The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Gene Expression of α 1 - 6 Fucosyltransferase in Human Hepatoma Tissues : A Possible Implication for Increased Fucosylation of α-Fetoprotein
Author(s)	野田, 勝久
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41833
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【20】

氏　　名	野　田　勝　久（のだ かつひさ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15225　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	Gene Expression of α1－6 Fucosyltransferase in Human Hepatoma Tissues : A Possible Implication for Increased Fucosylation of α-Fetoprotein （ヒト肝発癌における α1－6 fucosyltransferase の発現と α－fetoprotein のフコシル化の関係について）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　谷口　直之 （副査） 教　授　堀　正二　教　授　林　紀夫

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

α－fetoprotein（AFP）は、肝癌の腫瘍マーカーとして広く普及しているが、慢性肝炎や肝硬変でも上昇することが問題となっている。そこで近年、AFPの糖鎖構造の違い（L 3分画）がより特異的な肝癌の腫瘍マーカーとして、これら慢性肝疾患との鑑別に臨床応用されるようになった。すなわち、肝癌患者血清中のAFPは、*N*型糖鎖の根元のGlcNAcにフコースが付いた構造を認識するレンズマメ・レクチンのLCA（Lens Culinaris Agglutinin）レクチンと親和性が高いことを利用したものである。一方、α1－6 fucosyltransferase（α1－6 FucT）は、AFPなどに含まれる*N*型糖鎖の根元のGlcNAcにフコースを転移する酵素で、この肝癌特異的なAFPの糖鎖修飾に関与すると考えられている。我々の教室では、蛍光標識した糖鎖基質を用いた本酵素の簡便な活性測定系の確立と、ブタ脳とヒト胃癌細胞から本酵素の分離精製およびcDNAのクローニングに成功した。また、遺伝的な銅代謝異常により肝炎、肝癌を自然発症するLECラット（Long Evans with a Cinnamon-like Color Rat）でみた本酵素の発現レベルは、急性肝炎や加齢では変化せず、前癌病変および肝癌組織でのみ増強したことから、肝癌の早期マーカーとしての可能性を報告した（Noda K, et al. Int. J.Cancer : 75、444－450、1998）。そこで、本研究の目的は、ヒト肝癌におけるα1－6 FucTの発現を検討するとともに、本酵素の過剰発現が、正常肝細胞と肝癌細胞の産生する糖タンパク質の糖鎖に及ぼす影響を明らかにすることである。

【方法】〔ヒト肝組織〕

初回肝癌手術の12症例より得たヒト肝癌および非癌部肝組織と、正常肝組織5例を用いた。α1－6 FucT mRNAの発現レベルは、肝組織よりRNAを抽出し、α1－6 FucT cDNAの一部をプローブとしたノザン・ブロット法で検討した。また、α1－6 FucTの酵素活性測定には、肝組織を10mM Tris－HCl（pH7.4）、0.25M sucrose溶液中でホモジナイズし、900×gで遠心後その上清を酵素源に用いた。活性の測定は、pyridylamino-butylamineで蛍光標識した糖鎖をacceptor基質、GDP-fuceseをdonor基質として用い、肝組織由来の酵素源と反応後HPLCで解析した。〔正常肝細胞へのα1－6 FucT発現ベクターの遺伝子導入〕β－actinプロモーターを有するpCAGGSベクターにヒトα1－6 FucT cDNAを挿入した発現ベクターを作成し、ラット初代培養肝細胞にリポフェクチン法で行った。α1－6 FucTの過剰発現を確認後、培養液と細胞抽出液の電気泳動パターンをSDS－PAGEで解析し、LCAレクチン・ブロットでフコシル化の変化を解析した。〔肝癌cell lineへのα1－6 FucT発

現ベクターの遺伝子導入〕7種類のヒト肝癌細胞株中、最もα1－6 FucTの発現レベルが低かったHep 3B細胞に上記のα1－6 FucT発現ベクターを導入し、本酵素のstable transfectantを樹立した。抗ヒトAFP抗体を吸着したSepharose－CH_4gelのカラムを用いて、培養液中のAFPを精製し、LCAレクチン・ブロットでAFPのフコシル化の変化を解析した。

【成績】

(1)ノザン・ブロット法の結果、α1－6 FucT mRNAは、3.5kbの1本のバンドとして検出され、肝癌組織では、正常肝組織に比べα1－6 FucTの発現は有意に高値を示した。臨床病理学的背景から検討すると、肝癌のα1－6 FucT mRNAの発現は、男性に比べ女性で、また肝癌腫瘍内隔壁を有するものでは、そうでないものに比べ有意に高値を示した。α1－6 FucTの酵素活性値もほぼ同様の傾向を認めた。一部の症例の非癌部肝組織でも、α1－6 FucT mRNAの発現と酵素活性の上昇を認めたが、それらは進行した肝硬変例であった。(2)α1－6 FucTを遺伝子導入した正常肝細胞では、分泌タンパク質、構造タンパク質ともに、LCAレクチンとの結合性が亢進していた。(3)α1－6 FucTを遺伝子導入したHep 3B細胞が分泌するAFPは、コントロールに比べフコシル化の亢進を認めた。

【総括】

α1－6 FucTの発現は、正常肝に比べヒト肝癌組織で上昇していた。非癌部でも一部の進行した肝硬変症例では、α1－6 FucTの発現増強を認めたが、この理由は形質転換した肝細胞や、また鏡検レベルで判別不能な前癌病変を反映している可能性がある。また、α1－6 FucTを正常肝細胞で強発現させた場合、特定の分泌タンパク質と細胞タンパク質で*N*型糖鎖がフコシル化された。一方、α1－6 FucTを過剰発現させた肝癌細胞では、フコシル化AFP産生の割合が増加したことから、本酵素が肝癌特異的AFPの糖鎖修飾に関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

α1－6 fucosyltransferase（α1－6 FucT）は、細胞内のゴルジ装置に存在する糖転移酵素の一つで、肝癌の代表的な腫瘍マーカーであるα－fetoprotein（AFP）などに含まれる*N*型糖鎖のcore GlcNAcにフコースを付加（フコシル化）すると考えられてきたが、その詳細は不明であった。近年、阪大生化学教室では、世界に先駆け本酵素の精製およびcDNAのクローニングに成功し、ようやくその分子生物学的な機能解析が可能となった。本論文では、α1－6 FucTが肝癌細胞の産生するAFPのフコシル化に直接関与していることを証明した。また、正常肝細胞にα1－6 FucT遺伝子を導入した場合、非常に選択的に糖タンパク質のフコシル化が誘導されることを併せて報告した。実際、ヒト肝組織での本酵素の発現を検討したところ、従来の学説と異なり肝癌のみならず慢性肝疾患、特に肝硬変でも本酵素が高発現していることや、肝癌で腫瘍内隔壁を有する症例や女性例は本酵素の発現レベルが高い傾向にあることを見い出した。以上、本論文は、α1－6 FucTの糖タンパク質糖鎖へのフコシル化の機構と臨床的意義を明らかにしたもので、医学博士の学位を授与するのに値すると考える。