

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01376

研究課題名(和文)細胞内多標的分子計測技術の開発及びこれを用いた糖化の腫瘍細胞へ及ぼす影響の解析

研究課題名(英文)Development of intracellular multi-monitoring system and its application for analysis of glycation effect on tumor cells

研究代表者

三上 あかね(坂口あかね)(SAKAGUCHI-MIKAMI, Akane)

東京工科大学・医療保健学部・講師

研究者番号：70469782

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞内糖化の腫瘍関与機構の解明に向けた腫瘍細胞内糖化モニタリング技術構築及びこれを用いた腫瘍細胞の細胞内糖化と細胞への影響評価を試みた。

細胞内糖化レベルは、骨髄腫瘍細胞では変化しなかったが、老化モデル腫瘍細胞では培地糖濃度増加に伴って顕著に増加した。また糖代謝量、遺伝子発現様式から、骨髄腫瘍細胞の細胞内糖化制御には糖代謝制御とは異なる機構が関与し、腫瘍細胞ごとに細胞内糖化制御に関与する因子が異なっている事が示唆された。今後、各腫瘍細胞における細胞内糖化物形成機構及び細胞内糖化亢進の責任因子を解明し、その細胞内機能を同定することで細胞内糖化の腫瘍関与機構解明に寄与すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、近年、細胞内糖化と脱糖化のバランスが細胞機能及びエピジェネティック制御に影響し、がんや加齢関連疾患の進行などの発症・進行に関与するとして注目されている細胞内糖化レベルの簡便なモニタリングを可能とする技術を開発した。また本技術を用いた腫瘍細胞内糖化モニタリングにより、細胞内糖化制御に関与する因子が腫瘍細胞ごとに異なっていることが示唆された。本技術を用いた腫瘍細胞内糖化物の解析は、腫瘍進行と糖化の関与機構の解明のみならず、バイオマーカーの開発や薬剤スクリーニングにも有用であり、がんの治療及び早期発見に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study we attempted to investigate intracellular glycation in tumor cells and its effect on cell functions using intracellular glycation monitoring system, prior to elucidation of involvement mechanism for intracellular glycation on tumor progression.

The result showed that the intracellular glycation level was not change in myeloma cells whereas significantly increased in aged-model tumor cells with the increase of medium glucose. The glucose metabolism and gene expression patterns of the cells suggested that the glycation level in myeloma cells may be controlled by a mechanism other than glucose metabolism system. It is also indicated that genes concerned with intracellular glycation level in each tumor cells are different. Further studies to identify responsibility genes for intracellular glycation level and their cellular functions are expected to contribute to the elucidation of involvement mechanism for intracellular glycation on tumor progression.

研究分野：生体情報・計測/糖化/細胞工学

キーワード：生体情報・計測 細胞内計測 糖化関連疾病 細胞内糖化 腫瘍細胞

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖化反応は、還元糖とアミンの間で起こる非酵素的な一連の化学反応であり、生体内外、細胞内において普遍的に起こる。反応初期生成物や後期生成物(Advanced glycation end products, AGEs)等の糖化物(glycated products, GPs)の形成は、蛋白質の生体機能喪失をもたらす、糖尿病合併症を始めアルツハイマー病、癌など多くの疾病に関与するとして注目されている¹。これまでに AGEs によって癌細胞の増殖、転移浸潤が促進されること²、AGEs が AGE 受容体(RAGE)を介して炎症反応をもたらす、また、糖尿病と癌で見られる炎症反応の基盤機序は類似していることなどが報告されている。また、骨髄系腫瘍細胞において糖化によって形成される RAGE は細胞分化能に変化をもたらすと考えられている³。しかし、生体・細胞内には複数の GPs 形成経路の存在が示唆されており⁴、詳細な細胞内糖化機構及び腫瘍進行への関与機構は明らかとなっていない。このため、細胞内糖化の腫瘍の発症及び進行への関与機序解明のためには、細胞内における各糖化過程のリアルタイム計測及び、各糖化過程における糖化の細胞機能への影響評価を可能とする簡便な細胞内糖化計測技術及び細胞機能評価技術の開発が望まれる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、細胞内糖化の腫瘍発症・進行への関与機構解明のための、マルチプレックス細胞内糖化モニタリング技術の構築、及びこれを用いた腫瘍細胞機能と糖化の関連を評価する技術の構築を目的とした。糖化の細胞への影響評価法として、これまでに RAGE の発現及び応答に基づく評価法が広く用いられているが、RAGE は、マルチリガンド受容体であり、また、RAGE の発現も、様々な分子によって誘導され、GPs 特異性はない。そこで、本研究では、RAGE プロモーターを用いた従来の糖化評価法に加え、研究代表者らが開発した還元糖、初期糖化物などの細胞内糖化関連物質モニタリング技術など、複数の細胞内標的に対するモニタリング技術を組合せた簡便な細胞機能評価を可能にする新規マルチプレックス細胞内リアルタイム計測技術の構築を試みた。また、腫瘍機序は細胞種によって異なるため、本研究では分化・増殖能において特徴的な性質を持つ異なる 2 つの白血病細胞をはじめとする複数の腫瘍細胞を用いて、細胞内糖化モニタリング導入細胞を構築し、各腫瘍細胞における細胞内糖化レベルと細胞機能への影響の評価を試みた。

3. 研究の方法

(1)細胞内糖化モニタリングシステムの構築

先に構築した新規初期糖化物(糖化アミノ酸)特異的応答性転写調節因子遺伝子コンストラクト、及びレポーター遺伝子配列上流に初期糖化物特異的応答性転写調節因子結合領域(オペレーター)を融合したレポーター(ルシフェラーゼ)遺伝子コンストラクトに基づくルシフェラーゼレポーターアッセイ技術および緑色蛍光タンパク質を用いて細胞内糖化アミノ酸リアルタイムモニタリング法を構築した。また、終末糖化産物(AGEs)応答性のヒト RAGE プロモーターおよび赤色蛍光タンパク質を用いて AGEs に対する細胞リアルタイムモニタリング法を構築した。更に、新規糖化関連物質モニタリング用認識素子の開発を目的として、新規糖化タンパク質を認識し応答する転写調節因子、およびメチルグリオキサル認識素子の検索、クローニング、及びモニタリング素子としての特性検討を行った。

(2)細胞内糖化モニタリングシステム導入腫瘍細胞の構築

構築した初期糖化産物特異的応答性転写調節因子遺伝子コンストラクト、及びレポーターコ

ンストラクト，内部指標の，2種類の骨髄腫瘍細胞(単球系腫瘍細胞，及びT細胞系腫瘍細胞)及び酸化ストレス耐性を低下させた2種類の老化モデル腫瘍細胞への導入法の検討を行い，4種類の糖化モニタリングシステム導入腫瘍細胞を構築した．

(3)腫瘍細胞内糖化モニタリング及び細胞機能への影響の評価

細胞内糖化モニタリングシステム導入腫瘍細胞を濃度の異なるグルコース濃度で培養しレポーター発現量を指標に核細胞の細胞内糖化物レベルを評価した．また，細胞内グルコース濃度及びグルコース消費量，Real-time PCRを用いた糖化制御に関与する遺伝子，糖代謝関連遺伝子の発現量を評価し，各腫瘍細胞の細胞内糖化レベルとの関連を評価した．

4．研究成果

本研究では，糖化の腫瘍関与機構の解明のための，腫瘍細胞内の多因子のモニタリングを可能とする技術の構築およびこれを用いた腫瘍細胞機能と糖化の関連の評価を試みた．

(1)細胞内糖化モニタリングシステムの構築

初期糖化産物(糖化アミノ酸)特異的応答性転写調節因子及びレポーターアッセイ技術および緑色蛍光タンパク質をレポーターに用いた細胞内糖化アミノ酸リアルタイムモニタリング技術をヒト肝がん細胞に導入しフローサイトメトリーを用いて評価したところ，培地糖濃度の増加に伴い，細胞当たりの蛍光強度の増加がみられた．このことから，本技術を用いた細胞内糖化アミノ酸のリアルタイムモニタリングが可能であることが示唆された．次に，AGEsに対する細胞リアルタイムモニタリング技術をヒト肝がん細胞に導入し同様に評価したところ，細胞の蛍光強度は，培地 AGEs 添加によって顕著に増加したことから，本系を用いた AGEs モニタリングが可能であることが示唆された．一方 培地糖濃度の増加に伴う蛍光強度の増加はみられなかった．2つシステムを共導入した細胞を用いることで，蛍光強度を指標とした細胞内糖化レベルと細胞外 AGEs の同時リアルタイム評価が可能になると期待される．今後は，顕微鏡での評価を可能とするために，安定発現株を樹立して評価を行う．

更に，新規細胞内糖化タンパク質蛍光モニタリング用素子として，糖化タンパク質誘導性オペロンの制御因子と考えられる転写調節因子用タンパク質を組換え生産し，リガンド特性を検討したところ 糖化アミノ酸特異的な結合能を示した．そこで 環境感受性色素で蛍光修飾した後，リガンド結合によって誘導される構造変化に伴う蛍光強度変化を指標に糖化アルブミンとの結合能を評価したところ，糖化アルブミン結合量と非糖化アルブミンの結合量との差がみられなかった．今後，SPR など他の評価法を用いた本タンパク質の糖化アルブミン結合の検討を試みる必要がある．

(2)細胞内糖化モニタリングシステム導入腫瘍細胞の構築

2種類の老化モデル腫瘍細胞への細胞内初期糖化物モニタリングシステムの導入法を検討したところ，リポソーム法によって導入が確認された．一方，2種類の骨髄腫瘍細胞(単球系腫瘍細胞，及びT細胞系腫瘍細胞)への導入法の検討を行ったところ，リポソーム法では導入が確認されず，電気穿孔法を用いたところ導入が確認された．

(3)腫瘍細胞内糖化モニタリング及び細胞機能への影響の評価

2種類の骨髄腫瘍細胞(単球系腫瘍細胞，及びT細胞系腫瘍細胞)へ導入した骨髄腫瘍細胞を用いて，細胞内の糖化物，細胞内糖化関与因子および糖代謝関連因子のモニタリングを行い，細胞

内糖化物量と腫瘍細胞の機能の関連を検討した、また、老化モデル細胞として、酸化ストレス耐性の低下した2種類の腫瘍細胞を用いて同様の検討を行い、比較した。まず、培地糖濃度増加に伴う細胞内糖化レベルの亢進は、2種類の老化モデル細胞において野生型に比べて顕著に増加したのに対し、2種の骨髄腫瘍細胞では、実験した培地糖濃度範囲における細胞内糖化レベルの変化はみられず、細胞内糖化レベルは細胞種によって著しく異なることが示された。また細胞内糖濃度及び糖代謝量の測定から、両骨髄腫瘍細胞の細胞内糖化レベルは糖代謝機能制御とは異なる機構が関与することが示唆された。更に、任意の細胞内糖化レベルにおける糖化関連因子及び糖代謝関連遺伝子の発現様式から、細胞内糖化レベルに関与する因子は検討に用いた4種類の腫瘍細胞で異なり、細胞内糖化の制御機構及びその影響は細胞の種類ごとに異なることが示唆された。

今後、各腫瘍細胞における細胞内糖化物の形成機構及び細胞内糖化亢進の責任因子を解明し、その細胞内機能を同定することで、細胞内糖化の腫瘍関与機構解明に寄与すると期待される。

参考文献

- 1 . JS.Roriz-Filho, et al., *BBA*, 2009, 1792:432–443
- 2 . Elisa ten Hacken, Jan A. Burger, *Pharmacology & Therapeutics*, 2014, 144:338–348
- 3 . Sebastiano Gangemi, et al., *Inflammation Research*, 2012, 61(10): 1063-1067
- 4 . S.M. Sliman, et al., *Mol Cell Biochem* , 2010, 333:9–26

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Akane Sakaguchi-Mikami, Maho Sakurai, Shoya Kojima, Yukimi Sugimoto, Misato Kashiba
2. 発表標題 A Novel Monitoring System for Intracellular glycation
3. 学会等名 日本化学会第100回春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三上あかね、Yani Faozani Alli
2. 発表標題 土壌細菌由来新規糖化産物応答性転写調節因子
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金村孝太、綾野晃一、三上あかね
2. 発表標題 新規糖化タンパク質応答性転写調節因子の検索
3. 学会等名 第27回日本メイラー ド学会(女子栄養大学 埼玉)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 相上莉穂、廣原まゆ、三上あかね
2. 発表標題 細胞糖化マルチモニタリング用蛍光モニタリング法の開発
3. 学会等名 第27回日本メイラー ド学会(女子栄養大学 埼玉)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金井知英優、内田直恵、アリ ヤニ・ファオザニ、三上あかね
2. 発表標題 新規糖化物応答転写調節因子に基づく細胞内糖化物モ ニタリング法の開発
3. 学会等名 第27回日本メイラー ド学会(女子栄養大学 埼玉)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	山崎 智彦 (YAMAZAKI Tomohiko) (50419264)	国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・主幹研究員 (82108)	