

Title	Prometastatic Effect of N-Acetylglucosaminyltransferase V Is Due to Modification and Stabilization of Active Matriptase by Adding β 1-6 GlcNAc Branching
Author(s)	伊原, 伸治
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/43971
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	伊原伸治
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 17596 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Prometastatic Effect of <i>N</i> -Acetylglucosaminyltransferase V Is Due to Modification and Stabilization of Active Matriptase by Adding β 1-6 GlcNAc Branching (<i>N</i> -アセチルグルコサミン転移酵素 V の転移能はマトリプターゼの β 1-6 鎖付加による修飾とその安定性に寄与する。)
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之 (副査) 教授 中村 敏一 教授 木下タロウ

論文内容の要旨

【目的】アスパラギン結合型 (*N*結合型) 糖鎖は *N*-アセチルグルコサミン転移酵素群によって修飾され、1つ1つの糖鎖は、固有の糖転移酵素によって形成される。*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) は、糖タンパク質の分岐鎖構造を決定する糖転移酵素のひとつであるが、基本となる 2 本鎖構造の糖鎖に *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を転移し、 β 1-6 鎖と呼ばれる構造を形成する。これまでに GnT-V の発現と β 1-6 鎖の形成は、癌の転移及び予後に深く関与することが知られているが、その詳細な機構は明らかではない。本研究では GnT-V 過剰発現胃癌細胞において GnT-V が糖鎖修飾を行う基質糖タンパク質を同定して、GnT-V による転移機構を明らかにすることを試みた。

【方法ならびに成績】遺伝子導入により恒久的に GnT-V を高発現するヒト胃癌細胞 MKN45 を作製した。この細胞 1×10^6 個をヌードマウスの腹腔に注入し、1 カ月後にその転移能を検討した。コントロール癌細胞に較べて、GnT-V 高発現癌細胞では多臓器に転移していた。とくに転移先臓器として腹腔内リンパ節が目立った。大腸癌の臨床的検討からも GnT-V 高発現症例は、リンパ節転移、血管浸潤が多く見られたため、GnT-V を介する転移機構として浸潤能の亢進が想定された。そこで、ゼラチンを用いたザイモグラフィーによって GnT-V 高発現癌細胞が産生するプロテアーゼの活性測定を行った。方法としては、72 時間無血清培地で培養後、回収した培養上清を限外ろ過膜で約 10 倍程度に濃縮して、ザイモグラフィーのサンプルとした。さらに様々なプロテアーゼインヒビターを用いて、このプロテアーゼに対する阻害効果を検討した。その結果、GnT-V を発現している癌細胞では分子量 70 K の顕著なプロテアーゼの産生増加が確認された。このプロテアーゼ活性は、メタロプロテアーゼ阻害剤では阻害されず、アプロチニンや EDTA で阻害されたことから、金属要求性のセリンプロテアーゼであることが示唆された。分子量、その他の文献的考察から、このプロテアーゼは、II 型の膜貫通型のセリンプロテアーゼであるマトリプターゼと推察し、抗体を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、コントロール癌細胞に較べて、GnT-V 高発現癌細胞の分泌液中に大量のマトリプターゼが含まれていることが明らかになった。さらに抗体を用いて、マトリプターゼを除去すると、ザイ

モグラフィーでみられたプロテアーゼ活性は消失した。コントロール癌細胞と GnT-V 高発現癌細胞でマトリプターゼの mRNA の発現量をノーザンブロットで検討したところ、両者にほとんど差は見られなかった。しかし、タンパク質レベルでは培養液中と、confluent な状態の細胞膜表面で著明なマトリプターゼ発現量の差が確認された。

次にマトリプターゼが GnT-V の基質となる糖タンパク質かどうかを検討した。GnT-V の産物である β 1-6 鎖を認識するレクチン、L₄-PHA を用いて免疫沈降した後、抗マトリプターゼ抗体でウエスタンブロットしたところ、GnT-V 高発現癌細胞のみ強いバンドがみられたことから、マトリプターゼの糖鎖に β 1-6 鎖が付加されていることが示された。GnT-V 高発現癌細胞の分泌液中に大量のマトリプターゼが存在する理由を明らかにするために、コントロール癌細胞と GnT-V 高発現癌細胞を用いて、マトリプターゼの分解を検討した結果、GnT-V 高発現癌細胞では著しい分解遅延を認めた。さらにマトリプターゼの高発現が本当に癌転移を促進するかどうかを検討するため、MKN45 にマトリプターゼ発現ベクターを導入してマトリプターゼ過剰発現癌細胞を作成し、ヌードマウスを用いた同様の実験を行った。すると、GnT-V 高発現癌細胞とほぼ同様に腹腔内へのリンパ節転移が確認された。

【総括】GnT-V の過剰発現により、癌細胞は高転移能を獲得した。そのメカニズムとしては、GnT-V による糖鎖修飾が、マトリプターゼに高い分解耐性をもたらし、発現量が増加することであった。本研究は、十数年間不明であった、GnT-V を介する転移機構を明らかにしたものである。

論文審査の結果の要旨

N⁶アセチルグルコサミン転移酵素-V (GnT-V) は癌転移と直接関係している糖転移酵素である。しかし、その産物である β 1-6 鎖が基質糖タンパク質に対してどのような働きをもつのか明らかではなかった。申請者は、GnT-V を過剰発現させた胃癌細胞が糖タンパク質である特定のセリンプロテアーゼの分泌量を増強することを発見し、癌転移との関連を明らかにした。

まず遺伝子導入により、恒久的に GnT-V を高発現するヒト胃癌細胞 MKN45 を作製した。ヌードマウスを用いて、GnT-V 活性が有意に癌転移を促進することを確認した。その一因として GnT-V を高発現する MKN45 細胞では、培養上清に顕著なセリンプロテアーゼの放出を確認した。ウエスタンブロット及び免疫沈降により、このプロテアーゼは II 型の膜貫通型セリンプロテアーゼのマトリプターゼと同定した。さらにレクチンブロット解析により糖鎖構造を検討すると、GnT-V の産物である β 1-6 鎖の付加がみられた。パルスチェイス及びウエスタンブロット法により β 1-6 鎖修飾を受けたマトリプターゼはほとんど分解されなくなることを明らかにした。本研究は癌転移の機構を糖タンパク質の観点から明らかにしたものであり、学位に値するものと認める。