

MUC1 を介した腫瘍悪性化機構の解析

京都産業大学大学院 工学研究科 生物工学専攻
博士後期課程 255134 森 勇伍

目次

1. MUC1 への galectin-3 の結合によるシグナル伝達の活性化及び腫瘍悪性化への関与	
1-1. 序論	:1
1-2. 材料及び方法	:4
1-2-1. 細胞培養及び遺伝子導入	
1-2-2. Total RNA の調製及び DNA microarray 解析	
1-2-3. 細胞抽出液の調製	
1-2-4. 細胞表面のビオチン標識及び細胞表面タンパク質の調製	
1-2-5. MUC1 上の PNA (peanut agglutinin) 結合糖鎖の検出	
1-2-6. 免疫沈降	
1-2-7. SDS-PAGE 及び Western blotting	
1-2-8. 細胞免疫染色	
1-2-9. 免疫組織染色及び H&E (hematoxylin & eosin) 染色	
1-2-10. Recombinant galectin-3 の調製	
1-2-11. Galectin-3 処理による MUC1-C のリン酸化	
1-2-12. Galectin-3 処理による細胞内シグナル伝達	
1-2-13. MTT assay	
1-2-14. Anchorage-dependent clonogenic assay	
1-2-15. Wound healing assay	
1-2-16. Plate assay による合成グリコポリマーと galectin-3 の結合能の測定	
1-2-17. 合成グリコポリマーによる細胞増殖能への影響の検討	
1-2-18. FACS	
1-2-19. 有意差検定	
1-3. 結果	:10
1-3-1. 腫瘍細胞及びヒト腫瘍組織における MUC1 と galectin-3 の分布	
1-3-2. MUC1 への galectin-3 の結合に伴うシグナル伝達	
1-3-3. MUC1 への galectin-3 の結合に伴うシグナル伝達活性化による腫瘍悪性化	
1-4. 考察	:27
2. MUC1 による uPA の発現誘導及び腫瘍悪性化への関与	
2-1. 序論	:31
2-2. 材料及び方法	:32
2-2-1. 細胞培養及び遺伝子導入	
2-2-2. Total RNA の調製及び DNA microarray 解析	
2-2-3. 細胞抽出液の調製	
2-2-4. 細胞質及び核画分の調製	

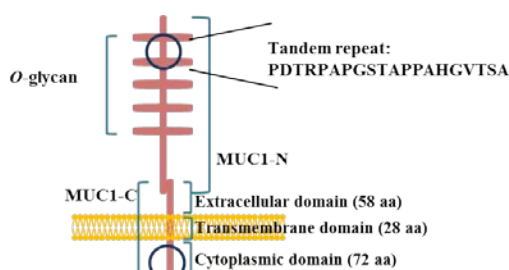
2-2-5. 免疫沈降	
2-2-6. SDS-PAGE 及び Western blotting	
2-2-7. 細胞免疫染色	
2-2-8. 免疫組織染色及び H&E 染色	
2-2-9. ChIP (chromatin immunoprecipitation) 及び Re-ChIP (re-chromatin immunoprecipitation) assay	
2-2-10. Luciferase construct の作製及び luciferase assay	
2-2-11. ELISA	
2-2-12. Gelatin 及び casein zymography	
2-2-13. 細胞浸潤能及び移動能の測定及びパーセント浸潤の算出	
2-2-14. 各阻害剤による細胞の処理	
2-2-15. FACS	
2-2-16. 有意差検定	
2-3. 結果	:37
2-3-1. 様々な悪性腫瘍における uPA と MUC1 の発現レベルの相関性	
2-3-2. MUC1-C/NF- κ B p65 複合体の形成と核移行	
2-3-3. MUC1-C/NF- κ B p65 複合体の uPA プロモーター上へのリクルート	
2-3-4. MUC1-C/NF- κ B p65 複合体の uPA プロモーター上への結合に伴う uPA 遺伝子転写活性への影響	
2-3-5. MUC1 による uPA 発現量増加に伴う細胞浸潤能の亢進	
2-4. 考察	:52
3. 総括	:55
4. 謝辞	:57
5. 参考文献	:58
6. 資料	:66

1. MUC1 への galectin-3 の結合によるシグナル伝達の活性化及び腫瘍悪性化への関与

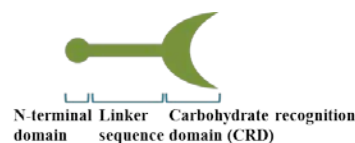
1-1. 序論

腺上皮や管腔上皮等の保護作用を担う分子の1つである mucin は高分子の糖タンパク質で、コアタンパク質に serine、threonine 及び proline 残基に富んだ一定のアミノ酸配列からなる繰り返し構造 (tandem repeat) を有することを特徴とする。また、serine 及び threonine 残基には GalNAc (*N*-acetylgalactosamine) を介して *O*-グリコシド型糖鎖が多数付加されており、mucin における総質量の半分以上を占めている。現在までにヒトにおいて 20 種類以上の mucin が同定されており、それらは膜結合型 mucin と分泌型 mucin に大別される。正常上皮細胞では apical 側のみに mucin は輸送され、膜結合型または分泌型 mucin となるが、上皮悪性腫瘍細胞では極性の消失に伴い mucin は細胞膜全体に発現し、血中にも分泌される。加えて、悪性化に伴い mucin 上の *O*-グリコシド型糖鎖構造が変化し、正常上皮細胞では検出されない様々な腫瘍関連糖鎖抗原が mucin 上に検出される [1]。このような mucin の量的かつ質的な変化による腫瘍悪性化への関与が示唆されているが、未解明な部分も多い。膜結合型 mucin においては細胞表面上の保護作用に加え、細胞質内領域を介したシグナル伝達分子としての働きも示唆されていることから [1]、代表的な膜結合型 mucin の1つである MUC1 (mucin 1) を介したシグナル伝達及び付随する腫瘍悪性化機構への関与を検討した。

A. MUC1



B. Galectin-3



1 CQCRKKNYGQLDIFPARDIYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSIDRSPEYKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL 72

© MUC1 及び galectin-3 模式図

MUC1 (模式図 A) は乳腺や膵臓、大腸などの消化管等を含む広範囲の上皮悪性腫瘍で発現量の異常な亢進が報告されている I 型の膜結合型糖タンパク質で、その発現量と癌患者の予後の経過には相関性があることが知られている [1-4]。MUC1 は1本のポリペプチド鎖として生合成された後、細胞膜への輸送過程時に小胞体内でコアタンパク質に含まれる SEA (sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin) domain 内の特定の配列 (GSVVV [Gly-Ser-Val-Val-Val] motif) で2本鎖に自己切断され、MUC1-N (MUC1 N-terminal subunit) 及び MUC1-C (MUC1 C-terminal subunit) の2つのサブユニットとなり、この2つのサブユニットが非共有結合で安定なヘテロ二量体を形成し細胞表面に発現する [5, 6]。MUC1 の細胞外領域の大部分を占めるサブユニットである MUC1-N は、20 アミノ酸で構成される

tandem repeat を多数有し、1つの tandem repeat 内には *O*-グリコシド型糖鎖が結合する可能性を有する 5つの serine または threonine 残基を含んでいる [7, 8]。一方、MUC1-C は 58 アミノ酸からなる短い細胞外領域、28 アミノ酸からなる膜貫通領域及び 72 アミノ酸からなる細胞質内領域から構成され、MUC1-N を細胞表面に保持している [9]。また、MUC1-C は細胞質内領域を介して β -catenin や STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)、NF- κ B (nuclear factor- κ B) 等のシグナル伝達関連分子と相互作用し核内に移行することで、様々なシグナル伝達経路の活性化に関与することに加え [10-12]、細胞質内領域中の特定のアミノ酸配列 (CQC [Cys-Gln-Cys] motif) が、MUC1 のホモ多量体化及び核移行関連タンパク質である importin β や nucleoporin p62 との相互作用に重要であることが報告されている [13, 14]。また、上皮悪性腫瘍細胞で過剰発現した MUC1 では、MUC1-N 上に付加されている *O*-グリコシド型糖鎖が正常細胞と比較して短くなり、TF 抗原 (Thomsen-Friedenreich 抗原: Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr) や Tn 抗原 (GalNAc α -Ser/Thr) といった異常な糖鎖の発現が認められる [15, 16]。これらの糖鎖の中で、TF 抗原は非還元末端に galactose を含む糖鎖構造 (β -galactoside) であることから、MUC1 が galectin-3 に対する ligand となり、腫瘍悪性化機構に関与している可能性が考えられた。

Galectin は β -galactoside を特異的に認識し結合する CRD (carbohydrate recognition domain) を有する lectin であり、構造の特徴から proto-type、chimera-type 及び tandem repeat-type の 3 種類に大別される [17]。唯一の chimera-type である galectin-3 (模式図 B) は CRD、N-terminal domain 及び両 domain を繋ぐ glycine、tyrosine 及び proline 残基に富んだコラーゲン様の linker sequence から構成される [18]。主に細胞質や核、ミトコンドリアに局在し [19, 20]、抗アポトーシス作用や細胞増殖、pre-mRNA のスプライシング等様々な細胞機能に関与する [21-23]。また、シグナル配列を有していないが、一部は細胞外にも分泌され [24, 25]、細胞表面分子や細胞外基質と結合することで血管新生や細胞接着等の細胞機能に関与する [17, 26, 27]。Galectin-3 の発現量は腫瘍の悪性化と相関性があり、癌患者での血中濃度は健常者と比較して上昇していることが報告されている [28, 29]。

MUC1 への galectin-3 の結合による腫瘍悪性化への関与は過去にも報告されている。これらの報告では、galectin-3 が MUC1 を架橋し細胞表面の一部に局在化することにより MUC1 に覆われていた細胞表面接着分子を露出させ、腫瘍細胞間や腫瘍細胞と血管内皮細胞間の接着を亢進させる機構に関与しているとされている [30-32]。また、MUC1 の関与するシグナル伝達としては、増殖因子の 1 つである EGF (epidermal growth factor) の結合を起点とした EGFR (EGF receptor) からのシグナルを、MUC1 が中継し増強する機構が報告されているが [1, 33-35]、これらの知見から新たな機構として、galectin-3 が MUC1 への結合を介して多量体を形成し MUC1 を架橋することにより、シグナル伝達を誘導する可能性が考えられた。腫瘍組織微小環境下において分泌された galectin-3 が、autocrine/paracrine 様機構によって MUC1 を介したシグナル伝達を惹起する可能性について、EGFR の関与も考慮に入れつつ、MAPK (mitogen-activated protein kinase) 及び PI3K (phosphatidylinositol

3-kinase)/Akt シグナル伝達経路について解析し、更にこれらに起因する腫瘍悪性化について検討した。

本研究では以下の知見を得た。様々なヒト癌患者組織切片において、MUC1 と galectin-3 は同様の分布を示した。また、MUC1 発現腫瘍細胞の細胞表面で MUC1 と galectin-3 が共局在していた。MUC1 発現腫瘍細胞において、MUC1 と galectin-3 の結合を介して MAPK 及び PI3K/Akt シグナル伝達経路が活性化し、細胞増殖能や移動能が亢進した。また、galectin-3 の発現を抑制した MUC1 発現腫瘍細胞では細胞増殖能や移動能が抑制され、加えて多量体形成能が欠損した galectin-3 では上述したシグナル伝達のレベルは著しく減少した。更に、galectin-3 によるシグナル伝達活性化は、EGFR 阻害剤存在下でも同様に誘導された。従って、増殖因子/増殖因子受容体依存的な MUC1 介在性のシグナル伝達とは別に、MUC1 単独でも galectin-3 によってシグナル伝達が活性化され、腫瘍悪性化に関与していることが示唆された。

1-2. 材料及び方法

1-2-1. 細胞培養及び遺伝子導入

HCT116 細胞 (ヒト大腸癌由来細胞株)、A549 細胞 (ヒト肺癌由来細胞株) 及び SKOV3 細胞 (ヒト卵巣癌由来細胞株) は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。MUC1 強制発現細胞株として、ヒト MUC1cDNA を導入した HCT116/MUC1 及び A549/MUC1 細胞もしくは empty vector のみを導入した HCT116/Mock 及び A549/Mock 細胞を作製した。また、MUC1 発現抑制細胞株として、ヒト MUC1 shRNA (OriGene) を導入した SKOV3/Si-1 及び Si-2 細胞もしくは scrambled shRNA (OriGene) を導入した SKOV3/Scr 細胞を作製した。HCT116/MUC1 細胞にヒト galectin-3 shRNA (InvivoGen) もしくは scrambled shRNA (InvivoGen) を導入した HCT116/MUC1-Gal-3/Si 及び HCT116/MUC1-Scr 細胞を作製した。HCT116/Mock、HCT116/MUC1、SKOV3/Scr、SKOV3/Si-1、SKOV3/Si-2、HCT116/MUC1-Scr 及び HCT116/MUC1-Gal-3/Si 細胞は、10% 非働化 FBS (heat-inactivated FBS: HI-FBS)、4 mM L-glutamine、100 units/ml penicillin 及び 100 µg/ml streptomycin を含む DMEM (Nissui Pharmaceutical) により培養した。A549/Mock 及び A549/MUC1 細胞は、10% HI-FBS、100 units/ml penicillin 及び 100 µg/ml streptomycin を含む F-12K medium (ATCC) により培養した。

なお、上述した各種細胞株への plasmid の導入には Fugene[®] HD transfection reagent (Promega) を用いた。

また、RNA 干渉については下記の配列を持つ MUC1 shRNA、galectin-3 shRNA 及びそれぞれの scrambled shRNA を使用した。

[MUC1 shRNA]

5'-GCCTCTCGATATAACCTGACGATCTCAGAtcaagagTCTGAGATCGTCAGGTTATATCGAG
AGGC-3'

[MUC1 scrambled shRNA]

5'-GCACTACCAGAGCTAACTCAGATAGTACTcaagagAGTACTATCTGAGTTAGCTCTGGTA
GTGC-3'

[galectin-3 shRNA]

5'- GCTACCCAGGGGCTTCCTATCtcaagagGATAGGAAGCCCCTGGGTAGC-3'

[galectin-3 scrambled shRNA]

5'- GCAGATCCGTCTCGGTACCTcaagagAGGTACGCGAGACGGATCTGC-3'

1-2-2. Total RNA の調製及び DNA microarray 解析

HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞を PBS により洗浄後、説明書に従って、ISOGEN (Nippon Gene) により total RNA を調製した。サンプルの解析を Takara Bio に外部委託し、DNA microarray 解析を行った。

1-2-3. 細胞抽出液の調製

細胞を PBS により洗浄後、cell lysis buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、5 mM EDTA、1% Tx-100 (Triton X-100) 及び 1% Protease Inhibitor Cocktail (Nacalai Tesque)) に懸濁し氷上で超音波処理を行った後、15,000 × g、4°C、10 分間遠心して得られた上清を細胞抽出液として用いた。

1-2-4. 細胞表面のビオチン標識及び細胞表面タンパク質の調製

細胞を PBS により洗浄後、0.1 mg/ml EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (Thermo Scientific) を含む PBS 中で 4°C、1 時間静置した。100 mM glycine/PBS により洗浄後、1-2-3 項に従って、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液 (250 もしくは 300 µg) に Streptavidin Sepharose™ High Performance (GE Healthcare) を加え 4°C、2 時間攪拌後、cell lysis buffer により洗浄し、得られた沈降物をサンプルとした。

1-2-5. MUC1 上の PNA (peanut agglutinin) 結合糖鎖の検出

1-2-3 項に記した方法に従って調製した HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液 (400 µg) に、PNA-Agarose (J-oilmills) もしくは樹脂のみを加え 4°C、2 時間攪拌した。Cell lysis buffer により洗浄し、得られた沈降物をサンプルとした。

1-2-6. 免疫沈降

1-2-3 項に記した方法に従って調製した細胞抽出液 (250 µg) に、ヤギ抗 galectin-3 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) もしくはコントロール抗体を加え 4°C、2 時間攪拌後、PureProteome™ Protein G Magnetic Beads (Merck Millipore) を加え更に 4°C、2 時間攪拌した。Cell lysis buffer により洗浄し、得られた沈降物をサンプルとした。

1-2-7. SDS-PAGE 及び Western blotting

各項に記した方法に従って調製したサンプル (5~25 µg) を電気泳動し、Zeta-Probe® Blotting Membrane (Bio-Rad Laboratories) もしくは Immun-Blot® PVDF Membrane (Bio-Rad Laboratories) に転写した。3% skim milk/PBS によりブロッキング後、各種一次抗体を加え 4°C、一晩処理した。TBST (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl 及び 0.05% Tween-20) により膜を洗浄後、該当する HRP 標識二次抗体を加え室温、1 時間処理した。TBST により膜を洗浄後、Chemi-Lumi One L (Nacalai Tesque) を用いて検出した。また、一部の結果においては、Image J software (National Institutes of Health) によりデータを数値化した。なお、一部の実験 (一次抗体にビオチン標識抗体を用いた場合等) においては、HRP 標識 streptavidin により膜を処理した後、上述した方法と同様に検出した。

使用した一次抗体及び二次抗体は下記に示す。

[一次抗体]

マウス抗 MUC1-N 抗体 (BD Biosciences)、アルメニアンハムスター抗 MUC1-C 抗体 (Lab Vision)、ウサギ抗 galectin-1 抗体 (Abcam)、ヤギ抗 galectin-3 抗体、ウサギ抗 EGFR 抗体、ビオチン標識マウス抗リン酸化 tyrosine 抗体 (以上 Santa Cruz Biotechnology)、マウス抗 β -actin 抗体 (Sigma-Aldrich)、マウス抗リン酸化 ERK1/2 抗体、ウサギ抗 ERK1/2 抗体、ウサギ抗リン酸化 Akt 抗体、ウサギ抗 Akt 抗体 (以上 Cell Signaling Technology)

[二次抗体]

HRP 標識ウサギ抗マウス IgG (H+L) 抗体、HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体、HRP 標識ウサギ抗ヤギ IgG (H+L) 抗体、HRP 標識ヤギ抗アルメニアンハムスター IgG (H+L) 抗体

1-2-8. 細胞免疫染色

細胞表面上の MUC1、galectin-3 もしくは galectin-1 の分布を検出する場合、細胞を PBS により洗浄後、1% BSA/PBS 中で 4°C、30 分間ブロッキングした。マウス抗 MUC1-N 抗体及びヤギ抗 galectin-3 抗体もしくはウサギ抗 galectin-1 抗体 (GeneTex) を含む 1% BSA/PBS 中で細胞を 4°C、2 時間処理し、PBS で洗浄後、該当する蛍光標識二次抗体 (Alexa Fluor[®] 488 標識ウサギ抗マウス IgG (H+L) 抗体及び Alexa Fluor[®] 594 標識ウサギ抗ヤギ IgG (H+L) 抗体もしくは Alexa Fluor[®] 488 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) 抗体及び Alexa Fluor[®] 594 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体) を含む 1% BSA/PBS 中で 4°C、1 時間遮光下で処理した。PBS により洗浄後、4% PFA/PBS (paraformaldehyde/PBS) 中で室温、20 分間遮光下で細胞を固定すると共に DAPI により核を染色した。

細胞内の galectin-3 及び galectin-1 を検出する場合、細胞を PBS により洗浄し、4% PFA/PBS 中で室温、20 分間固定後、PBS により洗浄した。0.1% Tx-100 を含む 5% BSA/PBS 中で室温、30 分間細胞のブロッキングと透過処理を行った後、上述した一次抗体及び 0.1% Tx-100 を含む 1% BSA/PBS 中で 4°C、一晩処理した。細胞を PBS により洗浄後、上述した蛍光標識二次抗体、DAPI 及び 0.1% Tx-100 を含む 1% BSA/PBS 中で室温、1 時間遮光下で処理後、PBS により洗浄した。両条件により調製した細胞は、50% glycerol/PBS により封入後、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica) で観察した。

1-2-9. 免疫組織染色及び H&E (hematoxylin & eosin) 染色

パラフィン包埋した各種ヒト癌患者組織切片及び癌部周囲の非癌部組織切片を xylene 及び EtOH により脱パラフィン化及び再水和化した。同組織切片を 10 mM citric acid buffer (pH 6.0) 中で 100°C、15 分間処理し抗原を賦活化後、PBS により洗浄した。5% BSA/PBS 中で室温、1 時間ブロッキング後、マウス抗 MUC1-N 抗体及びヤギ抗 galectin-3 抗体を含む 1% BSA/PBS 中で 4°C、一晩処理した。PBS により洗浄後、Alexa Fluor[®] 488 標識ウサギ抗マウス IgG (H+L) 抗体、Alexa Fluor[®] 594 標識ウサギ抗ヤギ IgG (H+L) 抗体及び DAPI を含む 1% BSA/PBS 中で室温、1 時間遮光下で処理した。PBS により洗浄後、ProLong[®] Gold

antifade reagent (Invitrogen) により封入し、蛍光顕微鏡 (Nikon) で観察した。また、上述の組織切片を観察後、Mayer's Hematoxylin (Muto Kagaku) 及び Pure Eosin (Muto Kagaku) により H&E 染色し、同様に観察した。

なお、本項で使用したヒト癌患者組織切片及び癌部周囲の非癌部組織切片は、大阪市立大学医学部倫理規定に従って癌患者より採取されたもので、同大学院腫瘍外科八代正和博士の御好意により供与して頂いた。

また 1-2-6、1-2-7、1-2-8 及び本項で使用した一次抗体の内、代表的なものについては抗体の反応性を示す図を別途添付した (資料 A)。

1-2-10. Recombinant galectin-3 の調製

1-2-2 項に記した方法に従って、HCT116/MUC1 細胞の total RNA を調製後、下記のプライマーを用いた RT-PCR により全長の galectin-3cDNA を調製した。

Forward primer: 5'-AAT CCA TGG CAG ACA ATT TTT CGC TCC AT-3'

Reverse primer: 5'-TAA GGA TCC TTA TAT CAT GGT ATA TGA AG-3'

増幅した galectin-3cDNA を pET-16b vector (Novagen) に挿入し、得られた vector を BL21(DE3) 株に transform した。IPTG によりタンパク質発現を誘導し、超音波処理後に遠心して上清を回収した。得られた上清より、lactose-agarose column を用いた affinity chromatography によって recombinant galectin-3 を精製した。

調製した recombinant galectin-3 の一部は、32 µg/ml collagenase type VII (Sigma-Aldrich)、150 mM NaCl 及び 10 mM CaCl₂ を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer 中で 37°C、2 時間処理した。分画分子量 50 kDa の Amicon[®] Ultra Centrifugal Filters (Merck Millipore) により collagenase を buffer 中から除去後、素通り溶液を分画分子量 10 kDa の Amicon[®] Ultra Centrifugal Filters により濃縮すると共に PBS に置換した。得られた galectin-3 は、cleaved galectin-3 として 1-2-12 項の実験に用いた。

1-2-11. Galectin-3 処理による MUC1-C のリン酸化

30 mM lactose/DMEM 中で一晚培養した HCT116/MUC1 細胞を 30 mM lactose/serum-free DMEM により洗浄後、更に同一培養液中で 3 時間培養した。Serum-free DMEM により洗浄し、Cell Dissociation Buffer, enzyme-free, Hank's Balanced Salt Solution (Invitrogen) により細胞を剥離後、serum-free DMEM に懸濁した。細胞懸濁液を等分した後、40 µg/ml recombinant galectin-3 もしくは PBS を加え 37°C、4 分間処理した。2,000 rpm、4°C、2 分間遠心し上清を除去後、1% Phosphatase Inhibitor Cocktail (Nacalai Tesque) を含む cell lysis buffer に細胞を懸濁し、氷中で 30 分間静置後、15,000 × g、4°C、10 分間遠心し細胞抽出液を調製した。得られた細胞抽出液にマウス抗 MUC1-N 抗体を加え、1-2-6 項に記した方法に従って得ら

れた沈降物を、1-2-7 項に記した方法に従って、以降の実験に用いた。

1-2-12. Galectin-3 処理による細胞内シグナル伝達

1-2-11 項に記した方法に従って調製した細胞懸濁液 (3×10^4 個) に、各濃度 (20、40 及び 60 $\mu\text{g/ml}$) の recombinant galectin-3 もしくは PBS を加え 37°C、10 分間処理した。同細胞懸濁液に SDS-PAGE sample buffer を加え細胞を溶解後、1-2-7 項に記した方法に従って、以降の実験に用いた。

また、一部の実験においては細胞懸濁液を等分した後、10 μM EGFR/ErbB-2/ErbB-4 inhibitor (Merck Millipore) もしくは DMSO を加え 37°C、1 時間処理した後に上記と同様の実験を行った。

1-2-13. MTT assay

細胞を 96-well plate に播種し、24、48 及び 72 時間培養後、MTT 溶液 (Nacalai Tesque) を加え更に 2 時間培養した。培養上清を除去後、生成された formazan を DMSO により溶解し、測定波長 570 nm、参照波長 630 nm の吸光度を測定した。

1-2-14. Anchorage-dependent clonogenic assay

細胞を 60 mm dish に播種し、2 週間培養した。培養上清を除去し、PBS により洗浄後、4% PFA/PBS 中で室温、20 分間処理し細胞を固定した。蒸留水により洗浄後、0.5% crystal violet/70% MeOH 中で室温、20 分間処理した。蒸留水により洗浄し室温で一晩乾燥後、10% AcOH 中で室温、20 分間振盪して色素を抽出し、測定波長 590 nm の吸光度を測定した。

1-2-15. Wound healing assay

細胞を Culture-Insert (Ibidi) に播種後、24 時間培養した。Culture-Insert を除去し細胞間に間隙を作製後、10 mM hydroxyurea/DMEM 中で 20 時間 (HCT116 細胞由来樹立細胞株) もしくは 7 時間 (SKOV3 細胞由来樹立細胞株) 培養した。また、一部の実験においては、40 $\mu\text{g/ml}$ recombinant galectin-3 を上述した培養液中に加え同様に培養した。Culture-Insert 除去時を 0 時間とし、上述した培養時間経過時に写真を撮影した。Adobe Photoshop (Adobe Systems) により細胞間の間隙の面積を測定した後、0 時間における細胞間の間隙面積を 100% として各培養時間経過後の細胞の移動度を評価した。

1-2-16. Plate assay による合成グリコポリマーと galectin-3 の結合能の測定

0.5 μM 各種合成グリコポリマーを Universal-BIND™ 96-well plate (Corning Inc.) に加え、室温、1 時間静置した。溶液を除き、UV 照射により合成グリコポリマーを固相化後、PBS により洗浄した。2.5% BSA/PBS で室温、2 時間ブロッキングし、PBST (PBS 及び 0.05% Tween-20) により洗浄後、0~2.5 $\mu\text{g/ml}$ に段階希釈した recombinant galectin-3 を含む 1%

BSA/PBS を加え室温、1時間処理した。PBST により洗浄し、ヤギ抗 galectin-3 抗体を含む 1% BSA/PBS により室温、2時間処理後、PBST により洗浄した。HRP 標識ウサギ抗ヤギ IgG (H+L) 抗体を含む 1% BSA/PBS により室温、1時間処理し、PBST により洗浄後、1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate (Thermo Scientific) により発色させた。1 M H₂SO₄ により反応を停止させた後、測定波長 450 nm の吸光度を測定した。

1-2-17. 合成グリコポリマーによる細胞増殖能への影響の検討

0.5% HI-FBS/DMEM に懸濁した細胞を 96-well plate に播種後、0.1 μM 各種合成グリコポリマーを添加した。細胞を 72 時間培養後、1-2-13 項に記した方法に従って、細胞増殖能を評価した。

なお、1-2-16 及び本項で使用した各種合成グリコポリマーは静岡大学農学部応用生命科学科村田健臣博士の御好意により供与して頂いた。

1-2-18. FACS

HCT116/MUC1 細胞 を Cell Dissociation Buffer, enzyme-free, Hank's Balanced Salt Solution により剥離し、0.5% BSA/PBS に懸濁後、0.5 μM (LacNAc)₃ もしくは PBS を加え 4°C、4 時間処理した。0.5% BSA/PBS により洗浄後、ヤギ抗 galectin-3 抗体もしくはコントロール抗体を加え 4°C、1 時間処理した。0.5% BSA/PBS により洗浄後、FITC 標識ウサギ抗ヤギ IgG (H+L) 抗体を含む 0.5% BSA/PBS 中で 4°C、1 時間遮光下で処理した。0.5% BSA/PBS により洗浄後、FACS Calibur (BD Biosciences) により解析した。

1-2-19. 有意差検定

2 個のグループ間のデータの有意性は、two-tailed Student's *t*-test により検討した。また、3 個以上のグループ間のデータの有意性は、one-way analysis of variance による評価後、Tukey-Kramer test もしくは Dunnett's test により評価した。

1-3. 結果

1-3-1. 腫瘍細胞及びヒト腫瘍組織における MUC1 と galectin-3 の分布

MUC1 を強制発現した HCT116 細胞及びそのコントロール細胞 (HCT116/MUC1 及び HCT116/Mock 細胞) における mucin 及び galectin family の mRNA レベルでの発現量を、DNA microarray 解析によって検討した。HCT116/Mock 細胞の mucin については、当解析で検討した全ての膜結合型及び分泌型 mucin の発現は認められず、HCT116/MUC1 細胞においては MUC1 の発現を確認した (図 1A)。また、galectin family では galectin-1 及び galectin-3 が主に発現していることが認められた (図 1B)。更に、同細胞を用いてタンパク質レベルでの各分子の発現量を検討した結果、DNA microarray 解析の結果と同様の傾向が認められた (図 1C)。

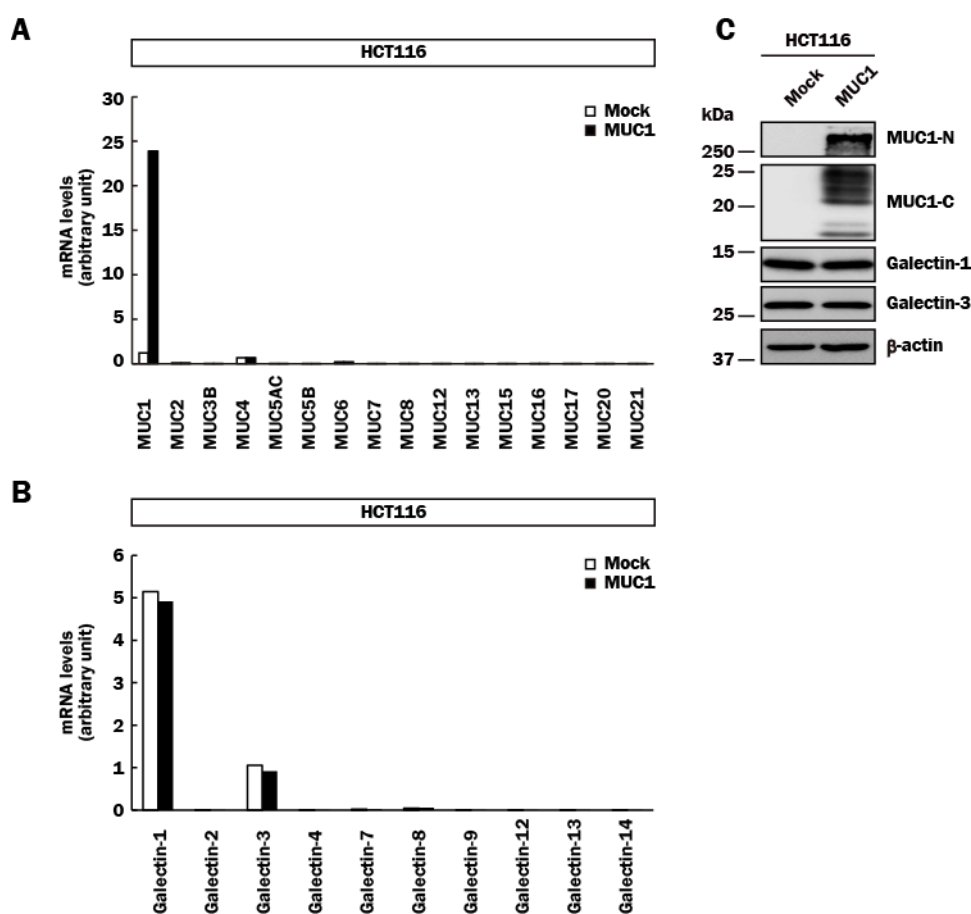


図 1. HCT116 細胞における mucin 及び galectin family の発現

(A, B) HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞における mucin (A) 及び galectin family (B) の mRNA レベルでの発現量を DNA microarray 解析により検討し、ヒストグラムで示した。(C) HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液を電気泳動し、Western blotting 後、MUC1-N、MUC1-C、galectin-1、galectin-3 及び β -actin をそれぞれの抗体を用いて検出した。

MUC1 は多数の *O*-グリコシド型糖鎖を持つ分子であることから、細胞外に分泌された galectin と MUC1 の結合が考えられた。この可能性を検討するために、HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞の細胞表面上に結合した galectin 量を、細胞表面をビオチン標識する手法によって検討した。ビオチン標識された細胞表面の galectin-3 量は、HCT116/MUC1 細胞で増加していることが認められた一方で、ビオチン標識された細胞表面の galectin-1 量については両細胞間で変化は認められなかった (図 2A, B)。また、MUC1 上における β -galactoside の 1 つである TF 抗原の発現は、HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液に TF 抗原結合レクチンである PNA-Agarose を加え PNA 結合性分子を沈降させた後、得られた沈降物中から MUC1-N が検出されたことより確認した (図 2C)。これらの結果から、細胞外に分泌された galectin-3 は TF 抗原を介して MUC1 に結合していることが示唆された。

次いで、上述の結果の普遍性を検討するために、他の細胞株における細胞表面での MUC1 と galectin-3 の結合を検討した。低いレベルの MUC1 が発現している A549 細胞から、MUC1 強制発現細胞及びそのコントロール細胞 (A549/MUC1 及び A549/Mock 細胞) を作製し、また検出可能なレベルの MUC1 を発現している SKOV3 細胞から、MUC1 発現抑制細胞及びそのコントロール細胞 (SKOV3/Si-1、SKOV3/Si-2 及び SKOV3/Scr 細胞) を作製した。これらの細胞における細胞全体の galectin-3 量は MUC1 の発現の増減によって変化しなかったが (図 2D)、ビオチン標識された細胞表面の galectin-3 量は MUC1 の発現に依存して増減した (図 2E, F, G, H)。MUC1 と galectin-3 の結合をより詳細に検討するために、HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液に抗 galectin-3 抗体を加え免疫沈降を行った結果、沈降物中に MUC1-N 及び MUC1-C が検出された (図 2D)。これらの結果から、MUC1 への galectin-3 の結合が示されると共に、同結合は様々な MUC1 発現腫瘍細胞で見られる普遍的な機構である可能性が示唆された。なお、MUC1 は界面活性剤を含む細胞抽出液中でも強い相互作用によってヘテロ二量体を維持していると考えられ、galectin-3 が MUC1-N または MUC1-C のどちらかもしくは双方に結合しているかについては明確ではない。関連する実験結果として、HCT116/MUC1 細胞より調製した MUC1 をグアニジン塩酸塩存在下での CsCl 密度勾配遠心により MUC1-N と MUC1-C に分離し、galectin-3 との結合を検討した結果、MUC1-N への galectin-3 の結合が示され、これは TF 抗原などを含む *O*-グリコシド型糖鎖が MUC1-N 上に付加されていることと一致した (データ未掲載)。

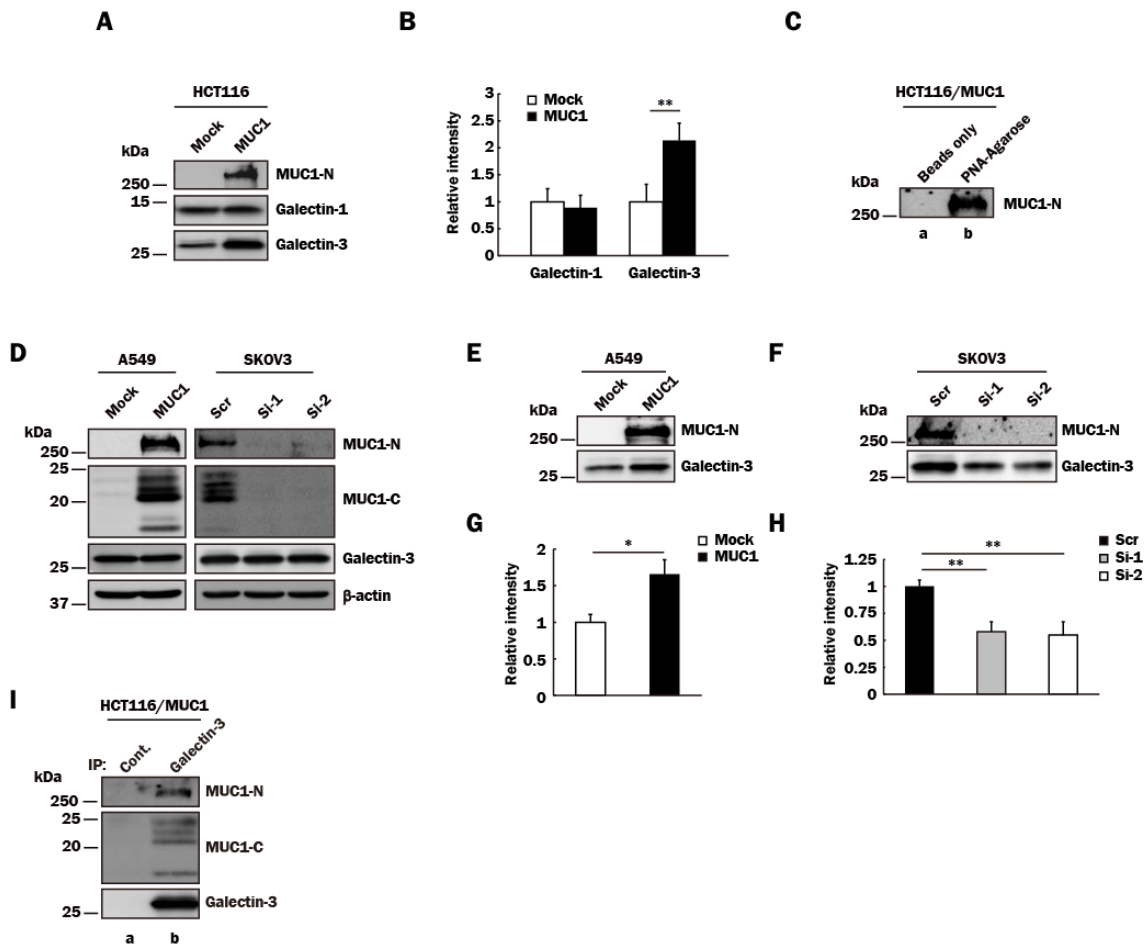


図 2. 様々な MUC1 発現腫瘍細胞における MUC1 への galectin-3 の結合

(A) 細胞表面をビオチン標識した HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液に、streptavidin-Sepharose を加えて得られた沈降物を図 1C に記した方法に従って処理し、MUC1-N、galectin-1 及び galectin-3 を検出した。(B) 図 2A で得られた galectin-1 及び galectin-3 のバンドの濃さを Image J により数値化後、コントロール細胞で得られたバンドの濃さをそれぞれ 1 として相対値をヒストグラムで示した (平均値±標準偏差、 $n=3$ 、** $p<0.01$)。(C) HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液に PNA-Agarose (lane b) もしくは樹脂のみ (lane a) を加えて得られた沈降物を図 1C に記した方法に従って処理し、MUC1-N を検出した。(D) 図 1C に記した方法に従って、A549/Mock、A549/MUC1、SKOV3/Scr、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞の MUC1-N、MUC1-C、galectin-3 及び β -actin を検出した。(E, F) 図 2A に記した方法に従って細胞表面をビオチン標識後、A549/Mock、A549/MUC1 (E)、SKOV3/Scr、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞 (F) の細胞表面の MUC1-N 及び galectin-3 を検出した。(G, H) 図 2E, F で得られた galectin-3 のバンドの濃さを Image J により数値化後、図 2B に記した方法に従って相対値をヒストグラムで示した (平均値±標準偏差、 $n=3$ 、* $p<0.05$ 、** $p<0.01$)。(I) HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液に抗 galectin-3 抗体 (lane b) もしくはコントロール抗体 (lane a) を加えて免疫沈降後、図 1C に記した方法に従って処理し、MUC1-N、MUC1-C 及び galectin-3 を検出した。

前述の結果を受けて、MUC1 発現腫瘍細胞 (HCT116/MUC1 及び SKOV3/Scr 細胞) 及びそれぞれのコントロール細胞 (HCT116/Mock 及び SKOV3/Si-1 細胞) における細胞表面での MUC1 と galectin-3 の分布を細胞免疫染色法により検討した。MUC1 発現腫瘍細胞では細胞表面上で MUC1 と galectin-3 は共局在したが、MUC1 を発現していないコントロール細胞では細胞表面における galectin-3 は検出可能なレベル以下であった (図 3A, C)。Galectin-3 は細胞質や核にも存在するタンパク質であるため、透過処理後の細胞における両分子の分布を観察した結果、細胞内の galectin-3 は MUC1 の発現レベルに係わらずそれぞれの細胞間で同程度検出された (図 3B, D)。更に、HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞の MUC1 と galectin-1 の分布を、抗 MUC1-N 抗体及び抗 galectin-1 抗体により同様に検討した結果、細胞表面あるいは細胞質に分布した galectin-1 は MUC1 の発現レベルに係わらず同程度検出された (図 3E, F)。これらの結果から、細胞表面での MUC1 と galectin-3 の結合が強く示唆され、これは図 2 に示す生化学的な手法による解析結果とも一致した。

更に、実際のヒト癌組織における MUC1 と galectin-3 の分布を免疫組織化学的に検討した。各種ヒト癌患者組織切片 (胃癌、大腸癌、乳癌及び膵臓癌) 及び癌部周囲の非癌部組織切片を抗 MUC1-N 抗体及び抗 galectin-3 抗体を用いて染色した。ヒト癌患者組織切片では MUC1 と galectin-3 は同様の分布を示したが、ヒト非癌部組織切片では両分子の分布は一致しなかった (図 4A, B)。この結果は、癌組織においても内在性の galectin-3 の一部が MUC1 と相互作用していることを示唆している。

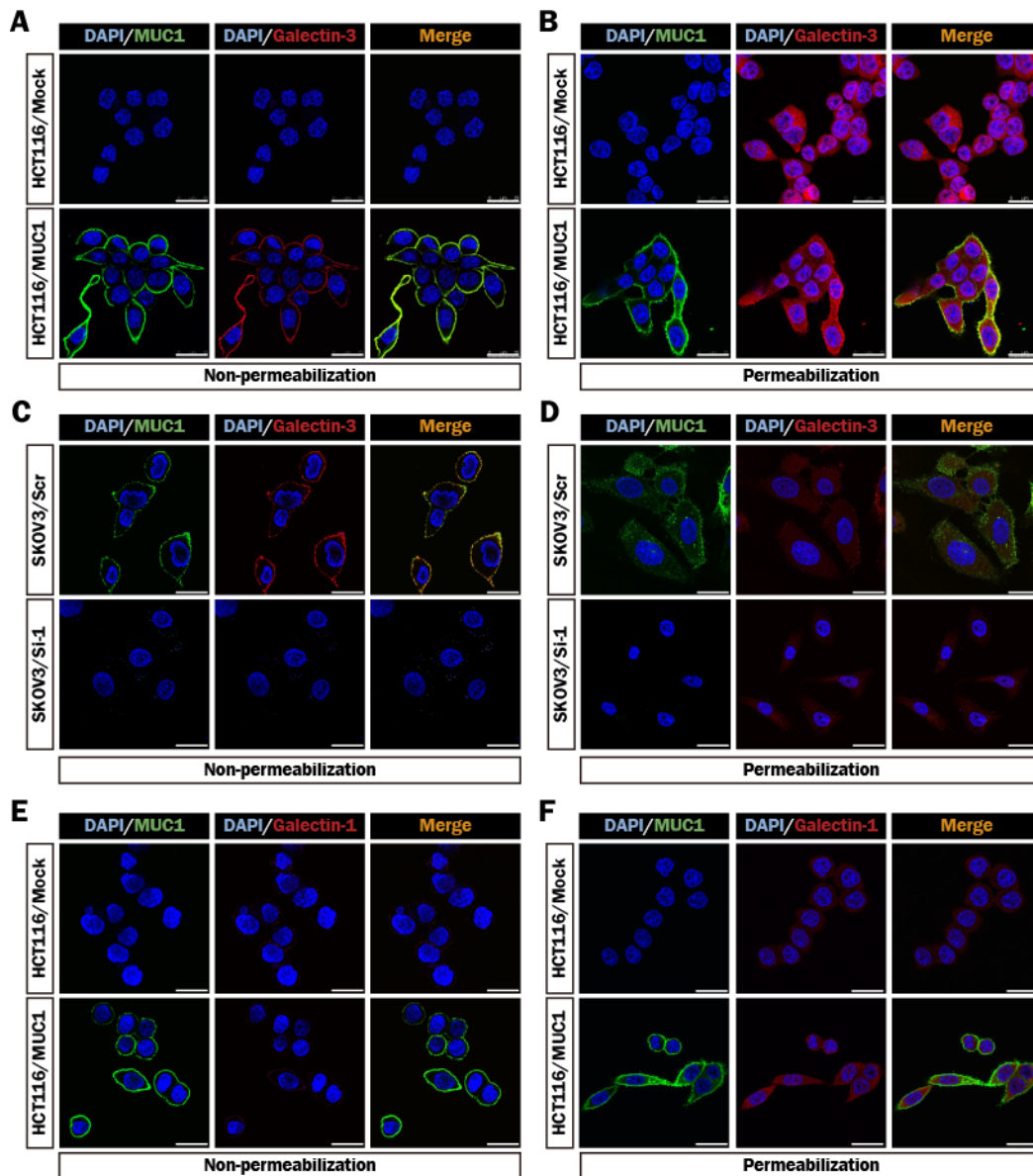
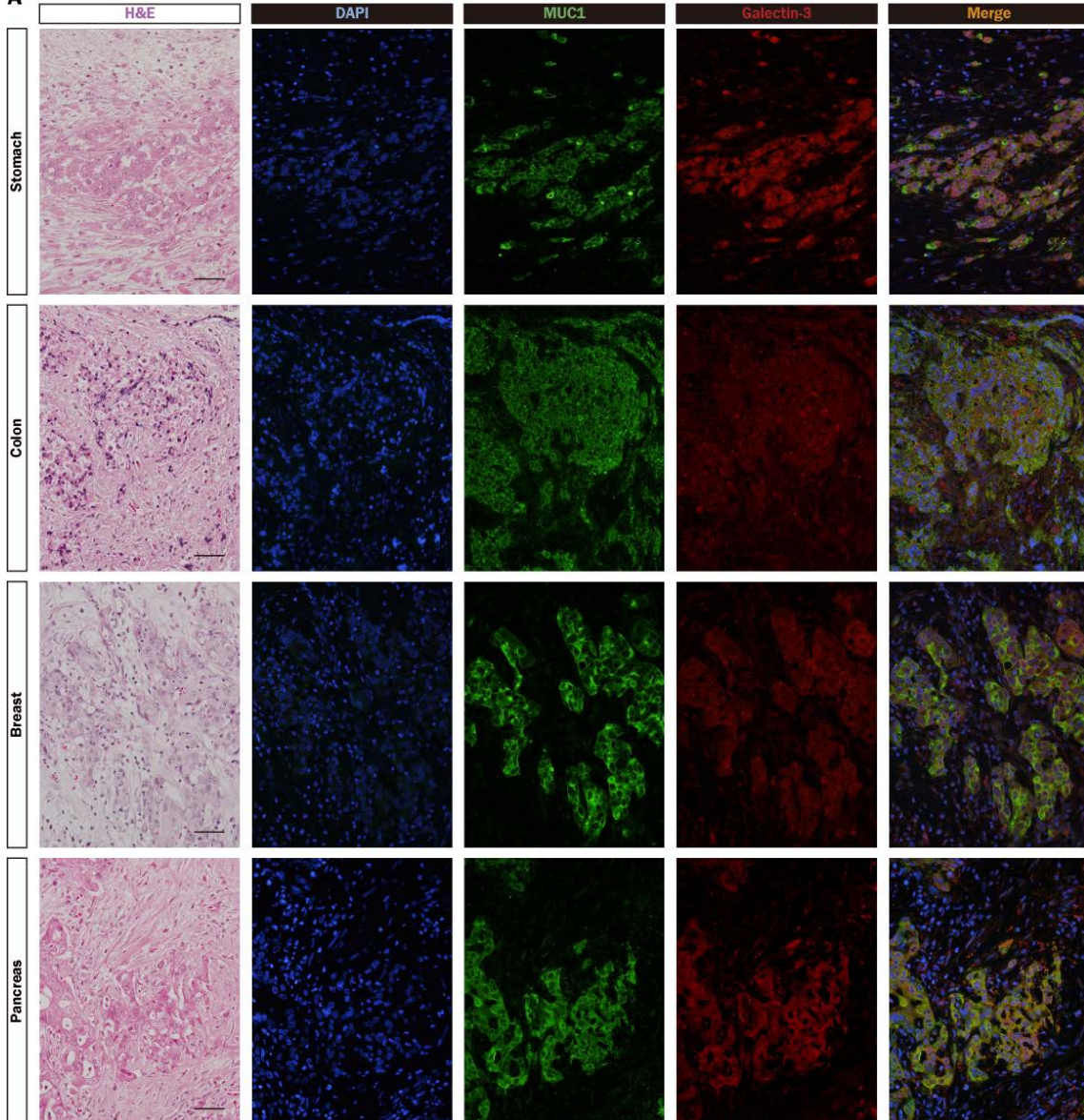


図 3. 様々な MUC1 発現腫瘍細胞における MUC1、galectin-1 及び galectin-3 の分布

(A, C, E) 抗 MUC1-N 抗体と Alexa Fluor[®] 488 標識二次抗体 (緑色) 及び抗 galectin-3 抗体と Alexa Fluor[®] 594 標識二次抗体 (赤色) により、HCT116/Mock、HCT116/MUC1 (A)、SKOV3/Scr 及び SKOV3/Si-1 細胞 (C) における細胞表面の MUC1 及び galectin-3 の分布を調べた。また、抗 MUC1-N 抗体と Alexa Fluor[®] 488 標識二次抗体 (緑色) 及び抗 galectin-1 抗体と Alexa Fluor[®] 594 標識二次抗体 (赤色) により、HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞 (E) における細胞表面の MUC1 及び galectin-1 の分布を細胞免疫染色法により調べた。(B, D, F) 図 3A, C, E に記した抗体を用いて、HCT116/Mock、HCT116/MUC1 (B)、SKOV3/Scr 及び SKOV3/Si-1 細胞 (D) における MUC1 及び galectin-3 の分布と HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞 (F) における MUC1 及び galectin-1 の分布を、透過処理条件下で細胞免疫染色法により調べた。核は DAPI (青色) により染色した。倍率: ×630; スケールバー: 25 µm。

A



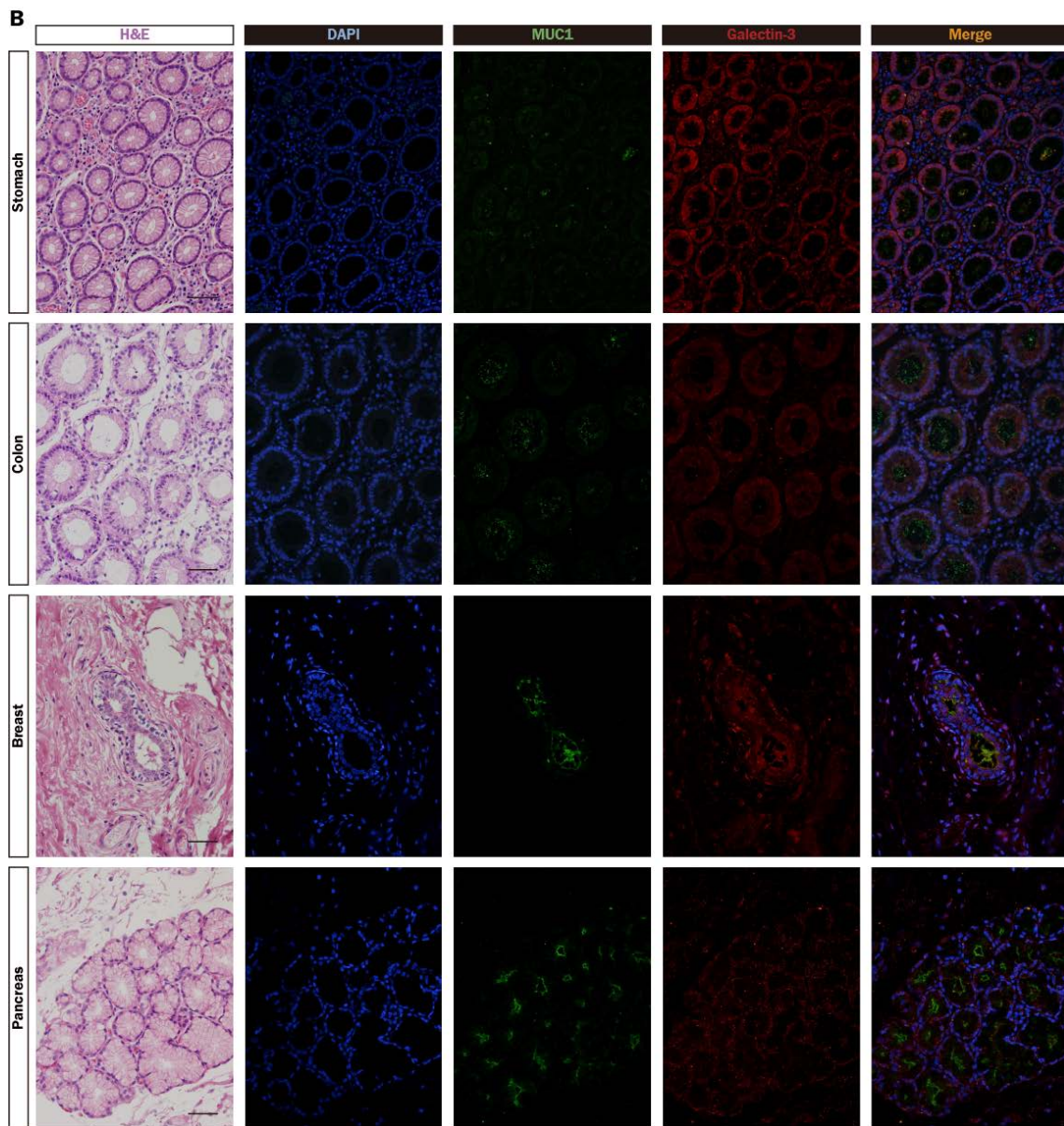


図 4. 様々な癌組織及び非癌部組織における MUC1 及び galectin-3 の分布

(A, B) パラフィン包埋したヒト癌組織切片 (胃癌、大腸癌、乳癌、膵臓癌 (A)) 及び癌部周囲の非癌部組織切片 (B) を H&E、DAPI (青色) 及び抗 MUC1-N 抗体と Alexa Fluor[®] 488 標識二次抗体 (緑色)、抗 galectin-3 抗体と Alexa Fluor[®] 594 標識二次抗体 (赤色) を用いて染色した。倍率: ×200; スケールバー: 100 μm。

1-3-2. MUC1 への galectin-3 の結合に伴うシグナル伝達

MUC1 は増殖因子受容体と相互作用することで、増殖因子依存的なシグナル伝達を補助することが過去に報告されているが、一方で ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) や Siglec-9 (sialic acid binding Ig-like lectin 9)、もしくは細菌の一種である緑膿菌が MUC1 に直接結合することでシグナル伝達を誘導することが報告されている [36-39]。これらの知見から、MUC1 への galectin-3 の結合に伴うシグナル伝達の誘導が考えられた。増殖因子を起点とした MUC1 介在性のシグナル伝達では、MUC1-C 中の tyrosine 残基のリン酸化が重要とされていることから [1]、MUC1 への galectin-3 の結合に伴う MUC1-C 中の tyrosine 残基のリン酸化について検討した。Galectin-3 により処理した HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液より免疫沈降した MUC1 中のリン酸化 tyrosine を検出した結果、分子量 25 kDa 付近にリン酸化 tyrosine を含む MUC1-C のバンドが検出された。加えて、このリン酸化レベルは galectin-3 処理により亢進 (約 2.3 倍) していた (図 5A, B)。この結果から、MUC1 への galectin-3 の結合が MUC1-C 中の tyrosine 残基のリン酸化を誘導することが示唆された。また、細胞表面をビオチン標識した HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液より免疫沈降した MUC1 を HRP 標識 streptavidin で検出した結果、通常 MUC1-C は糖鎖付加のレベルに応じて分子量 15~25 kDa 間の複数のバンドとして検出されるが、本手法では 25 kDa 付近のバンドのみが検出された (図 5C)。

次いで、MUC1-C のリン酸化に伴うシグナル伝達経路の活性化について検討した。Galectin-3 により処理した HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液を電気泳動し、Western blotting 後に MAPK シグナル伝達経路の構成分子である ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) のリン酸化を検出した結果、HCT116/Mock 細胞では galectin-3 処理によって変化しなかった一方、HCT116/MUC1 細胞では galectin-3 処理によりリン酸化が約 1.5 倍亢進した (図 5D, G)。また、同様の方法で PI3K/Akt シグナル伝達経路の構成分子である Akt のリン酸化を検出した結果、galectin-3 処理により HCT116/Mock 細胞でもリン酸化の亢進 (約 2 倍) が認められたが、HCT116/MUC1 細胞でより高いリン酸化の亢進 (約 4 倍) が認められた (図 5D, H)。また、galectin-3 処理に伴う両分子のリン酸化亢進は、他の MUC1 発現腫瘍細胞 (A549/MUC1 及び SKOV3/Scr 細胞) においても同様に認められ (図 5E, F, G, H)、加えて両分子のリン酸化は galectin-3 の濃度に依存して亢進した (図 6)。これらの結果から、MUC1 への galectin-3 の結合は MAPK 及び PI3K/Akt シグナル伝達経路を活性化させることが示唆された。

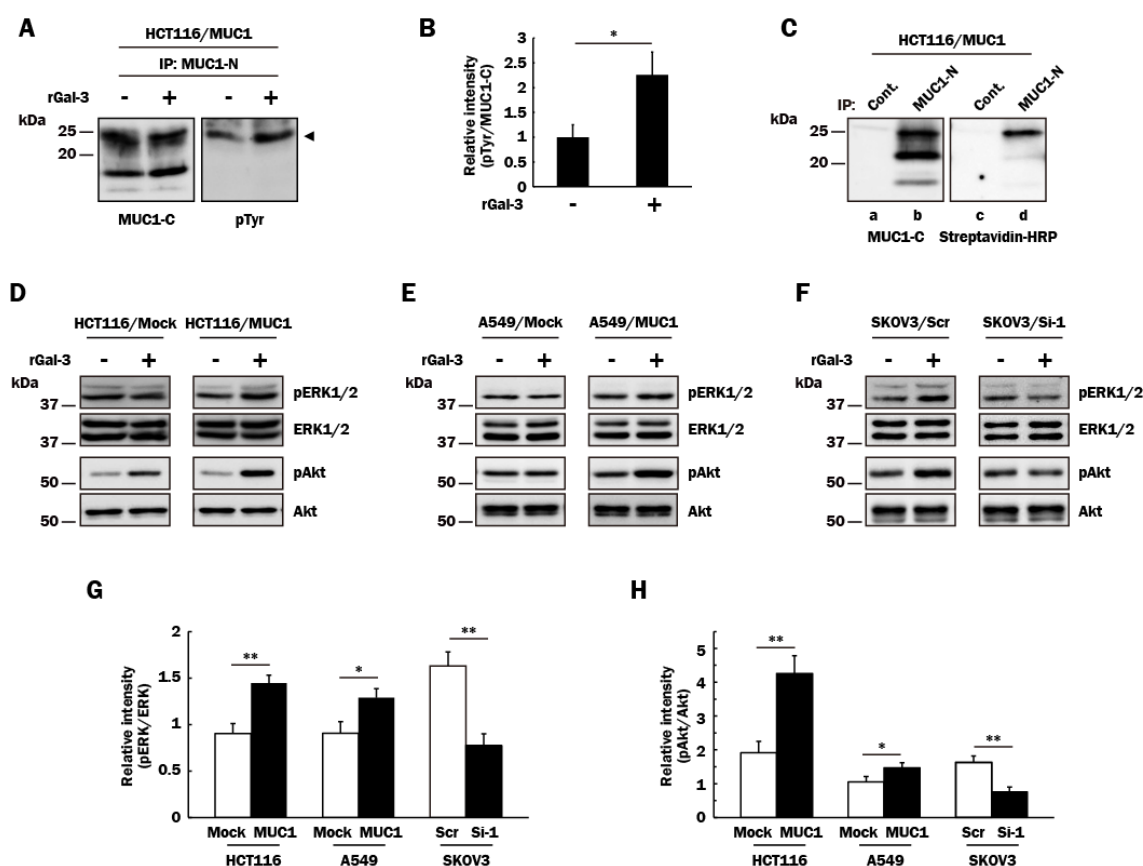


図 5. MUC1 への galectin-3 の結合を介した ERK1/2 及び Akt のリン酸化

(A) 細胞表面の galectin-3 を除去した HCT116/MUC1 細胞を recombinant galectin-3 (40 μ g/ml: rGal-3+) もしくは PBS (rGal-3-) により 4 分間処理後、同細胞抽出液より抗 MUC1-N 抗体を用いて MUC1 を免疫沈降した。図 1C に記した方法に従って、MUC1-C 及びリン酸化 tyrosine (pTyr) を検出した。矢頭はリン酸化された MUC1-C を示す。(B) 図 5A で得られた MUC1-C 及び pTyr のバンドの濃さを Image J により数値化後、MUC1-C 当たりの pTyr (=リン酸化 MUC1-C) の値を算出し、PBS 処理時の値を 1 とした時の相対値をヒストグラムで示した (平均値 \pm 標準偏差、 $n=3$ 、* $p<0.05$)。(C) 図 2A に記した方法に従って細胞表面をビオチン標識した HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液に、抗 MUC1-N 抗体 (lanes b, d) もしくはコントロール抗体 (lanes a, c)を加えて免疫沈降後、図 1C に記した方法に従って抗 MUC1-C 抗体もしくは HRP 標識 streptavidin により検出した。(D, E, F) 細胞表面の galectin-3 を除去した HCT116/Mock、HCT116/MUC1 (D)、A549/Mock、A549/MUC1 (E)、SKOV3/Scr 及び SKOV3/Si-1 細胞 (F) を recombinant galectin-3 (40 μ g/ml: rGal-3+) もしくは PBS (rGal-3-) により 10 分間処理後、図 1C に記した方法に従って、リン酸化 ERK1/2 (pERK1/2)、ERK1/2、リン酸化 Akt (pAkt) 及び Akt を検出した。(G, H) 図 5D, E, F で得られた各バンドの濃さを Image J により数値化後、ERK1/2 当たりの pERK1/2 (G) 及び Akt 当たりの pAkt の値 (H) を算出し、それぞれの細胞における PBS 処理時の値を 1 とした時の、galectin-3 処理時の相対値をヒストグラムで示した (平均値 \pm 標準偏差、 $n=3$ 、* $p<0.05$ 、** $p<0.01$)。

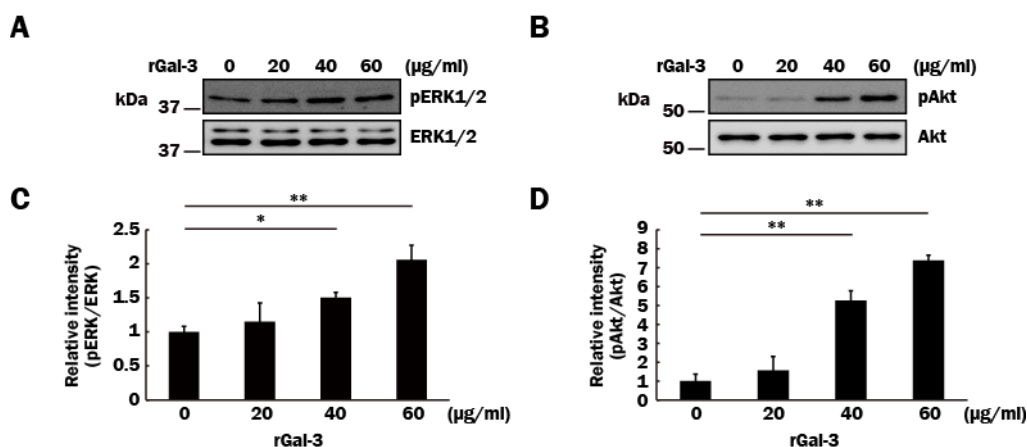


図 6. MUC1 への galectin-3 の結合を介した ERK1/2 及び Akt のリン酸化における galectin-3 の濃度依存性

(A, B) 図 5D, E, F に記した方法に従って、recombinant galectin-3 (0~60 μg/ml: rGal-3) により HCT116/MUC1 細胞を処理し、pERK1/2、ERK1/2、pAkt 及び Akt を検出した。(C, D) 図 6A, B で得られた各バンドの濃さを Image J により数値化後、図 5G, H に記した方法に従って値を算出した。PBS 処理時の値をそれぞれ 1 として相対値をヒストグラムで示した (平均値±標準偏差、n=3、* $p<0.05$ 、** $p<0.01$)。

Galectin-3 は EGFR と MUC1 の相互作用に関わり、EGF を起点とする MUC1 介在性のシグナル伝達に関与することが報告されている [35]。本研究で用いた HCT116/MUC1 細胞には EGFR が発現していることから [39]、前述の結果で示されたシグナル伝達への EGFR の関与が考えられた。この可能性を検討するために、EGFR の活性化を阻害したうえで galectin-3 による処理を行い、シグナル伝達活性化への影響を検討した。HCT116/MUC1 細胞における EGFR 阻害剤 (10 μM) の抑制効果をあらかじめ確認したうえで (データ未掲載)、同濃度の阻害剤存在下での galectin-3 処理による ERK1/2 及び Akt のリン酸化への影響を検討した。その結果、EGFR 阻害剤存在下であっても両分子のリン酸化は亢進し、そのレベルは阻害剤非存在下での結果と同程度であった (図 7)。これらの結果から、ERK1/2 及び Akt のリン酸化は MUC1 への galectin-3 の結合に伴うシグナル伝達によって誘導されるが、本機構に EGFR は関与していないことが示された。

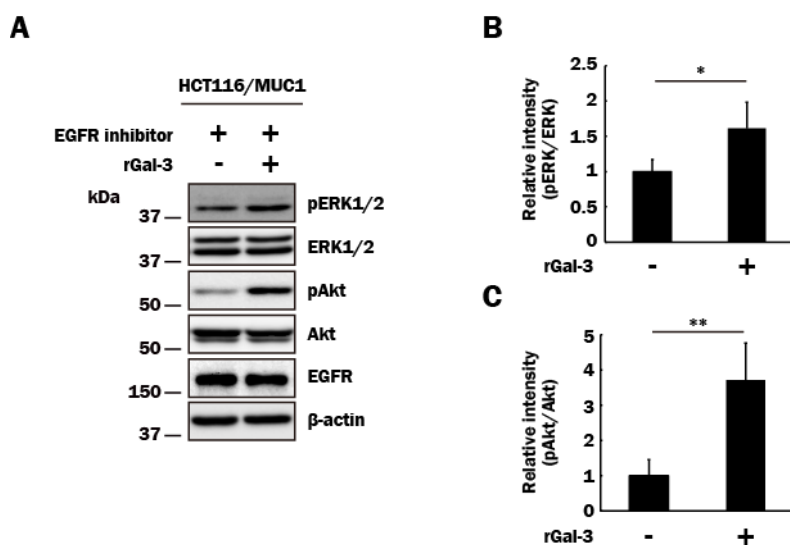


図 7. EGFR 阻害剤存在下における MUC1 への galectin-3 の結合を介した ERK1/2 及び Akt のリン酸化

(A) 細胞表面の galectin-3 を除去した HCT116/MUC1 細胞を EGFR 阻害剤 (10 μ M) により 1 時間処理後、図 5D, E, F に記した方法に従って、recombinant galectin-3 (40 μ g/ml: rGal-3+) もしくは PBS (rGal-3-) により細胞を処理し、pERK1/2、ERK1/2、pAkt 及び Akt を検出した。(B, C) 図 7A で得られた各バンドの濃さを Image J により数値化後、図 5G, H に記した方法に従って値を算出した。PBS 処理時の値をそれぞれ 1 として相対値をヒストグラムで示した (平均値 \pm 標準偏差、 $n=4$ 、* $p<0.05$ 、** $p<0.01$)。

シグナル伝達活性化における galectin-3 の多量体化の重要性を検討する目的で、多量体形成能を欠損した galectin-3 (cleaved galectin-3) を調製した (図 8A)。Cleaved galectin-3 処理による HCT116/MUC1 細胞の ERK1/2 及び Akt のリン酸化への影響を検討した結果、intact galectin-3 処理により誘導された両分子のリン酸化と比較して顕著に減少したことから (図 8B, C, D)、MUC1 への galectin-3 の結合に伴うシグナル伝達には galectin-3 の多量体化が重要であることが示唆された。

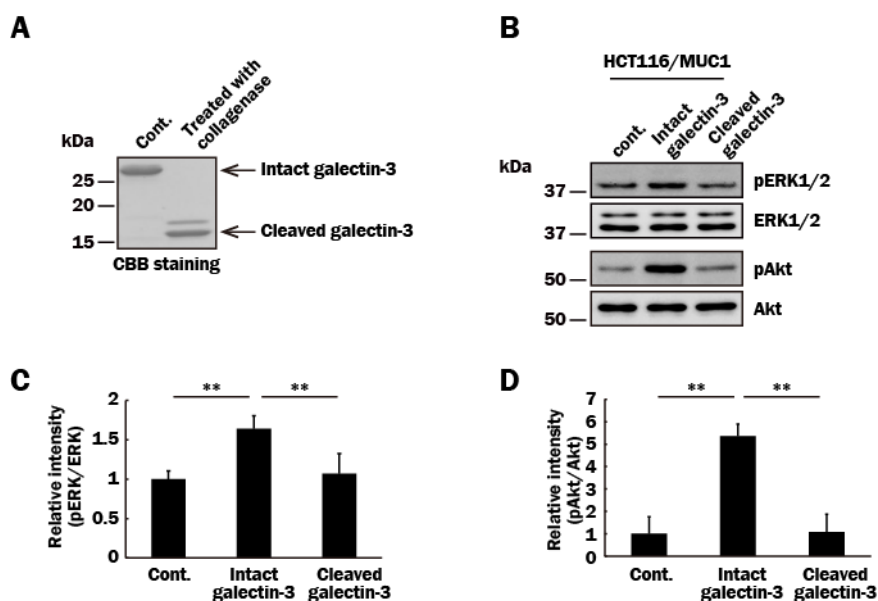


図 8. MUC1 への intact または cleaved galectin-3 の結合に伴う ERK1/2 及び Akt のリン酸化レベルの比較

(A) Collagenase type VII (cleaved galectin-3) もしくは PBS (intact galectin-3) により処理した recombinant galectin-3 を電気泳動後、CBB 染色により検出した。(B) 細胞表面の galectin-3 を除去した HCT116/MUC1 細胞を intact galectin-3, cleaved galectin-3 (それぞれ 40 $\mu\text{g/ml}$) もしくは PBS により 10 分間処理後、図 5D, E, F に記した方法に従って、pERK1/2、ERK1/2、pAkt 及び Akt を検出した。(C, D) 図 8B で得られた各バンドの濃さを Image J により数値化後、図 5G, H に記した方法に従って値を算出した。PBS 処理時の値をそれぞれ 1 として相対値をヒストグラムで示した (平均値 \pm 標準偏差、 $n=3$ 、** $p<0.01$)。

1-3-3. MUC1 への galectin-3 の結合に伴うシグナル伝達活性化による腫瘍悪性化

MUC1 への galectin-3 の結合に伴う細胞増殖能及び移動能への影響について検討した。MUC1 発現腫瘍細胞 (HCT116/MUC1、A549/MUC1 及び SKOV3/Scr 細胞) 及びそれぞれのコントロール細胞 (HCT116/Mock、A549/Mock、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞) の細胞増殖を経時的に比較した結果、MUC1 発現腫瘍細胞において細胞増殖が亢進していた (図 9A, B, C)。また、HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞を用いた anchorage-dependent clonogenic assay による評価でも、上述の結果と同様の傾向が認められた (図 9D, E)。更に、MUC1 発現腫瘍細胞 (HCT116/MUC1 及び SKOV3/Scr 細胞) 及びそれぞれのコントロール細胞 (HCT116/Mock、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞) を用いた wound healing assay を行った。本手法により細胞移動能を評価するうえで細胞増殖能の影響が考えられたため、DNA 合成阻害剤である hydroxyurea 存在下での細胞移動能を検討した結果、MUC1 発現腫瘍細胞において細胞移動が亢進していた (図 10)。これらの結果は、細胞増殖能や移動能が MUC1 の発現レベルと相関することを示している。

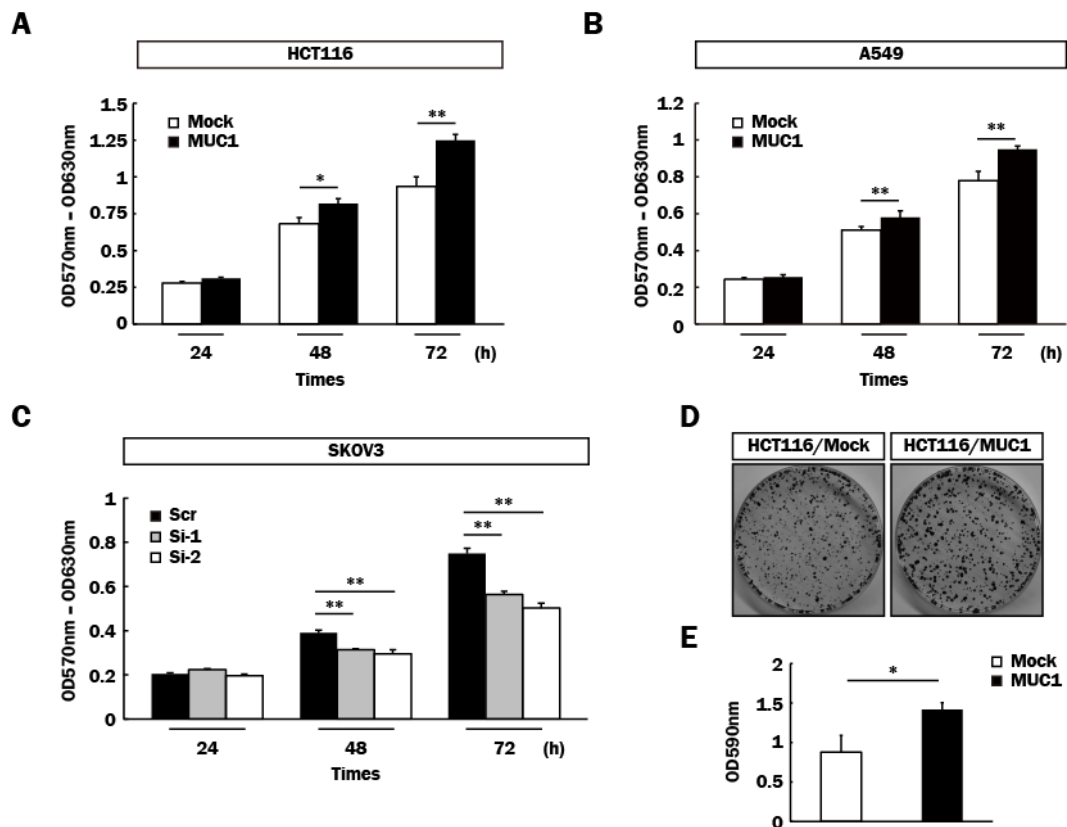


図 9. 様々な MUC1 発現腫瘍細胞における細胞増殖能

(A, B, C) HCT116/Mock, HCT116/MUC1 (5×10^3 個 (A)), A549/Mock, A549/MUC1 (2×10^3 個 (B)), SKOV3/Scr, SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞 (2×10^3 個 (C)) を播種し、24、48 及び 72 時間培養後、MTT assay を行った (平均値 \pm 標準偏差、 $n=3$ 、* $p<0.05$ 、** $p<0.01$)。 (D) HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞 (5×10^3 個) を播種し、2 週間培養した。細胞を固定後、crystal violet により染色した。 (E) 図 9D で得られた染色後の細胞から crystal violet 色素を抽出し、吸光度を測定した (平均値 \pm 標準偏差、 $n=3$ 、* $p<0.05$)。

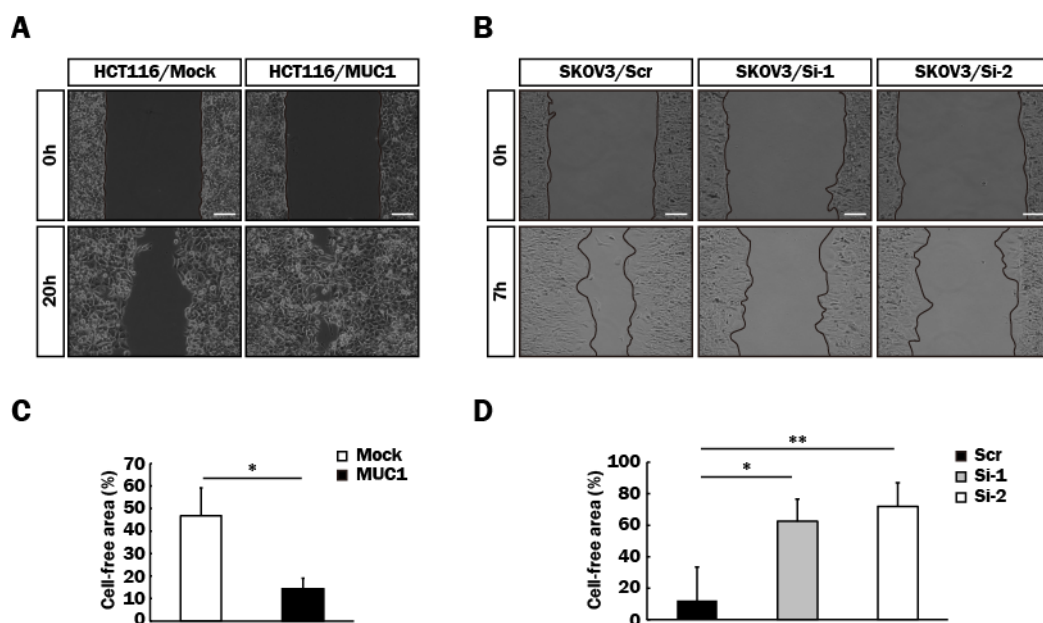


図 10. 様々な MUC1 発現腫瘍細胞における細胞移動能

(A, B) Culture-Insert を用いて HCT116/Mock、HCT116/MUC1 (A)、SKOV3/Scr、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞 (B) を培養し、間隙を作製した。更に、hydroxyurea (10 mM) 存在下で 20 時間 (A) もしくは 7 時間 (B) 培養し、培養前後の写真を撮影した。倍率: $\times 100$; スケールバー: 100 μm 。 (C, D) 各培養時間前後における細胞間隙領域の面積を測定し、それぞれの細胞における培養前の値を 100% とした時の、20 時間 (C) 及び 7 時間 (D) 培養後の値の割合をヒストグラムで示した (平均値 \pm 標準偏差, $n=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$)。

これまでの結果より、MUC1 発現腫瘍細胞の悪性化に、MUC1 への galectin-3 の結合に伴うシグナル伝達が関与している可能性が強く示唆された。従って、内在性の galectin-3 の発現を抑制することで MUC1 への galectin-3 の結合が減少し、悪性化の誘導が抑制されることが考えられた。Galectin-3 shRNA により HCT116/MUC1 細胞の内在性の galectin-3 の発現を抑制した細胞 (HCT116/MUC1-Gal-3/Si 細胞) 及びそのコントロール細胞 (HCT116/MUC1-Scr 細胞) を作製し、それぞれの細胞における細胞全体及び細胞表面に存在する galectin-3 量を比較した結果、HCT116/MUC1-Gal-3/Si 細胞においていずれの galectin-3 量も減少していた (図 11A, B, C)。また、細胞増殖能及び移動能についても両細胞間で比較した結果、HCT116/MUC1-Gal-3/Si 細胞においてこれらの細胞機能の抑制が認められた (図 11D, E, F, G, H)。また、低下した HCT116/MUC1-Gal-3/Si 細胞の細胞移動能は、galectin-3 を培養液に加えることによってコントロール細胞と同程度まで回復した (図 11G, H)。

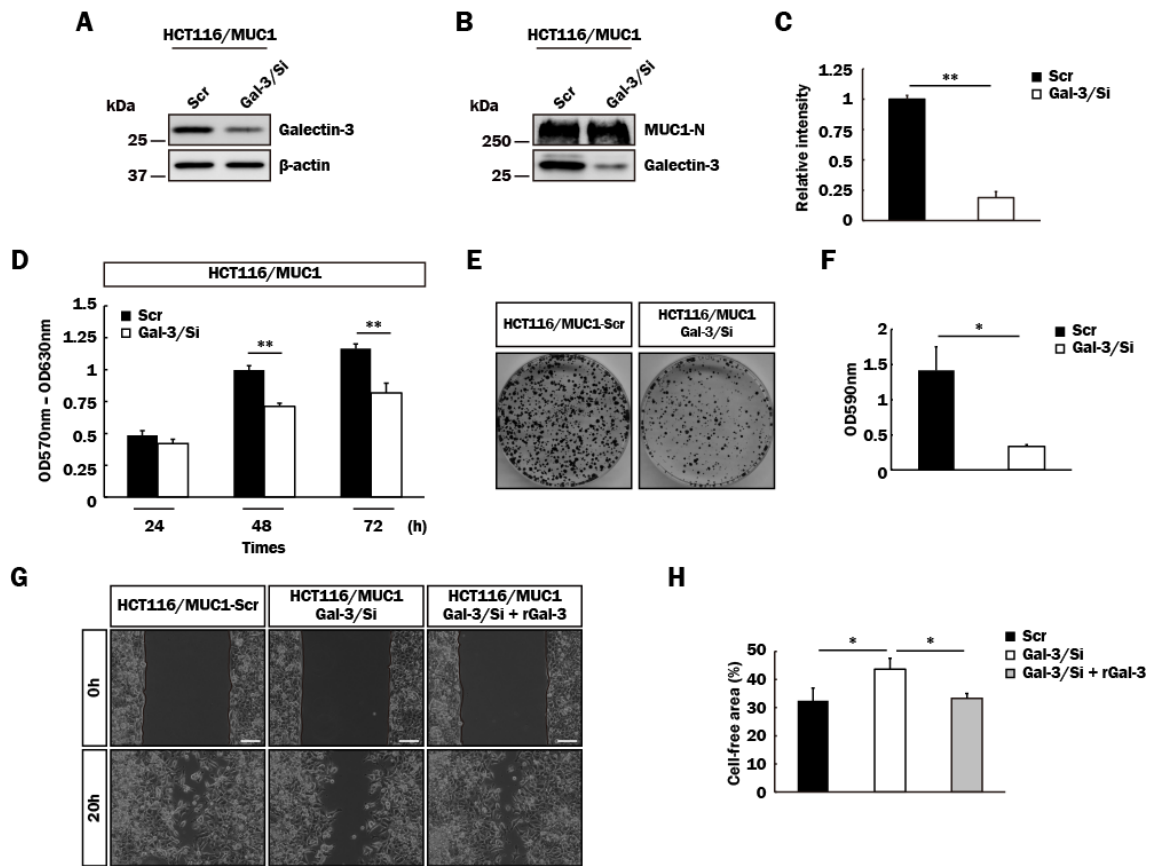


図 11. HCT116/MUC1 細胞の galectin-3 発現抑制に伴う細胞増殖能及び移動能への影響

(A) 図 1C に記した方法に従って、HCT116/MUC1-Scr 及び HCT116/MUC1-Gal-3/Si 細胞の galectin-3 及び β -actin を検出した。(B) 図 2A に記した方法に従って細胞表面をビオチン標識した HCT116/MUC1-Scr 及び HCT116/MUC1-Gal-3/Si 細胞の、細胞表面の MUC1-N 及び galectin-3 を検出した。(C) 図 11B で得られた galectin-3 のバンドの濃さを Image J により数値化後、図 2B に記した方法に従って相対値をヒストグラムで示した (平均値 \pm 標準偏差、 $n=3$ 、** $p < 0.01$)。(D) HCT116/MUC1-Scr 及び HCT116/MUC1-Gal-3/Si 細胞 (1×10^4 個) を播種し、図 9A, B, C に記した方法に従って細胞増殖を測定した (平均値 \pm 標準偏差、 $n=3$ 、** $p < 0.01$)。(E, F) HCT116/MUC1-Scr 及び HCT116/MUC1-Gal-3/Si 細胞 (5×10^3 個) を播種し、図 9D, E に記した方法に従って足場依存的な細胞増殖を測定した (平均値 \pm 標準偏差、 $n=3$ 、* $p < 0.05$)。(G, H) 図 10A, B に記した方法に従って間隙を作製した HCT116/MUC1-Scr 及び HCT116/MUC1-Gal-3/Si 細胞を、図 10A, B に記した方法に従って 20 時間培養した。HCT116/MUC1-Gal-3/Si 細胞においては、recombinant galectin-3 (40 μ g/ml: rGal-3) を加えて、同様に培養した。培養前後の細胞間隙の面積を測定後、図 10C, D に記した方法に従って培養後の細胞間隙面積の割合をヒストグラムで示した (平均値 \pm 標準偏差、 $n=3$ 、* $p < 0.05$)。倍率: $\times 100$; スケールバー: 100 μ m。

次いで、MUC1 への galectin-3 の結合を阻害することによる腫瘍悪性化抑制効果を検討した。Galectin-3 は LacNAc (*N*-acetyllactosamine) に対して強い親和性を持つが、LacNAc の繰り返し構造の数が増加するほど、その親和性も増大することが報告されている [40]。ポリグルタミン酸骨格上に LacNAc もしくは同ユニットの 2 個または 3 個の繰り返し構造を持つ合成グリコポリマー ((LacNAc)₁、(LacNAc)₂ 及び (LacNAc)₃) の増殖抑制効果を検討した (図 12A)。まず、plate assay により合成グリコポリマーと galectin-3 の結合を検討した結果、LacNAc の繰り返し構造の数が多いほど galectin-3 の結合活性は高く (図 12B)、従来の報告と一致した。合成グリコポリマー存在下での HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞の細胞増殖について検討した結果、LacNAc の繰り返し構造の数が多いほど細胞増殖はより強く抑制され、更に HCT116/MUC1 細胞においてより高い抑制効果が認められた (図 12C)。この結果は、galectin-3 の結合が細胞表面の MUC1 と合成グリコポリマーとの間で拮抗し、galectin-3 の一部が細胞表面の MUC1 から離脱したことによる可能性を示唆している。実際、HCT116/MUC1 細胞における細胞表面の galectin-3 量は、(LacNAc)₃ の処理により減少した (図 12D)。

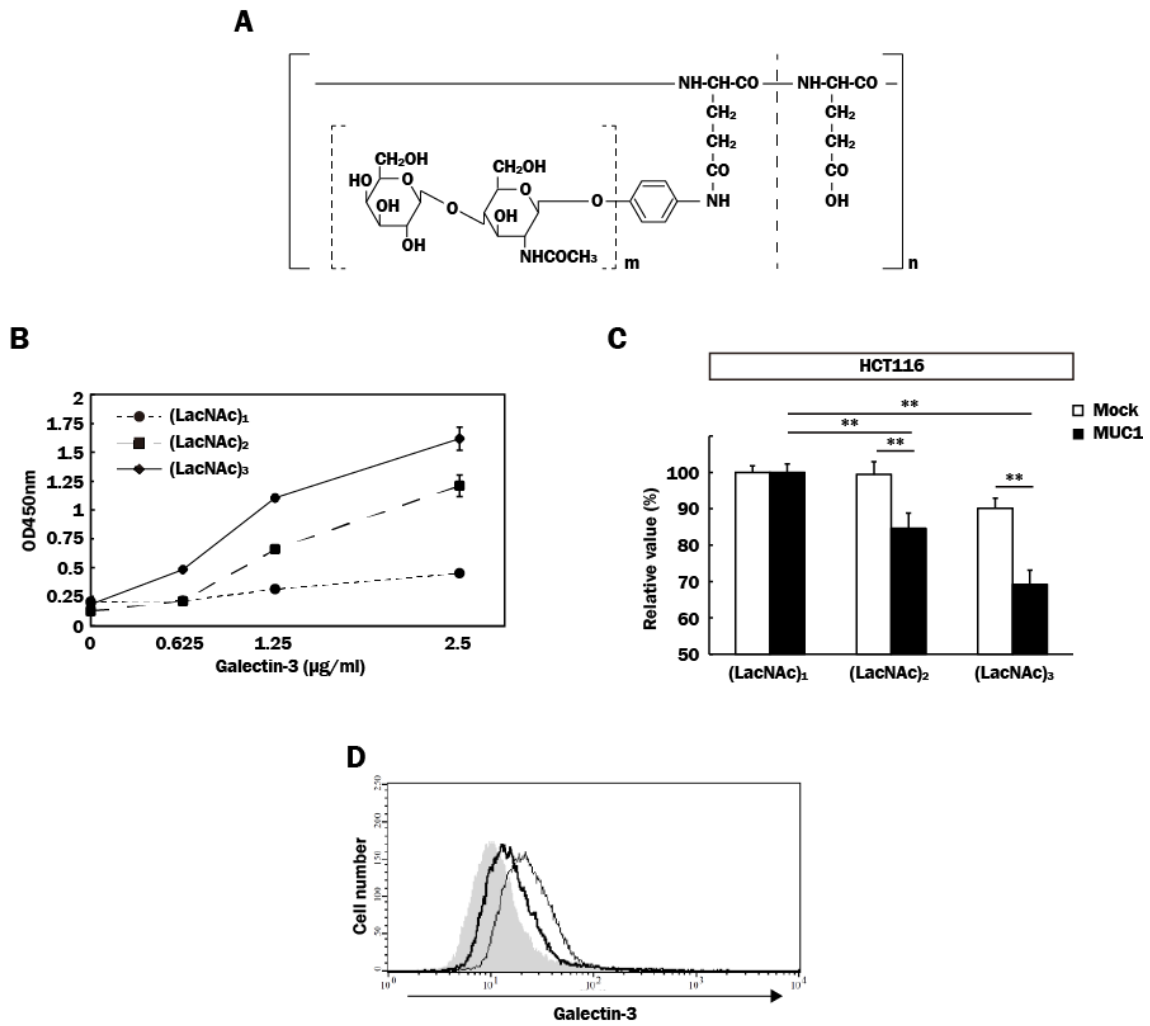


図 12. 細胞増殖に対する galectin-3 結合性合成グリコポリマーによる抑制効果

(A) 合成グリコポリマーの構造模式図を示す。m: LacNAc の繰り返し構造数 ($m=1\sim3$); n: グルタミン酸骨格の長さ ($n=467$)。 (B) 固相化した各種合成グリコポリマー ($0.5\ \mu\text{M}$) に対する galectin-3 の結合活性を plate assay により測定した (平均値 \pm 標準偏差, $n=3$)。 (C) 0.5% HI-FBS 及び各種合成グリコポリマー ($0.1\ \mu\text{M}$) を含む培養液に懸濁した HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞 (1×10^4 個) を播種し、72 時間培養後、MTT assay により各種合成グリコポリマーの細胞増殖への影響を検討した。(LacNAc)₁ 処理時の値をそれぞれ 100% として相対値をヒストグラムで示した (平均値 \pm 標準偏差, $n=4$, ** $p<0.01$)。 (LacNAc)₁₋₃: 合成グリコポリマー中の LacNAc 繰り返し構造数 (1~3) を示す。 (D) (LacNAc)₃ もしくは PBS により処理した HCT116/MUC1 細胞における細胞表面の galectin-3 を、抗 galectin-3 抗体を用いて FACS により検出した。コントロール抗体: gray fill、PBS: thin line、(LacNAc)₃: thick line。

1-4. 考察

MUC1 及び galectin-3 の発現量の亢進は、様々な悪性腫瘍において予後の経過との関連性が報告されているが、MUC1 と galectin-3 の協同的な機能としては MUC1 への galectin-3 の結合に伴う細胞接着への影響以外あまり報告されていない。

現在までに多くの mucin 及び galectin が同定されている [1, 17]。本研究では、DNA microarray 解析によって、HCT116 細胞では MUC1 を含む全ての mucin の発現が確認されなかった (図 1A)。仮にいずれかの mucin が内在的に発現していた場合、MUC1 だけでなく他の mucin にも galectin が結合する結果、MUC1 への galectin の結合及び同機構を介した細胞機能の誘導が減弱される可能性が考えられた。これらの懸念から、今回行った全ての実験において HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞を主に使用した。MUC1 の発現の有無による galectin-1 及び galectin-3 の発現に変化は認められなかったが (図 1C)、細胞表面における存在量は galectin-3 のみ HCT116/MUC1 細胞で増加していた (図 2A, B)。MUC1 は galectin-3 遺伝子に対する microRNA の発現を抑制することにより、galectin-3 の発現亢進に関与することが報告されているが [35]、一方で同一のグループから、ヒト肺癌細胞株である H1975 細胞において、MUC1 発現の増減に伴う galectin-3 の発現量の変化は認められなかったことが報告されている [41]。今回の実験では、MUC1 の発現を増減させることで galectin-3 の発現量に変化は見られず、MUC1 による galectin-3 の発現制御に関しては細胞種によるという後者の報告と一致した。また、一般的に galectin family は TF 抗原のような β -galactoside に対して高い結合親和性を有するが、その結合親和性は galectin 間で一定ではなくそれぞれで異なることが報告されている [40, 42]。MUC1 上に発現している TF 抗原の場合、galectin-1 より galectin-3 でより高い結合親和性を示すことから [42, 43]、galectin-1 及び galectin-3 は共に細胞外に分泌されるが、galectin-3 が優先的に MUC1 上の TF 抗原に結合したことを示唆している。MUC1 と galectin-3 の相互作用は、複数のヒト癌患者組織切片においても認められたが (図 4A)、癌部周囲の非癌部組織切片では MUC1 の発現はわずかであり、galectin-3 の分布とも異なっていた (図 4B)。この結果は、恐らく正常組織では MUC1 が apical 側にのみ発現していること及び TF 抗原が MUC1 上に付加されていないことに起因すると考えられる。

MUC1 への galectin-3 の結合によるシグナル伝達として、本研究では galectin-3 による MUC1-C のリン酸化の亢進を示した。しかしながら、リン酸化 tyrosine を含む MUC1-C のバンドは 25 kDa 付近の 1 本のみであり (図 5A, B)、またビオチン標識された MUC1-C も、25 kDa 付近の 1 本のみであった (図 5C)。この結果と関連して、同様に Li らは、tyrosine 残基を含む分子量 25 kDa 付近の MUC1-C のみが増殖因子/増殖因子受容体により誘導されたシグナル伝達によってリン酸化されることを報告している [34]。これらの結果から、25 kDa 付近の MUC1-C は MUC1-N と複合体を形成し細胞表面に発現することでリン酸化の制御を受けるが、他の分子種は細胞内輸送過程中的の中間体であり、リン酸化の制御を受ける部位に存在していないことが考えられる。Galectin-3 処理による MUC1-C のリン酸化

に付随して、ERK1/2 及び Akt のリン酸化の亢進が認められ (図 5)、更に両分子のリン酸化亢進は、galectin-3 濃度依存的であった (図 6)。しかしながら、両分子のリン酸化亢進には数十マイクログラム以上の galectin-3 が必要であり、本研究結果が生理的な条件を反映した現象であるか否かは疑問が残っている。この点に関連して、Zhao らは大腸癌患者の血中 galectin-3 濃度が 5 $\mu\text{g/ml}$ 程度まで上昇していることを報告しているが [31]、本研究で用いた濃度よりは低濃度である。しかし腫瘍組織微小環境下では、腫瘍細胞だけでなく腫瘍周囲の炎症性細胞や間質細胞からも galectin-3 は分泌され、腫瘍細胞の細胞表面上の分子等に結合することで、局所的には癌患者の血中濃度より高濃度となることが考えられる。従って、本研究で用いた galectin-3 濃度は腫瘍組織微小環境下での局所的濃度に近似していると推測される。本研究結果と関連して、Ramasamy らは galectin-3 による MUC1 と EGFR 間の架橋に伴う両分子の相互作用の亢進が、EGF 依存的な MUC1 介在性のシグナル伝達の活性化に関与することを報告している [35]。対照的に、Merlin らは galectin-3 の発現抑制により MUC1 と EGFR の相互作用が亢進し、EGF 依存的な MUC1 介在性のシグナル伝達の活性化が誘導されることを示している [44]。相反する両報告の根拠は明確ではないが、いずれの報告も EGF のような増殖因子が MUC1 を介するシグナル伝達には必要となることを示している。今回本研究で示した HCT116/MUC1 細胞における ERK1/2 及び Akt のリン酸化の亢進は、EGFR の自己リン酸化阻害剤存在下及び無血清下、即ち EGF 及び EGFR が関与しない条件下でも認められた (図 7)。また増殖因子を起点とするシグナル伝達では、MUC1 と増殖因子受容体が相互作用する必要がある、実験的には免疫沈降により MUC1 と増殖因子受容体が共沈降することで裏付けされている。当研究室では以前に、HCT116/MUC1 細胞において MUC1 と EGFR は共沈降しなかった結果を報告している [39]。従って、galectin-3 処理による MUC1-C のリン酸化及びそれに伴う ERK1/2 及び Akt のリン酸化は、EGF/EGFR 非依存的に誘導されていることを示している。加えて、本研究で用いた EGFR 阻害剤は、EGFR だけでなく ErbB2 (HER2) 及び ErbB4 (HER4) の活性化も同時に抑制する阻害剤であるため、少なくとも EGFR、ErbB2 及び ErbB4 は galectin-3 による MUC1 のリン酸化に直接関与しないことが考えられる。しかしながら、MUC1 と他の増殖因子受容体間の架橋に galectin-3 が関与し、MAPK 及び PI3K/Akt シグナル伝達経路を活性化させている可能性は残されており、今後詳細を検討する必要がある。

MUC1-C の細胞質内領域は 72 アミノ酸で構成されており 7 個の tyrosine 残基を含んでいるが、これらの tyrosine 残基はそれぞれ別々の tyrosine kinase によってリン酸化される [1]。60 番目の tyrosine 残基を含む Y⁶⁰TNP (Tyr⁶⁰-Thr-Asn-Pro) motif 及び 20 番目の tyrosine 残基を含む Y²⁰HMP (Tyr²⁰-His-Pro-Met) motif にはアダプタータンパク質である Grb2 (growth factor receptor-bound protein-2) や PI3K p85 が SH2 domain を介してそれぞれの motif に結合することで、それぞれ下流の MAPK 及び PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化に寄与している [45-48]。本研究で認められた galectin-3 処理による MUC1-C 中の tyrosine 残基のリン酸化が、どの tyrosine 残基で誘導されているかは現時点では未解明であ

るが、上述した motif 内の tyrosine 残基は、ZAP-70 (zeta-chain associated protein kinase 70) や c-Abl (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) 等の tyrosine kinase によってリン酸化されることが報告されている [49, 50]。従って、これらの tyrosine 残基が EGF/EGFR 非依存的にリン酸化され、その後 EGF/EGFR 依存的な MUC1 を介したシグナル伝達と同様に MAPK 及び PI3K/Akt シグナル伝達経路に関与しているものと考えられる。一方で、46 番目の tyrosine 残基を含む Y⁴⁶EKV (Tyr⁴⁶-Glu-Lys-Val) motif は EGFR を含むいくつかの tyrosine kinase によってリン酸化されることで、同 motif への β -catenin のリクルートが促進される [34, 51]。この結果と関連して、当研究室では以前に Siglec-9 による HCT116/MUC1 細胞の処理もしくは galectin-3 による 3T3/MUC1 細胞の処理が、MUC1-C への β -catenin のリクルートを促進させることを報告している [39, 52]。これらの報告から、EGF/EGFR 依存的な MUC1 を介したシグナル伝達と MUC1 への galectin-3 の結合を介したシグナル伝達は、どちらも MUC1-C をシグナル伝達活性化の足場として利用しているが、MUC1-C のリン酸化を誘導する因子及び機構が双方で異なると考えられる。また、MUC1 への galectin-3 の結合を介したシグナル伝達は、EGF/EGFR 依存的な MUC1 介在性のシグナル伝達と同等の働きを有することが示唆され、これは EGFR 阻害剤存在下においても galectin-3 処理によって ERK1/2 及び Akt のリン酸化が誘導された結果とも一致している。

Galectin-3 は ligand と結合していない時、もしくは分子中に単一の結合部位を持つ ligand と結合している時には大部分が単量体として存在しているが [53]、分子中に複数の結合部位を持つ ligand と結合している時には、N-terminal domain を介して多量体を形成することで多価の lectin のように挙動する [54, 55]。MUC1 の tandem repeat 上には TF 抗原のような galectin-3 結合性の糖鎖が多数付加されていることから、MUC1 は分子内及び分子間で galectin-3 により架橋され易い状態にあると予想される。また、MUC1 は一般的な細胞表面上の接着分子 (約 30 nm) と比較して巨大な棒状の糖タンパク質 (200~500 nm) であるため [56, 57]、galectin-3 が MUC1 に結合することは容易であると考えられる。加えて ligand に対する galectin-3 の結合活性は、ligand のクラスター化によって劇的に亢進することが報告されているが [58]、上述した両分子の特性及び細胞表面における存在状態から推定して、MUC1 は galectin-3 に対して高い親和性を有するものと考えられる。MUC1 への galectin-3 の結合に伴うシグナル伝達の活性化における詳細な機構は未解明な部分も残されているが、興味深い報告として、MUC1 の tandem repeat 数に依存して MUC1 を介したシグナル伝達が誘導されること [59]、また MUC1-C の膜近傍の領域に存在する CQC motif を介した同分子のホモ多量体化が、MUC1 介在性のシグナル伝達において重要な機構であることが報告されている [1, 13, 41, 48]。これらの知見は、MUC1 の tandem repeat 中の糖鎖を介した galectin-3 の多量体化及び分子間で MUC1 を架橋することによる MUC1 のクラスター化が、MUC1 への galectin-3 の結合を介したシグナル伝達の惹起に重要であることを示唆している。また他の機構として、galectin-3 が分子内で MUC1 を架橋し、

MUC1 の立体構造を変化させることで MUC1 を介したシグナル伝達の惹起に寄与している可能性も同時に考えられるが、いずれの場合においても galectin-3 の多量体化が重要となる。Galectin-3 の N-terminal domain は、collagenase type VII 処理によって galectin-3 の CRD から除去することが可能であり [18, 60]、当処理によって多量体形成能を欠損させた cleaved galectin-3 では ERK1/2 及び Akt のリン酸化の誘導が著しく減少した結果からも (図 8)、上述したどちらかもしくは両方の機構がシグナル伝達に関与している可能性が強く示唆される。

一般的に、MAPK 及び PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化は、細胞増殖能や移動能といった様々な腫瘍悪性化に関与しており [61, 62]、実際このような細胞機能が MUC1 や galectin-3 の発現レベルの上昇に応じて亢進した (図 9, 10, 11)。これは MUC1 と galectin-3 が腫瘍細胞の悪性化に協同的に機能していることを示唆している。また、細胞表面への galectin-3 の結合を介した腫瘍悪性化の亢進は、拮抗剤により同分子を細胞表面から取り除くことによって減弱される可能性が考えられた。実際、LacNAc 含有合成グリコポリマーによる細胞増殖抑制効果は、HCT116/Mock より HCT116/MUC1 細胞に対してより効果的であったことに加え、同抑制効果は galectin-3 の結合活性とほぼ一致した (図 12)。なお、HCT116/Mock 細胞でも合成グリコポリマーによる弱い細胞増殖抑制効果が認められたが、可能性の一つとして、未知の細胞表面分子への galectin-3 の結合に起因する Akt のリン酸化 (図 5D, H) が抑制された結果であると考えられる。また本研究で用いた galectin-3 拮抗剤以外にも、citrus pectin を改変した GCS-100 や合成化合物である lacturose-L-leucine といった galectin-3 拮抗剤が、前立腺癌細胞や多発性骨髄腫細胞の悪性化の抑制に効果的であるという知見は非常に興味深い [63-65]。

本研究の結果より、生理的状況下では分泌された galectin-3 が autocrine/paracrine によって MUC1 へ結合し、MUC1 介在性のシグナル伝達を恒常的に活性化することで腫瘍悪性化を誘導していると考えられる。また、癌の悪性化に伴い MUC1、galectin-3 及び TF 抗原の各分子は増加することが報告されており、これらの分子の増加に伴い本機構が誘導される頻度もより増加していくものと考えられる。今回示した機構は、腫瘍細胞の悪性化に関する新たな機構であり、増殖因子や増殖因子受容体に依存しないシグナル伝達であるため、これらの分子が発現していない、もしくは機能しないような腫瘍細胞でも腫瘍悪性化が誘導されることを示唆している。また、本機構の抑制効果が期待される galectin-3 拮抗剤は、新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

2. MUC1 による uPA の発現誘導及び腫瘍悪性化への関与

2-1. 序論

MUC1 による腫瘍悪性化には、MUC1 を介したシグナル伝達の結果として新たな分子の発現が誘導され、その分子による作用も内包される可能性が考えられる。MUC1 は E-cadherin 等の接着分子を覆うことで、細胞間及び細胞と細胞外基質間の接着を物理的に阻害し、上皮悪性腫瘍細胞の浸潤及び転移の亢進に関与する [66]。一方で、腫瘍細胞の浸潤及び転移の亢進は接着阻害のみに起因する訳ではなく、腫瘍組織微小環境下での細胞外基質の分解も重要な機構であり、この機構を担う種々の protease の中の 1 つに、uPA (urokinase-type plasminogen activator) が挙げられる。

uPA は細胞の浸潤及び転移に関与する serine protease の 1 つで、腫瘍細胞や周囲の間質細胞から前駆体の形 (pro-uPA) で腫瘍組織微小環境下に分泌される。分泌された pro-uPA は、受容体である uPAR (uPA receptor) に結合することで活性化型に変換され、活性化した uPA は plasminogen を plasmin へと変化させる。Plasmin は直接もしくは MMPs (matrix metalloproteinases) を活性化させることで間接的に細胞外基質を分解し、細胞浸潤能を亢進させる [67-70]。また、uPA は細胞外基質だけでなく HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor) や PDGF-D (platelet-derived growth factor-D) を切断することで、その活性化を制御している [71, 72]。更に、uPA/uPAR 複合体は vitronectin や integrin との相互作用を通じて、細胞と細胞外基質間の接着や PI3K/Akt 及び FAK (focal adhesion kinase)/c-Src シグナル伝達経路等の活性化を制御する [69, 73-77]。uPA の発現量と細胞浸潤能や癌患者の予後の経過には相関性があり [67, 68]、その発現を制御している因子の 1 つとして NF- κ B が報告されている [78-80]。転写因子の 1 つである NF- κ B は、RelA/p65 と p50 の 2 つのサブユニットから構成され、通常は細胞質内で I κ B (inhibitor κ B) と複合体を形成し不活性化型として存在する。しかしながら、IKK (I κ B kinase) によるリン酸化に伴う I κ B の分解によって、NF- κ B は活性化型となり核内へ移行する [81]。また、乳癌細胞において MUC1-C と IKK family または NF- κ B p65 の相互作用は、NF- κ B シグナル伝達経路の活性化を制御する [12, 82]。

MUC1 による uPA の発現誘導機構の解析を行い、本研究では以下の知見を得た。uPA の発現量は MUC1 の発現量と相関した。またこれは、MUC1-C が NF- κ B p65 と複合体を形成後核内に移行し、uPA プロモーター上に結合することによる uPA 遺伝子の転写の亢進に起因していた。更に、MUC1 発現腫瘍細胞の細胞浸潤能は有意に亢進した。従って、MUC1 による腫瘍細胞の細胞浸潤能の亢進には、uPA の誘導機構が関与していることが示唆された。

2-2. 材料及び方法

2-2-1. 細胞培養及び遺伝子導入

HCT116/Mock、HCT116/MUC1、A549/Mock、A549/MUC1、SKOV3/Scr、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞は 1-2-1 項に記した方法に従って作製し、同様の培養液により培養した。

2-2-2. Total RNA の調製及び DNA microarray 解析

1-2-2 項に記した方法に従って、total RNA の調製及び DNA microarray 解析を行った。

2-2-3. 細胞抽出液の調製

1-2-3 項に記した方法に従って、細胞抽出液を調製した。

2-2-4. 細胞質及び核画分の調製

細胞を PBS により洗浄後、説明書に従って、NE-PRE[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent (Thermo Scientific) により細胞質及び核画分を調製した。

2-2-5. 免疫沈降

1-2-3 項に記した方法に従って調製した細胞抽出液 (500 µg) に、アルメニアンハムスター抗 MUC1-C 抗体、ウサギ抗 NF-κB p65 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) もしくはコントロール抗体を加え、1-2-6 項に記した方法に従って得られた沈降物をサンプルとした。

2-2-6. SDS-PAGE 及び Western blotting

各項に記した方法に従って調製したサンプル (5~50 µg) を、1-2-7 項に記した方法に従って、SDS-PAGE 及び Western blotting に用い、化学発光法により検出した。

使用した一次抗体及び二次抗体は下記に示す。

[一次抗体]

ヤギ抗 uPA 抗体 (R&D Systems)、アルメニアンハムスター抗 MUC1-C 抗体、ウサギ抗 NF-κB p65 抗体、ウサギ抗 HSP90 β 抗体 (Bioss)、ヤギ抗 lamin B 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、マウス抗 uPAR 抗体 (BioLegend)、マウス抗 MMP-2 抗体 (Thermo Scientific)、ウサギ抗 MMP-9 抗体 (GeneTex)、マウス抗 β-actin 抗体

[二次抗体]

HRP 標識ウサギ抗マウス IgG (H+L) 抗体、HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体、HRP 標識ウサギ抗ヤギ IgG (H+L) 抗体、HRP 標識ヤギ抗アルメニアンハムスター IgG (H+L) 抗体

2-2-7. 細胞免疫染色

マウス抗 MUC1-N 抗体、ヤギ抗 uPA 抗体、アルメニアンハムスター抗 MUC1-C 抗体及びウサギ抗 NF-κB p65 抗体を用いて、1-2-8 項に記した方法に従って、細胞を染色した。

2-2-8. 免疫組織染色及び H&E 染色

マウス抗 MUC1-N 抗体及びヤギ抗 uPA 抗体を用いて、1-2-9 項に記した方法に従って、各種ヒト癌患者組織切片及び癌部周囲の非癌部組織切片を染色した。

なお 2-2-5、2-2-6、2-2-7 及び本項で使用した一次抗体の内、代表的なものについては抗体の反応性を示す図を別途添付した (資料 B)。

2-2-9. ChIP (chromatin immunoprecipitation) 及び Re-ChIP (re-chromatin immunoprecipitation) assay

細胞を 1% formaldehyde/DMEM 中で室温、10 分間処理後、125 mM glycine/PBS 中で室温、5 分間処理した。冷 PBS により洗浄後、セルスクレーパーを用いて細胞を回収した。2,500 rpm、4°C、10 分間遠心後、細胞を SDS lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA、0.5% SDS 及び 1% Protease Inhibitor Cocktail) に懸濁し、氷中に 15 分間静置した。氷上で 10 秒間、6 回超音波処理を行った後、15,000 rpm、4°C、10 分間遠心し上清を回収した。回収した上清を、ChIP dilution buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、167 mM NaCl、1.1% Tx-100 及び 0.11% sodium deoxycholate) により 5 倍希釈し、ウサギ抗 NF-κB p65 抗体、アルメニアンハムスター抗 MUC1-C 抗体もしくはコントロール抗体を加え 4°C、一晩攪拌後、Dynabeads[®] protein A (Invitrogen) または Dynabeads[®] protein G (Invitrogen) を加え更に 4°C、2 時間攪拌した。Low salt buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、0.1% SDS、1% Tx-100 及び 0.1% sodium deoxycholate)、high salt buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、500 mM NaCl、1 mM EDTA、0.1% SDS、1% Tx-100 及び 0.1% sodium deoxycholate)、LiCl buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、250 mM LiCl、1 mM EDTA、0.5% Nonidet P-40 及び 0.5% sodium deoxycholate) 及び Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 及び 1 mM EDTA) により沈降物を洗浄後、ChIP elution buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、300 mM NaCl、5 mM EDTA 及び 0.5% SDS) に再懸濁し 65°C、一晩処理した。上清を回収し、100 µg/ml RNase により 37°C、30 分間処理後、100 µg/ml proteinase K により 55°C、2 時間処理した。上清中の DNA 断片を High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche Applied Science) により回収後、一部を用いて PCR を行った。

Re-ChIP assay においては、アルメニアンハムスター抗 MUC1-C 抗体により得られた沈降物を、Re-ChIP elution buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、2 mM EDTA、1% SDS、10 mM DTT 及び 1% Protease Inhibitor Cocktail) に懸濁し 37°C、30 分間処理した。上清を回収し、Re-ChIP buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、167 mM NaCl、2 mM EDTA 及び 1.1% Tx-100) により 20 倍希釈した後、ウサギ抗 NF-κB p65 抗体により MUC1-C と複合体を形成している NF-κB p65 を回収した。沈降物から上述の方法により DNA 断片を回収し、一部を用いて PCR を

行った。

PCR は下記に示すプライマーを用いて、uPA プロモーター上に存在する NF-κB 結合領域 (NF-κB BR) 及び uPA 非プロモーター領域 (negative control 領域: CR) を増幅した。また、Image J software によりバンドの濃さを数値化した。

[NF-κB BR]

Forward primer: 5'-CTC TCA GCA ATC AGC ATG AC-3'

Reverse primer: 5'-TCC TCT AGA AGA CTG TGG TCA G-3'

[CR]

Forward primer: 5'-ACT TGG AGA ATG GAG CCT TG-3'

Reverse primer: 5'-AGG TCT GCT GGT CGC TTA TC-3'

2-2-10. Luciferase construct の作製及び luciferase assay

NucleoSpin[®] Tissue (Macherey-Nagel) により HCT116/MUC1 細胞から genome DNA を調製後、下記のプライマーを用いた PCR を行い、uPA プロモーター領域 (-1933~+58) を増幅した。

Forward primer: 5'-GGC AGA TCT CCT CCA GCC AAG TAA TCT GG-3'

Reverse primer: 5'-AAT CCA TGG CTG CGG GGA CAG GTG GAC CC-3'

増幅した PCR 産物は、説明書に従って、pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] vector (Invitrogen) に導入後、PicaGene Basic Vector 2 (Toyo Ink) にサブクローニングした (WT/uPA vector)。また、WT/uPA vector の uPA プロモーター上の NF-κB 結合領域の一部 (-1867~-1865 及び -1844~-1842 の GGG を ACC に置換) もしくは TCF4 (T-cell factor 4) 結合領域の一部 (-739~-738 及び -564~-563 の TT を CG に置換) を変異させた vector を KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) により作製した (MutNF-κB/uPA vector 及び MutTCF4/uPA vector)。

細胞に pRL-TK vector (Toyo Ink) と WT/uPA vector、MutNF-κB/uPA vector、MutTCF4/uPA vector もしくは empty vector を Fugene[®] HD transfection reagent により同時に導入し 24 時間培養後、uPA プロモーター活性を PicaGene Dual Sea Pansy Luminescence Kit (Toyo Ink) により測定した。測定後、各 vector のホタルルシフェラーゼ活性 (WT/uPA vector、MutNF-κB/uPA vector、MutTCF4/uPA vector もしくは empty vector) をウミシイタケルシフェラーゼ活性 (pRL-TK vector) で補正し、uPA プロモーター活性を数値化した。

2-2-11. ELISA

細胞を PBS により洗浄後、serum-free DMEM に置換し 24 時間培養した。培養上清を回収後、説明書に従って、AssayMax Human Urokinase (uPA) ELISA Kit (Assaypro) により培養

上清中に分泌された uPA を測定した。

2-2-12. Gelatin 及び casein zymography

2-2-11 項に記した方法に従って、培養上清を回収し、Amicon® Ultra Centrifugal Filters により濃縮後調製したサンプル (1 もしくは 10 µg) を、gelatin zymography においては 1 mg/ml gelatin を含むゲル、casein zymography においては 0.1% casein 及び 5 µg/ml plasminogen を含むゲルを用いて非還元条件下で電気泳動を行った。泳動後のゲルを 2.5% Tx-100 を含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer 中で室温、1 時間処理後、10 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer 中で室温、30 分間処理した。処理後、gelatin zymography においては、150 mM NaCl、10 mM CaCl₂ 及び 2 µM ZnCl₂ を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer 中で 37°C、36 時間処理した。Casein zymography においては、150 mM NaCl 及び 10 mM CaCl₂ を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer 中で 37°C、14 時間処理した。各分子の酵素活性は、処理後のゲルを CBB 染色しバンドとして可視化した。

2-2-13. 細胞浸潤能及び移動能の測定及びパーセント浸潤の算出

細胞浸潤能の測定には、upper chamber の膜上に 5 µg Matrigel (BD Biosciences) をコートした Transwell chamber (24-well plate、pore size: 8.0 µm; Corning Inc.) を用いた。細胞移動能の測定には、upper chamber の膜の裏面に 1 µg fibronectin をコートした Transwell chamber を用いた。Lower well には DMEM を加え、upper chamber には 0.1% BSA/serum-free DMEM に懸濁した細胞を播種し、20 時間培養した。培養後、膜を MeOH により固定し、H&E 染色後、upper chamber の膜の裏面に浸潤もしくは移動しなかった細胞を綿棒で除去した。浸潤もしくは移動した細胞数は膜当たり 5 視野観察し、その平均の細胞数を求めた。上述の結果から、移動細胞数に対する浸潤細胞数の割合を求めて得られた結果を真の細胞浸潤能と判断し、下記の式を用いて浸潤細胞の割合をパーセント浸潤として算出した。

$$\text{パーセント浸潤} = \text{浸潤した細胞の平均値} / \text{移動した細胞の平均値} \times 100$$

2-2-14. 各阻害剤による細胞の処理

HCT116/MUC1 細胞を 10 µM JSH-23 (NF-κB inhibitor: Symansis) もしくは DMSO により 30 時間処理し、2-2-3~2-2-5 項の実験に用いた。また、同細胞懸濁液に、20 µM GM6001 (MMPs inhibitor: Enzo Life Sciences)、25 µM amiloride (uPA inhibitor: Sigma-Aldrich)、10 µM JSH-23 もしくは DMSO を加え 2-2-13 項の実験に用いた。

2-2-15. FACS

マウス抗 uPAR 抗体もしくはコントロール抗体を用いて、1-2-18 項に記した方法に従って、FACS を行った。

2-2-16. 有意差検定

1-2-19 項に記した方法に従って、有意差検定を行った。

2-3. 結果

2-3-1. 様々な悪性腫瘍における uPA と MUC1 の発現レベルの相関性

MUC1 による腫瘍悪性化を調べるために、HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞を用いた DNA microarray 解析を行い、両細胞間で mRNA レベルでの発現量に変化している分子を網羅的に検討した。複数の分子について発現量の変化が認められたが、その中でも腫瘍細胞の細胞浸潤能に関与する分子である uPA の発現が MUC1 遺伝子の導入により約 2.4 倍上昇していた点に注目した (図 13A)。MUC1 と uPA の発現量の相関性をより詳細に検討するために、前章でも述べた MUC1 強制発現細胞株及び MUC1 発現抑制細胞株を用いた。3 種類の MUC1 発現腫瘍細胞 (HCT116/MUC1、A549/MUC1 及び SKOV3/Scr 細胞) 及びそれぞれのコントロール細胞 (HCT116/Mock、A549/Mock、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞) を用いてタンパク質レベルでの発現量を検討した結果、MUC1 発現腫瘍細胞において uPA 発現の増加が認められた (図 13B)。また、HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞を用いた細胞免疫染色法においても同様の傾向が認められた (図 13C)。

更に、各種ヒト癌患者組織切片 (胃癌、大腸癌、乳癌及び膵臓癌) 及び癌部周囲の非癌部組織切片を用いて、免疫組織染色法により MUC1 と uPA の分布及び発現の相関性を検討した。ヒト癌患者組織切片では MUC1 の発現部位と uPA の発現部位は一致したが (図 14A)、ヒト非癌部組織切片では両分子の発現レベルは低く発現部位も一致しなかった (図 14B)。この結果からも、MUC1 と uPA の発現レベルの相関性及び同一の細胞における発現が強く示唆された。

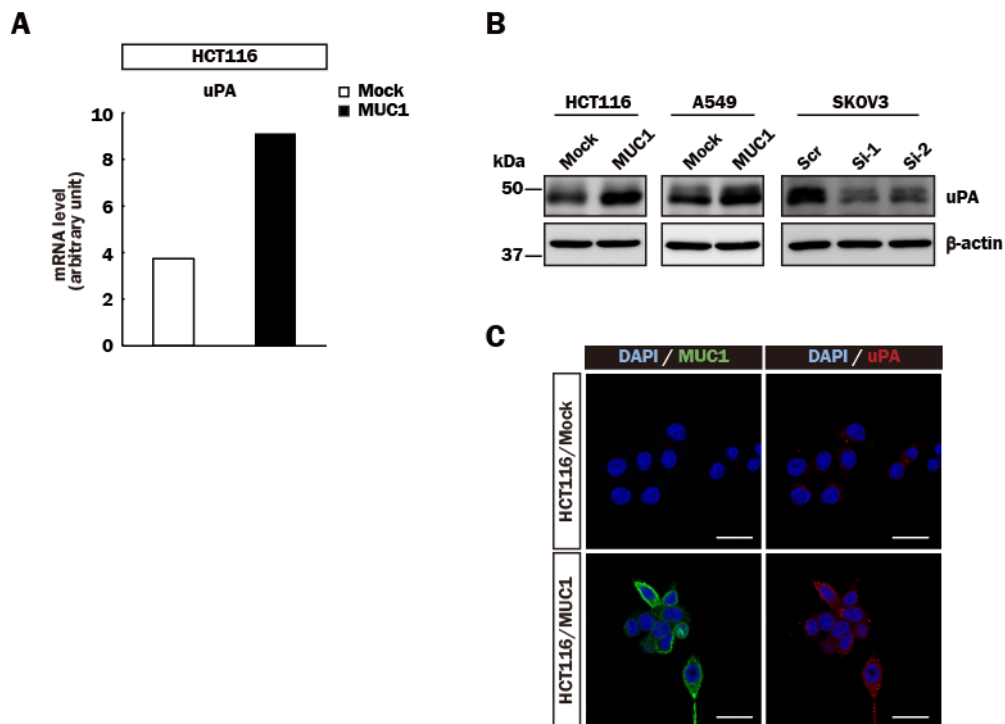
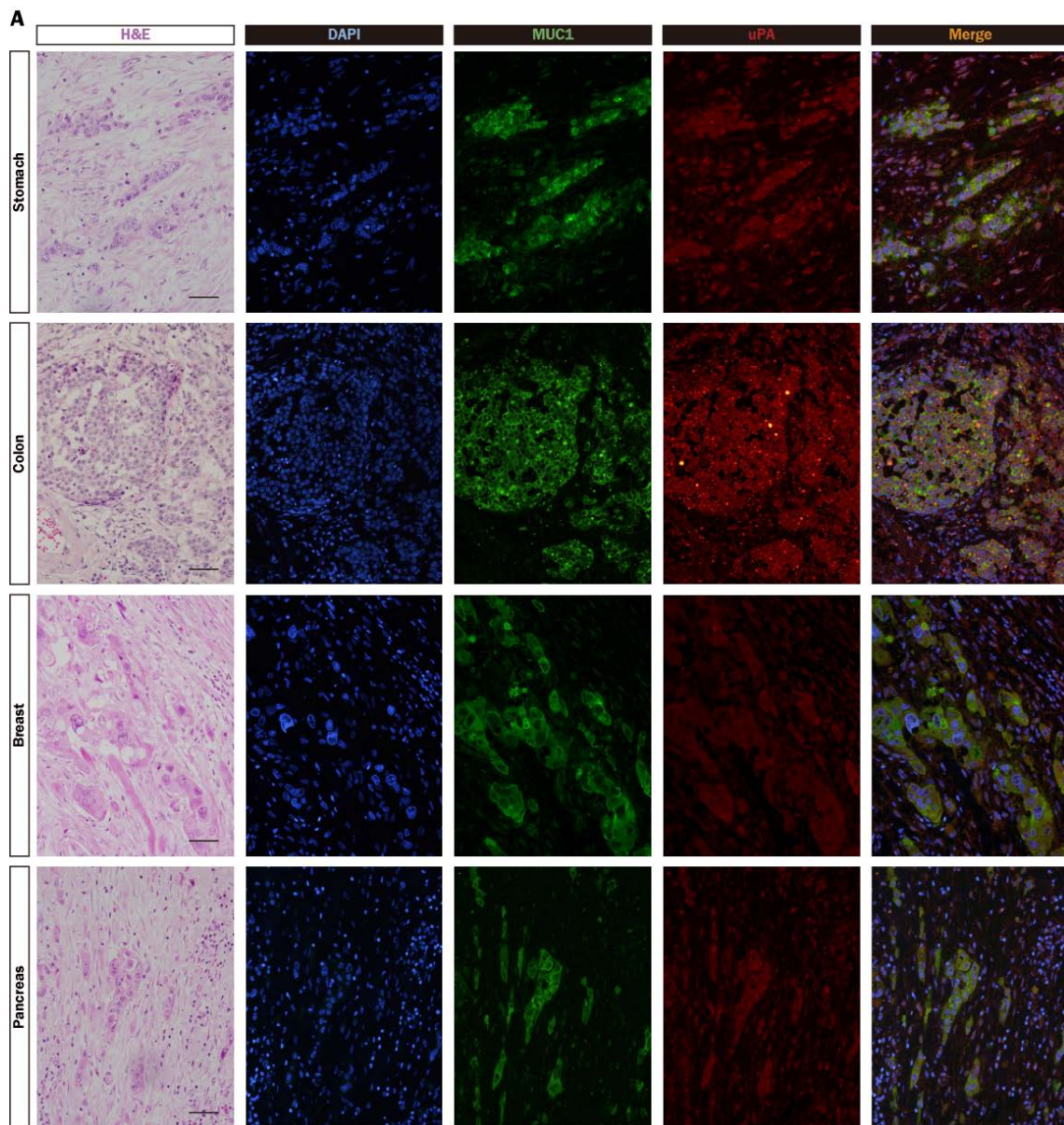


図 13. 様々な腫瘍細胞における MUC1 と uPA の発現量

(A) HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞における uPA mRNA の発現量を DNA microarray 解析により検討し、ヒストグラムで示した。(B) 図 1C に記した方法に従って、HCT116/Mock、HCT116/MUC1、A549/Mock、A549/MUC1、SKOV3/Scr、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞の uPA 及び β -actin を検出した。(C) 図 3 に記した方法に従って、HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞における MUC1 (緑色) 及び uPA (赤色) の発現を細胞免疫染色法により検出した。核は DAPI (青) により染色した。倍率: $\times 630$; スケールバー: 25 μm 。



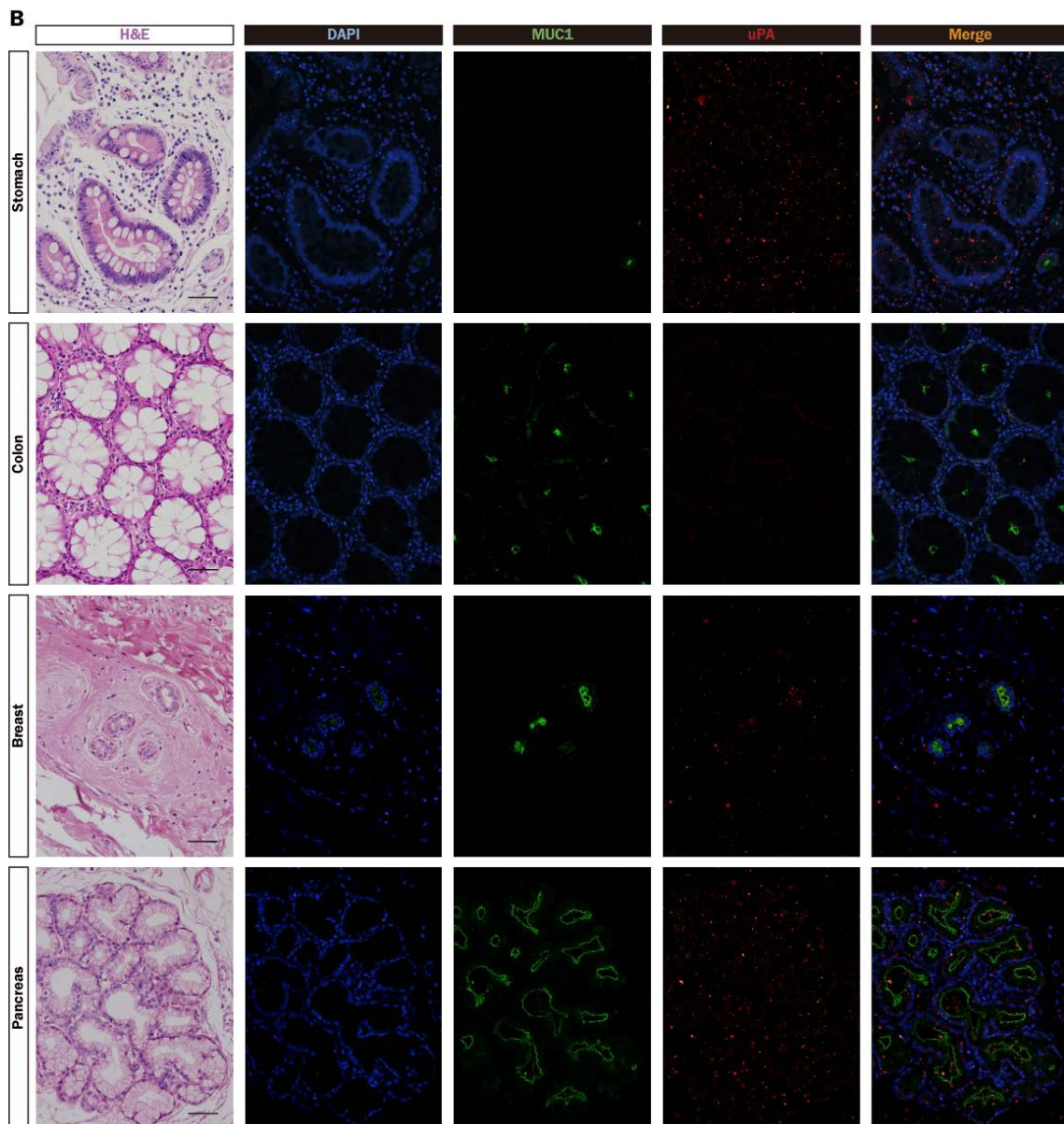


図 14. 様々な癌組織及び非癌部組織における MUC1 及び uPA の分布

(A, B) 図 4 に記した方法に従って、パラフィン包埋したヒト癌組織切片 (胃癌、大腸癌、乳癌、膵臓癌 (A)) 及び癌部周囲の非癌部組織切片 (B) を H&E、DAPI (青色) 及び MUC1 (緑色)、uPA (赤色) に対する抗体を用いて染色した。倍率: $\times 200$; スケールバー: $100 \mu\text{m}$ 。

2-3-2. MUC1-C/NF- κ B p65 複合体の形成と核移行

MUC1 と uPA の発現の相関性について、NF- κ B の関与を検討した。HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液に抗 MUC1-C 抗体を加えて得られた沈降物を用いて電気泳動及び Western blotting を行った結果、NF- κ B p65 が検出された (図 15A, lane b)。また、抗 NF- κ B p65 抗体により得られた沈降物中から MUC1-C が検出されたことから (図 15A, lane d)、HCT116/MUC1 細胞において MUC1-C と NF- κ B p65 は相互作用し、複合体を形成していることが示唆された。次いで、MUC1-C/NF- κ B p65 複合体形成による NF- κ B p65 の核移行への影響を検討した。MUC1 発現腫瘍細胞 (HCT116/MUC1 及び SKOV3/Scr 細胞) 及びそれぞれのコントロール細胞 (HCT116/Mock、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞) から細胞質及び核画分を調製し、各画分中の MUC1-C 及び NF- κ B p65 を検出した結果、MUC1 発現腫瘍細胞では細胞質画分のみならず (図 15B, lanes b, e)、核画分にも MUC1-C が検出された (図 15B, lanes d, h)。細胞質画分中の NF- κ B p65 は MUC1 の発現レベルに関係なく同程度検出されたが (図 15B, lanes a, b, e, f, g)、核画分中の NF- κ B p65 は MUC1 の発現レベルに依存して増減した (図 15B, lanes c, d, h, i, j)。更に、MUC1-C と NF- κ B p65 の分布を共焦点レーザー顕微鏡下で観察し、核内における両分子の共局在を確認した (図 15C)。これらの結果より、NF- κ B p65 の核移行は MUC1-C と複合体を形成することにより促進されることが示唆された。

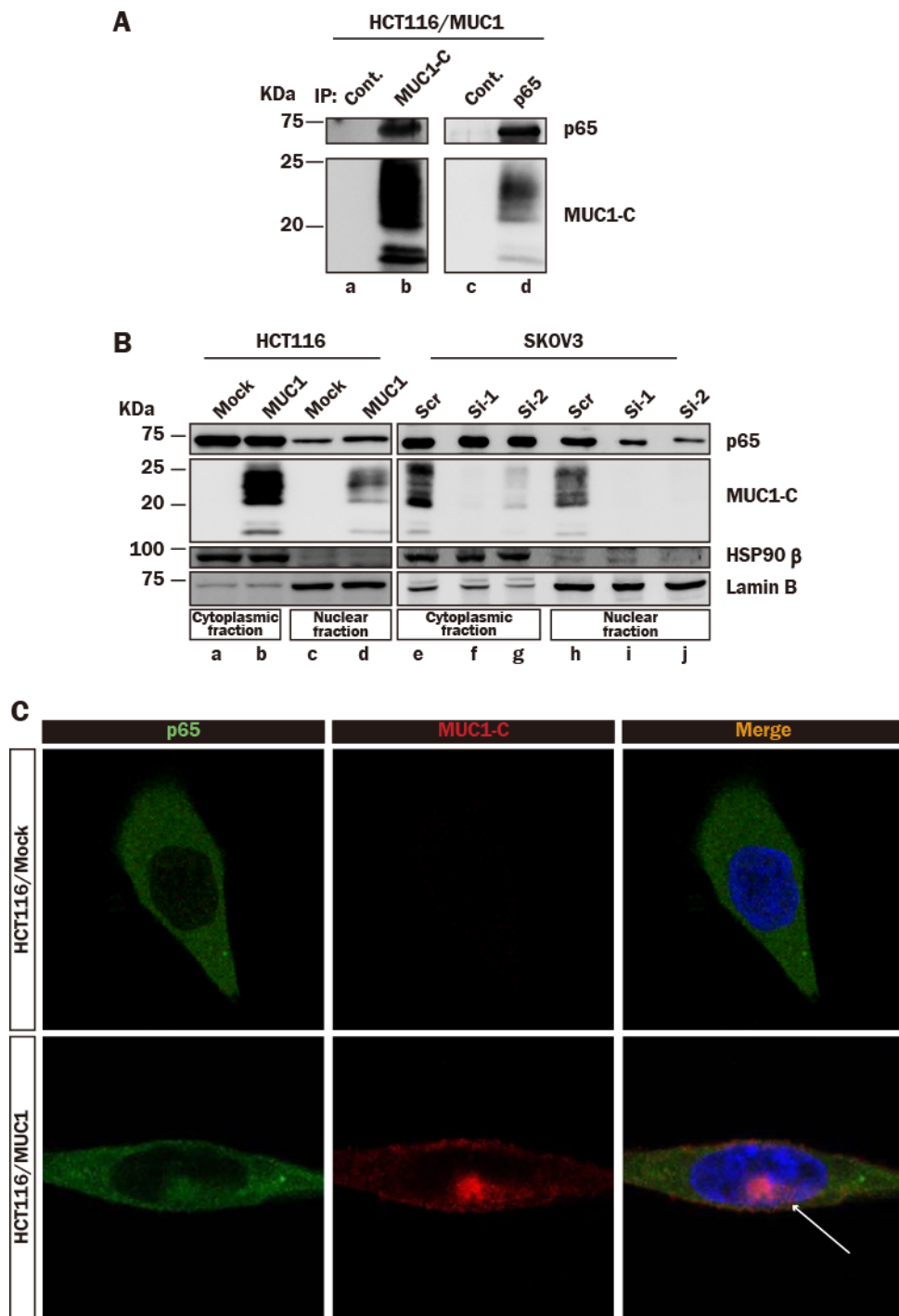


図 15. MUC1-C/NF- κ B p65 複合体の核移行

(A) HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液に抗 MUC1-C 抗体 (lane b)、抗 NF- κ B p65 抗体 (lane d) もしくはそれぞれのコントロール抗体 (lanes a, c) を加えて免疫沈降後、図 1C に記した方法に従って、NF- κ B p65 及び MUC1-C を検出した。(B) HCT116/Mock、HCT116/MUC1、SKOV3/Scr、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞から細胞質及び核画分を調製後、図 1C に記した方法に従って、NF- κ B p65、MUC1-C、HSP90 β (heat-shock protein 90 β : 細胞質画分マーカー) 及び lamin B (核画分マーカー) を検出した。(C) 図 3 に記した方法に従って、HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞を透過処理後、NF- κ B p65 (緑色) 及び MUC1-C (赤色) の分布を細胞免疫染色法により調べた。核は DAPI (青色) により染色した。矢印は核内での MUC1-C/NF- κ B p65 複合体を示す。

2-3-3. MUC1-C/NF-κB p65 複合体の uPA プロモーター上へのリクルート

uPA 遺伝子はプロモーター上に NF-κB 結合領域を有する。前項で述べた MUC1-C/NF-κB p65 複合体が uPA 遺伝子の転写を制御している可能性を検討するために、抗 NF-κB p65 抗体を用いて ChIP assay を行った。MUC1 発現腫瘍細胞 (HCT116/MUC1 及び SKOV3/Scr 細胞) 及びそれぞれのコントロール細胞 (HCT116/Mock、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞) を 1% formaldehyde 中で処理し、DNA と DNA 結合タンパク質を架橋後、それぞれの細胞抽出液に抗 NF-κB p65 抗体を加え得られた沈降物中の DNA を、NF-κB 結合領域 (-1955~-1729: NF-κB BR) もしくは非プロモーター領域 (+3348~+3531: CR) に対するプライマーを用いて増幅した。コントロール細胞と比較して MUC1 発現腫瘍細胞では NF-κB 結合領域を含む DNA 領域がより増幅され (図 16A, B, C, D)、uPA プロモーター上への NF-κB p65 のリクルートが促進していることが示唆された。更に、NF-κB 結合領域に結合している NF-κB p65 が MUC1-C と複合体を形成している可能性を、抗 MUC1-C 抗体によって得られた DNA/MUC1-C 複合体を抗 NF-κB p65 抗体によって再度免疫沈降する手法 (Re-ChIP assay) により検討した。MUC1 発現腫瘍細胞 (HCT116/MUC1 及び SKOV3/Scr 細胞) において、NF-κB 結合領域に結合している NF-κB p65 には MUC1-C も結合していることが認められた (図 16E, F, G, H)。これらの結果より、MUC1-C は NF-κB p65 と複合体を形成し、uPA プロモーター上への NF-κB p65 のリクルートを促進することが示唆された。

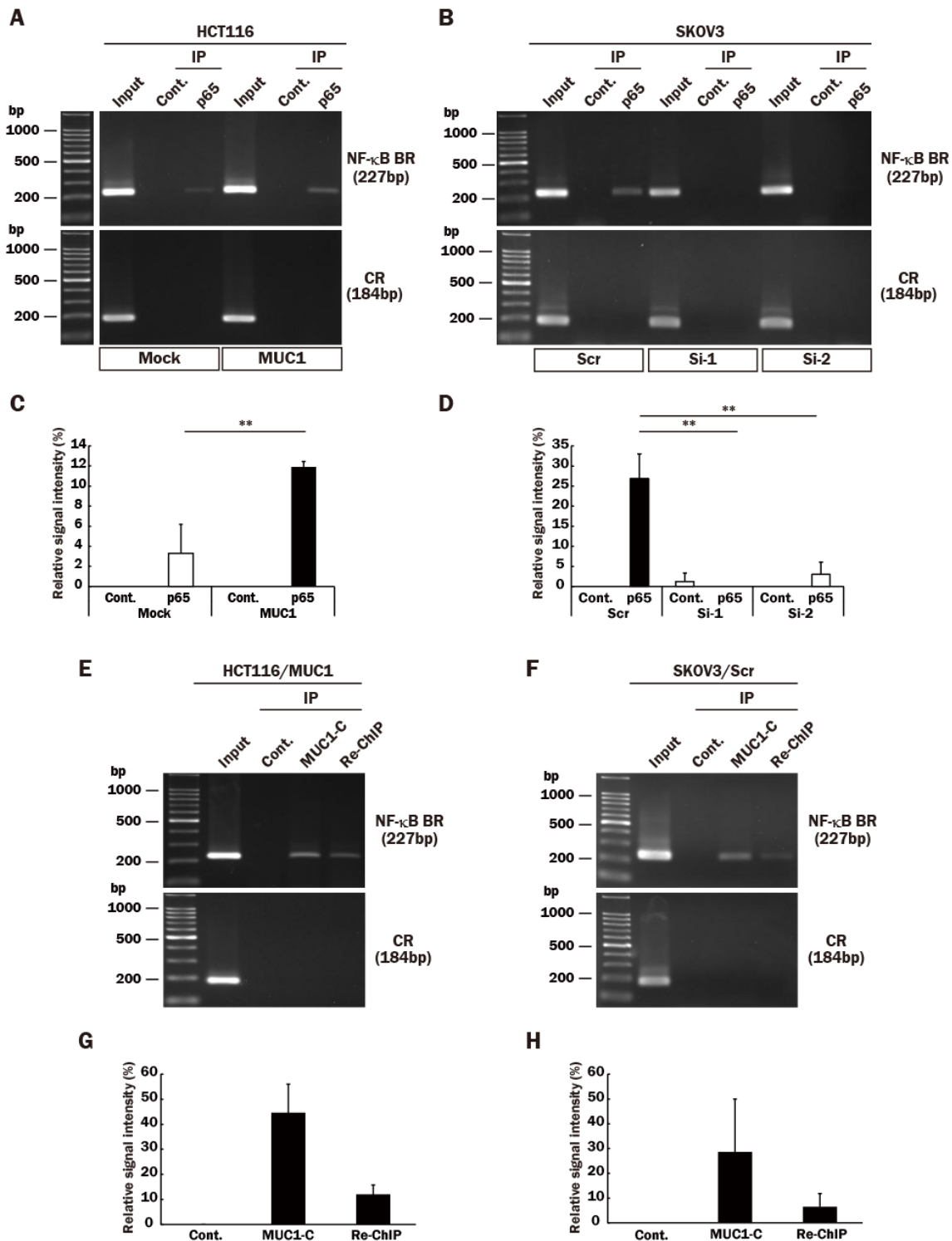


図 16. uPA プロモーター上への MUC1-C/NF-κB p65 複合体のリクルート

(A, B) Formaldehyde で固定した HCT116/Mock、HCT116/MUC1 (A)、SKOV3/Scr、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞 (B) の細胞抽出液に抗 NF-κB p65 抗体もしくはコントロール抗体を加えて免疫沈降後、得られた沈降物中から DNA を回収した。PCR によって uPA プロモーター上の NF-κB 結合領域 (NF-κB BR: -1955~-1729) もしくは非プロモーター領域 (CR: +3348~+3531) を増幅し、電気泳動後、EtBr により染色した。(C, D) 図 16A, B で得られたバンドの濃さを Image J により数値化後、input DNA で得られたバンドの濃さを 100% として相対値をヒストグラムで示した (平均値±標準偏差、n=3、** p<0.01)。(E, F) Formaldehyde で固定した HCT116/MUC1 (E) 及び SKOV3/Scr 細胞 (F) の細胞抽出液に抗 MUC1-C 抗体もしくはコントロール抗体を加えて免疫沈降を行った。Re-ChIP assay においては、抗 MUC1-C 抗体により得られたサンプルを、抗 NF-κB p65 抗体により再度免疫沈降した。得られた沈降物から DNA を回収後、図 16A, B に記した方法に従って、増幅した DNA を検出した。(G, H) 図 16E, F で得られたバンドの濃さを、図 16C, D に記した方法に従って数値化し、相対値をヒストグラムで示した (平均値±標準偏差、n=3)。

2-3-4. MUC1-C/NF- κ B p65 複合体の uPA プロモーター上への結合に伴う uPA 遺伝子転写活性への影響

MUC1 による uPA プロモーター上への NF- κ B p65 のリクルートに伴う uPA 遺伝子の転写への影響を、luciferase assay により検討した。uPA 遺伝子の転写活性は、コントロール細胞 (HCT116/Mock、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞) と比較して MUC1 発現腫瘍細胞 (HCT116/MUC1 及び SKOV3/Scr 細胞) において亢進した (図 17A)。また、上述の機構の関与を更に検討するために、uPA 遺伝子のプロモーター上に存在する 2 か所の NF- κ B 結合領域中の塩基配列の一部を変異し (-1867~-1865 及び -1844~-1842 の GGG を ACC に置換)、同様の実験を行った。上述した結果で確認された MUC1 発現腫瘍細胞における uPA 遺伝子の転写活性の亢進は、塩基配列に変異を導入することでコントロール細胞のレベルまで低下した (図 17A)。この結果は、uPA プロモーター上への MUC1-C/NF- κ B p65 複合体の結合が、uPA 遺伝子の転写を誘導していることを示している。一方で、uPA 遺伝子の転写は NF- κ B 以外の転写因子によっても制御されており、一例として、大腸癌において転写因子 β -catenin が uPA プロモーター上に結合することで、uPA の発現を亢進させることが報告されている [83]。MUC1-C は β -catenin との複合体形成を介して、標的遺伝子の転写に関与することから [39, 84]、同機構による uPA 遺伝子の転写誘導も考えられた。この可能性を検討するために、uPA 遺伝子のプロモーター上に存在する 2 か所の TCF4 結合領域中の塩基配列の一部を変異し (-739~-738 及び -564~-563 の TT を CG に置換)、MUC1 発現腫瘍細胞による luciferase assay を行ったが、uPA 遺伝子の転写活性に変化は見られなかった (図 17B)。従って、今回実験に用いた細胞株 (HCT116 及び SKOV3 細胞) においては、uPA 遺伝子の転写は MUC1-C/NF- κ B p65 複合体によって制御されており、MUC1-C/ β -catenin 複合体には制御されていないことが示された。

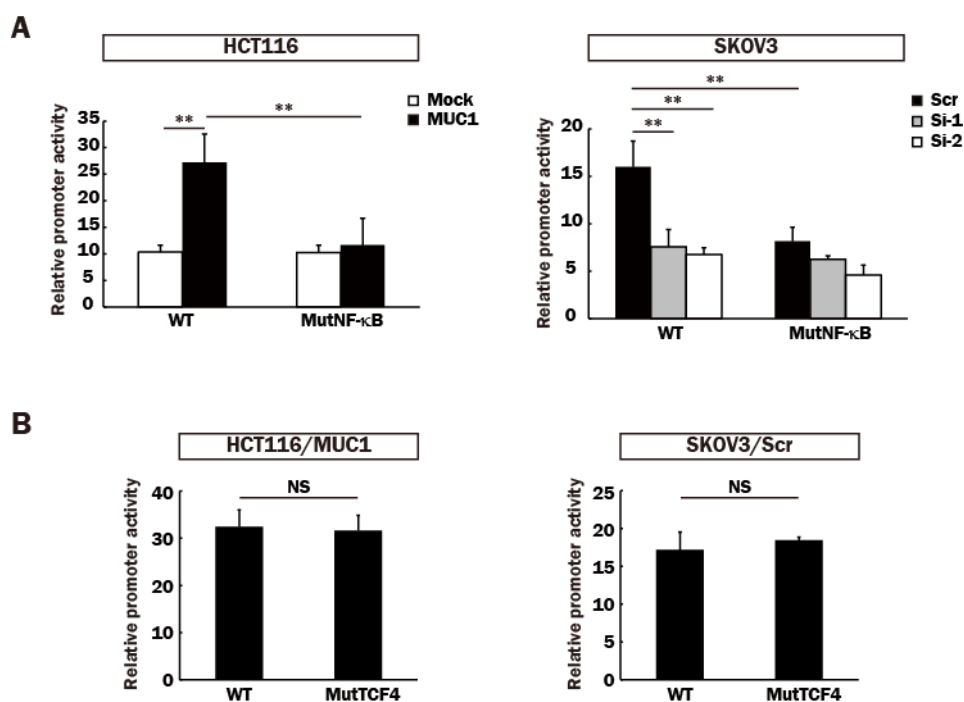


図 17. uPA プロモーター上への MUC1-C/NF-κB p65 複合体のリクルートに伴うプロモーター活性の測定

(A) HCT116/Mock、HCT116/MUC1、SKOV3/Scr、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞に control reporter vector である pRL-TK vector と empty vector、WT/uPA vector もしくは MutNF-κB/uPA vector を同時に導入し 24 時間培養後、uPA プロモーター活性を luciferase assay により検討した。(B) HCT116/MUC1 及び SKOV3/Scr 細胞に pRL-TK vector と empty vector、WT/uPA vector もしくは MutTCF4/uPA vector を同時に導入し 24 時間培養後、uPA プロモーター活性を luciferase assay により検討した。各 vector 導入により得られた uPA プロモーター活性 (=ホタルルシフェラーゼ活性) は、control reporter vector で得られた内部標準 (=ウミシイタケルシフェラーゼ活性) により補正後、empty vector 導入により得られたプロモーター活性を 1 として相対値をヒストグラムで示した (平均値±標準偏差、 $n=3$ 、** $p<0.01$ 、NS: 有意差なし)。WT: WT/uPA vector transfectant、MutNF-κB: MutNF-κB/uPA vector transfectant、MutTCF4: MutTCF4/uPA vector transfectant。

2-3-5. MUC1 による uPA 発現量増加に伴う細胞浸潤能の亢進

細胞外に分泌された uPA は細胞の浸潤能亢進に直接関与することから、培養上清中の uPA 量を ELISA により測定し、MUC1 の影響を検討した。コントロール細胞 (HCT116/Mock、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞) と比較して MUC1 発現腫瘍細胞 (HCT116/MUC1 及び SKOV3/Scr 細胞) において uPA 分泌量の増加が認められた (図 18A)。また、uPA は別の protease である MMPs (MMP-2/9) の活性化を通じて間接的にも細胞の浸潤能亢進に関与することから、培養上清中に分泌された uPA に加えて MMP-2/9 の酵素活性を zymography assay により検討した結果、MUC1 発現腫瘍細胞 (HCT116/MUC1 及び SKOV3/Scr 細胞) において uPA 及び MMP-2/9 の活性型の増加が認められた (図 18B)。uPA の活性化は uPAR への結合を介して誘導されることから、HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞における uPAR の発現を DNA microarray 解析、電気泳動及び flow cytometry により検討したが、両細胞間で uPAR の発現量に大きな差は認められず (図 18C, D)、細胞表面においては HCT116/Mock 細胞の方がむしろ多く発現していた (図 18E)。また、MMPs 酵素活性の亢進が、MMPs 自体の発現量増加に依存している可能性を検討するために、HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞における MMP-2/9 の発現を DNA microarray 解析及び電気泳動により検討したが、両細胞間で発現量に大きな変化は認められなかった (図 18F, G, H, I)。これらの結果から、uPA 及び MMP-2/9 の活性型の増加は、uPA の発現亢進に付随する機構であることが示唆された。

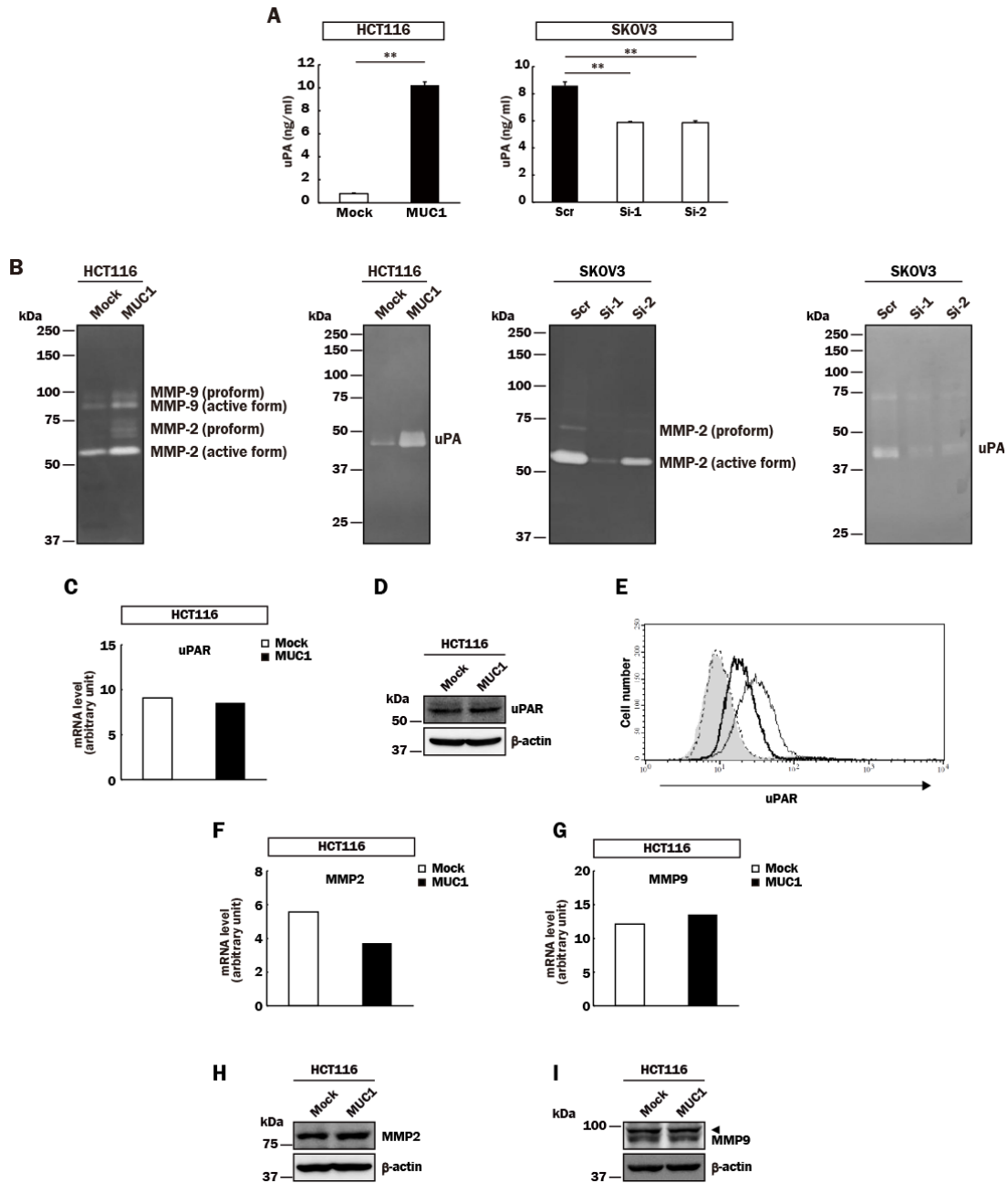


図 18. uPA の分泌レベルと uPA 及び MMP-2/9 の酵素活性 への MUC1 の影響

(A) HCT116/Mock、HCT116/MUC1、SKOV3/Scr、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞の培養上清中に分泌された uPA 量を ELISA により測定し、ヒストグラムで示した (平均値±標準偏差、 $n=3$ 、** $p<0.01$)。 (B) 上述した各細胞の培養上清中に分泌された活性型 uPA 及び MMP-2/9 を、gelatin zymography (MMP-2/9) 及び casein zymography (uPA) により検出した。 (C) DNA microarray 解析による HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞における uPAR mRNA の発現量をヒストグラムで示した。 (D) 図 1C に記した方法に従って、HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞の uPAR 及び β -actin を検出した。 (E) HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞における細胞表面の uPAR の発現を、抗 uPAR 抗体を用いて FACS により検出した。コントロール抗体 (Mock 細胞: gray fill, MUC1 細胞: dotted line)、抗 uPAR 抗体 (Mock 細胞: thin line、MUC1 細胞: thick line)。 (F, G) DNA microarray 解析による HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞における MMP-2 及び MMP-9 mRNA の発現量をヒストグラムで示した。 (H, I) 図 1C に記した方法に従って、HCT116/Mock 及び HCT116/MUC1 細胞の MMP-2、MMP-9 及び β -actin を検出した。図 18I の矢頭は MMP-9 を示す。

uPA 及び MMP-2/9 の活性化に伴う細胞浸潤への影響を検討するために、細胞外基質成分を含んだ再構成基底膜である Matrigel をコートした chamber を用いた invasion assay を行った。また、細胞増殖等の別の要因によって細胞浸潤能が正確に評価されない可能性を防ぐため、fibronectin をコートした chamber を用いた migration assay も同時に行い、invasion assay と migration assay の結果から浸潤細胞の割合を算出し細胞浸潤能を評価した。それぞれの膜を通過した細胞を染色後、通過した細胞を数えた結果、コントロール細胞 (HCT116/Mock、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞) と比較して MUC1 発現腫瘍細胞 (HCT116/MUC1 及び SKOV3/Scr 細胞) において細胞浸潤能が亢進していた (図 19A, B)。

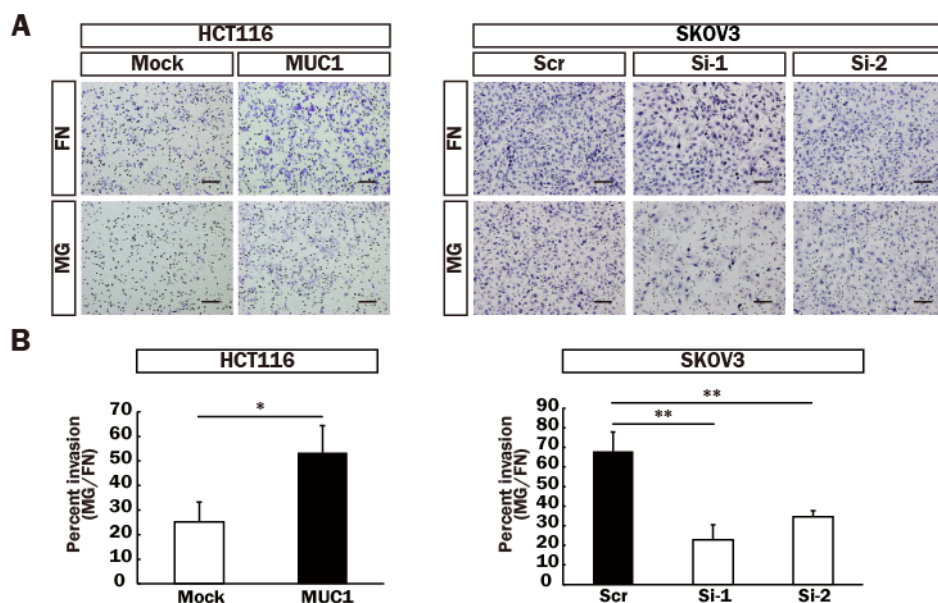


図 19. 細胞浸潤能への MUC1 の影響

(A) Transwell chamber の upper chamber の膜の裏面に fibronectin (migration assay) もしくは upper chamber の膜上に Matrigel (invasion assay) をコートした後に、HCT116/Mock、HCT116/MUC1、SKOV3/Scr、SKOV3/Si-1 及び SKOV3/Si-2 細胞 (5×10^4 個) を播種した。20 時間培養後、fibronectin をコートした膜を通過した細胞 (移動細胞: FN) 及び Matrigel をコートした膜を通過した細胞 (浸潤細胞: MG) を観察した。倍率: $\times 100$; スケールバー: $200 \mu\text{m}$ 。 (B) 無作為に選んだ 5 視野における移動細胞及び浸潤細胞を数え平均を算出後、浸潤細胞の割合を (浸潤細胞数 (MG) の平均値/移動細胞数 (FN) の平均値 $\times 100$) により算出し、パーセント浸潤としてヒストグラムで示した (平均値 \pm 標準偏差、 $n=3$ 、* $p<0.05$ 、** $p<0.01$)。

この結果から、uPA の発現亢進及び MMP-2/9 の酵素活性のレベルと腫瘍細胞の細胞浸潤能は相関していることが示唆された。更に、上述の浸潤能亢進作用が MUC1 によって誘導された uPA に起因していることをより詳細に検討するために、HCT116/MUC1 細胞の細胞懸濁液に MMPs 阻害剤である GM6001、uPA 阻害剤である amiloride もしくは NF- κ B 阻害剤である JSH-23 を添加して invasion assay を行った結果、各阻害剤によって細胞の浸潤能は顕著に抑制された (図 20A, B)。なお、invasion assay と同濃度の各阻害剤で処理した HCT116/MUC1 細胞について MTT assay を行い、上述の結果が各阻害剤処理による細胞生存率の低下に起因していないことを確認した (データ未掲載)。

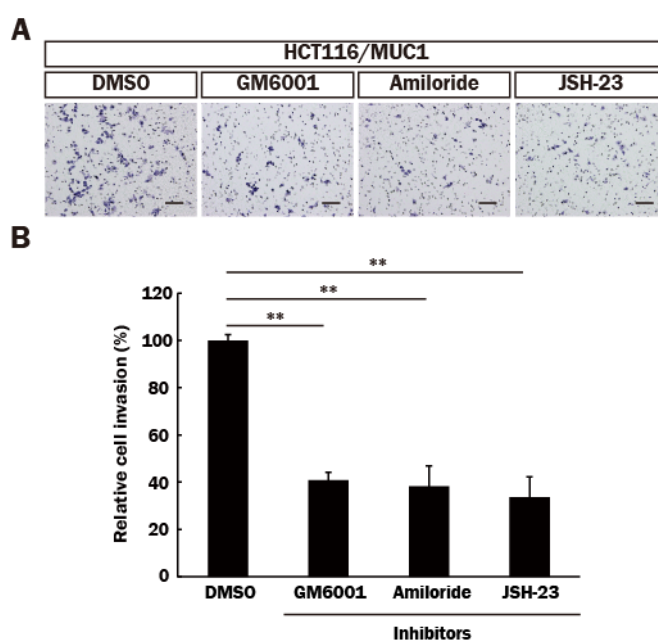


図 20. 各種阻害剤処理による HCT116/MUC1 細胞の細胞浸潤能

(A) HCT116/MUC1 細胞の細胞懸濁液に GM6001 (20 μ M)、amiloride (25 μ M)、JSH-23 (10 μ M) もしくは DMSO を加え、図 19A に記した方法に従って、invasion assay を行った後、Matrigel をコートした膜を通過した細胞を観察した。(B) 図 19B に記した方法に従って、浸潤細胞数を数えた後、コントロール (DMSO) によって得られた浸潤細胞数を 100% とし、相対値をヒストグラムで示した (平均値 \pm 標準偏差、 $n=3$ 、** $p<0.01$)。

また、JSH-23 処理による細胞浸潤抑制効果が MUC1-C/NF- κ B p65 複合体の形成、同複合体の核移行及びこれに付随する uPA 発現の抑制に起因している可能性を、JSH-23 により処理した HCT116/MUC1 細胞を用いて検討した。抗 MUC1-C 抗体及び抗 NF- κ B p65 抗体を用いた免疫沈降を行った結果、JSH-23 未処理の HCT116/MUC1 細胞では MUC1-C と NF- κ B p65 の相互作用に伴う複合体形成が検出されたが (図 21A, lanes a, c)、JSH-23 処理の同細胞では両分子の複合体形成は検出されなかった (図 21A, lanes b, d)。また同阻害剤処理により、MUC1-C/NF- κ B p65 複合体の核移行及び uPA の発現も抑制された (図 21B, C)。これらの結果は、MUC1 によって発現が誘導された uPA によって MUC1 発現腫瘍細胞の細胞浸潤能が亢進していることを強く示唆している。

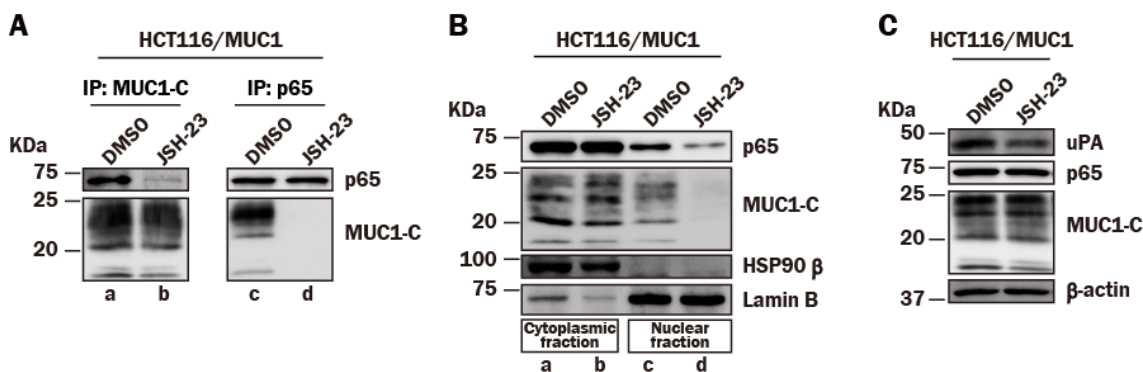


図 21. NF- κ B 阻害剤による MUC1-C/NF- κ B p65 複合体形成への影響

(A) JSH-23 (10 μ M) もしくは DMSO 処理を行った HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液に、抗 MUC1-C 抗体もしくは抗 NF- κ B p65 抗体を加えて免疫沈降を行った後、図 1C に記した方法に従って、共沈降した NF- κ B p65 あるいは MUC1-C を検出した。(B) JSH-23 (10 μ M) もしくは DMSO 処理を行った HCT116/MUC1 細胞から細胞質及び核画分を調製後、図 1C に記した方法に従って、NF- κ B p65、MUC1-C、HSP90 β (細胞質画分マーカー) 及び lamin B (核画分マーカー) を検出した。(C) 図 1C に記した方法に従って、JSH-23 (10 μ M) もしくは DMSO で処理した HCT116/MUC1 細胞の uPA、NF- κ B p65、MUC1-C 及び β -actin を検出した。

2-4. 考察

過剰発現した MUC1 は上皮悪性腫瘍細胞の細胞浸潤能、転移能、増殖能や細胞生存等の機構の一端に係わり、腫瘍悪性化に関与するが [1]、MUC1 による細胞浸潤能や転移能亢進に関しては未解明な部分も多い。細胞浸潤の誘導には、MUC1 介在性のシグナル伝達が関与することが考えられ、過去の報告例として、膵臓癌細胞において MUC1 と HIF1- α (hypoxia-inducible factor 1- α) の相互作用を介した PDGF-A の発現量増加による細胞浸潤の誘導や [85]、PDGFR- β (PDGF receptor- β) による MUC1 のリン酸化を介した膵臓腺癌細胞の細胞浸潤能の亢進が示されているが [86]、MUC1 が介在する細胞浸潤能亢進機構について詳細に検討されているとは言い難い。本研究では、DNA microarray 解析によって uPA の発現が MUC1 によって制御されている可能性が考えられた (図 13A)。実際に、様々な腫瘍細胞における MUC1 と uPA の発現レベルに相関性が認められたことに加え (図 13B)、様々なヒト癌患者組織切片において MUC1 と uPA の発現分布が一致した (図 14A)。更に、MUC1 と uPA の発現レベルは、ヒト癌組織切片においてより高レベルであったことから (図 14A, B)、これらの結果に基づいて、uPA の発現量亢進が MUC1 発現腫瘍細胞の細胞浸潤能を亢進させているものと想定した。この仮説は、uPA の発現レベルが悪性腫瘍の浸潤能や癌患者の予後の経過に関係すること [67, 68] 及び MUC1 の発現量の亢進が様々な浸潤性及び転移性上皮悪性腫瘍細胞で認められる [2-4] といった従来報告によって強く支持される。

MUC1-C の細胞質内領域は様々な転写因子と相互作用することが報告されているが、その中の1つとして NF- κ B が含まれる。MUC1-C は細胞質内領域中の特定のアミノ酸配列 (GGSSLSY [Gly-Gly-Ser-Ser-Leu-Ser-Tyr] motif) を介して NF- κ B p65 と直接相互作用するだけでなく、I κ B α のリン酸化に伴う NF- κ B p65 と I κ B α の解離を誘導することで NF- κ B 標的遺伝子の転写を亢進させる [12, 82]。uPA は NF- κ B によって転写が制御される分子の1つであることより、MUC1 によって誘導される細胞浸潤能は、MUC1-C/NF- κ B p65 複合体形成により誘導される uPA の発現亢進に起因すると考えられた。MUC1-C/NF- κ B p65 複合体の核移行の促進及び核内での両分子の共局在が認められたことは (図 15B, C)、MUC1 発現腫瘍細胞における同複合体形成が NF- κ B p65 の核移行を促進させることを示している。更に、MUC1-C/NF- κ B p65 複合体が uPA プロモーター上の NF- κ B 結合領域に直接結合し (図 16)、NF- κ B 依存的な uPA 遺伝子転写活性を誘導することも示された (図 17A)。一方で、MUC1-C は β -catenin との複合体形成を介して β -catenin の安定化に関与することから [10, 34, 39, 51, 87]、MUC1-C/ β -catenin 複合体が uPA 遺伝子の転写を制御している可能性も考えられた。 β -Catenin は別の転写因子である TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) の活性化を制御することが一般的に知られており、 β -catenin と TCF/LEF の複合体により標的遺伝子の転写が制御される [88]。従って、プロモーター上への MUC1-C/ β -catenin 複合体の結合及び転写因子としての作用には、TCF/LEF が必要となる。uPA 遺伝子の転写が MUC1-C/ β -catenin 複合体によっても制御されている場合、uPA 遺伝

子のプロモーター上に存在する TCF 結合領域中の塩基配列の一部を変異することによる転写活性の低下が考えられたが、本研究では変異挿入による転写活性の変化は認められなかった (図 17B)。

uPA は腫瘍細胞や周囲の間質細胞から細胞外に分泌され MMPs を活性化する。本研究では図 18 に示すように、MUC1 発現腫瘍細胞において uPA 及び MMP-2/9 についてそれぞれ分泌量及び活性型の増加が認められた一方で、uPA の活性化や uPA によるシグナル伝達に関与する uPAR 及び MMP-2/9 の発現量自体に変化は見られなかった。uPAR は uPA と同様に β -catenin により発現が制御され [89, 90]、また MMPs とりわけ MMP-9 の発現は、NF- κ B シグナル伝達に制御されることが報告されているが [91]、本研究では MUC1 発現腫瘍細胞における MMPs 活性の亢進は、MUC1 によって誘導される uPA の発現亢進に依存していることが強く示唆された。uPA 及び MMP-2/9 の活性化は細胞外基質の分解にとって重要であり、これらの分子の活性化は細胞浸潤能の亢進に大きく関わる。図 19 及び 20 に示すように、細胞浸潤能の評価指標であるパーセント浸潤が MUC1 発現腫瘍細胞において上昇しており、また uPA 及び MMP-2/9 の酵素活性の上昇とも相関した。一方で、MUC1 は細胞増殖能、生存能、移動能といった細胞機能も制御することから、MUC1 発現によって誘導された悪性化がどのような分子的背景に依存するかを区別することが重要となる。本研究では、uPA 及び MMP-2/9 の関与をより正確に評価するために、invasion assay と migration assay を同時に行い評価した。加えて図 20 に示すように、HCT116/MUC1 細胞における細胞浸潤能の亢進は MMPs、uPA 及び NF- κ B の各阻害剤処理によって抑制された。これらの結果は、MUC1 発現腫瘍細胞の細胞浸潤能が、MUC1 によって誘導される MUC1-C/NF- κ B-uPA-MMPs 経路によって制御されていることを強く示唆している。

MUC1 を介した遺伝子転写制御を対象とした従来の報告の多くは、MUC1-C と転写因子の相互作用以降の機構に焦点を当てており、MUC1-C へ転写因子がリクルートされる機構についてはほとんどアプローチされていない。第 1 章でも触れたように、当研究室では以前に、Siglec-9 や galectin-3 が MUC1 上の糖鎖に結合することで MUC1-C/ β -catenin 複合体形成を誘導することを報告した。HCT116/MUC1 細胞は内在的に galectin-3 を発現し、またその一部は細胞表面上の MUC1 と結合していることから [第 1 章参照]、本研究で示された MUC1-C/NF- κ B p65 複合体形成が、MUC1 への galectin-3 の結合に起因する可能性が考えられた。この可能性を検討するために、第 1 章と同様の方法で galectin-3 により HCT116/MUC1 細胞を処理後、免疫沈降を行い MUC1-C と共沈降する NF- κ B p65 を検出した結果、galectin-3 処理により MUC1-C と共沈降する NF- κ B p65 量は増加し、処理後 20 分で最大となった (図 22)。この結果より、MUC1 への galectin-3 の結合が MUC1-C/NF- κ B p65 複合体形成に関与する可能性が考えられる。本研究で扱った細胞は galectin-3 を産生し細胞外に分泌していることから、本章で行った実験系では内在性の galectin-3 が MUC1 に結合し、MUC1-C/NF- κ B p65 複合体形成を誘導した状態での結果である可能性が考えられる。

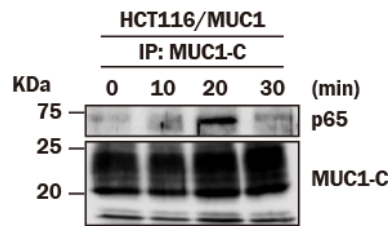


図 22. MUC1 への galectin-3 の結合に伴う NF-κB p65 のリクルート

図 5A に記した方法に従って、細胞表面の galectin-3 を除去した HCT116/MUC1 細胞を、recombinant galectin-3 (40 μg/ml: rGal-3) により 0~30 分間処理後、同細胞抽出液に抗 MUC1-C 抗体を加えて免疫沈降を行った。図 1C に記した方法に従って、NF-κB p65 及び MUC1-C を検出した。

本研究では、MUC1 が MUC1-C/NF-κB p65 複合体を形成し NF-κB シグナル伝達経路を活性化することで、同経路活性化に伴う uPA の発現及び MMP-2/9 の活性化が亢進し、MUC1 発現腫瘍細胞の細胞浸潤能が亢進することを示した。上述の機構は MUC1 による細胞浸潤能亢進における新たな機構を示したものであり、本機構を阻害することが新たな癌治療法の 1 つとなる可能性を秘めている。MUC1 を標的とした細胞膜透過性の合成ペプチドである GO-203 は、MUC1-C のホモ多量体化を阻害することで MUC1 発現腫瘍細胞の細胞増殖を抑制することが示されており、抗癌剤として治験も進められているが [13, 41, 48]、本研究の結果は、MUC1 だけでなく uPA も MUC1 の過剰発現による腫瘍細胞の悪性化に対する治療への有用な標的となる可能性を示唆するものである。

3. 総括

MUC1 は様々な上皮悪性腫瘍細胞において過剰発現しているタンパク質である。従来から、増殖因子/増殖因子受容体依存的な MUC1 介在性のシグナル伝達による腫瘍悪性化への関与が報告されてきたが、今回本研究では異なる 2 つのテーマの研究を通して、MUC1 を起点とした新たな腫瘍悪性化機構を解明した。今回明らかにした結果は以下の通りである。

- 1-1) 腫瘍細胞で産生された galectin-3 の一部は、腫瘍細胞上の MUC1 に結合した。
- 1-2) ヒト癌患者組織切片において、MUC1 と galectin-3 は同様の分布を示した。
- 1-3) MUC1 への galectin-3 の結合に伴い、MUC1-C のリン酸化及びそれに付随する ERK1/2 及び Akt のリン酸化の亢進が認められた。
- 1-4) 上述のリン酸化亢進機構に EGFR は関与せず、また galectin-3 の多量体形成能が重要であることを示した。
- 1-5) MUC1 及び galectin-3 の発現レベルと、細胞増殖能及び移動能には相関性が認められた。

(図 23, 左経路)

- 2-1) 腫瘍細胞及びヒト癌患者組織切片において、MUC1 と uPA の発現には相関性が認められた。
- 2-2) ヒト癌患者組織切片において、MUC1 と uPA の発現部位が一致した。
- 2-3) MUC1-C と NF- κ B p65 が複合体を形成後核移行し、uPA プロモーター上へリクルートされることを示した。
- 2-4) uPA の発現量増加は、uPA 及び MMP-2/9 の活性型の増加を誘導した。
- 2-5) 腫瘍細胞の細胞浸潤能は、上述の酵素活性化と相関した。
- 2-6) MUC1-C/NF- κ B p65 複合体形成には、MUC1 への galectin-3 の結合が関与している可能性が示唆された。

(図 23, 右経路)

今回示された両機構が、腫瘍組織微小環境下において MUC1 発現腫瘍細胞の悪性化に関与していることが考えられる。またどちらの機構においても、MUC1 への galectin-3 の結合が腫瘍悪性化に関与している可能性は注目すべき点である。これは腫瘍細胞や周囲の間質細胞等から分泌された galectin-3 が autocrine/paracrine に MUC1 に結合することによって、MUC1 発現腫瘍細胞における様々な悪性化機構の引き金として機能している可能性を示すものであり (図 23)、増殖因子/増殖因子受容体に依存しない、新たな腫瘍悪性化機構であることを示すものである。

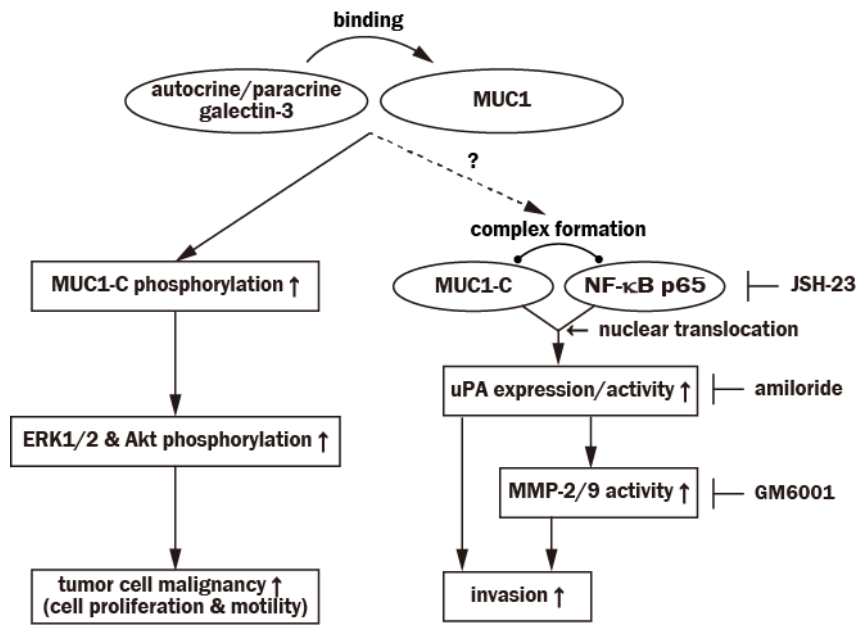


図 23. MUC1 への galectin-3 の結合による MUC1 発現腫瘍細胞における腫瘍悪性化への関与
 MUC1 への galectin-3 の結合を起点として、MUC1-C のリン酸化及び MUC1-C へのアダプタータンパク質のリクルートが促進する結果、様々な腫瘍悪性化が誘導される。

4. 謝辞

本研究を行うに当たり、終始御懇意なる御指導と御鞭撻を承りました恩師京都産業大学工学部（現総合生命科学部）中田博教授に深甚な謝意を表します。

また、本研究に種々の有益なる御助言を賜りました秋田薫氏、井上瑞江氏、戸田宗豊氏、石田有希子氏、万木肇氏、谷田周平氏に深く感謝致しますと共に、本研究にご協力頂いた当研究室の皆様方に深く感謝致します。

本研究において、ヒト癌組織及び非癌部組織標本の提供及び有益なる御助言を賜りました大阪市立大学大学院医学研究科八代正和博士、澤田鉄二博士、平川弘聖博士並びに合成グリコポリマーの提供及び有益なる御助言を賜りました静岡大学農学部村田健臣博士に深く感謝致します。

5. 参考文献

1. Kufe, D. (2009) Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 874-885
2. Kufe, D., Inghirami, G., Abe, M., Hayes, D., Justi-Wheeler, H., and Schlom, J. (1984) Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. *Hybridoma* **3**, 223-232
3. Qu, C. F., Li, Y., Song, Y. J., Rizvi, S. M., Raja, C., Zhang, D., Samra, J., Smith, R., Perkins, A. C., Apostolidis, C., and Allen, B. J. (2004) MUC1 expression in primary and metastatic pancreatic cancer cells for in vitro treatment by (213)Bi-C595 radioimmunoconjugate. *Br. J. Cancer* **91**, 2086-2093
4. Nakamori, S., Ota, D. M., Cleary, K. R., Shirotani, K., and Irimura, T. (1994) MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. *Gastroenterology* **106**, 353-361
5. Ligtenberg, M. J., Kruijshaar, L., Buijs, F., van Meijer, M., Litvinov, S. V., and Hilken, J. (1992) Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor. *J. Biol. Chem.* **267**, 6171-6177
6. Parry, S., Silverman, H. S., McDermott, K., Willis, A., Hollingsworth, M. A., and Harris, A. (2001) Identification of MUC1 proteolytic cleavage sites in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 715-720
7. Siddiqui, J., Abe, M., Hayes, D., Shani, E., Yunis, E., and Kufe, D. (1988) Isolation and sequencing of a cDNA coding for the human DF3 breast carcinoma-associated antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 2320-2323
8. Gendler, S., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, T., Rothbard, J., and Burchell, J. (1988) A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *J. Biol. Chem.* **263**, 12820-12823
9. Ligtenberg, M. J., Vos, H. L., Gennissen, A. M., and Hilken, J. (1990) Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J. Biol. Chem.* **265**, 5573-5578
10. Yamamoto, M., Bharti, A., Li, Y., and Kufe, D. (1997) Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **272**, 12492-12494
11. Ahmad, R., Rajabi, H., Kosugi, M., Joshi, M. D., Alam, M., Vasir, B., Kawano, T., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2011) MUC1-C oncoprotein promotes STAT3 activation in an autoinductive regulatory loop. *Sci. Signal.* **4**, ra9
12. Ahmad, R., Raina, D., Joshi, M. D., Kawano, T., Ren, J., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2009) MUC1-C oncoprotein functions as a direct activator of the nuclear factor-kappaB p65

- transcription factor. *Cancer Res.* **69**, 7013-7021
13. Raina, D., Ahmad, R., Rajabi, H., Panchamoorthy, G., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2012) Targeting cysteine-mediated dimerization of the MUC1-C oncoprotein in human cancer cells. *Int. J. Oncol.* **40**, 1643-1649
 14. Leng, Y., Cao, C., Ren, J., Huang, L., Chen, D., Ito, M., and Kufe, D. (2007) Nuclear import of the MUC1-C oncoprotein is mediated by nucleoporin Nup62. *J. Biol. Chem.* **282**, 19321-19330
 15. Lloyd, K. O., Burchell, J., Kudryashov, V., Yin, B. W., and Taylor-Papadimitriou, J. (1996) Comparison of *O*-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 33325-33334
 16. Brockhausen, I. (1999) Pathways of *O*-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 67-95
 17. Liu, F. T., and Rabinovich, G. A. (2005) Galectins as modulators of tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 29-41
 18. Herrmann, J., Turck, C. W., Atchison, R. E., Huflejt, M. E., Poulter, L., Gitt, M. A., Burlingame, A. L., Barondes, S. H., and Leffler, H. (1993) Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacterial and tissue collagenase. *J. Biol. Chem.* **268**, 26704-26711
 19. Davidson, P. J., Davis, M. J., Patterson, R. J., Ripoché, M. A., Poirier, F., and Wang, J. L. (2002) Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. *Glycobiology* **12**, 329-337
 20. Yu, F., Finley, R. L., Jr., Raz, A., and Kim, H. R. (2002) Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome *c* release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J. Biol. Chem.* **277**, 15819-15827
 21. Yang, R. Y., Hsu, D. K., and Liu, F. T. (1996) Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 6737-6742
 22. Honjo, Y., Nangia-Makker, P., Inohara, H., and Raz, A. (2001) Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* **7**, 661-668
 23. Dagher, S. F., Wang, J. L., and Patterson, R. J. (1995) Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 1213-1217
 24. Sato, S., and Hughes, R. C. (1994) Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. *J. Biol. Chem.* **269**, 4424-4430
 25. Hughes, R. C. (1999) Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 172-185
 26. Nangia-Makker, P., Honjo, Y., Sarvis, R., Akahani, S., Hogan, V., Pienta, K. J., and Raz, A. (2000) Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **156**, 899-909

27. Ochieng, J., Leite-Browning, M. L., and Warfield, P. (1998) Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 788-791
28. Iurisci, I., Tinari, N., Natoli, C., Angelucci, D., Cianchetti, E., and Iacobelli, S. (2000) Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **6**, 1389-1393
29. Saussez, S., Lorfevre, F., Lequeux, T., Laurent, G., Chantrain, G., Vertongen, F., Toubeau, G., Decaestecker, C., and Kiss, R. (2008) The determination of the levels of circulating galectin-1 and -3 in HNSCC patients could be used to monitor tumor progression and/or responses to therapy. *Oral Oncol.* **44**, 86-93
30. Yu, L. G., Andrews, N., Zhao, Q., McKean, D., Williams, J. F., Connor, L. J., Gerasimenko, O. V., Hilkens, J., Hirabayashi, J., Kasai, K., and Rhodes, J. M. (2007) Galectin-3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion. *J. Biol. Chem.* **282**, 773-781
31. Zhao, Q., Guo, X., Nash, G. B., Stone, P. C., Hilkens, J., Rhodes, J. M., and Yu, L. G. (2009) Circulating galectin-3 promotes metastasis by modifying MUC1 localization on cancer cell surface. *Cancer Res.* **69**, 6799-6806
32. Zhao, Q., Barclay, M., Hilkens, J., Guo, X., Barrow, H., Rhodes, J. M., and Yu, L. G. (2010) Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis. *Mol. Cancer* **9**, 154
33. Schroeder, J. A., Thompson, M. C., Gardner, M. M., and Gendler, S. J. (2001) Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J. Biol. Chem.* **276**, 13057-13064
34. Li, Y., Ren, J., Yu, W., Li, Q., Kuwahara, H., Yin, L., Carraway, K. L. 3rd, and Kufe, D. (2001) The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin. *J. Biol. Chem.* **276**, 35239-35242
35. Ramasamy, S., Duraisamy, S., Barbashov, S., Kawano, T., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2007) The MUC1 and galectin-3 oncoproteins function in a microRNA-dependent regulatory loop. *Mol. Cell* **27**, 992-1004
36. Rahn, J. J., Shen, Q., Mah, B. K., and Hugh, J. C. (2004) MUC1 initiates a calcium signal after ligation by intercellular adhesion molecule-1. *J Biol Chem.* **279**, 29386-29390
37. Shen, Q., Rahn, J. J., Zhang, J., Gunasekera, N., Sun, X., Shaw, A. R., Hendzel, M. J., Hoffman, P., Bernier, A., and Hugh, J. C. (2008) MUC1 initiates Src-CrkL-Rac1/Cdc42-mediated actin cytoskeletal protrusive motility after ligating intercellular adhesion molecule-1. *Mol. Cancer Res.* **4**, 555-567
38. Lillehoj, E. P., Kim, H., Chun, E. Y., and Kim, K. C. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* stimulates phosphorylation of the airway epithelial membrane glycoprotein Muc1 and activates MAP

- kinase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **287**, L809-L815
39. Tanida, S., Akita, K., Ishida, A., Mori, Y., Toda, M., Inoue, M., Ohta, M., Yashiro, M., Sawada, T., Hirakawa, K., and Nakada, H. (2013) Binding of the sialic acid-binding lectin, Siglec-9, to the membrane mucin, MUC1, induces recruitment of β -catenin and subsequent cell growth. *J. Biol. Chem.* **288**, 31842-31852
 40. Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., Muller, W. E., Yagi, F., and Kasai, K. (2002) Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 232-254
 41. Kharbanda, A., Rajabi, H., Jin, C., Tchaicha, J., Kikuchi, E., Wong, K. K., and Kufe, D. (2014) Targeting the oncogenic MUC1-C protein inhibits mutant EGFR-mediated signaling and survival in non-small cell lung cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **20**, 5423-5434
 42. Sparrow, C. P., Leffler, H., and Barondes, S. H. (1897) Multiple soluble beta-galactoside-binding lectins from human lung. *J. Biol. Chem.* **262**, 7383-7390
 43. Bian, C. F., Zhang, Y., Sun, H., Li, D. F., and Wang, D. C. (2011) Structural basis for distinct binding properties of the human galectins to Thomsen-Friedenreich antigen. *PLoS ONE* **6**, e25007
 44. Merlin, J., Stechly, L., de Beaucé, S., Monté, D., Leteurtre, E., van Seuning, I., Huet, G., and Pigny, P. (2011) Galectin-3 regulates MUC1 and EGFR cellular distribution and EGFR downstream pathways in pancreatic cancer cells. *Oncogene* **30**, 2514-2525
 45. Pandey, P., Kharbanda, S., and Kufe, D. (1995) Association of the DF3/MUC1 breast cancer antigen with Grb2 and the Sos/Ras exchange protein. *Cancer Res.* **55**, 4000-4003
 46. Kinlough, C. L., Poland, P. A., Bruns, J. B., Harkleroad, K. L., and Hughey, R. P. (2004) MUC1 membrane trafficking is modulated by multiple interactions. *J. Biol. Chem.* **279**, 53071-53077
 47. Kato, K., Lu, W., Kai, H., Kim, K. C. (2007) Phosphoinositide 3-kinase is activated by MUC1 but not responsible for MUC1-induced suppression of Toll-like receptor 5 signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **293**, L686-L692
 48. Raina, D., Kosugi, M., Ahmad, R., Panchamoorthy, G., Rajabi, H., Alam, M., Shimamura, T., Shapiro, G. I., Supko, J., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2011) Dependence on the MUC1-C oncoprotein in non-small cell lung cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **10**, 806-816
 49. Li, Q., Ren, J., and Kufe, D. (2004) Interaction of human MUC1 and beta-catenin is regulated by Lck and ZAP-70 in activated Jurkat T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 471-476
 50. Raina, D., Ahmad, R., Kumar, S., Ren, J., Yoshida, K., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2006) MUC1 oncoprotein blocks nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *EMBO J.* **25**, 3774-3783
 51. Li, Y., Kuwahara, H., Ren, J., Wen, G., and Kufe, D. (2001) The c-Src tyrosine kinase regulates signaling of the human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen with GSK3 beta and

- beta-catenin. *J. Biol. Chem.* **276**, 6061-6064
52. Tanida, S., Mori, Y., Ishida, A., Akita, K., and Nakada, H. (2014) Galectin-3 binds to MUC1-N-terminal domain and triggers recruitment of β -catenin in MUC1-expressing mouse 3T3 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 1790-1797
 53. Morris, S., Ahmad, N., André, S., Kaltner, H., Gabius, H. J., Brenowitz, M., and Brewer, F. (2004) Quaternary solution structures of galectins-1, -3, and -7. *Glycobiology* **14**, 293-300
 54. Yang, R. Y., Hill, P. N., Hsu, D. K., and Liu, F. T. (1998) Role of the carboxyl-terminal lectin domain in self-association of galectin-3. *Biochemistry* **37**, 4086-4092
 55. Ahmad, N., Gabius, H. J., André, S., Kaltner, H., Sabesan, S., Roy, R., Liu, B., Macaluso, F., and Brewer, C. F. (2004) Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J. Biol. Chem.* **279**, 10841-10847
 56. Becker, J. W., Erickson, H. P., Hoffman, S., Cunningham, B. A., and Edelman, G. M. (1989) Topology of cell adhesion molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 1088-1092
 57. Bramwell, M. E., Wiseman, G., and Shotton, D. M. (1986) Electron-microscopic studies of the CA antigen, epitectin. *J. Cell Sci.* **86**, 249-261
 58. Dam, T. K., Gabius, H. J., André, S., Kaltner, H., Lensch, M., and Brewer, C. F. (2005) Galectins bind to the multivalent glycoprotein asialofetuin with enhanced affinities and a gradient of decreasing binding constants. *Biochemistry* **44**, 12564-12571
 59. Cascio, S., Zhang, L., and Finn, O. J. (2011) MUC1 protein expression in tumor cells regulates transcription of proinflammatory cytokines by forming a complex with nuclear factor- κ B p65 and binding to cytokine promoters: importance of extracellular domain. *J. Biol. Chem.* **286**, 42248-42256
 60. John, C. M., Leffler, H., Kahl-Knutsson, B., Svensson, I., and Jarvis, G. A. (2003) Truncated galectin-3 inhibits tumor growth and metastasis in orthotopic nude mouse model of human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **9**, 2374-2383
 61. Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch W. (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**, 3279-3290
 62. Engelman, J. A. (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 550-562
 63. Chauhan, D., Li, G., Podar, K., Hideshima, T., Neri, P., He, D., Mitsiades, N., Richardson, P., Chang, Y., Schindler, J., Carver, B., and Anderson, K. C. (2005) A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100 overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Cancer Res.* **65**, 8350-8358
 64. Streetly, M. J., Maharaj, L., Joel, S., Schey, S. A., Gribben, J. G., and Cotter, F. E. (2010) GCS-100, a novel galectin-3 antagonist, modulates MCL-1, NOXA, and cell cycle to induce

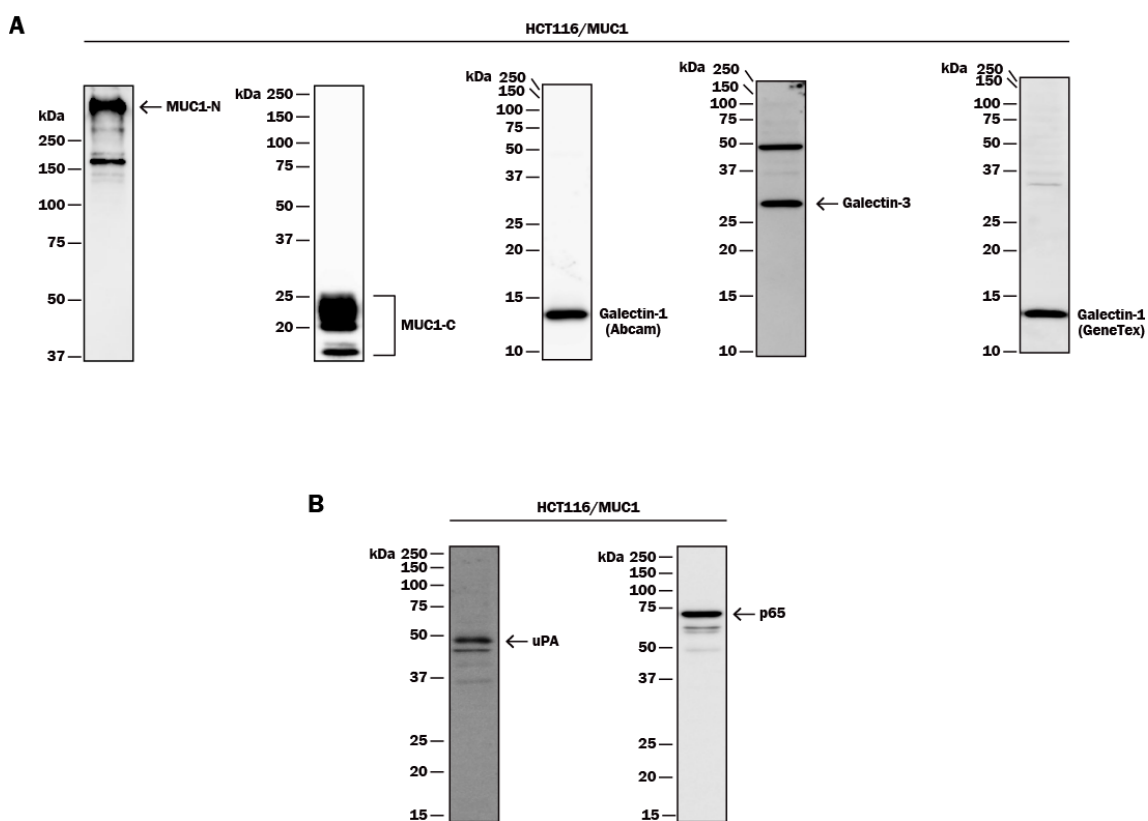
- myeloma cell death. *Blood* **115**, 3939-3948
65. Glinskii, O. V., Sud, S., Mossine, V. V., Mawhinney, T. P., Anthony, D. C., Glinsky, G. V., Pienta, K. J., and Glinsky, V. V. (2012) Inhibition of prostate cancer bone metastasis by synthetic TF antigen mimic/galectin-3 inhibitor lactulose-L-leucine. *Neoplasia* **14**, 65-73
 66. Wesseling, J., van der Valk, S. W., and Hilkens, J. (1996) A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. *Mol. Biol. Cell* **7**, 565-577
 67. Andreasen, P. A., Kjølner, L., Christensen, L., and Duffy, M. J. (1997) The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J. Cancer* **72**, 1-22
 68. Danø, K., Behrendt, N., Høyer-Hansen, G., Johnsen, M., Lund, L. R., Ploug, M., and Rømer, J. (2005) Plasminogen activation and cancer. *Thromb. Haemost.* **93**, 676-681
 69. Blasi, F., and Carmeliet, P. (2002) uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 932-943
 70. Mason, S. D., and Joyce, J. A. (2011) Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol.* **21**, 228-237
 71. Naldini, L., Tamagnone, L., Vigna, E., Sachs, M., Hartmann, G., Birchmeier, W., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Blasi, F., and Comoglio, P. M. (1992) Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J.* **11**, 4825-4833
 72. Ustach, C. V., and Kim, H. R. (2005) Platelet-derived growth factor D is activated by urokinase plasminogen activator in prostate carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6279-6288
 73. Waltz, D. A., and Chapman, H. A. (1994) Reversible cellular adhesion to vitronectin linked to urokinase receptor occupancy. *J. Biol. Chem.* **269**, 14746-14750
 74. Wei, Y., Eble, J. A., Wang, Z., Kreidberg, J. A., and Chapman, H. A. (2001) Urokinase receptors promote beta1 integrin function through interactions with integrin alpha3beta1. *Mol. Biol. Cell* **12**: 2975-2986
 75. Wei, Y., Czekay, R. P., Robillard, L., Kugler, M. C., Zhang, F., Kim, K. K., Xiong, J. P., Humphries, M. J., and Chapman, H. A. (2005) Regulation of alpha5beta1 integrin conformation and function by urokinase receptor binding. *J. Cell Biol.* **168**, 501-511
 76. Gondi, C. S., Kandhukuri, N., Dinh, D. H., Gujrati, M., and Rao, J. S. (2007) Down-regulation of uPAR and uPA activates caspase-mediated apoptosis and inhibits the PI3K/AKT pathway. *Int. J. Oncol.* **31**, 19-27
 77. Aguirre Ghiso, J. A. (2002) Inhibition of FAK signaling activated by urokinase receptor induces dormancy in human carcinoma cells in vivo. *Oncogene* **21**, 2513-2524
 78. Irigoyen, J. P., Muñoz-Cánoves, P., Montero, L., Koziczak, M., and Nagamine, Y. (1999) The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 104-132

79. Novak, U., Cocks, B. G., and Hamilton, J. A. (1991) A labile repressor acts through the NFkB-like binding sites of the human urokinase gene. *Nucleic Acids Res.* **19**: 3389-3393
80. Cicek, M., Fukuyama, R., Cicek, M. S., Sizemore, S., Welch, D. R., Sizemore, N. and Casey, G. (2009) BRMS1 contributes to the negative regulation of uPA gene expression through recruitment of HDAC1 to the NF-kappaB binding site of the uPA promoter. *Clin. Exp. Metastasis* **26**: 229-237
81. Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344-362
82. Ahmad, R., Raina, D., Trivedi, V., Ren, J., Rajabi, H., Kharbanda, S. and Kufe, D. (2007) MUC1 oncoprotein activates the IkappaB kinase beta complex and constitutive NF-kappaB signalling. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1419-1427
83. Hiendlmeyer, E., Regus, S., Wassermann, S., Hlubek, F., Haynl, A., Dimmler, A., Koch, C., Knoll, C., van Beest, M., Reuning, U., Brabletz, T., Kirchner, T., and Jung, A. (2004) Beta-catenin up-regulates the expression of the urokinase plasminogen activator in human colorectal tumors. *Cancer Res.* **64**, 1209-1214
84. Huang, L., Ren, J., Chen, D., Li, Y., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2003) MUC1 cytoplasmic domain coactivates Wnt target gene transcription and confers transformation. *Cancer Biol. Ther.* **2**, 702-706.
85. Sahraei, M., Roy, L. D., Curry, J. M., Teresa, T. L., Nath, S., Besmer, D., Kidiyoor, A., Dalia, R., Gendler, S. J., and Mukherjee, P. (2012) MUC1 regulates PDGFA expression during pancreatic cancer progression. *Oncogene* **31**, 4935-4945
86. Singh, P. K., Wen, Y., Swanson, B. J., Shanmugam, K., Kazlauskas, A., Cerny, R. L., Gendler, S. J., and Hollingsworth, M. A. (2007) Platelet-derived growth factor receptor beta-mediated phosphorylation of MUC1 enhances invasiveness in pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* **67**, 5201-5210
87. Huang, L., Chen, D., Liu, D., Yin, L., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2005) MUC1 oncoprotein blocks glycogen synthase kinase 3beta-mediated phosphorylation and degradation of beta-catenin. *Cancer Res.* **65**, 10413-10422
88. MacDonald, B. T., Tamai, K., and He, X. (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell.* **17**, 9-26
89. Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M. L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W. F., Moyer, M. P., Riecken, E. O., Buhr, H. J., and Hanski, C. (1999) Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 1603-1608
90. Wang, Q., Sun, Z. X., Allgayer, H., and Yang, H. S. (2010) Downregulation of E-cadherin is an essential event in activating beta-catenin/Tcf-dependent transcription and expression of its

target genes in Pcd4 knockdown cells. *Oncogene* **29**, 128-138

91. Farina, A. R., Tacconelli, A., Vacca, A., Maroder, M., Gulino, A., and Mackay, A. R. (1999) Transcriptional up-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression during spontaneous epithelial to neuroblast phenotype conversion by SK-N-SH neuroblastoma cells, involved in enhanced invasivity, depends upon GT-box and nuclear factor kappaB elements. *Cell Growth Differ.* **10**, 353-367

6. 資料



資料 1. 本研究に使用した代表的な抗体の反応性

(A) 抗 MUC1-N 抗体 (Western blotting 等に使用)、抗 MUC1-C 抗体 (Western blotting 等に使用)、抗 galectin-1 抗体 (Abcam: Western blotting に使用)、抗 galectin-3 抗体 (Western blotting 等に使用) 及び抗 galectin-1 抗体 (GeneTex: 細胞免疫染色に使用) の反応性を、HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液を電気泳動後、Western blotting の一次抗体として使用することにより検討した。(B) 上述の方法に従って、抗 NF- κ B p65 抗体 (Western blotting 等に使用) 及び抗 uPA 抗体 (Western blotting 等に使用) の反応性を検討した。