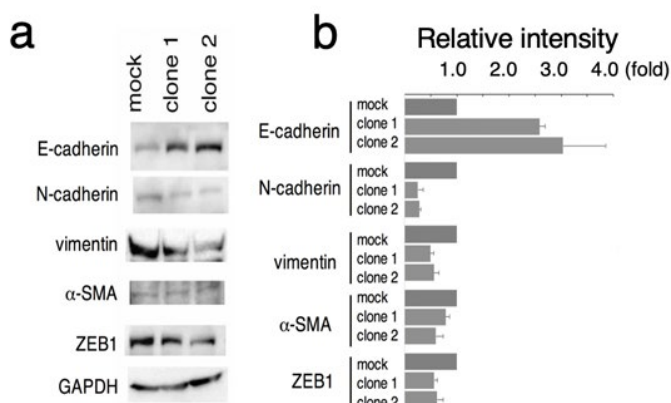
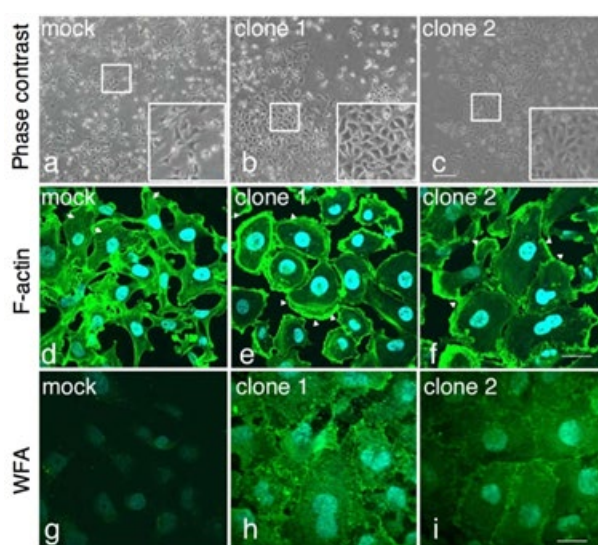


## ○糖鎖による癌の悪性形質変化とそのメカニズムに関する研究

### 1. 乳癌の抑制に関与する LacdiNAc 糖鎖

N 結合型および O 結合型糖鎖の GalNAc  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4GlcNAc (LacdiNAc) 構造をもつ糖鎖は極微量ながらも様々な動物組織や細胞に存在し、LacdiNAc 構造の形成には 2 種の  $\beta$  4-N-アセチルガラクトサミン転移酵素 ( $\beta$  4GalNAcT3 および  $\beta$  4GalNAcT4) が関与している。これまでに LacdiNAc 構造および  $\beta$  4GalNAcT の発現量の増加が前立腺癌、子宮癌、肝癌ならびに結腸癌の進行に相関していることが報告されている。乳癌では、癌の進行に伴って細胞表面の糖鎖上の LacdiNAc 構造の発現量が減少することが報告され、N 結合型糖鎖上の LacdiNAc 構造の発現は乳腺の細胞を正常に保つ上で重要な役割を担うと考えられた。しかしながら、乳癌における LacdiNAc 構造の減少/消失の生物学的意義についての詳細は不明である。そこで、乳癌細胞株 MDA-MB-231 に  $\beta$  4GalNAcT4 遺伝子を過剰発現させて LacdiNAc 構造を強制発現した細胞株を樹立し、細胞増殖能、コロニー形成能、腫瘍形成能ならびに浸潤能に与える影響について解析を行ったところ、対照細胞と比較してコロニー形成能や浸潤能は著しく抑制された。さらに対照細胞をヌードマウスの皮下に移植すると腫瘍が形成されたが、高発現細胞を移植しても腫瘍の形成は見られなかった。以上

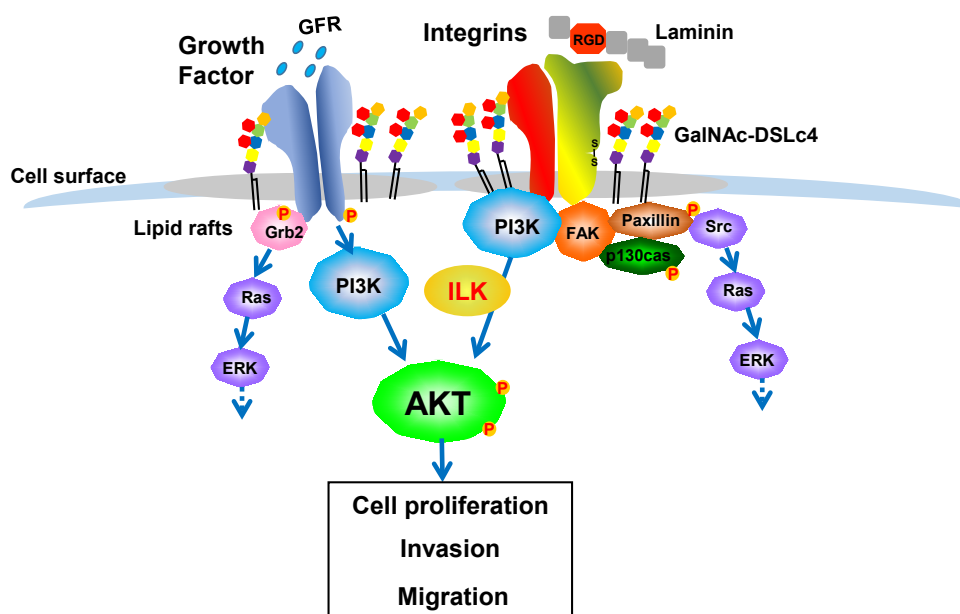


の結果より、MDA-MB-231 細胞において細胞表面の N 結合型糖鎖で LacdiNAc 構造の発現量を増大させると、腫瘍形成能や浸潤能が抑制されることが明らかとなった。その後の解析で、この乳癌細胞における LacdiNAc 構造の腫瘍抑制作用には間葉-上皮移行 (mesenchymal-epithelial transition: MET) が誘導されていることが強く示唆されている。

乳癌は女性の罹患する癌としては最も多く、世界規模でその患者数は増加している。乳癌においては癌化の分子機構が比較的良好に解明されており、それぞれの患者さんに適した治療が施されている。しかしながら、ホルモン受容体及び上皮成長因子受容体 2 が欠損している、所謂トリプルネガティブタイプの患者さんに対する適切な治療法がないのが現状である。本研究で用いた MDA-MB-231 細胞はトリプルネガティブタイプの細胞であり、 $\beta$ 4GalNAcT4 遺伝子の発現の増大によって各種の悪性形質の抑制がみられることから、将来的な乳癌治療への応用展開が期待される。

## 2. 腎癌の悪性形質と糖脂質

腎癌は多臓器に血行性転移をきたしやすく、初診時にすでに転移を認める症例が 25～30%あるとの報告や経過中に転移をきたす症例もある。また、腎癌全体では最終的に 50～60%の症例で遠隔転移がみられ、転移部位としては肺が最も頻度が高く多発性であることが多い。現在のところ手術が最も有効な治療法であるが、早期発見や治療効果の指標となる腫瘍マーカーが未だ確立されていないのが現状である。これまでの研究で、腎癌細胞株における糖脂質糖鎖の発現解析から腎癌細胞株において  $\alpha$ 2,6 シアル酸転移酵素 ST6GalNAc VI の発現が抑制された結果、細胞表面の Disialyl galactosyl globoside (DSGG) 抗原が消失し、前駆構造の Monosialyl galactosyl globoside (MSGG) 抗原が発現す



るといふ顕著な変化を明らかにした。さらに、Lc4の末端にGalNAcが $\beta$ 1-4結合した糖鎖構造が肺への高転移株に存在するという報告を受け、フローサイトメトリーによる細胞表面糖鎖の発現解析を行った結果、多くの腎癌細胞株の細胞表面にGalNAc-disialyl Lc4糖鎖抗原(以下、GalNAc-DSLc4と略す)が発現していることを確認した。そこで、GalNAc-DSLc4抗原の生合成過程に働く糖転移酵素を同定し、GalNAc-DSLc4を安定に発現する腎癌細胞株を樹立した後、得られたGalNAc-DSLc4安定発現株の癌性形質について解析を行ってきた。その結果、1)細胞表面のGalNAc-DSLc4を増加させる事で癌悪性形質の特徴とされる増殖能、浸潤能、ラミニンへの接着能が亢進する事、2)その要因の1つとしてPI3K経路の活性化増強が関与する事、3)GalNAc-DSLc4は脂質ラフト中に局在し、インテグリン等膜タンパクの局在を変える事、などが明らかとなった。

GalNAc-DSLc4抗原という糖脂質の発現増加によりラフト様ドメインに局在するインテグリン分子が増え、ドメイン内でインテグリン分子と成長因子受容体が接近することでタンパク-脂質間の相互作用が各刺激時に安定化する。さらにダイナミックなドメイン構造を形成して、より機能的なプラットフォームとして働くことで悪性を誘導する細胞内シグナルが増強すると考えられる。本研究により、GalNAc-DSLc4抗原に対する抗体を用いることなどで、GalNAc-DSLc4による悪性形質を抑制する治療法の可能性が示された。

### 3. 前立腺癌組織由来スフェロイドの新規癌特異的グライコフォーム

前立腺癌の診断に利用される前立腺特異抗原(PSA)の濃度測定では、基準値である4 ng/ml以上の場合でも癌の確率は25%程度である。その理由として、前立腺炎や前立腺肥大等の良性疾患でもその量が増えることなどが考えられる。さらに癌細胞では異常な糖鎖が発現することから、より正確な診断を目指してPSA上の癌特異的な糖鎖構造を見出す研究が行われている。例えば、前立腺癌細胞株LNCaPの培養上清と健常人精漿由来のPSA糖鎖を比較することで、シアリル化糖鎖の欠如とFuc $\alpha$ 1-2GalやGalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc(LacdiNAc)構造の増加が見出された。しかし、前立腺癌患者血清由来PSAにはそのような糖鎖変化は見いだされておらず、細胞株の樹立時に親腫瘍のいくつかの特徴を失って糖鎖プロファイルが変化していることも考えられた。癌組織由来のスフェロイド(CTOS)はもとの腫瘍の主要な特徴を保持しているためCTOS由来PSAは患者の腫瘍の糖鎖構造を反映すると考え、CTOS培養上清由来のPSAの糖鎖構造を分析することにした。健常人精漿、CTOS、癌細胞株LNCaP(リンパ節転移)および22Rv1(前立腺に局在)由来のPSAのグライコフォームについて、レクチンカラムクロマトグラフィーによる分析と糖鎖構造解析より、癌特異的PSAグライコフォームの候補として高分岐化糖鎖型および無糖鎖型を見出した。LacdiNAc構造の増加やシアリル化の変化は全ての前立腺癌細胞由来PSA糖鎖に共通な変化ではなかったが、Con A非結合性のPSA分子はCTOSを含めて解析した癌細胞共通に見出され、健常人精漿由来PSAでは殆ど見出されなかった。癌細胞由来PSA

には Con A 非結合性画分に共通して高分子量と低分子量の PSA が存在すること、さらに Con A 非結合性画分には高分岐複合型糖鎖を含み  $\alpha$  1,2-、 $\alpha$  1,3(4)-フコースが存在することが見出された。無糖鎖のペプチドを抗体等のプローブで検出できれば、より正確な診断に役立つ可能性があり、特定の糖鎖構造を検出する以外に N 結合型糖鎖修飾の割合も決定することが重要になるかもしれない。

本研究では、CTOS および他の癌細胞から PSA の N 結合型糖鎖を分析することにより、PSA の新しい癌関連グリコフォームを提示することができた。これらの新しいグリコフォームを認識するプローブの開発は、より進化した診断への道を開く可能性を秘めている。