

Title	REMODELING OF GRACOCONJUGATES ON CD44 ENHANCES CELL ADHESION TO HYALURONATE, TUMOR GROWTH AND METASTASIS IN B16 MELANOMA CELLS EXPRESSING $\beta$ 1, 4-N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE III
Author(s)	盛, 音
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41815">https://hdl.handle.net/11094/41815</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	せい おん 盛 音
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 2 2 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 12 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	REMODELING OF GLYCOCONJUGATES ON CD44 ENHANCES CELL ADHESION TO HYALURONATE, TUMOR GROWTH AND METASTASIS IN B16 MELANOMA CELLS EXPRESSING $\beta$ 1, 4 -N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE III ( $\beta$ 1、4 -N -アセチルグルコサミン転移酵素高発現マウス B16 メ ラノーマ細胞における CD44 の糖鎖構造のリモデリングによるヒアル ロン酸への接着の増強と腫瘍増殖および癌転移の促進)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 谷 口 直 之  (副査) 教 授 高 井 義 美    教 授 岡 本 光 弘

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

CD44 接着分子はヒアルロン酸をリガンドとする膜糖タンパク質であり、癌の転移や浸潤などと密接に関連していることが知られている。このような CD44 の機能には糖鎖が重要な役割を担っていることも報告されており、癌の転移における糖鎖構造の癌性変化の関与が示唆されてきた。一方、アスパラギン結合型糖鎖に見られる bisecting N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造の付加は糖鎖の癌性変化として最も高頻度に見られる構造の一つであるが、この構造の付加が CD44 の機能をどのように変化させ、癌の転移能など癌細胞の性質を変えるのかについてはほとんど知られていない。bisecting GlcNAc 構造を付加する糖転移酵素である  $\beta$  1、4 -N -アセチルグルコサミン転移酵素 (GnT-III) の癌転移などにおける役割や生理的意義などの解明を目指して、本研究室ではこれまで GnT-III の分離精製および遺伝子クローニングを行い、その機能を解析してきた。本研究では、bisecting GlcNAc 構造の付加による糖鎖癌性変化の癌転移における意義を CD44 の機能制御という点から明らかにするために、高転移性のマウス B16 メラノーマ細胞株 B16-hm に GnT-III 遺伝子を導入、高発現させた細胞株を樹立し、これを用いて CD44 を介した細胞接着や癌細胞の転移に対する bisecting GlcNAc 構造の影響を解析した。

#### 【方法】

$\beta$ -actin プロモーターを持つ pCAGGS ベクターのクローニング部位にラット GnT-III の cDNA を挿入し、これを GnT-III 発現ベクターとした。高転移性のマウス B16 メラノーマ細胞株 B16-hm に electroporation 法により GnT-III 発現ベクターを導入し、高活性の GnT-III を発現する三つのクローンを樹立した。一方 B16-hm 親株やベクターのみを導入したクローンでは GnT-III 活性は検出されなかった。

この GnT-III 高発現細胞株 (positive transfectant) を用いて (1) 抗 CD44 抗体による CD44 の免疫沈降物への E-PHA レクチン (bisecting GlcNAc 構造に特異的な親和性を示す) の結合、(2) flow cytometry による細胞表面での CD44 の発現量、(3) 固相化ヒアルロン酸への接着と soluble ヒアルロン酸の細胞表面への結合および抗 CD44 抗体による接着の阻害、(4) グリコシダーゼ処理による CD44-ヒアルロン酸に対する接着の感受性の変化、(5) 同種マウスへの皮下接種後の腫瘍の進展、を解析し親株と比較した。

#### 【成績】

抗 CD44 抗体による CD44 の免疫沈降物への E-PHA レクチンの結合は GnT-III 高発現細胞株で著明に増加して

いたが、flow cytometry による細胞表面での CD44 の発現量は親株と変わらないことから、高発現細胞株では CD44 上の bisecting GlcNAc 構造が増加していると考えられた。固相化ヒアルロン酸への接着や soluble ヒアルロン酸の細胞表面への結合は GnT-III 高発現細胞株で増加し、これらの相互作用は抗 CD44 抗体で抑制されたことからヒアルロン酸への CD44 の接着能が GnT-III 高発現細胞株で増加していると考えられた。親株はノイラミニダーゼと  $\beta$ -ガラクトシダーゼ処理によりヒアルロン酸への接着が減少したが、GnT-III 高発現細胞株ではほとんど変化せず、さらに  $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ処理することによりヒアルロン酸への接着が減少することがわかった。このことから GnT-III 高発現細胞株に観察された CD44 を介したヒアルロン酸への接着の増強には GlcNAc 構造が重要であると考えられた。同種マウスへの皮下接種後に親株では脾臓への転移がみられないのに対して、GnT-III 高発現細胞株では脾臓への転移が見られた。この転移は接種前に細胞と CD44 の阻害抗体を反応させることによって抑制された。

#### 【総括】

以上の結果から、GnT-III 遺伝子導入による CD44 の bisecting GlcNAc 構造の増加は CD44 のヒアルロン酸への結合能を増加させ、マウス B16 メラノーム細胞の脾臓への転移を促進させることがわかった。本研究では糖鎖によって CD44 のような糖タンパク質の機能が調節されることを明らかにし、このような機序によって癌化に伴う糖鎖構造の変化（いわゆる糖鎖の癌性変化）が、癌転移のような癌細胞の悪性度と密接な関連性をもつことを示唆した。

### 論文審査の結果の要旨

糖タンパク質の糖鎖の癌性変化は古くから知られており、近年それらを制御する糖転移酵素のいくつかがクローニングされてきた。アスパラギン結合型糖鎖の分岐鎖構造 bisecting GlcNAc の合成を触媒する  $\beta$  1、4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) は肝癌や大腸癌細胞など、種々の癌細胞でその活性が上昇することが知られている。しかし、GnT-III を含め糖転移酵素の活性化に伴う接着分子などの糖鎖改変とその生理機能に関する研究は殆ど報告されていない。

本研究は、GnT-III 遺伝子を過剰発現させたマウス B16 メラノーマ細胞を用いて、近年癌の転移と深く関係があると言われている接着分子 CD44 にターゲットをしばり、ヒアルロン酸に対する接着能と in vivo での腫瘍の進展から検討したものである。GnT-III によって糖鎖修飾された CD44 は、ヒアルロン酸への接着能を亢進させ、脾臓への転移性を特異的に促進した。本論文は糖鎖遺伝子の導入により CD44 のもつ特定の糖鎖構造が接着能などの機能に重要な役割を果たすことをはじめて明らかにしたものであり、基礎的にもまた臨床的にも、糖鎖のリモデリングによる癌転移の抑制への道を開く可能性がある。

以上の理由により本論文は学位の授与に値するものと考えられる。