

## 審査の結果の要旨

氏名 大田 将 以

「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」との題目を持つ本論文は、細胞表面の糖鎖と内在性レクチンとの相互作用が、がん細胞の宿主との相互作用を通してがんの病態に影響するという概念に基づき、肝臓に転移しやすい癌細胞が肝臓の組織との接着の分子機構を明らかにしたものである。従来がん細胞と宿主との相互作用には、腫瘍マーカー抗原として知られているシアリルルイス X (NeuAc α2-3Gal β1-4(Fuc α1-3)GlcNAc: sLe<sup>x</sup>)が重要な位置を占めると考えられて来たが、本論文において申請者はヒト大腸癌細胞と肝臓との接着が、sLe<sup>x</sup>と類似であるが構造の異なるシアル酸とフコースを含む、伸長型のポリラクトサミン糖鎖と、肝実質細胞に発現している従来知られていなかったレクチン様分子との相互認識に基づくことを明らかにした。

本研究の背景の最も重要なポイントは、従来は抗 sLe<sup>x</sup> 抗体として知られていたモノクローナル抗体である FH6 のヒト大腸癌組織に対する結合性が高いと、その腫瘍を持つ患者の予後が悪い、という知見である。この抗体に認識される糖鎖は複数種存在し、sLe<sup>x</sup> はそのひとつにすぎない事が後に判明した。sLe<sup>x</sup> はレクチン様ドメインを持つ接着分子であるE-セレクトインのリガンド糖鎖として知られるが、モノクローナル抗体 FH6 に対するエピトープを含む糖鎖のすべてがE-セレクトインに結合性を示すとは限らない。さらに、E-セレクトインとリガンドとの相互作用は、好中球など白血球の炎症部位への集積には重要な細胞接着をつかさどるが、肝臓組織と癌細胞の相互作用にも重要である事を示す知見は乏しかった。本研究で学位申請者は、in vitro におけるヒト大腸癌細胞の肝臓への接着を測定する系を確立し、この接着は、ヒト大腸癌細胞表面のシアル酸とフコースを含む伸長型のポリラクトサミン糖鎖と、肝実質細胞上のレクチン様接着分子との分子相互作用に基づくことを明らかにするという、重要な発見をした。さらに、このレクチン様分子を精製し、新しい特異性を持つ内在性レクチン解明への糸口を開いた。

具体的な研究内容は、三つの部分から成る。第一部では、ヒト大腸癌細胞が肝臓組織の凍結切片に接着する際に、肝臓組織のどの細胞を介した相互作用が決定的であるかを解明することが目標となった。マウス肝臓から実質細胞及び非実質細胞をそれぞれ単離し、ヒト大腸癌のモノクローナル抗体 FH6 高結合バリエーション細胞と低結合バリエーション細胞の接着性を比較検討するという実験の結果、肝臓実質細胞が相手方であることが強く示唆された。C3H マウスより樹立されたマウス肝臓実質細胞株 MLE-15A2 に対してもヒト大腸癌モノクローナル抗体 FH6 高結合バリエーション細胞は接着性が高く、この抗体で接着が阻害された。これに対して、sLe<sup>x</sup> 4 糖構造に特異的なモノクローナル抗体である KM93 で前処理した時は、接着性に変化はみられなかった。また細胞をエンド-β-ガラクトシダーゼで処理すると接着性が有意に低下した。これらの特徴はヒト大腸癌細胞の肝臓凍結切片に対する接着の

特徴と一致し、これが肝臓実質細胞を介した相互作用であると結論された。

第二部では、FUT6（フコシルトランスフェラーゼ-6）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が行われている。上記したような特徴をもつヒト大腸癌モノクローナル抗体 FH6 高結合バリエーション細胞表面糖鎖の構造を、学位申請者は共同で既に NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ 1-6(NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3)GalNAc と決定していたが、この糖鎖のフコース残基が接着に関わるかどうかは、モノクローナル抗体 FH6 低結合バリエーション細胞にフコース転移酵素の遺伝子を強制発現させることが得策であると考えた。フコース転移酵素の内、FUT6 遺伝子導入により、モノクローナル抗体 FH6 高結合 FUT6 トランスフェクタント細胞が作製された（FUT6中発現トランスフェクタント細胞クローン）ので、この細胞の肝組織との接着性を詳細に検討した。その結果から、モノクローナル抗体 FH6 に認識される、エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ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。

第三部では学位申請者が、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与する分子を同定すべく、解析した結果が述べられている。マウス肝臓内の血行性細胞に接触しうる表面蛋白分子をビオチン標識して可溶化した。固定しておいたモノクローナル抗体 FH6 高結合バリエーション細胞上に細胞可溶化物を重層し、結合画分を2次元電気泳動によって分離し検出した。この細胞に結合性を示し、低発現細胞に結合性を示さない分子が複数検出された。

本研究によってヒト大腸癌の悪性挙動、特に消化器癌の肝転移に大きく関与する細胞相互作用の一端としての、癌細胞と肝臓との接着の具体的なメカニズムが、エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ感受性のモノクローナル抗体 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。同じ構造がヒトの同じタイプの癌の悪性度の指標となることからヒト消化器癌特に大腸癌の自然史の理解、予後判定法の改善、それによる治療法の個別化と改善に大きく貢献するはずである。このように腫瘍生物学と糖鎖生物学に強いインパクトを持つ本研究を行った大田将以は博士（薬学）の学位を得るにふさわしいと判断した。