



Title	A Remodeling System of the 3'-Sulfo-Lewis a and 3'-Sulfo-Lewis x Epitopes
Author(s)	池田, 直樹
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45447
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"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 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

氏名	いけ だ なお き 池 田 直 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 19045 号
学位授与年月日	平成 16 年 10 月 21 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	A Remodeling System of the 3'-Sulfo-Lewis a and 3'-Sulfo-Lewis x Epitopes (3' スルホルイス a と 3' スルホルイス x 抗原の生合成経路の構築)
論文審査委員	(主査) 教 授 松 田 暉 (副査) 教 授 宮 坂 昌 之 教 授 木 下 タ ロ ウ

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

がん細胞表面における特定の糖鎖の増加と血行性転移の正の相関が知られている。その理由は接着分子としての糖鎖の機能によるとされ、そのことから糖鎖改変による転移抑制の可能性が考えられる。また大腸癌切除標本において、がん化に伴うスルホルイス抗原とシアリルルイス抗原の発現の変動が報告されているが、硫酸化糖鎖の生理的機能は明らかでない。

本研究では、硫酸転移酵素 GP3ST が 3' スルホルイス抗原の生合成を行うか、また GP3ST がシアリルルイス抗原の発現に影響を及ぼすかを検討した。次に、GP3ST の発現が肺がん細胞株において接着能と転移能に与える影響を評価した。

〔 方 法 〕

- 1) 1 型、2 型糖鎖を基質として、硫酸転移酵素 GP3ST、次にフコース転移酵素 α 1, 3/4-fucosyltransferase (FUT-III) の順で反応させ、生成物を質量分析で解析した。また同時に硫酸化糖鎖とシアリル化糖鎖に対するフコース転移反応の酵素活性を各々検討した。
- 2) 2 型糖鎖とシアリル酸転移酵素 α 2,3-sialyltransferase 活性を有する CHO 細胞に *FUT-III* 遺伝子と *GP3ST* 遺伝子を共導入し、シアリルルイス抗原と 3' スルホルイス抗原の発現の変化を解析した。
- 3) 同様に肺がん細胞株 ABC-1、A549、大腸がん細胞株 COLO201 に *GP3ST* 遺伝子を導入し、がん細胞における糖鎖抗原の変化を解析した。
- 4) リコンビナント E-selectin が固相化されたキャピラリー管に、シアリルルイス抗原が高発現している肺がん細胞 ABC-1 と、シアリルルイス抗原の発現が抑制され 3' スルホルイス抗原が高発現している *GP3ST* 遺伝子導入 ABC-1 細胞を各々流して、接着細胞数を計数し、*GP3ST* 遺伝子導入によるがん細胞 ABC-1 と E-selectin との接着能の変化を Rolling assay で評価した。
- 5) TNF- α の前投与により血管内皮細胞上に E-selectin 発現を誘導したヌードマウスの尾静脈から、4) で用いた肺がん細胞 ABC-1 と *GP3ST* 遺伝子導入 ABC-1 細胞を各々注入し、3 週間後に犠牲死させ肺を摘出して転移病変数を計数し、GP3ST の発現が肺転移に与える影響を検討した。

〔 成 績 〕

- 1) ピリジルアミノ化した1型、2型糖鎖を基質として、GP3STによる硫酸転移反応、引き続きFUT-IIIによるフコース転移反応を行なった生成物の質量分析の結果は、各々3'スルホルイス a と 3'スルホルイス x 構造を有していた。またフコース転移反応の酵素活性は、硫酸化糖鎖を基質とした場合の方が、シアリル化糖鎖を基質とした場合に比して高値を示した。
- 2) *FUT-III* 遺伝子と *GP3ST* 遺伝子を共導入した CHO 細胞の糖鎖抗原を解析した結果、遺伝子導入により 3'スルホルイス x 抗原が細胞表面に発現誘導されただけでなく、同時に腫瘍マーカーとして有名なシアリルルイス x 抗原の発現が抑制された。
- 3) *GP3ST* 遺伝子を導入した肺がん細胞株 ABC-1、A549、大腸がん細胞株 COLO201 の糖鎖抗原の解析の結果、全ての細胞株で 3'スルホルイス抗原の発現が誘導された。また、シアリルルイス抗原を発現していた細胞株 ABC-1、COLO201 においては、*GP3ST* 遺伝子導入により同時にシアリルルイス抗原の発現は抑制された。
- 4) Rolling assay において観察しえた、固相化された E-selectin とシアリルルイス抗原を発現している肺がん細胞 ABC-1 の接着が、*GP3ST* 遺伝子導入により著明に低下した。
- 5) ノードマウス経尾静脈転移モデルにおいて、肺がん細胞 ABC-1 による肺転移陽性頭数、肺転移病変数が、*GP3ST* 遺伝子導入によりともに減少した。

〔 総 括 〕

- 1) 硫酸転移酵素 GP3ST と α 1,3/4-fucosyltransferase (FUT-III) により 3'スルホルイス抗原は生合成しえた。また *in vivo* において、*GP3ST* 遺伝子導入により 3'スルホルイス抗原の発現が誘導されるだけでなく、シアリルルイス抗原の発現も抑制された。このことは GP3ST と α 2,3-sialyltransferase が基質を競合するためと考えられた。
- 2) *GP3ST* 遺伝子導入により肺がん細胞 ABC-1 の肺転移が減少したのは、がん細胞表面のシアリルルイス抗原の発現が抑制され、血管内皮上の E-selectin との相互作用が低下したためと考えられた。
- 3) 以上より、ヒト肺がんにおいても、硫酸転移酵素 GP3ST はシアリルルイス抗原の発現を低下させることにより、血行性転移を抑制しうる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

がん細胞表面における特定の糖鎖の増加と血行性転移の正の相関が知られている。その理由は接着分子としての糖鎖の機能によるとされ、そのことから糖鎖改変による転移抑制の可能性が考えられる。また大腸がん切除標本において、がん化に伴うスルホルイス抗原とシアリルルイス抗原の発現の変動が報告されているが、硫酸化糖鎖の生理的機能は明らかでない。

本研究では、硫酸転移酵素 GP3ST が 3'スルホルイス抗原の生合成を行うか、また GP3ST がシアリルルイス抗原の発現に影響を及ぼすかを検討した。次に、GP3ST の発現が肺がん細胞株において接着能と転移能に与える影響を評価した。

in vitro において硫酸転移酵素 GP3ST により 3'スルホルイス抗原は生合成しえた。また *in vivo* において、*GP3ST* 遺伝子導入により 3'スルホルイス抗原の発現が誘導されただけでなく、シアリルルイス抗原の発現は抑制された。このことは *in vitro* でのフコース転移反応の活性検討の結果から、GP3ST と α 2,3-sialyltransferase が基質を競合するためと考えられた。

またがん細胞株においても、*GP3ST* 遺伝子導入により 3'スルホルイス抗原の発現が誘導されただけでなく、同時にシアリルルイス抗原の発現は抑制された。ノードマウス経尾静脈肺転移モデルにおいて、シアリルルイス抗原を発現している肺がん細胞 ABC-1 による肺転移が、*GP3ST* 遺伝子導入により抑制された。さらに Rolling assay において、固相化された E-selectin と ABC-1 との接着が、*GP3ST* 遺伝子導入により著明に低下した。このことにより、*GP3ST* 遺伝子導入によりがん細胞表面のシアリルルイス抗原の発現が抑制され、血管内皮上の E-selectin との相互作用が低下したため、ノードマウスモデルにおいて肺転移が抑制されたと考えられた。

本研究結果は、GP3ST によるシアリル基から硫酸基への糖鎖リモデリングにより、E-selectin との相互作用の低下を介した転移抑制の可能性を示唆すると考えられ、学位の授与に値するものと認める。