

論文の内容の要旨

論文題目 「ヒト大腸癌細胞の肝臓との相互作用における癌細胞表面糖鎖の関与
— エンド-β-ガラクトシダーゼ感受性で mAb FH6
によって認識される糖鎖の役割について —」

氏名 大田 将以

細胞表面の糖鎖と多様な内在性レクチンとの相互作用は細胞の相互認識、移動、局在などの細胞交通を制御する。癌細胞が転移性の増殖をする際にもこのようなメカニズムを利用していると考えられる。大腸癌臨床標本を用いた解析に基づいて、モノクローナル抗体 (mAb) FH6 により認識される糖鎖の癌細胞表面での発現が大腸癌患者の生存率と逆相関することから、これらの糖鎖が癌の悪性形質に関与する生物学的な役割を担っていると示唆された。mAb FH6 に認識される糖鎖は複数種あり、E-セレクトインのリガンド糖鎖として知られるシアリルルイス X (NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc: sLe^x) もそのひとつであるが、必ずしもすべてが E-セレクトインに結合性を示すとは限らないことが明らかにされた。私は修士課程において、mAb FH6 の認識する糖鎖の機能を探るために、ヒト大腸癌細胞の mAb FH6 結合性の高いバリエーション細胞 KM12-HX 及び低いバリエーション細胞 KM12-LX (以下 HX 細胞、LX 細胞と省略) を用いてマウス肝臓凍結切片に対する接着性を調べた。その結果、HX 細胞は LX 細胞に比べ、肝臓凍結切片に対し高い接着性を示し、この相互作用は肝実質部を含めた広範な領域で観察された。また HX 細胞と肝臓凍結切片との接着はエンド-β-ガラクトシダーゼ (EGase) 感受性のフコースとシアル酸を含む糖鎖を介した、Ca²⁺ 依存性の相互作用である可能性が示された(1)。同様の結果はヒト肝臓切片を用いた実験からも得られた(2)。しかし、HX 細胞が接着するマウス肝臓内の部位や細胞の種類は、不明であった。また HX 細胞と LX 細胞は、mAb FH6 に認識される糖鎖以外の接着に関わる分子の発現に差異がある可能性が残っていた。そこで本研究では大腸癌細胞が接着する相手の細胞と分子を同定することを目標とした。さらに、

α -1,3- フコース転移酵素遺伝子を LX 細胞に強制的に発現させて得られた細胞を用いることによって、肝臓に対する接着における mAb FH6 に認識され EGase 感受性である糖鎖の重要性を確認した。

【方法及び結果】

1. マウス肝臓実質細胞、非実質細胞の単離、及び培養

HX 細胞のマウス肝臓凍結切片への接着は、肝臓組織切片のどの部位を介した相互作用であるか調べるために、マウス肝臓実質細胞及び非実質細胞の単離を試みた。定法に従い、まず Balb/c マウスの肝臓を灌流し脱血後、0.5% コラゲナーゼ溶液を灌流した。酵素消化後の細胞をナイロンメッシュでろ過し、500 rpm で1分間、遠心し沈殿物を肝臓実質細胞とした。この方法でマウス 1匹あたり約 2.5×10^7 個の肝臓実質細胞を取得できた。培養は、コラーゲンをコートした24穴プレートに 10^5 個 / $0.2 \text{ ml} / \text{cm}^2$ の密度で播種した。次に肝臓非実質細胞を取得するため遠心後の上清液を再び遠心し、沈殿物を30%メトリザマイド液とよく混ぜ、その上に20%メトリザマイド液、PBS を順次重層した。遠心後、20%メトリザマイド液とPBS との境界面に分離された浮遊塊を肝臓非実質細胞とした。この方法でマウス1匹あたり約 1.5×10^7 個の肝臓非実質細胞を得た。得られた肝臓非実質細胞を 2.5×10^6 個 / well の密度でコラーゲンコートした24穴プレートに播種し、培養した。肝臓実質細胞は、非実質細胞と比べ細胞径が明らかに大きいので、これらの細胞は顕微鏡下で視覚的に判別可能であり細胞の純度がそれぞれ99%以上であることを確認した。

2. ヒト大腸癌 mAb FH6結合性バリエーション細胞のマウス肝臓実質細胞及び非実質細胞への接着性の検討

BCECF-AM にて蛍光標識した HX 細胞及び LX 細胞を 2×10^6 cells / ml の懸濁液に調製し、24穴プレートで単層培養したマウス肝臓実質細胞、又は非実質細胞に 1×10^6 cells / $500 \mu\text{l}$ / well の密度で重層した。4°C で30分間接着させ、DPBS にて接着しない細胞を洗浄後、3%グルタルアルデヒドで固定した。蛍光顕微鏡下にて 1 well につき任意の8視野を選び平均を1視野あたりの接着細胞数として計測し、1データとしてさらに3データ分の結果を評価した。HX 細胞は、マウス肝臓実質細胞に対し、LX 細胞に比べ有意に高い接着性を示した(Fig 1-A)。一方、マウス肝臓非実質細胞に対しては、HX

細胞と LX 細胞の接着に有意な差はみられなかった(Fig 1-B)。また C3H マウスより樹立されたマウス肝臓実質細胞株 MLE-15A2 に対する HX 細胞及び LX 細胞の接着についても検討した。MLE-15A2 細胞に対し接着

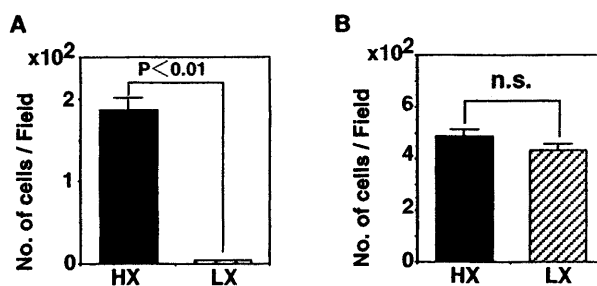


Fig 1 ヒト大腸癌細胞のマウス肝臓実質細胞(A)、及び非実質細胞(B)に対する接着

した HX 細胞数は LX 細胞に比べ有意に多かった(Fig 2-A)。次に BCECF-AM 標識した HX 細胞を mAb

FH6 (50 µg/ml)
及び FH6とは異なる特異性スペクトルをもつ別の抗 sLe^x 抗体である mAb KM93(50µg/ml)
さらにコントロー

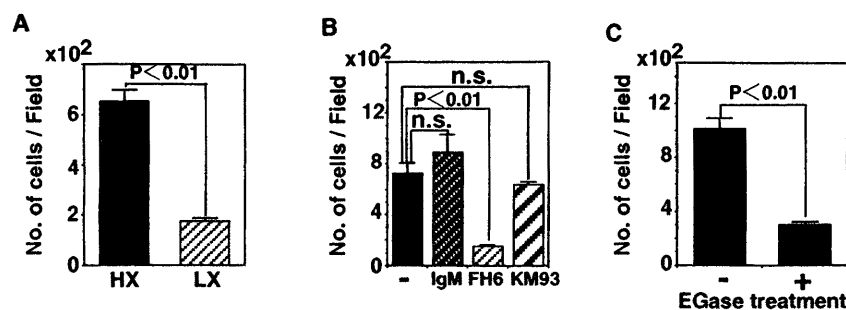


Fig 2 ヒト大腸癌細胞のマウス肝臓実質細胞株 MLE-15A2 に対する接着
A: HX 細胞, LX 細胞の比較
B: 抗体前処理の HX 細胞の接着に与える影響
C: EGase 処理の HX 細胞の接着に与える影響

ルとして正常マウス IgM (50 µg/ml)で4℃ で30分間、前処理したときの MLE-15A2細胞に対する接着性を検討した。mAb FH6で前処理すると HX 細胞の接着性は有意に減少したが mAb KM93、正常マウス IgM で前処理しても変化はみられなかった(Fig 2-B)。また HX 細胞を EGase で処理すると mAb KM93の結合性に変化はみられないが、mAb FH6の結合性は減少し MLE-15A2 細胞に対する接着性が有意に低下した(Fig 2-C)。これらの特徴は HX 細胞の肝臓凍結切片に対する接着の特徴と一致した。従って HX 細胞のマウス肝臓凍結切片に対する接着は、肝臓実質細胞を介した相互作用であることが推測された。またこの相互作用は癌細胞表面に発現される「mAb FH6に認識される EGase に感受性の糖鎖」を介した相互作用であると考えられた。このような特徴をもつ糖鎖として、HX 細胞から単離したものの構造を「NeuAc α2-3Gal β1-4GlcNAc β1-3Gal β1-4GlcNAc β1-3Gal β1-4(Fuc α1-3)GlcNAc β1-6(NeuAc α2-3 Gal β1-3)GalNAc」と決定した(1)。

3. FUT6 中発現トランスフェクタント細胞クローンのマウス肝臓凍結切片への接着性の検討

HX 細胞は mAb FH6 を用いたソーティングを繰り返すことによって得られたバリエーション細胞であり、mAb KM93 の結合性も LX 細胞よりも高かった。また未知の接着に関わる細胞表面分子が高発現している可能性も否定できなかった。そこで mAb FH6 結合性の糖鎖のみが細胞形質として異なっている細胞の組み合わせを利用してこの問題を解決することとした。フコース転移酵素の内、FUT6 がポリラクトサミンの還元末端に近い N-アセチルグルコサミンにフコースを転移するという知見に基づき、FUT6トランスフェクタント細胞が作製された(加納 亮 修士論文)。LX 細胞に FUT6 cDNA をトランスフェクトして得た細胞の中発現クローンの1つは、Mock トランスフェクタント細胞と比較して mAb FH6の結合性が高く、mAb KM93の結合性に差がみられなかった。そこでこの細胞を用いてマウス肝臓凍結切片に対する接着性を検討した。BCECF-AM にて蛍光標識した FUT6中発現トランスフェクタント細胞クローン(F6M 細胞)及び Mock トランスフェクタント細胞を 1×10^6 cells / mlの懸濁液に調製し、10 µm 厚のマウス肝臓凍結切片上にそれぞれ100 µl ずつ加えた。4℃ で30分間接着させ、DPBS にて接着しない細胞を洗浄後、3%グルタル

アルデヒドで固定した。蛍光顕微鏡下にて1切片につき任意の6視野を選び平均を1視野あたりの接着細胞数として計測し、1データとしてさらに3データ分の結果を評価した。F6M 細胞は、Mock トランスフェクタント細胞に比べマウス肝臓凍結切片に対し

有意に高い接着性を示した (Fig 3-A)。

BCECF-AM 標識した F6M 細胞に mAb FH6 (50 $\mu\text{g/ml}$) 及び mAb KM93 (50 $\mu\text{g/ml}$)、コントロールとして正常マウス IgM (50 $\mu\text{g/ml}$) を 4 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間、前処理したときの

肝凍結切片に対する接着性を検討した。

mAb FH6 で前処理すると F6M 細胞の接着

性は有意に減少したが mAb KM93、正常マウス IgM で前処理しても変化はみられなかった。また F6M

細胞を EGase で 37 $^{\circ}\text{C}$ で 4 時間処理すると mAb FH6 の結合性は完全に消失し、マウス肝凍結切片に対する接着性が有意に低下した (Fig 3-B)。これら

の細胞を用いてマウス肝臓実質細胞株

MLE-15A2 細胞への接着性も検討したところ、

F6M 細胞は Mock トランスフェクタント細胞に比べ有意に高い接着性を示し (Fig 4-A)、

エンド- β -ガラクトシダーゼ処理により

接着性が低下した (Fig 4-B)。これらの結果

からも mAb FH6 に認識される、EGase 感

受性のフコースを含む糖鎖がマウス肝臓実質細胞との接着に関与していることが確認された。

4. ヒト大腸癌 mAb FH6 結合性バリエーション細胞のマウス肝臓との相互作用に関する分子の解析

Balb/c マウスを麻酔後開腹し、門脈にカニューレ挿入した。灌流し、脱血した後 Sulfo-NHS-biotin (5 mg/生理食塩水) を灌流することで肝臓内血管表面タンパク分子をビオチン標識した。肝臓を摘出し、細片にした後に 0.05% コラゲナーゼ、0.005% DNase 溶液で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間、保温した。コラゲナーゼ消化物をナイロンメッシュでろ過し 3000 rpm で 10 分間、遠心した後、沈殿物を PBS (-) で洗浄した。0.5% NP-40 を加え 4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間、可溶化した。14000 rpm で 10 分間遠心し、上清画分を細胞可溶化物とした。予め 12 穴プレートにグルタルアルデヒドで固定しておいた HX 細胞上、あるいは LX 細胞上に細胞可溶化物をタンパク量として 3 mg 重層し、4 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間、静置した。非結合画分を除き洗浄した後、結合画分を EDTA で溶出した。溶出画分中のタンパク分子を二次元電気泳動を行い分離し、アルカリフォスファターゼ・スト

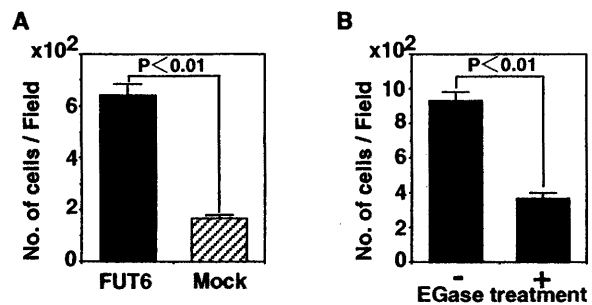


Fig 3 F6M 細胞のマウス肝臓凍結切片に対する接着
A: F6M 細胞、Mock トランスフェクタント細胞のマウス肝臓凍結切片に対する接着
B: EGase 処理の F6M 細胞の接着に与える影響

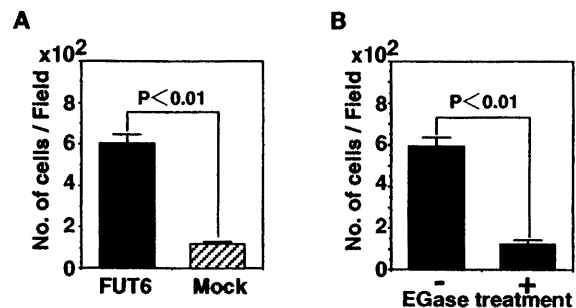


Fig 4 F6M 細胞のマウス肝臓実質細胞株 MLE-15A2 に対する接着
A: F6M 細胞、Mock トランスフェクタント細胞の比較
B: EGase 処理の F6M 細胞の接着に与える影響

レプトアビジンで検出した。HX 細胞に結合性を示し、LX 細胞に結合性を示さない分子が複数検出された。HX 細胞に結合性を示す肝臓内ビオチン化タンパク分子が肝臓実質細胞由来かどうか、また F6M 細胞を用いても同じ分子が同定できるか現在解析を進めている。

【まとめ、考察】

本研究によってヒト大腸癌細胞とマウス肝臓との接着が、EGase 感受性の mAb FH6 に認識される糖鎖を介した相互作用であることが明らかになった。この相互作用は、マウス肝臓実質細胞表面に発現されるリガンド分子との結合によるものである可能性が高く、その分子の同定が進めば、大腸癌の肝臓での転移性増殖における糖鎖の役割が明らかとなり、将来的には新しい治療法の開発へと発展するものと期待される。

【参考文献】

1. Ota M, Takamura N, Irimura T (2000) *Cancer Res*, 60: 5261-5268.
2. Irimura T, Ota M, Kawamura Y, Nemoto-Sasaki Y (2000) *Adv Exp Med Biol*, in press.