



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	siRNA-Mediated Gene Silencing of ST6GalNAc I Suppresses the Metastatic Potential via Inhibition of STAT5b-IGF-1 Signaling in Gastric Cancer Cells. (ST6GalNAc I siRNA による STAT5b-IGF-1 シグナルを介した胃癌の転移抑制)
Author(s) 著者	田村, 文人
Degree number 学位記番号	甲第 2768 号
Degree name 学位の種類	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2014-03-31
Original Article 原著論文	
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 2768 号	氏 名	田村 文人
<p>siRNA-Mediated Gene Silencing of ST6GalNAc I Suppresses the Metastatic Potential <i>via</i> Inhibition of STAT 5b-IGF-1 Signaling in Gastric Cancer Cells.</p> <p>ST6GalNAc I siRNA による STAT 5b -IGF -1 シグナルを介した胃癌の転移抑制</p> <p>研究目的</p> <p>胃癌は、未だ死亡率の高い癌の一つである。その大半は、転移を有する進行胃癌の状態で見られることから、根治手術の適応とならず効果的な治療も確立していないため、依然として5年生存率は2~15%と不良である。</p> <p>癌細胞において糖鎖の合成異常が生じることが知られている。なかでも、Sialyl-Tn 抗原 (Neu5Acα2 -6GalNAcα1-O-Ser/Thr) は、STn 抗原、CD175s とも表記される単純ムチン型糖鎖抗原であり、serine もしくは threonine と GalNAc (N-アセチルガラクトサミン) が結合した Tn 抗原がシアル化され生成される。正常細胞では、GalNAc に糖鎖が O グリコシド結合し、これを基盤として糖鎖が伸長し様々な糖鎖が合成される。しかし、癌細胞で見られる GalNAc のシアル化は、O グリコシド型の糖鎖の伸長を効率的に遮断する。従って、STn は正常細胞には発現せず胃癌、大腸癌、卵巣癌、乳癌、膵癌など様々な癌腫で強く発現し、癌の浸潤や転移とも強く相関すると報告されている。実際に、血清 STn 値は癌の悪性度や転移能を示す予後因子としても有用とされている。</p> <p>STn の生成は、主に serine もしくは threonine 残基を有する Tn 抗原にシアル酸を α 2-6 結合させるシアル酸転移酵素の ST6GalNAc I によって行われる。これまでに ST6GalNAc I 遺伝子を導入した STn 発現胃癌細胞株の検討において、STn 発現は接着能、遊走能、浸潤能を増強させることが示され、マウスの検討では、STn 発現が腹膜播種の増強と生存率の低下を来し、これが抗 STn 抗体で改善することを示されている。</p> <p>今回、我々は ST6GalNAc I に着目し、これを標的とする胃癌の抗転移治療を開発するため、ST6GalNAc I の発現を siRNA で抑制し、転移関連遺伝子の網羅的な解析を行うとともに、その増殖能、遊走能、浸潤能を検討し、マウスの胃癌細胞腹膜播種モデルを用いた転移抑制効果を検討した。</p> <p>研究方法</p> <p>1) 細胞株</p> <p>胃癌細胞株である MKN45、MKN74 は独立行政法人 医薬基盤研究所より購入し、JRST、HSC-39 は免疫生物研究所、KATOIII と NUGC4 は理研細胞バンクより購入した。また、ルシ</p>			

フェラーゼを遺伝子導入した MKN45-luc についても医薬基盤研究所より購入した。

2) siRNA の調整と導入

ST6GalNAc I siRNA HSS125080; (5'-CCUGGAACACUUUGCACCACCCUUU-3')、コントロールとして stealth RNAi negative control high GC (random siRNA) を invitrogen より購入した。遺伝子導入については Lipofectamine RNAiMAX を使用し、Invitrogen のプロトコールに準じて行った。

3) RT2 profiler PCR array

TRIzol reagent を使用し RNA を抽出した。RT2 profiler PCR array を使用し、96 well のプレートで 89 種類の転移と細胞運動能に関連する遺伝子と 5 種類の housekeeping gene の mRNA を SABioscience のプロトコールに従い測定した。ST6GalNAc I siRNA を導入した MKN45 と random siRNA を導入した MKN45 の Ct 値の差は、 $\Delta\Delta Ct$ 法で計算した; $\Delta Ct = Ct - Ct (HK)$, $\Delta\Delta Ct = Ct (ST6GalNAc I siRNA 導入細胞) - Ct (random siRNA 導入細胞)$ 。

4) ウェスタンブロットと免疫沈降法

MKN45 に各種 siRNA を導入し、72 時間後にタンパク質を抽出した。一次抗体は、抗 ST6GalNAc I 抗体、抗 IGF-1 抗体、抗 β -actin 抗体を使用した。その後、二次抗体反応を行い、LAS-4000UV mini で測定した。免疫沈降法には抗 STAT5b 抗体、抗 phospho-STAT5 抗体を使用した。

5) ST6GalNAc I plasmid の導入

pCMVNeo vector に ST6GalNAc I cDNA クローンを導入したプラスミド発現ベクターを OriGene より購入し、MKN45 に Lipofectamin LTX & PULS reagent を用いて遺伝子導入した。

6) 蛍光免疫染色

各胃癌細胞株を chamber slide で培養し、FITC-conjugated STn 抗体 (STn219) と FITC-conjugated anti-mouse IgG 抗体を反応後、蛍光顕微鏡で観察した。

7) フローサイトメトリー

各胃癌細胞株 (1×10^6 個) を FITC-conjugated STn 抗体 (STn219) と FITC-conjugated anti-mouse IgG 抗体を反応させ、FACS calibur instrument で測定した。

8) 細胞増殖アッセイ

24well のプレートの各 well に 5×10^4 個の細胞を培養し、各種 siRNA を導入後、それぞれ 24、48、72 時間後に WST-1 法で検討した。

9) 細胞遊走アッセイ

Boyden chamber 法で評価した。 3×10^4 個の細胞をチャンバー内で培養し、24 時間後にチャンバー内の細胞を除去した。残った細胞をメタノールで固定し、メチレンブルーで染色した。洗浄後、ランダムに 5 視野を低倍率で観察し細胞数をカウントした。

10) 細胞浸潤アッセイ

マトリゲルを敷いた Boyden chamber 法で評価した。 3×10^4 個の細胞をチャンバー内に撒き、48 時間後にチャンバー内の細胞を除去した。残った細胞をメタノールで固定し、メチレンブルーで染色した。洗浄後、ランダムに 5 視野を低倍率で観察し細胞数をカウントした。

11) 腹膜播種モデルでの ST6GalNAc I siRNA の抗腫瘍効果の検討

すべての動物実験は札幌医大動物実験委員会の承認を得て行った。7-8 週の BALB/c ノードマウスに 1×10^7 個の MKN45-luc を腹腔内投与し腹膜播種モデルを作成後、第 2 日目より各群それぞれに PBS、random siRNA ($70 \mu g$ siRNA)、ST6GalNAc I siRNA ($70 \mu g$ siRNA) を週 2 回、4 週間 (計 7 回) 腹腔内投与した。腹膜播種に対する抗腫瘍効果について、IVIS シ

システムを用いて経時的に評価した。第 26 日目に解剖し、各群の腹膜結節を採取し 10%ホルマリンで固定した。また、血清を採取し STn 抗原を測定した。同様に 7-8 週の BALB/c ノードマウスに 1×10^7 個の MKN45 を腹腔内投与し腹膜播種モデルを 3 群 (N=6) で作成し、同様のスケジュールで治療し生存率を検討した。今回の検討では、各 siRNA は Invivofectamine 2.0 Reagent と 1 対 1 で混合し計 $200 \mu\text{l}$ (siRNA $70 \mu\text{g}$) としたものを腹腔投与した。

12) 腹膜結節の免疫染色

パラフィン固定された腹膜結節に対して抗 TAG72 抗体 (B72.3) を用いて免疫染色を施行した。

研究成績

1) ST6GalNAc I siRNA を導入した MKN45 細胞を用いた転移関連遺伝子の PCR array の検討

ST6GalNAc I が転移のメカニズムにどのように関わるかを調べるために、転移関連遺伝子の mRNA の発現を PCR array で検討した。Random siRNA 導入 MKN45 細胞と ST6GalNAc I siRNA 導入 MKN45 細胞を PCR array で比較したところ、最も大きな変化を認めたのは insulin-like growth factor-1 (IGF-1) でありその発現は ST6GalNAc I 群で $\Delta\Delta\text{CT}$ 値で 2.126 倍減少していた。ウェスタンブロットでの検討でも、IGF-1 の発現は ST6GalNAc I siRNA を導入した細胞で低下していた。逆に ST6GalNAc I plasmid を用いて強制発現させた細胞では、IGF-1 の発現は増加していた。これらの結果より、MKN45 細胞において ST6GalNAc I が IGF-1 の発現を調節している可能性が示唆された。

2) ST6GalNAc I siRNA が IGF-1 の発現を抑制するメカニズムの検討

ST6GalNAc I siRNA が IGF-1 の発現を抑制するメカニズムを検討するために、IGF-1 の発現を制御する signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b) シグナル経路について検討した。ウェスタンブロットでの検討では、リン酸化 STAT5b は ST6GalNAc I siRNA 導入 MKN45 細胞で random siRNA 導入 MKN45 細胞に比べ発現が低下していた。また、ST6GalNAc I plasmid を用いて強制発現させた MKN45 細胞では、random siRNA 導入 MKN45 細胞に比べ、よりリン酸化 STAT5b の発現が増強していた。この結果より ST6GalNAc I は、IGF-1 の発現を制御する STAT5b シグナル経路を調節していることが示された。

3) ST6GalNAc I siRNA の細胞増殖抑制効果についての検討

ST6GalNAc I siRNA を導入した胃癌細胞株の細胞増殖能を検討するために WST-1 法を行った。フローサイトメトリーと蛍光免疫染色により STn 高発現を確認した MKN45、JRST、HSC-39 細胞において、ST6GalNAc I siRNA 導入細胞でコントロールの細胞 (No treat、random siRNA 導入細胞) に比べ有意に細胞増殖が抑制された。同様に STn 低発現を確認した MKN74 では、ST6GalNAc I siRNA 導入によって増殖は抑制されなかった。

4) ST6GalNAc I siRNA を導入した MKN45 細胞を用いた遊走、浸潤抑制効果についての検討

遊走能の検討では、ST6GalNAc I 導入 MKN45 細胞はコントロール群 (No treat、random siRNA) に対し有意に低下していた。また、浸潤能も同様に ST6GalNAc I 導入 MKN45 細胞で有意に低下していた。これらの結果から ST6GalNAc I 遺伝子の発現を抑制することにより、遊走能と浸潤能が抑制されることが示唆された。

5) マウスの腹膜播種モデルにおける ST6GalNAc I siRNA の腫瘍抑制効果の検討

MKN45-luc で腹膜播種を作成し、ST6GalNAc I siRNA-liposome を腹腔内投与した。IVIS システムにより腹膜播種結節の経過を day7、14、21、26 で評価したところ ST6GalNAc I siRNA-liposome 投与群では、コントロールの PBS 投与群、random siRNA-liposome 投与群に比べ有意に腫瘍の増殖は抑制されていた。次に、day26 に解剖し各群の腹膜結節と血清を採取したところ、腹膜結節の総重量についても ST6GalNAc I siRNA-liposome 投与群でコントロール投与群に比べ有

意に減少していた。血清 STn 抗原値は、ST6GalNAc I siRNA-liposome 投与群 (45±4U/ml) であり、random siRNA-liposome 投与群 (120±38U/ml) と比べ有意に減少していた。各群の腹膜結節を抗 STn 抗体で免疫染色したところ、STn 抗原の発現はコントロール群に比べ ST6GalNAc I siRNA-liposome 投与群で著明に低下していた。

6) マウスの腹膜播種モデルにおける ST6GalNAc I siRNA 治療による生存率の検討

腫瘍抑制効果の検討と同様な方法で腹膜播種モデルを作成、治療を行い生存率を検討した。マウスの生存率は、ST6GalNAc I siRNA-liposome 投与群で PBS 投与群、random siRNA-liposome 投与群より有意に延長していた。マウスの体重については、ST6GalNAc I siRNA-liposome 投与群で、PBS 投与群、random siRNA-liposome 投与群と比べ有意な体重減少の抑制が確認された。

考察

我々は胃癌細胞において ST6GalNAc I が STAT5b シグナル経路の活性化を介し IGF-1 の発現を制御することを明らかにし、ST6GalNAc I を標的とした胃癌治療の可能性を示した。

まず、6種類の胃癌細胞株で定量的 RT-PCR 法により ST6GalNAc I mRNA の発現を検討し、最も発現の高かった MKN45 細胞に ST6GalNAc I siRNA を導入したところ、ST6GalNAc I と STn の発現をほぼ完全に抑制できることを示した。さらに増殖能、遊走能、浸潤能についても ST6GalNAc I siRNA を導入した細胞の方がいずれもコントロール群に比べて抑制されることを示した。そこで、実際にマウスに MKN45-luc を腹腔内接種し腹膜播種モデルを作成後、ST6GalNAc I siRNA リポソームを腹腔内投与する治療により、腹膜播種結節の STn の発現低下と、腹膜結節量、血清の STn 値の低下を認めた。さらに、マウス生存期間の延長効果を確認し in vivo においても抗腫瘍効果を発揮することが示された。

ST6GalNAc I の抑制による抗転移効果の機序を検討するため ST6GalNAc I siRNA を導入した MKN45 を用いて転移関連遺伝子群の発現を PCR array で検索したところ、IGF-1 mRNA の発現が著明に低下することを見いだした。胃癌細胞においてパラクライン/オートクラインループを介した IGF-1/IGF-1 レセプターの活性化が生じており、その増殖、生存、血管新生の促進やアポトーシスの抑制に関与している。従って、ST6GalNAc I siRNA の導入により IGF-1 の発現を抑制すると、このループが破綻し転移が抑制されるのではないかと推察された。JAK2-STAT 経路は、IGF 産生系の主要な細胞内伝達経路の一つであり、様々な STAT 蛋白の中で STAT5b は直接 IGF-1 mRNA の発現を調節している。これまで、シアル酸残基と JAK-STAT 経路の活性化の関連を示唆する報告がされているが、ST6GalNAc I と JAK-STAT シグナルの関連は不明であった。今回の検討により ST6GalNAc I が STAT5b シグナル経路を介し IGF-1 の発現を制御することが明らかとなった。しかしながら、ST6GalNAc I が STAT5b を活性化する機序については、更なる検討が必要である。

以上、ST6GalNAc I は転移性胃癌に対する有望な治療標的となる可能性が示された。さらに STn は、大腸癌や乳癌組織においても発現しておりこれらの腫瘍に対しても有効となる可能性が示唆される。

論文審査の要旨及び担当者

平成 26 年 1 月 20 日提出

(平成 26 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 2768 号	氏 名	田村 文人
論文審査 担 当 者	主査 加藤 淳二	副査 篠村 恭久	
	委員 堀尾 嘉幸	委員 澤田 典均	

論文題名	siRNA-Mediated Gene Silencing of ST6GalNAc I Suppresses the Metastatic Potential via Inhibition of STAT5b-IGF-1 Signaling in Gastric Cancer Cells. (ST6GalNAc I siRNA による STAT5b-IGF-1 シグナルを介した胃癌の転移抑制)
------	---

結果の要旨

本研究では、胃癌の多くで STn 抗原を発現することから、STn 抗原の合成酵素である ST6GalNAcI に着目し、STn 抗原の発現の意義と未解明である STn 抗原の作用機序の検討を試みた。まず、ST6GalNAcI siRNA による胃癌細胞の増殖・転移能の抑制を確認し、PCR array で IGF-1 の発現低下を見いだした。その機序として、STAT5b のリン酸化状態が変化していたことから、STn 抗原が JAK2-STAT5b pathway に作用する可能性を示した。さらにマウス胃癌腹膜播種モデルにおいて、ST6GalNAcI siRNA-liposome による治療を検討し、抗腫瘍効果と生存の延長を示した。以上の結果、STn 抗原が JAK2-STAT5b pathway に作用することと ST6GalNAcI が胃癌の新規の治療標的分子となる可能性を示したものであり、学位論文として十分に値するものであると考えられた。