaki T, Ohkuma H, Katanosaka Y, Shimizu

I, Sonoo M, Toda T, Matsumura K. Overexpression of LARGE suppresses muscle regeneration via down-regulation of insulin-like growth factor 1 and aggravates muscular dystrophy in mice. Hum Mol Genet. 2014; 23: 4543-4558. doi:10.1093/hmg/ddu168 (査読有)

Goddeeris MM, Wu B, Venzke D, Yoshida-Moriguchi T, Saito F, Matsumura K, Moore SA, Campbell KP. LARGE glycans on dystroglycan function as a tunable matrix scaffold to prevent dystrophy. Nature. 2013 ; 503: 136-140. doi:10.1038/nature1 (査読有)

齋藤史明. LARGEによる α -ジストログリカノパチーに対する治療戦略. 神経内科 2012; 76: 367-371 (査読有)

〔学会発表〕(計 11 件)

齋藤史明, 金川基, 池田美樹, 萩原宏毅, 真先敏弘, 大熊秀彦, 片野坂友紀, 清水輝夫, 園生雅弘, 戸田達史, 松村 喜一郎. LARGEの過剰発現はIGF-1の発現低下により筋再生を抑制してマウスの筋ジストロフィーを悪化させる. 第 8 7 回日本生化学会大会. 国立京都国際会館(京都府京都市). 2014.10.18

齋藤史明, 金川基, 池田美樹, 萩原宏毅, 真先敏弘, 大熊秀彦, 片野坂友紀, 清水輝夫, 園生雅弘, 戸田達史, 松村 喜一郎. LARGEの過剰発現による筋ジストロフィーモデルマウスにおける筋再生の抑制. 第 3 7 回日本神経科学大会. パフィシコ横浜(神奈川県横浜市). 2014.9.11

齋藤史明, 金川基, 萩原宏毅, 真先敏弘, 池田美樹, 清水輝夫, 園生雅弘, 戸田達史, 松村 喜一郎. FukutinノックアウトマウスにおけるLARGEの過剰発現 - 治療応用へ向けての課題 -. 第 5 5 回日本神経学会学術大会. 福岡国際会議場(福岡県福岡市). 2014.5.24

萩原宏毅, 齋藤史明, 真先敏弘, 松村喜一郎, 園生雅弘. レスベラトロールは線維化を軽減し先天性筋ジストロフィーモデルの症状を改善する. 第 5 5 回日本神経学会学術大会. 福岡国際会議場(福岡県福岡市). 2014.5.24

齋藤史明, 金川基, 萩原宏毅, 真先敏弘, 池田美樹, 清水輝夫, 園生雅弘, 戸田達史, 松村喜一郎. 骨格筋特異的Fukutin欠損マウスに対するLARGEの過剰発現の影響. 第 5 4 回日本神経学会学術大会. 東京国際フォーラム(東京都千代田区). 2013.5.31

萩原宏毅, 齋藤史明, 真先敏弘, 清水輝夫, 松村喜一郎, 園生雅弘. レスベラトロールの先天性筋ジストロフィーモデルマウスに対する効果の検討. 第 5 4 回日本神経学会学術大会. 東京国際フォーラム(東京都千代田区). 2013.5.31

Saito F, Hagiwara H, Ikeda M, Masaki T, Shimizu T, Matsumura K. Effects of overexpression of LARGE on a mouse model of congenital muscular dystrophy. 17th

International congress of the World Muscle Society. Perth, Australia. Oct 9, 2012.

Hagiwara H, Shan H, Masaki T, Ikeda M, Shimizu T, Matsumura K, Saito F.

The role of the transcriptional factor Pax3 on myogenesis and the effect on the expression of myogenic regulatory factors. 17th International congress of the World Muscle Society. Perth, Australia. Oct 11, 2012.

齋藤史明, 萩原宏毅, 真先敏弘, 池田美樹, 園生雅弘, 松村喜一郎. LARGEによる-dystroglycanの機能亢進を用いた先天性筋ジストロフィー治療の試み. 第 5 3 回日本神経学会学術大会. 東京国際フォーラム(東京都千代田区). 2012.5.24

萩原宏毅, 齋藤史明, 真先敏弘, 清水輝夫, 松村喜一郎, 園生雅弘. 転写因子 Pax3は MyoDと細胞周期の制御因子に作用して筋分化を抑制する. 第 5 3 回日本神経学会学術大会. 東京国際フォーラム(東京都千代田区). 2012.5.24

真先敏弘, 齋藤史明, 萩原宏毅, 松村喜一郎, 園生雅弘. 細胞外H1蛋白は末梢神経・胸腺における新しいラミニン結合蛋白である. 第 5 3 回日本神経学会学術大会. 東京国際フォーラム(東京都千代田区). 2012.5.24

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 輝夫 (Shimizu Teruo)

帝京大学・医療技術学部・教授

研究者番号: 00107666

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

松村 喜一郎 (Matsumura Kiichiro)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：50260922

斉藤 史明 (Saito Fumiaki)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：40286993