

# 博士學位論文要旨

(令和4年3月取得分)



# Functional analysis of $\alpha$ 1,6-Fucosyltransferase (FUT8) in pancreatic carcinoma cell lines

## (膵がん細胞における FUT8 の機能解析)

梁 彩霞

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 細胞制御学教室

Pancreatic carcinoma is one of the deadliest malignant diseases, in which the increased expression of  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase (FUT8), a sole enzyme responsible for catalyzing core fucosylation, which catalyzes the transfer of a fucose from GDP-fucose to the innermost GlcNAc residue via  $\alpha$ 1,6 linkage (Fig. 1), has been reported.

FUT8 play crucial roles in malignant behaviors, such as tumor growth and metastasis in several cancers. However, its pathological roles and regulatory mechanisms in pancreatic cancer remain largely unknown. Here, we use two pancreatic adenocarcinoma cell lines, MIA PaCa-2 and PANC-1 cells, as cell models, to explore the roles of FUT8. We found that a FUT8 gene knockout (FUT8-KO) using CRISPR/Cas9 inhibited cell migration when examined in transwell and wound-healing assays. In MTT and colony-formation assays the FUT8-KO significantly reduced cell proliferation. The potential inhibitory effects were also observed and verified in xenograft tumors in vivo. Moreover, the expression levels of cancer stemness markers such as EpCAM, CXCR4, c-Met, and CD133 were

decreased in the FUT8-KO cells compared with wild-type cells. Also, the spheroid formations in the KO cells were loose and unstable, which was confirmed by pipetting. Additionally, FUT8-KO increased the chemosensitivity to gemcitabine, which is the first-line therapy for advanced pancreatic cancer (Fig. 2).

These novel findings are the first to suggest that the expression of FUT8 is involved in regulating the stemness features of pancreatic cancer cells. Taken together, this study clearly shows that FUT8 has important biological functions in pancreatic cancer, which could provide insights for the treatment of pancreatic carcinoma.

### 〈参考文献〉主論文（原著論文）

Liang C, Fukuda T, Isaji T, Duan C, Song W, Wang Y, Gu J.  $\alpha$ 1,6-Fucosyltransferase contributes to cell migration and proliferation as well as to cancer stemness features in pancreatic carcinoma. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2021 Jun;1865(6):129870.

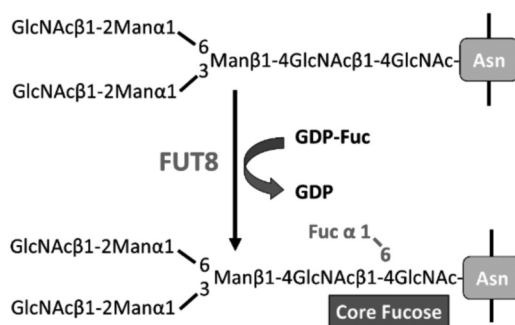


Figure 1. Reaction pathway for the synthesis of core fucose.

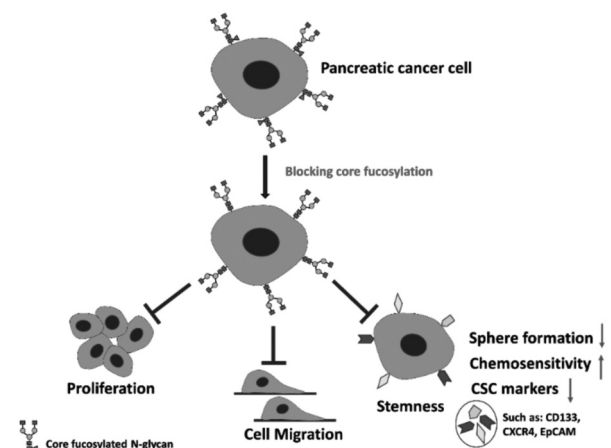


Figure 2. Schematic diagram of FUT8 in pancreatic cancer.



## OGT Regulates $\beta$ 1,4-GlcNAc-branched *N*-glycan Biosynthesis Via the OGT/SLC35A3/GnT-IV Axis

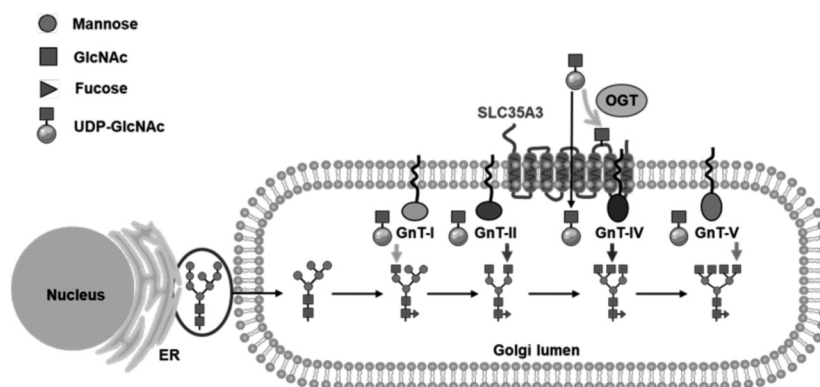
(OGT は OGT/SLC35A3/GnT-IV 軸を介して  $\beta$ 1,4-GlcNAc 分岐型 *N*-グリカンの生合成を制御する)

宋 万里

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 細胞制御学教室

Amongst multiple post-translational modifications (PTMs), protein glycosylation is a common and important process in cells, and altered glycosylation is a hallmark of many diseases including cancers and diabetes. *N*-Linked glycosylation and *O*-linked *N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) are important protein PTMs. One of unique features of *N*-glycans is the GlcNAc-branched complex structure that is sequentially synthesized first by *N*-acetylglucosaminyltransferase I (GnT-I) and GnT-II, and then by GnT-III, GnT-IV, or GnT-V to produce functionally diverse *N*-glycosylated proteins. But *O*-GlcNAcylation is a simple protein PTM, where a single moiety of GlcNAc acts on the serine or threonine residue of target proteins without further elongation or modification into more complex structures. Thus far, the relationship between these two types of glycosylation has remained elusive, and it is unclear whether one influences the other via UDP-GlcNAc, which is a common donor substrate. Theoretically, a decrease in *O*-GlcNAcylation may increase the

products of GlcNAc-branched *N*-glycans. In this study, we found that the amounts of GlcNAc-branched tri-antennary *N*-glycans catalyzed by *N*-acetylglucosaminyltransferase IV (GnT-IV) and tetra-antennary *N*-glycans were significantly decreased in *O*-GlcNAc transferase knockdown cells (OGT-KD) compared with those in wild type cells. We examined this specific alteration by focusing on SLC35A3, which is a main UDP-GlcNAc transporter in mammals that is believed to modulate GnT-IV activation. It is interesting that a deficiency of SLC35A3 specifically leads to a decrease in the amounts of GlcNAc-branched tri- and tetra-antennary *N*-glycans. Furthermore, we found that SLC35A3 interacts with GnT-IV, but not with *N*-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) as shown in following figure. And our experiments have confirmed that OGT modifies SLC35A3 and that *O*-GlcNAcylation contributes to its stability. Furthermore, we found that SLC35A3-KO enhances cell spreading and suppresses both cell migration



Schematic diagram of the proposed molecular mechanism for regulation of the biosynthesis of  $\beta$ 1,4-GlcNAc-branched *N*-glycans by OGT.

and cell proliferation, which are similar to the phenomena observed in the OGT-KD cells. Taken together, these data are the first to demonstrate that *O*-GlcNAcylation specifically governs the biosynthesis of tri- and tetra-antennary *N*-glycans via the OGT-SLC35A3-GnT-IV axis.

## Reference

Song, W, Isaji, T, Nakano, M, Liang, C, Fukuda, T, Gu, J. *O*-GlcNAcylation regulates  $\beta$ 1,4-GlcNAc-branched *N*-glycan biosynthesis via the OGT/SLC35A3/GnT-IV axis. *FASEB J.* 2022; 36:e22149. doi:10.1096/fj.202101520R

## 低酸素環境における Lenvatinib 抗腫瘍作用抵抗性機序の解明

### —— ヒト肝細胞癌細胞株を用いての検討 ——

高橋 将典

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 臨床薬剤学教室

肝細胞癌 (Hepatocellular Carcinoma: HCC) 治療において、経口投与可能な全身化学療法薬である lenvatinib mesylate (LEN) は限られた選択肢のひとつであり、LEN に対する治療抵抗性の克服が大きな課題となっている。HCC は腫瘍内の低酸素状態が最も顕著な腫瘍であり、この低酸素状態が多くの抗悪性腫瘍薬の治療抵抗性発現の一因であることが示されている。しかしながら、HCC 治療における LEN の低酸素下での抗腫瘍作用抵抗性についての報告は現在までになされていない。そこで、本研究の目的はヒト HCC 細胞株を用いて低酸素環境における LEN の抗腫瘍作用抵抗性のメカニズムを解明することとした。

初めに、HCC 細胞株において低酸素状態での LEN 抗腫瘍作用抵抗性を確認した。PLC/PRF/5 細胞で LEN の  $IC_{50}$  は、通常酸素環境においては  $13.0 \pm 0.8 \mu M$  であったが、低酸素環境では  $21.3 \pm 1.1 \mu M$  であり、有意に上昇がみられた。一方、HepG2 細胞では有意な上昇は見られなかった。低酸素環境での PLC/PRF/5 細胞の LEN 抗腫瘍作用抵抗性メカニズムを解明するために、マイクロアレイ解析を行い、このメカニズムに関連すると考えられる遺伝子を抽出した。さらに、*in-silico* 解析により、細胞外マトリックスに関わる遺伝子の有意な変化が確認され、その中でもフィブロネクチン (FN) をコードする FN1 が遺伝子群のハブとして同定された。一方、免疫蛍光染色により解析すると、PLC/PRF/5 細胞における FN の発現は、低酸素環境では細胞内外で有意に上昇し、通常酸素環境で LEN を投与すると減少する傾向にあった。また、PLC/PRF/5 細胞の培養液中の FN 濃度を ELISA で調べたところ、LEN (−) 条件では低酸素環境では通常酸素環境に比べて 2.3 倍、LEN (+) 条件では低酸素環境で通常酸素下よりも 1.6 倍上昇していた。PLC/PRF/5 細胞では、通常酸素環境では LEN の直接的な標的ではないが FN を低下させる効果があるが、低酸素環境では

HIF-1 $\alpha$  などの転写因子が誘導されるため、FN の産生が促進され、LEN の効果が減弱して薬剤の抗腫瘍作用抵抗性を引き起こすことが推察される。このことは、FN1 遺伝子を knockdown した PLC/PRF/5 細胞を用いた実験の結果、低酸素環境で LEN の効果が回復したことからも FN の薬剤抗腫瘍作用抵抗性への関与が支持された。さらに、細胞外だけではなく細胞内での機序について検討するために、細胞増殖に重要な役割を果たすシグナル伝達経路である mitogen-activated protein kinase (MAPK) の主要タンパク質である ERK1/2 についてタンパク質発現解析を行った。PLC/PRF/5 細胞では、低酸素環境で LEN 非投与群において 24 h で ERK1/2 の活性型である p-ERK1/2 の発現が上昇し、LEN 投与群においても 48 h で p-ERK1/2 の発現上昇を確認した。複数の HCC 細胞株を用いた LEN の実験において、p-ERK1/2 の発現が低下した報告があったことから、本研究でも p-ERK1/2 の発現が低下する想定をしていたが、その想定とは異なる結果であった。この結果により、LEN が MAPK を主標的としないことが考えられ、LEN による他経路の抑制の代償として LEN 存在下で ERK1/2 が活性化したこと、LEN 非投与群の p-ERK1/2 の上昇は HIF-1 $\alpha$  をコードする HIF1A の遺伝子発現レベルの上昇が確認されたことから、HIF-1 $\alpha$  が関与したことが推察される。また、検討した 2 種類の細胞株において、HepG2 細胞では変動を示した結果がみられなかったことから、低酸素環境における LEN 曝露による FN の挙動は、少なくとも本研究で用いた 2 つの細胞株のうち PLC/PRF/5 細胞に特異的なものであることが示唆された。

以上のことから、低酸素下 LEN 抗腫瘍作用抵抗性は、低酸素状態で FN の上流転写因子である HIF-1 $\alpha$  が上昇し、FN の高発現が機序の根底としてあることが示唆される結果となった (Fig. 1)。また、本研究では MAPK が主標的とされていない

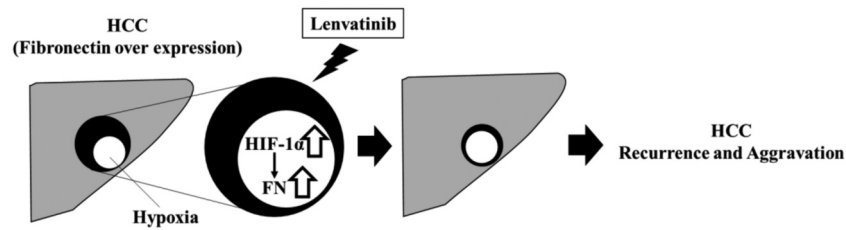


Fig. 1. Mechanism of Lenvatinib resistance in Hypoxia.

ことが示唆されたため、臨床において FN が高発現した HCC には LEN 療法を使用せず、作用機序の異なるベバシズマブ・アテゾリズマブ併用療法へ早期に切り替えるなど、患者への負担軽減や治療変更により HCC の治療成績の向上を見込める治療戦略策定、すなわち患者個別化医療の一端を担うことができると考えられる。

#### 〈参考文献〉主論文（原著論文）

Masanori Takahashi, Kouji Okada, Ryusuke Ouchi, Taisuke Konno, Kensuke Usui, Hiroyuki Suzuki, Mari Satoh, Takayuki Kogure, Kennichi Satoh, Yoshiteru Watanabe, Hitoshi Nakamura, Yuriko Murai. Fibronectin plays a major role in hypoxia-induced Lenvatinib resistance in hepatocellular carcinoma PLC/PRF/5 cells, *Die Pharmazie*, 2021, **76**, 594 – 601.