

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860213

研究課題名(和文) 正常腸組織および大腸がんにおけるガレクチン4の機能解析

研究課題名(英文) Biological activity of galectin-4 and its roles in colorectal cancer and normal tissue.

研究代表者

小川 崇 (Ogawa, Takashi)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80405018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ガレクチン4の機能を明らかにするために、ガレクチン4を発現していない大腸がん細胞株にガレクチン4を強制発現させ、ガレクチン4を発現している大腸がん細胞株にsiRNAを導入し発現抑制を試みた。その結果、ガレクチン4の発現が大腸がん細胞の増殖を抑制することを明らかにした。さらに、ガレクチン4強制発現細胞をヌードマウスに移植すると、コントロールに比べて造腫瘍性が抑制されることを明らかにした。そこでガレクチン4結合分子の探索を行ったところ、あるタンパク質(プロテインX)とガレクチン4が結合することを明らかにした。現在、糖鎖結合性の観点からガレクチン4の大腸癌抑制機構の解明を目指し研究を続けている。

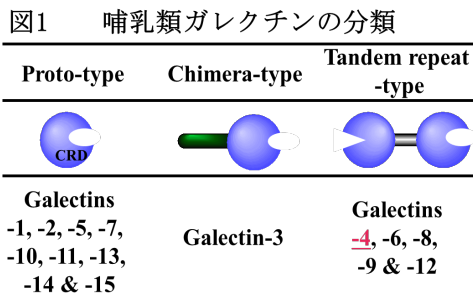
研究成果の概要(英文)：Galectin-4 is a major galectin isoform existed in the digestive tract, and it may contribute to the differentiation of epithelial cell. Recently, many immunohistochemical studies have shown that the galectin-4 is highly expressed in normal tissues, but decreased in the adenoma and the invasion front of colonic cancers. These facts suggest that the galectin-4 has specific activity, which might be involved in tumor suppression. However, the direct correlation between disappearance of galectin-4 and its molecular mechanism of tumor inhibition remain to be understood. To investigate the role of galectin-4 in tumor growth, we prepared the stable transfectants of galectin-4 in human colonic cancer cells (CRCs). Then, we found that overexpression of the galectin-4 suppresses growth of CRCs. Furthermore, knockdown of galectin-4 resulted in an increased CRCs proliferation. These results suggest that galectin-4 contributes to the suppression of colorectal cancer.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ガレクチン 大腸がん 消化管 レクチン

1. 研究開始当初の背景

ガレクチンは、 β -ガラクトシド構造に特異的に結合する動物レクチンファミリーである。ガレクチンと糖鎖との相互作用はCRD (carbohydrate recognition domain)と呼ばれるドメイン構造を介して行われる。ガレクチンはCRDの配置からプロト、キメラ、タンデムリピートの3つのサブタイプに分類される(図1)。哺乳類では現在までに15種(ガレクチン1~15)の遺伝子が同定されており、線虫、ハエ、カエル等様々な動物種においてもガレクチンの発現が確認されている。近年、ガレクチンは胚発生、上皮機能、分化、免疫、腫瘍形成、がん転移など多くの現象への関与が示唆されているが、詳細は不明である。当研究室では、これまでに哺乳類ガレクチンファミリーの免疫系での機能の一端を明らかにしてきた。

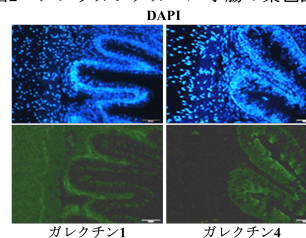


ガレクチン4はCRDを2つ持つタンデムリピート型に分類され(図1)、ヒトでは消化管上皮に多く発現し、他の臓器や組織では発現がほとんど見られない。ガレクチン4の生理的な機能は未だ不明な点が多いが、腺がんや浸潤性の大腸がんではガレクチン4の発現が減少することや、細胞レベルでのガレクチン4のノックダウンが上皮のアピカル側に局在するタンパク質の輸送を阻害することから、正常腸組織の恒常性維持に関与している可能性が考えられる。そこで私達はガレクチン4の機能を明らかにしようと考えた。

ガレクチン4の腸における生理的な機能を知るために、ノックアウトマウスを作製する方法が第一に考えられる。しかし、マウスに

はガレクチン4と非常によく似たマウス特有のガレクチン6がガレクチン4と同様な分布で発現しているため、ガレクチン4のノックアウトによる直接的な効果を解析しにくい。ヒトはガレクチン6を発現していないため、ガレクチン4の本来の機能を知るには、ヒト同様ガレクチン6を発現していない種での発現及び機能抑制研究が効果的であると考えられる。そこで、我々は種を越えた共通のガレクチン機能の解明を目指し、アフリカツメガエルをモデル系として導入した。アフリカツメガエルは、発生生物学的知見・手法が豊富であり、さらに我々の解析の結果、種々の組織におけるガレクチン含量が哺乳類に比べて多く、ガレクチンタンパク質の精製も容易である。現在までに、12種のアフリカツメガエルガレクチンを新規にクローニングした。さらに、ガレクチンファミリーの発現分布を調べた結果、アフリカツメガエル腸にはヒト同様ガレクチン4が多く発現し、ガレクチン6は発現していないことを明らかにした。さらに、ユビキタスに発現しているガレクチン1とガレクチン4の染色図を比較すると、ガレクチン1は主に上皮よりも内層の筋層に多く発現しているのに対し、ガレクチン4は上皮の特にapical側に多く存在しており、局在的にもヒトのガレクチン4と一致していることが明らかになった(図2)。しかし、アフリカツメガエルは異質4倍体であるため、発現抑制研究が困難である。そこで、同じピパ科に属し、2倍体であるネッタイツメガエルに着目した。ネッタイツメガエルは全ゲノムが明

図2 アフリカツメガエル小腸の染色図



ガレクチン1は筋層に多く、ガレクチン4は腸上皮のapical側に多く存在することが明らかになった。

らかにされている唯一の両生類で、ノックアウト作製の実績もあるため、ガレクチン4の個体レベルでの機能解析により適していると考えた。

一方、ガレクチン4は正常腸組織で強く発現しているが、がん組織においては発現が減少することが知られている。特に、浸潤性の大腸がんではガレクチン4の発現がほとんど確認できない。つまり、ガレクチン4の発現が大腸がんの抑制に働く可能性が考えられる。そこで、大腸がん細胞を用いてガレクチン4の発現が大腸がんの造腫瘍性及び浸潤性へどのような影響を与えるか調べる。

2. 研究の目的

ガレクチン4は、様々な動物種の腸で強く発現している。実際、我々がモデル系として用いているツメガエルにおいても、ガレクチン4が腸に多く発現することを明らかにしている。ガレクチン4の機能は不明な点が多いが、浸潤性の大腸がんではガレクチン4の発現が減少することや、細胞レベルでガレクチン4のノックダウンがアピカル側に局在するタンパク質の輸送を阻害することから、正常腸組織の恒常性維持に関与している可能性が考えられる。最近、私達はガレクチン4の発現が、大腸がん細胞の増殖を抑制することなどを明らかにした。そこで、本研究では正常組織（ツメガエル）やがん細胞におけるガレクチン4の機能およびその作用機序を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

現在までに、アフリカツメガエルの腸には、哺乳類と同様にガレクチン4が多く発現することを明らかにしている。そこでノックアウトの基礎実験として同じピバ科に属するネッタイツメガエルにおいて消化管にガレクチン4が発現しているか調べる。また、ガレクチン4の局在や糖鎖結合性を含めた機能等基礎データを集めた後に、ガレクチン4ノ

ックアウトツメガエルの作製を試みる。

さらに、大腸がんにおいてガレクチン4の発現は正常組織に比べて減少することが知られている。特に、浸潤性の大腸がんではガレクチン4の発現がほとんど確認できない。そこで、ガレクチン4が大腸がん細胞に与える影響を強制発現、発現抑制両面から考察する。

4. 研究成果

ネッタイツメガエル個体から各臓器を取り出し、RT-PCRにて各ガレクチンの発現を調べたところ、アフリカツメガエル同様消化管にガレクチン4相同物が発現している事が明らかになった。このガレクチン4のクローニングを行い、現在このガレクチン4の糖鎖結合性を含む生理活性を調べている。

また、大腸がんにおけるガレクチン4の発現の意義を明らかにするために、我々はガレクチン4を発現していない大腸がん細胞株（HCT116）にガレクチン4を強制発現させ、ガレクチン4を発現している大腸がん細胞株（CW2やHT29）にsiRNAを導入し発現抑制を試みた。その結果、ガレクチン4の発現が大腸がん細胞の増殖を抑制することを明らかにした。さらに、ガレクチン4強制発現細胞をヌードマウスに移植すると、コントロールに比べて顕著に造腫瘍性が抑制されることを明らかにした。さらに、その作用機構の1つとしてガレクチン4の発現により細胞内の増殖シグナルが抑制されることを明らかにしている（投稿準備中）。そこでガレクチン4結合分子の探索を行ったところ、ごく最近、あるタンパク質（プロテインX）とガレクチン4が結合することを明らかにした。このプロテインXにガレクチン4が結合することで細胞増殖活性を抑制することが推測される。現在、糖鎖結合性の観点からプロテインとガレクチン4の結合から増殖抑制までの大腸癌抑制機構の解明を目指し研究を続け

ている。

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 2 件)

Cooperative Interactions of Oligosaccharide and Peptide Moieties of a Glycopeptide Derived from IgE with Galectin-9.

Nakakita S, Itoh A, Nakakita Y, Nonaka Y, Ogawa T, Nakamura T, Nishi N.

J Biol Chem. 2016 Jan 8;291(2):968-79.

Crystal structure of a *Xenopus laevis* skin proto-type galectin, close to but distinct from galectin-1.

Nonaka Y, Ogawa T, Yoshida H, Shoji H, Nishi N, Kamitori S, Nakamura T

Glycobiology. 2015 Jul;25 (7):792-803.

〔学会発表〕(計 4 件)

Takashi Ogawa

Biological activity of galectin-4 and its roles in CRCs growth.

第73回日本癌学会学術総会 2014年9月(横浜)

小川 崇, 東海林 博樹, 野中 康宏, 舘野 浩章, 平林 淳, 西 望, 中村 隆範

ツメガエル消化管およびヒト大腸がん細胞におけるガレクチン4の発現及び機能解析

第87回日本生化学会大会(京都)、2014年10月

Takashi Ogawa

Biological activity of galectin-4 and its roles in CRCs growth. 第73回日本癌学会学術総会 2015年10月(名古屋)

小川 崇, 東海林 博樹, 野中 康宏, 舘野 浩章, 平林 淳, 西 望, 中村 隆範

ツメガエル消化管およびヒト大腸がん細胞におけるガレクチン4の発現及び機能解析

第88回日本生化学会大会(神戸)、2015年12月

〔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:

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

小川 崇 (Takashi Ogawa)

香川大学・医学部・助教

研究者番号: 80405018

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: