

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17855

研究課題名（和文）Effect of LARGE1 systemic gene delivery by adeno-associated virus on metastatic potential in high-risk neuroblastoma

研究課題名（英文）Effect of LARGE1 systemic gene delivery by adeno-associated virus on metastatic potential in high-risk neuroblastoma

研究代表者

米川 貴博（Yonekawa, Takahiro）

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10464166

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：【背景】ジストログリカン（DG）は糖鎖修飾を受け、細胞外マトリックス（ECM）蛋白と結合し、ECM環境を管理し、細胞増殖、分化、接着、遊走を調整する。【目的】DGの糖鎖修飾異常の回復は、神経芽腫（NB）の増殖を抑制するかどうかを明らかにする。【結果】ヒトNB細胞株のなかに DGの糖鎖修飾低下、ラミニン結合低下を呈する株があり、低下株と正常株の間で DG糖鎖修飾関連遺伝子発現に差はなく、ribitol投与はSJ-N-JF株の DGの糖鎖修飾低下を改善し、xenograftモデルにおいて腫瘍増大を抑制した。【結論】NBの DG糖鎖修飾低下は腫瘍増殖に関連し治療標的になりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高リスク神経芽腫（NB）では、腫瘍細胞の薬剤耐性獲得やCR後の微小残存病変は克服すべき課題である。本研究では、DGの糖鎖修飾過基質ribitolを高リスクNB培地中、xenograftモデルマウスに投与した結果、DGの糖鎖修飾低下が回復し、NBの増殖が抑制されることを明らかにした。骨髄毒性のある化学療法を自家造血幹細胞移植後CRに入った患者にすぐ追加するのは難しく、低容量の化学療法に抗腫瘍効果は期待できない。ribitol投与により、NB細胞表面の DG糖鎖異常を正常化し、NBの再発を抑制しようとする治療戦略は、MRDレベルの高リスクNBの後療法として低侵襲で画期的なアプローチである。

研究成果の概要（英文）：Background: -dystroglycan (DG) is glycosylated and binds to the extracellular matrix proteins, which can maintain the micro-environment. Objectives: To elucidate that restoration of hypoglycosylated -DG inhibits neuroblastoma (NB) cell proliferation. Results: Some of NB cell lines exhibited hypoglycosylation and low laminin binding capacity of -DG. The genes involved in -DG glycosylation were normally expressed. Supplementation of ribitol improved hypoglycosylation of -DG in SJ-N-JF cells and repressed tumor growth in SJ-N-JF xenograft model. Conclusions: Restoration of hypoglycosylated -DG can inhibit neuroblastoma (NB) cell proliferation.

研究分野：小児神経

キーワード：ジストログリカン 糖鎖修飾 細胞外マトリックス 神経芽腫

1．研究開始当初の背景

神経芽腫（NB）は小児の固形腫瘍の中では、最も多く、小児がん全体の8-10%、小児がん死亡の約15%を占める（J Immunol Res 2018）。神経堤由来の交感神経系から発生する悪性腫瘍で、体幹の交感神経節や副腎髄質に多く発生し、診断時すでに骨髄、骨、所属リンパ節への転移を伴っていることが多い。高リスク NB では、集学的治療、骨髄破壊的前処置による自家造血幹細胞移植や免疫療法によって、一旦完全寛解（complete remission: CR）に入った患者でも40-50%に再発を認め、無イベント生存率は50%に満たない（Cell Tissue Res 2018）。高リスク NB の治療成績を向上するための新たな戦略が必要である。

ジストログリカン（DG）はジストロフィン糖タンパク質複合体の構成成分であり、細胞骨格と基底膜を結ぶ分子軸として機能する。と の2つのサブユニットから成り、DG は細胞膜貫通型サブユニットであり、細胞外では DG を細胞表面に、細胞内ではジストロフィンを細胞膜直下につなぎとめている。DG は高度に糖鎖修飾を受け、ラミニンなどの細胞外マトリックス（extracellular matrix: ECM）蛋白と結合し、ECM 環境を管理し、細胞の増殖、分化、接着、遊走などの機能を調整している（Semin Cancer Biol 2002）。

乳がん、前立腺がん、脳腫瘍などの高悪性度例では、DG の糖鎖異常、ラミニン結合能の低下が観察されている（Hum Pathol 2007, J Biol Chem 2009, Tumor Biol 2014）。また神経芽腫、髄芽腫、横紋筋肉腫、髄芽腫のヒト病理標本においても、DG の糖鎖修飾異常、ラミニン結低下がみられる（Hum Pathol, Skeletal Muscle 2019）。これらより、1）悪性腫瘍では、DG 糖鎖修飾異常に関連して ECM 環境が機能不全に陥っており、2）ECM 環境の機能不全が癌の悪性度に関与しているのではないかと考えられる。そこで、「DG の糖鎖修飾異常を回復させ、ECM 環境を正常化することができれば、NB の転移や再発を抑制できる」という仮説を立てた。

2．研究の目的

乳がん細胞株を用いた先行研究で、乳がん細胞株の中に DG の糖鎖修飾に関わる遺伝子 *LARGE1* の発現低下、DG の糖鎖修飾低下を呈する株があり、*LARGE1* 導入によって DG の糖鎖異常やラミニン結合能の回復、細胞増殖や遊走能亢進の抑制が示されている（Cancer Res 2012）。さらに、乳がん細胞株を用いた xenograft モデルにおいて、*LARGE1* 導入後乳がん細胞の増殖が抑制されることも示されている（Cancer Res 2012）。

本研究では、1）ヒト NB 細胞株のなかに DG の糖鎖修飾異常やラミニン結合低下を呈するものがあるか、2）DG の糖鎖修飾異常を示す細胞株と示さない細胞株の間で DG の糖鎖修飾関連遺伝子の発現に違いがあるか、3）遺伝子発現低下があれば、その遺伝子導入によってヒト NB 細胞株の増殖、浸潤、転移能を変化させることができるか、を明らかにすることを目的とした。

3．研究の方法

- (1) ヒトNB細胞株を用いた DGの糖鎖異常とリガンド結合活性の解析
当施設で保有するヒトNB細胞株を用いた。培養細胞表面 DGは、wheat germ agglutinin(WGA) アガロースビーズを用いて回収し、DGの発現および糖鎖をそれぞれAF6868(ヒトDGに対するポリクローナル抗体)、IIH6(DGの糖鎖をエピトープとするマウスモノクローナル抗体)、マウスEngelbreth-Holm-Swarm肉腫由来ラミニン蛋白、抗ラミニン抗体を用いてウエスタンブロット、フローサイトメトリーで評価した。病的コントロールとしてstage1細胞株NB massを用いた。
- (2) B細胞 DGの糖鎖修飾に関わる遺伝子発現解析
DGの糖鎖修飾には多くの糖転移酵素や器質合成酵素が関わっている。既知の13関連遺伝子（Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2017）について、定量的PCRを用いてNB細胞株における遺伝子発現を測定した。
- (3) DGの糖鎖異常の回復がヒトNB細胞株の増殖に及ぼす効果の解析
DGの糖鎖異常とリガンド結合活性低下を認めた細胞株については、特定の関連遺伝子に有意な発現低下を認めなかった。
最近、乳がん細胞株の培地へのribitol付加が、遺伝子発現とは無関係に乳がん細胞株のDG糖鎖異常、ラミニン結合能低下を回復させることが報告された（Sci Rep 2020）。DGの糖鎖異常とリガンド結合活性低下を認めた細胞株について、以下の実験を行った。
ribitol添加がNB細胞株 DGの糖鎖、リガンド活性に及ぼす効果の解析
当施設の先行研究で xenograft として生着良好であることがわかっており（Cancer Ther 2005, Exp Cell Res 2018）、DG の糖鎖異常やラミニン結合能低下を確認した細胞株 SJ-N-JF, SK-N-SH を用いた。培地に最終濃度 2.5、5、10、20 mM となるようにそれぞれ ribitol を添加し培養後、DG の糖鎖に及ぼす効果を(1)と同様にウエスタンブロット、フローサイトメトリーで評価した。

ribitol添加がNB細胞株の増殖能に及ぼす効果の解析
 ribitolを添加した培地で培養した細胞株を用い、細胞株の細胞死、濃度依存性をWST8 assayで評価した。
 ribitol添加がNB細胞株のxenograft増殖に及ぼす効果の解析
 当施設の先行研究に準じて、NB細胞株SJ-N-JF, SK-N-SHをヌードマウスの脇腹に注射した。最終濃度が5%になるように給水ボトルにribitolを溶解し、マウスに自由飲水させて飼育した (Nat Commun 2018)。マウスの体重、腫瘍サイズを注射後3日おきに評価した (Exp Cell Res 2018)。注射後35日でマウスを安楽死させ、摘出した腫瘍のDG糖鎖の変化をウエスタンブロット評価した。

4. 研究成果

- (1) ヒトNB細胞株において、DGの糖鎖修飾低下、ラミニン結合能低下が確認された
 ヒトNB細胞株のうち、LAN-1, KP-N-SI, KP-N-SIFA, SJ-N-JF, SK-N-SH, IMR5, IMR32において糖鎖修飾とラミニン結合能が低下していた。SJ-N-JFは特に増殖が早く、フローサイトメトリーのMFI値が低かった。
- (2) NB細胞株DGの糖鎖修飾に関わる遺伝子発現解析
 既知の13遺伝子の発現について、定量的PCRを用いて調べた。DGの糖鎖異常とリガンド結合活性低下を認めた細胞株について、病的コントロールNB massに比し有意な発現低下を認める遺伝子は同定できなかった。
- (3) DGの糖鎖異常の回復がヒトNB細胞株の増殖に及ぼす効果の解析
 ribitol添加がNB細胞株DGの糖鎖、リガンド活性に及ぼす効果の解析
 当施設の先行研究でxenograftとして生着良好であることがわかっており (Cancer Ther 2005, Exp Cell Res 2018)。DGの糖鎖異常やラミニン結合能低下がみられた細胞株SJ-N-JF, SK-N-SHのうち、特に増殖が早く、フローサイトメトリーのMFI値が低いSJ-N-JFを用いた。ribitolをSJ-N-JF培地中に添加すると、濃度依存性にDGの糖鎖修飾とラミニン結合能が回復した。また、フローサイトメトリーにおいてもMFI値が濃度依存性に回復した。
 ribitol添加がNB細胞株の増殖能に及ぼす効果の解析
 ribitolを添加した培地で培養したSJ-N-JFを用い、細胞株の細胞死、濃度依存性をWST8 assayで評価した。Ribitol添加では濃度依存的にSJ-N-JFの増殖能を抑制する傾向がみられ、10 mMで非投与群に比し有意に増殖が抑制された。
 ribitol添加がNB細胞株のxenograft増殖に及ぼす効果の解析
 当施設の先行研究に準じて、SJ-N-JFをヌードマウスの脇腹に注射した。最終濃度が5%になるように給水ボトルにribitolを溶解し、マウスに自由飲水させて飼育し、マウスの体重、腫瘍サイズを注射後3日おきに評価した (Exp Cell Res 2018)。Ribitol投与群では、xenograftの増殖が抑制された。注射後35日でマウスを安楽死させ、摘出した腫瘍のDG糖鎖の変化をウエスタンブロット評価した結果、ribitol投与群のxenograftではDG糖鎖修飾異常とラミニン結合能が回復した。

5. 考察

NBのヒト病理組織において、病期が進行するとDG糖鎖修飾とラミニン結合能が低下することが報告されている (Hum Pathol 2007)。今回、ヒトNB細胞株において、stage1細胞株NB massではDGの糖鎖修飾低下はみられず、stage 4細胞株のなかにDGの糖鎖修飾低下、ラミニン結合能低下がみられる細胞株があることを明らかにした。この結果は、NBのヒト病理組織の観察を支持するものであり、その他の悪性腫瘍、細胞株でも共通して認められうるものである (Hum Pathol 2007, J Biol Chem 2009, Tumor Biol 2014, Skeletal Muscle 2019)。

乳がんや横紋筋肉腫の細胞では、DGの糖鎖修飾関連遺伝子 *LARGE* の発現低下がDGの糖鎖修飾低下と関連するという報告がある (J Bio Chem 2009, Skeletal Muscle 2019)。*LARGE* はDG糖鎖のラミニン結合に重要な[-GlcA-beta1,3-Xyl-alpha1,3-]_nを形成する酵素である。*LARGE* の発現低下を認める乳がん、横紋筋肉腫細胞株において、ウイルスベクターを用いて *LARGE* を強制発現させると、糖鎖修飾、ラミニン結合能が回復し、乳がん細胞株においては細胞移動度やコロニー形成能が低下したと報告されている。今回、DGの糖鎖修飾異常を示す細胞株と示さない細胞株の間で、DG糖鎖修飾関連遺伝子の発現には調べた13遺伝子については有意な差はなかった。したがって、stage4ヒトNB細胞株でみられるDGの糖鎖修飾異常の回復が腫瘍の増殖、浸潤、転移能を変化させるかどうか、を明らかにするための方法論として遺伝子導入は適切ではないと考えた。

ペントース型アルコールであるribitolはDG糖鎖の形成において重要な酵素であるFKRPとFKTNの基質である。最近、乳がん細胞株の培地にribitol付加すると、DGの糖鎖修飾関連遺伝子の発現とは無関係に乳がん細胞株のDG糖鎖異常、ラミニン結合能低下を回復させることが報告された (Sci Rep 2020)。同様に、FKRP変異筋ジストロフィーマウスにribitolを投与すると、骨格筋のDG糖鎖修飾低下とラミニン結合能が回復し、筋ジストロフィーによる運動機能低下や線維化を改善すると報告された (Nat Commun 2018)。今回、DGの糖鎖異常やラミニ

ン結合能低下を明らかにしたヒト NB 細胞株 SJ-N-JF において、ribitol を培地に添加すると、濃度依存的に糖鎖修飾とラミニン結合能が改善することを明らかにした。また、細胞増殖能も ribitol 濃度依存的に抑制される傾向にあることを明らかにした。興味深いことに、xenograft モデルにおいて、担癌マウスに ribitol を自由飲料で投与すると、非投与群に比し SJ-N-JF の腫瘍径増大が抑制されることを明らかにし、腫瘍組織の DG 糖鎖修飾異常とラミニン結合能が回復することも明らかにした。これらの結果は、NB において DG 糖鎖修飾低下が腫瘍の増殖に関連する可能性があり、DG 糖鎖修飾低下が NB の治療ターゲットになりうることを示唆している。

今回の研究では、DG の糖鎖修飾が低下している NB 細胞株がある一方で、低下していない細胞株もあった。DG 糖鎖修飾低下が生じるメカニズムや、ribitol 付加によってヒト NB 細胞株の DG 糖鎖修飾低下が改善し増殖能が抑制されるメカニズムを明らかにしておらず、引き続き研究が必要である。また、DG 糖鎖修飾低下と薬剤抵抗性との関連性についても明らかにしたい課題である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------