

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590364

研究課題名(和文)低酸素誘導因子HIFが転写誘導する接着分子遺伝子の細胞遊走能亢進における役割

研究課題名(英文)Roles of cell adhesion molecules in enhanced cell motility induced by hypoxia-inducible factor HIF

研究代表者

神奈木 玲児 (Kannagi, Reiji)

愛知医科大学・公立大学の部局等・客員教授

研究者番号：80161389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素により細胞の運動能・遊走能が著明に亢進する。従来から我々は低酸素によって細胞接着分子に大きな変化が誘導されることを解析していたので、本研究においては低酸素によって誘導される接着分子のうち、この細胞運動能・遊走能の著明な亢進をもたらしている主要な接着分子を同定しようと試みた。本研究で得られた成績から、CD44とヒアルロン酸との結合によって媒介される細胞接着系の低酸素による変化が、細胞運動能・遊走能の著明な亢進の主な動因となっていることが判明した。とくに、ヒアルロン酸の合成と分解に関わる遺伝子の転写が低酸素誘導因子(HIF)によって誘導されることが重要な役割を演じると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cellular hypoxia remarkably enhances cellular mobility. In the previous project we had found alterations in the expression of various cell adhesion molecules. In the current project we intended to identify which adhesion molecule among them is mainly responsible for the enhancement of cellular mobility induced by hypoxia. Our results indicated that the changes occurred in the CD44-hyaluronan cell adhesion system, especially altered transcription levels of the genes involved in the synthesis and catabolism of hyaluronan induced by hypoxia-inducible factor (HIF), are mainly responsible for the enhanced cellular motility under hypoxia.

研究分野：医歯薬学

キーワード：生体分子医学 低酸素誘導因子

1. 研究開始当初の背景

細胞接着は多くの疾患の病態生理に深く関連している。従来から我々は低酸素によって細胞接着分子に大きな変化が誘導されることを見だし、その分子生物学的背景を DNA マイクロアレイなどによって調査解析してきた(*PNAS* 101: 8132, 2004)。その結果これまでに、フィブロネクチンへの接着に関与する遺伝子、*ITGA5* と *SDC4* が低酸素により強く誘導されることを見だした。また、低酸素によりフコース転移酵素 *FUT7*、シアル酸転移酵素 *ST3O*、UDP-ガラクトーストランスporter *UGT1*、シアル酸トランスporter *Sialin* などの遺伝子が強く誘導されることを見だした(*Cancer Res.* 66: 2937, 2006、*BBRC*, 357: 537, 2007、*FEBS Lett.* 584: 1872, 2010 など)。これらはセレクチンを介した細胞接着においてセレクチンの特異的リガンドの合成を誘導する。またごく最近我々は、低酸素によるヒアルロン酸代謝酵素の強い誘導を見だした。

細胞接着分子の多くは膜蛋白質であり、その一部は特定の脂質ラフトに局在することが判明している。ラフトの変化は間接的に細胞接着分子の機能に影響を与えられられる。*HPLC-ESI-MS/MS* 解析を用いた我々の以前の研究の結果、細胞膜の脂質組成も低酸素によって大きく変化することが判明している(*FEBS Lett.* 584: 1872, 2010 など)。とくに、細胞膜の主成分であるグリセロ脂質のみならず、ラフトの主成分であるスフィンゴ脂質の組成にも大きな変化が見られている。脂質合成系にはとくに酸素を基質として要求する酵素が少なからず存在するためと考えられる。グリセロ脂質からはプロスタグランジン/ロイコトリエン/LPA など、またスフィンゴ脂質からはセラミド/スフィンゴシン-1-リン酸などの生理活性物質が産生されることから、低酸素による細胞膜脂質の変化も低酸素に伴う細胞運動能・遊走能の亢進において重要な役割を演じる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、低酸素による細胞の運動能・遊走能の著明な亢進のメカニズムを解析することである。上記の如く我々はこれまでに、三大細胞接着分子系、すなわちセレクチン/糖鎖リガンド系、*CD44*/ヒアルロン酸系、フィブロネクチン/シンデカン-インテグリン接着系のすべてにわたって、転写因子 hypoxia inducible factor (HIF) による細胞接着分子遺伝子の転写誘導の結果、大きな変化が起こることを解析してきた。これらのうちのどの接着分子システムが特に低酸素に伴う細胞運動能・遊走能の著明な亢進に関与するかを同定する事が本研究の目的である。あわせて、低酸素に伴う細胞膜脂質の変化を解析し、これら脂質が低酸素に伴う細胞運動能・遊走能の亢進に寄与する可能性を検索する。

3. 研究の方法

低酸素による細胞接着分子の発現変化は特異抗体を用いたフローサイトメトリーおよび接着

分子遺伝子の RT-PCR により解析した。転写調節機構の解析にはリポーターアッセイおよび ChIP 法を用いた。低酸素による細胞膜の脂質組成の変化の解析は TLC および質量分析法により行った。細胞運動能の測定は Boyden チェンバー法および創傷治癒アッセイにより行った。

4. 研究成果

低酸素により誘導される接着分子をコードする遺伝子の shRNA を培養細胞に導入して、低酸素における細胞の運動能の変化を測定することにより、特に *CD44* とその特異的リガンドであるヒアルロン酸糖鎖との結合を介した細胞接着に関与する分子が重要な役割を演じることが明らかになった。

我々の用いた細胞では、*CD44* 遺伝子の転写は低酸素によって変化しなかった。これに対して、ヒアルロン酸糖鎖の合成と分解を行う酵素の遺伝子の一部には低酸素による転写誘導が観察された。この結果に基づき、ヒアルロン酸糖鎖の合成と分解を行う酵素の遺伝子について、その転写調節機構をさらに解析した。

調節領域のシクエンスの解析から、これらヒアルロン酸合成酵素およびヒアルロン酸分解酵素の遺伝子については、5'調節域にそれぞれ複数の *HIF-1 α* 結合可能領域が存在していた。調節領域をクローニングしてこれらの部位を欠失あるいは変異したコンストラクトを作成してレポーターアッセイを行ったところ、それぞれについて各一個の主要な低酸素反応エレメント、hypoxia responsive element (HRE) を同定することが出来た。両遺伝子とも、低酸素下の培養によって *HIF-1 α* が 5'調節領域に結合することが ChIP アッセイによって確認された。以上から、これらの遺伝子が *HIF* によって転写誘導されることが確認された。

従来から我々は低酸素の細胞運動能・遊走能に対する影響の測定には Boyden チェンバー法を用いた方法を用いてきたが、本研究では感度および定量性の向上を目指して創傷治癒アッセイ(Wound Healing Assay、スクラッチアッセイ)による測定をも合わせて試みた。この測定法においても低酸素によって細胞運動能・遊走能の亢進が観察され、ヒアルロン酸糖鎖の合成と分解を行う酵素の遺伝子に対する shRNA 導入細胞では抑制される傾向が観察された。この方法では顕微鏡観察が可能であるので、遊走の過程をビデオ撮影することに成功した。しかし両方法によるアッセイの感度と定量性を比較すると、低酸素に関わる実験の場合は Boyden チェンバー法のほうが創傷治癒アッセイよりも優れていた。この理由は、おそらく低酸素によって産生された遊走物質の濃度勾配が、細胞遊走能の亢進において重要な因子となっているためであると考えられた。また、ヒトのヒアルロン酸分解酵素には基質特異性がヒアルロン酸の鎖長に依存する数種のアイソザイムが存在する。異なる鎖長の蛍光標識ヒアルロン酸基質を用い、それぞれのアイソザイムのリコンビナント酵素を標準物質として、アイソザイム別に酵素活性を測定するための活

性測定系の樹立を試みた。

あわせて低酸素に伴う細胞膜脂質の変化を解析し、グリセロ脂質およびスフィンゴ脂質の組成に興味深い変化を見いだした。これらの変化の細胞運動能の亢進に対する貢献についての検討は今後の研究課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Tanaka, K., Tamiya-Koizumi, K., Yamada, M., Murate, T., Kannagi, R., and Kyogashima, M.: Individual profiles of free ceramide species and the constituent ceramide species of sphingomyelin and neutral glycosphingolipid and their alteration according to the sequential changes of environmental oxygen content in human colorectal cancer Caco-2 cells. *Glycoconj. J.*, **31**: 209-219, 2014. 査読有. 10.1007/s10719-013-9511-9
2. Kawamura, Y. I., Adachi, Y., Curiel, D. T., Kawashima, R., Kannagi, R., Nishimoto, N., and Dohi, T.: Therapeutic adenoviral gene transfer of a glycosyltransferase for prevention of peritoneal dissemination and metastasis of gastric cancer. *Cancer Gene Ther.*, **21**: 427-433, 2014. 査読有. 10.1038/cgt.2014.46
3. Patnode, M. L., Yu, S. Y., Cheng, C. W., Ho, M. Y., Tegesjo, L., Sakuma, K., Uchimura, K., Khoo, K. H., Kannagi, R., and Rosen, S. D.: KSGal6ST generates galactose-6-O-sulfate in high endothelial venules but does not contribute to L-selectin-dependent lymphocyte homing. *Glycobiology*, **23**: 381-394, 2013. 査読有. 10.1093/glycob/cws166
4. Sakuma, K., Furuhashi, T., Kondo, S., Yabe, U., Ohmori, K., Ito, H., Aoki, M., Morita, A., and Kannagi, R.: Sialic acid cyclization of human Th homing receptor glycan associated with recurrent exacerbations of atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.*, **68**: 187-193, 2012. 査読有. 10.1016/j.jdermsci.2012.09.015
5. Tanaka, K., Tamiya-Koizumi, K., Hagiwara, K., Ito, H., Takagi, A., Kojima, T., Suzuki, M., Iwaki, S., Fujii, S., Nakamura, M., Banno, Y., Kannagi, R., Tsurumi, T., Kyogashima, M., and Murate, T.: Role of down-regulated neutral ceramidase during all-trans retinoic acid induced neuronal differentiation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Biochem.*, **151**: 611-620, 2012. 査読有. 10.1093/jb/mvs033
6. Sakuma, K., Chen, G. Y., Aoki, M., and Kannagi, R.: Induction of 6-sulfated glycans with cell adhesion activity via T-bet and GATA-3 in human helper T cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**: 841-848, 2012. 査読有. 10.1016/j.bbagen.2012.03.005
7. Sakuma, K., Aoki, M., and Kannagi, R.: Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**: 7776-7781, 2012. 査読有. 10.1073/pnas.1111135109

[学会発表] (計 9 件)

1. 京ヶ島守, 田中広治, 山田真希, 小泉恵子, 村手隆, 神奈木玲児: 酸素濃度変化が大腸癌細胞株 Caco-2 のセラミド・スフィンゴミエリン・糖脂質分子種へ与える影響. 第 56 回日本脂質生化学会, 大阪, 6 月 6 日-7 日, 2014.
2. 佐久間圭一朗, 神奈木玲児, 青木正博: Sialyl Lewis glycan expression is linked with epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells (2P-15 大腸がん細胞においてシアリルルイス糖鎖の発現と EMT は関連する). 第 65 回日本細胞生物学会大会, 名古屋, 6 月 19 日-21 日, 2013.
3. 前屋舗千明, 河村由紀, 萩原輝記, 大坪武史, 櫻井恵, 櫻井俊之, 永田尚義, 小島康志, 秋山純一, 神奈木玲児, 土肥多恵子: 末梢白血球レクチン発現は炎症性腸疾患の病勢を反映するマーカーである. 第 99 回日本消化器病学会総会, 鹿児島, 3 月 21 日-23 日, 2013.
4. 家治翔平, 中川直樹, 神奈木玲児, 浅野雅秀, 吉原亨, 岡昌吾: 神経系に発現する Lewis X 糖鎖抗原に関する研究 / Analysis of Lewis X epitope in the nervous system. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡, 12 月 14 日-16 日, 2012.
5. 小泉恵子, 清水嘉文, 神奈木玲児, 田中広治, 山下純, 田中保, 鈴木元, 村手隆, 岩城壮一郎, 藤井聡, 徳村彰: ヒト大腸がん細胞において低酸素下で誘導されるエーテル型リン脂質の著しい増加とそのメカニズム. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡, 12 月 14 日-16 日, 2012.
6. 清水嘉文, 小泉恵子, 岸野恵理佳, 神奈木玲児, 田中広治, 山下純, 田中保, 鈴木元, 村手隆, 岩城壮一郎, 藤井聡, 徳村彰: ヒト大腸がん細胞でのリン脂質代謝に対する低酸素の影響. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡, 12 月 14 日-16 日, 2012.
7. 佐久間圭一朗, 神奈木玲児, 青木正博: c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand glycan expression in colon cancer cells undergoing EMT (c-Myc と CDX2 は EMT を起こした大腸がん細胞における E-セレクチンリガンド糖鎖の発現を媒介する). 第 71 回日本癌学会総会, 札幌, 9 月 19 日-21 日, 2012.
8. Sakuma K, Furuhashi T, Kondo S, Yabe U, Ohmori K, Ito H, Aoki M, Morita A, Kannagi R: Sialic acid cyclization of human

Th2 homing receptor glycan associated with recurrent exacerbations of atopic dermatitis. SialoGlyco 2012 the 9th international conference on sialic acid (Chaired by Wong CH), Taipei, September 9-12, 2012.

9. 清水嘉文, 小泉恵子, 神奈木玲児, 田中広治, 山下純, 田中保, 曹科, 鈴木元, 村手隆, 岩城壮一郎, 藤井聡, 徳村彰: ヒト大腸がん細胞における低酸素条件下でのリブリン脂質およびエーテル型リン脂質の増加. 第54回日本脂質生化学会, 福岡, 6月7日-8日, 2012.

[図書] (計 4 件)

1. Kannagi, R., Sakuma, K., and Ohmori, K. Sialyl sulfoglycans in immune regulation and their clinical applications. *In* N. Taniguchi, T. Endo, G. W. Hart, P. H. Seeberger, and C. H. Wong (eds.), *Glycoscience: Biology and Medicine*, pp. 617-625. Tokyo: Springer, 2015.
2. Kannagi, R. Fucosyltransferase 5. GDP-Fucose Lactosamine α 3/4-Fucosyltransferase (FUT5). *In* N. Taniguchi, K. Honke, M. Fukuda, H. Narimatsu, Y. Yamaguchi, and T. Angata (eds.), *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*, 2 ed, pp. 549-558. Springer Japan, 2014.
3. Kannagi, R. Fucosyltransferase 6. GDP-Fucose Lactosamine α 3-Fucosyltransferase (FUT6). *In* N. Taniguchi, K. Honke, M.

Fukuda, H. Narimatsu, Y. Yamaguchi, and T. Angata (eds.), *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*, 2 ed, pp. 559-571. Springer Japan, 2014.

4. Kannagi, R., Sakuma, K., and Ohmori, K. Cell-surface glycoconjugates controlling human T-lymphocyte homing: Implications for bronchial asthma and atopic dermatitis. *In* M. Shibasaki, M. Iino, and H. Osada (eds.), *Chembiomolecular Science: At the Frontier of Chemistry and Biology*, pp. 167-176. Tokyo: Springer Japan, 2013.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

神奈木 玲児 (KANNAGI REIJI)

愛知医科大学・公私立大学の部局等・客員教授

研究者番号:80161389