

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430118

研究課題名(和文)がん糖鎖によるがん微小環境への適応応答の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analyses of molecular mechanism of the glycan-dependent adaptation of tumor cells to tumor microenvironments

研究代表者

大坪 和明(Ohtsubo, Kazuaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部(保)・教授

研究者番号：30525457

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)：我々は、腫瘍内低酸素環境により誘導されるがん糖鎖Sialyl-Tn (sTn)抗原によって惹起されるがん細胞の細胞増殖抑制、酸化ストレス耐性能、アポトーシス回避能に着目し、そのメカニズム解析を通じてsTn抗原によるがん微小環境への適応によるがん転移促進の分子機構の解明を行った。その結果、sTn抗原発現がん細胞では細胞周期の抑制、抗酸化酵素の発現誘導、それによる酸化ストレスによるアポトーシス回避能を獲得することを見出した。これらsTn抗原のより付与される細胞機能はがん微小環境に適応し、生存・転移するために重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed molecular mechanisms of the Sialyl-Tn (sTn) antigen-induced alterations encompassing the reduced cell proliferation, the acquisition of anti-oxidative stress and anti-apoptosis under hypoxic conditions which are based on the tumor adaptation to dramatically changing microenvironments, and then we found that sTn antigen reduces cell cycle and induces antioxidant enzymes that confers anti-apoptotic functions on tumor cells under hypoxic conditions. These sTn antigen-induced cellular functions are important for survival and metastasis of tumor cells.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖修飾 がん糖鎖 シアリルTn抗原 転移 浸潤 低酸素

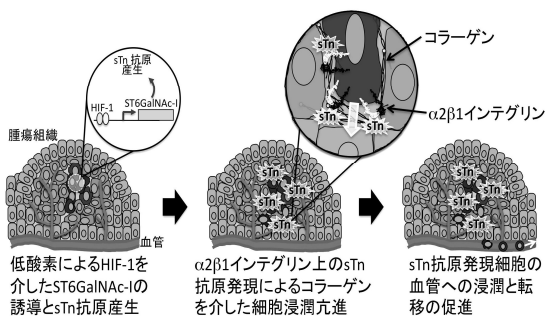
1. 研究開始当初の背景

わが国のがん患者数は増加の一途をたどっており、その年間死亡者数は 357,305 人 (2011 年統計) にも達し、死亡原因の最上位に位置している。がんの予後を占う上で最も重要なのが、がん細胞の“転移能”であり、がんの転移抑制ががん治療の最重要課題となっている。

悪性腫瘍内部の低酸素領域のがん細胞は、様々なストレスや一般的な抗がん剤に対して抵抗性を示し、さらに高い運動・遊走能を示すことから、これらがん細胞が転移細胞の供給源と考えられている。これまでの研究から、低酸素領域では転写因子 Hypoxia-inducible Factor-1(HIF-1)が活性化し、がんの進展に関わる様々な遺伝子の発現を調節することで、悪性化に寄与していることが明らかになっている。しかしながら、HIF-1 による制御を受ける下流分子は多岐に渡るため、その詳細な分子機構を捉えるのは困難であり、未だ十分な解明には至っていない。

一方、細胞のがん化に伴い糖鎖構造が変化することは古くから知られており、数多くのがん糖鎖が、腫瘍マーカーとして臨床の現場で利用されている。シアリル Tn 糖鎖(sTn)抗原は様々な進行がんにおいて検出され、その発現が予後の不良やがん転移と相関することから、がん患者の経過観察に利用される腫瘍マーカーである。しかし、sTn 抗原を含め、これらがん糖鎖の生物学的機能はほとんど明らかになっていないのが現状である。

最近、我々は腫瘍組織深部の低酸素領域において HIF-1 を介して糖転移酵素 ST6GalNAc-I が発現し、これにより sTn 抗原が合成されることを解明した。これら腫瘍組織内 sTn 抗原発現細胞はコラーゲン受容体である $\alpha 2\beta 1$ インテグリン上に sTn 抗原を発現しており、これによりコラーゲンへの接着とコラーゲンを介した細胞浸潤能が亢進することを明らかにした。実際、sTn 抗原発現がん細胞は腫瘍組織内で血管への浸潤像を呈し、実際のヒト肺ガン組織においても低酸素領域に sTn 抗原発現細胞が生じることを見出した。また、ヌードマウスを用いたがん細胞の皮下移植実験から sTn 抗原発現細胞が移植後非常に早期から血中に浸潤することを明らかにした(下図)。さらに、sTn 抗原発現がん細胞は、腫瘍随伴マクロファージ(TAM)上の Siglec-15 を介して TAM を活性化させ、



TGF- β 産生を介して上皮間葉転移(EMT)を惹起し、がん転移を促進することを突き止めた (Takamiya R, Ohtsubo K. et al, *Glycobiology*, 2012)。これら事実は sTn 抗原が単なる予後マーカーではなく、直接転移を促進させる機能分子であることを示すとともに、sTn 抗原発現がん細胞が低酸素領域がん細胞の特徴を色濃く受け継いでいることを明示するものである。

2. 研究の目的

我々が低酸素曝露がん細胞および、ST6GalNAc-I 導入(sTn 抗原発現)がん細胞における遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイにより解析を行った結果、共通して細胞外マトリックス分解系、抗酸化系、抗アポトーシス系、脂質代謝系分子の発現が上昇するとともに、細胞増殖系分子の発現が低下していることが判明した。事実、sTn 抗原発現がん細胞が過酸化水素による酸化ストレス曝露に対してアポトーシス抵抗性を示す知見を得ている。以上の知見は、sTn 抗原が腫瘍組織深部での低酸素、低栄養、高酸化ストレス、アポトーシス誘導といった、がん微小環境下での生存戦略に深く関与していることを意味している。我々のこれまでの知見は、低酸素環境によって発現誘導される sTn 抗原が がん細胞自身の運動機能の亢進、

免疫細胞との相互作用によるがん微小環境調節、 がん微小環境への適応応答を制御することで、がん転移を促進していることを示している。

これまでの知見から「sTn 抗原発現によるがん微小環境への適応応答」は、sTn 糖鎖修飾による細胞膜タンパク質の機能変化が起因となっているとともに、細胞のレドックス環境変化による細胞代謝の変動が深く関与していると考えられる。本研究では、これまでに樹立してきた sTn 抗原発現がん細胞および、確立してきた腫瘍形成・がん転移マウスモデル等を用いて、sTn 糖鎖発現による膜タンパク質制御機構、レドックス転写制御を解析し、細胞増殖抑制機構、抗酸化ストレス機構、アポトーシス回避機構に着目し、sTn 抗原によるがん微小環境への適応によるがん転移促進の分子機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

1) sTn 抗原発現細胞における酸化ストレス耐性能獲得

sTn 抗原発現細胞における酸化ストレス耐性能獲得メカニズムを解析するため、以下の実験を行った。

細胞内酸化ストレスレベルの解析

ヒト非小細胞肺がん細胞株 H157 にヒト ST6GalNAc-I 発現プラスミドを導入することで樹立した sTn 抗原発現(ST6exp)細胞及びそのコントロール(MOCK)細胞を細胞膜透過性活性酸素種検出用蛍光マーカー分子である

DCFH(2-(2,7-dichloro-3,6-diacetyloxy-9H-xanthen-9-yl)-benzoic acid)で処理し、その後、過酸化水素水により酸化ストレスを負荷し、細胞内酸化ストレスレベルを生じた蛍光レベルにより観察した。

Hemo Oxygenase-1 (HO-1)遺伝子 / タンパク質の発現レベルの解析

DNAマイクロアレイ解析によりST6exp細胞において発現が亢進していることが示されたHO-1遺伝子の発現レベルをRT-PCR及び、Real time PCRにより解析した。加えてHO-1酵素タンパク質の発現量をウエスタンブロットにより解析した。

HO-1 遺伝子の転写調節および上流シグナルの解析

HO-1 遺伝子プロモーターの機能は転写因子NRF2により制御されていることが報告されている。そこで、ST6exp細胞におけるHO-1遺伝子プロモーターへのNRF2の結合をクロマチン免疫沈降法(ChIPアッセイ)により解析した。加えて、NRF2がAKTにより活性化することが知られており、ST6exp細胞におけるAKTの活性化レベルをウエスタンブロットによりAKTのリン酸化レベルを検出することで解析した。一方、AKTはインテグリンシグナルの下流に存在するため、sTn抗原発現により活性化されたインテグリンシグナルによってHO-1遺伝子が誘導されたことが予測されたため、2インテグリンノックダウン細胞におけるこれらシグナル伝達経路および転写制御系を解析した。

HO-1 阻害による細胞内酸化ストレスレベルの解析

HO-1はSnPPiXにより阻害される。そこで、細胞内での活性酸素消去におけるHO-1の関与を検証するため、ST6exp細胞をSnPPiX処理し、その後、DCFH処理、過酸化水素処理を行い、細胞内活性酸素レベルを解析した。

HO-1以外の関連抗酸化酵素の探索

SnPPiX処理による細胞内酸化ストレスレベルの回復度はおよそ50%であることから、他の抗酸化酵素の関与が強く疑われた。そこで、細胞内酸化ストレス代謝に関わる酵素群、XO(キサンチンオキシダーゼ)、SOD(スーパーオキシドジスムターゼ)、MPO(ミエロペルオキシダーゼ)、Cat(カタラーゼ)、GPX(グルタチオンペルオキシダーゼ)、GR(グルタチオンレダクターゼ)、TR(チオレドキシン)、PRX(ペルオキシレドキシン)の発現レベルをRT-PCR及び、Real time PCRにより解析した。

SOD2 阻害による細胞内酸化ストレスレベルの解析

ST6exp細胞において有意に発現が上昇していたSOD2の細胞内酸化ストレス制御への関

与を検証するため、ST6exp細胞へSOD2へのsiRNAを導入し、ノックダウン細胞を作成し、DCFHを用いて細胞内酸化ストレスレベルの解析を行った。

腫瘍組織における高酸化ストレス領域、アポトーシス領域、sTn抗原発現領域の分布解析

sTn抗原によって誘導される抗酸化酵素の、実際の腫瘍内がん細胞の酸化ストレス低減およびアポトーシス回避への関与を検証するため、H157細胞由来マウス腫瘍組織における、アポトーシス細胞、sTn抗原発現細胞、酸化ストレス曝露細胞をTUNEL染色、sTn抗体染色、4-HNE抗体染色により解析した。

2) sTn 抗原によるインテグリンシグナル活性化メカニズムの解析

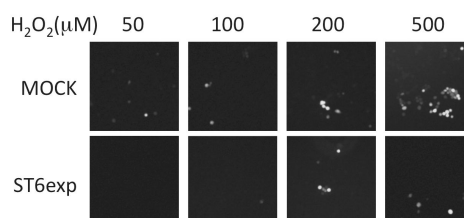
ST6exp細胞においてインテグリンシグナルが活性化していることから、sTn抗原がインテグリンシグナルタンパク質の質的・量的制御を行っていると考えられた。そこで、2インテグリンの遺伝子発現レベルをRT-PCR及び、Real time PCRにより解析した。また、2インテグリンのタンパク質レベルをウエスタンブロットにより解析した。ST6exp細胞における2インテグリンのタンパク質の半減期を解析するため、細胞表面タンパク質を Sulfo-NHS-LC-Biotinにより標識し、経時的に細胞ライセートを回収し、2インテグリン抗体による免疫沈降物中におけるビオチン化タンパク質をHRP-streptavidinで検出した。0時間目のビオチン化2インテグリンタンパク質レベルに対する経時的なタンパク質量の減衰から半減期を解析した。

4. 研究成果

1) sTn 抗原発現細胞における酸化ストレス耐性能獲得

細胞内酸化ストレスレベルの解析
ST6exp細胞では、コントロール細胞に比べ過酸化水素曝露による細胞内酸化ストレスレベルが低下していることが判明した。とりわけ、高濃度域ではその差が顕著であった(下図)。この結果は、sTn抗原発現により細胞内での酸化ストレス除去系が活性化されていることを示している。

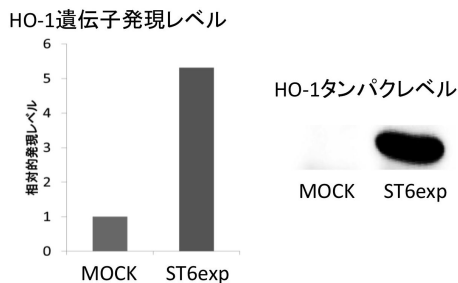
DCFHによる細胞内酸化ストレスレベルの解析



Hemo Oxygenase-1 (HO-1)遺伝子 / タンパク質の発現レベルの解析

ST6exp細胞においてHO-1遺伝子の発現レベルが及ぼ5倍に上昇しており、これを反映し

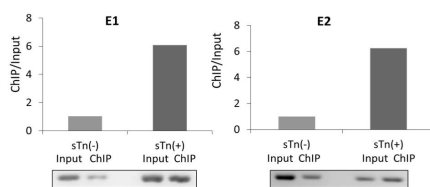
ウェスタンブロットにより大量の HO-1 タンパク質が検出された(下図)。この結果は、抗酸化酵素の一種である HO-1 が sTn 抗原発現により何らかのメカニズムを介して誘導されたことを示している。



HO-1 遺伝子の転写調節および上流シグナルの解析

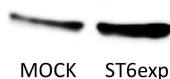
HO-1 遺伝子プロモーターにおける NRF2 シスエレメント 2 カ所について、ChIP アッセイにより NRF2 の結合を解析した結果、ST6exp 細胞において 2 つのエレメントともに、NRF2 の結合レベルが上昇していた(下図)。

HO-1プロモーターへのNRF2の結合

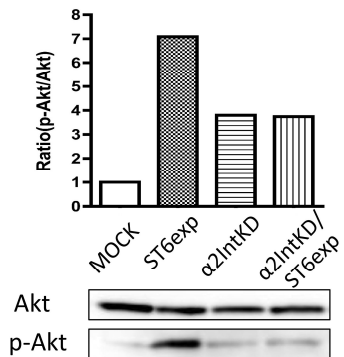


この結果は、HO-1 遺伝子発現レベルの上昇と非常に一致していた。また、この結果は NRF2 の核への移行が活性化されたことを示唆している。そこで、核内の NRF2 レベルをウェスタンブロットにより解析した結果、ST6exp 細胞核において NRF2 レベルが著しく上昇していることが判明した(下図)。

NRF2タンパクレベル



AKTの活性化とインテグリンシグナル



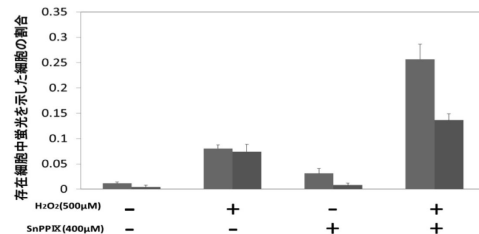
さらに、NRF2 の活性化の一因である AKT の活性化レベルを解析した結果、ST6exp 細胞において著しい活性化が観察された。さらに、この AKT の活性化は 2 インテグリンのノックダウンにより抑制されることから、インテグ

リンシグナルの下流に AKT の活性化が位置することが示された(上図)。この結果は、これまでの我々の知見である、sTn 抗原がインテグリンシグナルを活性化させることと非常に良く符合している。

HO-1 阻害による細胞内酸化ストレスレベルの解析

実際に、sTn 抗原により誘導された HO-1 が細胞内の酸化ストレス除去に効果を発揮しているのかを検証するため、HO-1 阻害剤である SnPPiX で細胞を処理し、細胞内の酸化ストレスレベルを解析した。その結果、SnPPiX 処理により、著しい細胞内酸化ストレスレベルの上昇が観察され、HO-1 が効果的に細胞内の酸化ストレス除去に効果を発揮していることが確認された。しかしながら SnPPiX 処理によっても、依然 ST6exp 細胞の方でコントロール細胞の半分程度の抑制が観察されたことから、他の抗酸化酵素の関与が示唆された(下図)。

HO-1阻害による細胞内酸化ストレスレベル



HO-1 以外の関連抗酸化酵素の探索

細胞内酸化ストレス代謝に関わる酵素群の発現レベルを解析した結果、ST6exp 細胞において X0 が約 2.9 倍、SOD2 が約 5 倍、PRX2 が約 2.1 倍に発現レベルが上昇していることが判明した。X0 は低酸素環境に曝露されることで、酸素からスーパーオキシドを産生する。SOD2 はスーパーオキシドを過酸化水素と水に代謝する酵素である。PRX2 は還元型チオレドキシンの参加を介して過酸化水素を水に変換する酵素である。これら酵素はがんの進展において重要な機能を果たすことが報告されている。

SOD2 阻害による細胞内酸化ストレスレベルの解析

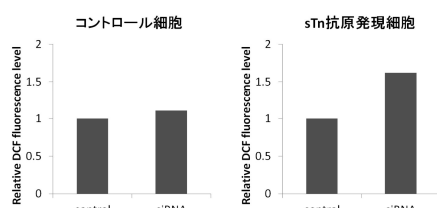
HO-1 阻害後の残存抗酸化ストレス能を担う酵素として、発現誘導が顕著であった SOD2 がその候補として予想された。その検証のため、SOD2 ノックダウン細胞において細胞内酸化ストレスレベルの解析を行った。その結果、コントロール細胞においては SOD2 ノックダウンによって殆ど変化が観察されなかったが、sTn 抗原発現細胞では顕著な増加が観察された(下図)。この結果は、sTn 抗原発現により誘導された SOD2 も細胞内の酸化ストレス除去に寄与していることを意味している。

腫瘍組織における高酸化ストレス領域、ア

ポトース領域、sTn 抗原発現領域の分布解析

コントロール H157 細胞の移植により形成されたマウス腫瘍組織におけるアポトース細胞、sTn 抗原発現細胞、4-HNE 陽性酸化ストレス曝露細胞の分布を解析した結果、sTn 抗原発現細胞ではアポトースや 4-HNE は観察されなかった。この結果および上述の実験結果より、sTn 抗原発現細胞において抗酸化酵素が誘導されているため、細胞内酸化ストレスレベルが低減されており、結果、アポトースが抑制されていると考えられる。

SOD2ノックダウン細胞における細胞内酸化ストレスレベル



2) sTn 抗原によるインテグリンシグナル活性化メカニズムの解析

ST6exp 細胞におけるインテグリンシグナル増強のメカニズムの解析のため、インテグリン分子の RNA 発現レベルを Real time PCR で解析した結果、コントロール細胞と同レベルの発現であることが判明した。一方、ウエスタンブロットによる $\alpha 2$ インテグリンタンパク質の発現レベルを解析した結果、ST6exp 細胞ではおよそ 3 倍に増加していることが判明した。この結果は、 $\alpha 2$ インテグリンタンパク質の寿命延長に依るものと推測された。そこで、細胞表面での $\alpha 2$ インテグリンタンパク質を解析した結果、コントロール細胞に比べ ST6exp 細胞での $\alpha 2$ インテグリンタンパク質の寿命が 3 倍に延長していることが判明した。この結果は、sTn 抗原の発現により $\alpha 2$ インテグリンタンパク質の寿命が延長し、それにより $\alpha 2$ インテグリンタンパク質の増加、インテグリンシグナルの増強が引き起こされたことを意味している。

以上の結果は、腫瘍の増大に伴い形成される低酸素環境が sTn 抗原の発現を誘導し、それによって、インテグリンシグナルを活性化させ、抗酸化酵素群を誘導し、酸化ストレスによるアポトースを抑制していることを意味している。腫瘍組織では常に虚血再灌流を繰り返しており、この動的に変化する酸素レベルに即時的に適応し、生存するためにがん細胞が sTn 抗原を利用していると考えられる。sTn 抗原発現とがん患者の予後不良や腫瘍組織の増大、転移と強く相関することから、この知見はがんの進展メカニズムを理解する上で非常に重要な知見であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Wang Y, Fukuda T, Isaji T, Lu J, Im S, Hang O, Gu W, Hou S, **Ohtsubo K**, Gu J. Loss of $\alpha 1,6$ -fucosyltransferase inhibits

chemical-induced hepatocellular carcinoma and tumorigenesis by down-regulating several cell signaling pathways. The FASEB Journal 査読有り 29, 2015, 3217-3227. doi:10.1096/fj.15-270710

Takahashi M, Kizuka Y, **Ohtsubo K**, Gu J, Taniguchi N. Disease-associated glycans on cell surface proteins. Mol. Aspects of Med. 査読有り 51, 2016, 56-70. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.04.008>

Taniguchi N, Kizuka Y, Takamatsu S, Miyoshi E, Gao C, Suzuki K, Kitazume S, **Ohtsubo K**. Glyco-redox, a link between oxidative stress and changes of glycans: Lessons from research on glutathione, reactive oxygen and nitrogen species to glycobiology. Arch. Biochem. Biophys. 査読有り 595, 2016, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.024>

Ishii T, Angata T, Wan ES, Cho MH, Motegi T, Gao C, **Ohtsubo K**, Kitazume S, Gemma A, ParÉ PD, Lomas DA, Silverman EK, Taniguchi N, Kida K. Influence of SIGLEC9 polymorphisms on COPD phenotypes including exacerbation frequency. Respirology 査読有り 2017. DOI: 10.1111/resp.12952

Gao C, Fujinawa R, Yoshida T, Ueno M, Ota F, Kizuka Y, Hirayama T, Korekane H, Kitazume S, Maeno T, **Ohtsubo K**, Yoshida K, Yamaguchi Y, Lepenies B, Aretz J, Rademacher C, Kabata H, Hegab AE, Seeberger PH, Betsuyaku T, Kida K, Taniguchi N. A keratan sulfate disaccharide prevents inflammation and the progression of emphysema in murine models. Am J. of Phys. Lung Cell. Mol. Phys. 査読有り 2016. 312. L268-L276. DOI: 10.1152/ajplung.00151.2016

〔学会発表〕(計 8 件)

〔図書〕(計 1 件)

〔その他〕

大坪研究室紹介

<http://www.kumamoto-u.ac.jp/kenkyuu/laboratory-exploration/57-2015summer>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大坪 和明 (OHTSUBO, Kazuaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：30525457

(3) 連携研究者

是金 宏昭 (KOREKANE, Hiroaki)

独立行政法人理化学研究所・疾患糖鎖研究チーム・研究員

研究者番号：50421912

中嶋 和紀 (NAKAJIMA, Kazuki)

独立行政法人理化学研究所・新液播く機能研究チーム・研究員

研究者番号：10442998