

論文の内容要旨

論文題目：E-selectin との結合に関与するヒト肝癌細胞の N-glycan 糖タンパク質

氏 名：林 啓 智

【はじめに】

selectin は血管内皮細胞、白血球、血小板などに発現する接着分子のファミリーであり、白血球の血管外遊走、リンパ球のホーミング、癌細胞の浸潤や転移などに関与することが知られおり、sLe^x、sLe^a、或は硫酸化された糖鎖構造を認識することが明らかにされてきた。これまで selectin 分子の ligand の探索がなされ、O-glycan に富むムチン様糖タンパク質(CD34, GlyCAM-1, PSGL-1 等) や糖脂質が L-及び P-selectin 分子の ligand として同定されてきた。一方、E-selectin に対する ligand については、マウスの好中球前駆細胞の ESL-1 を除いてヒト血液系細胞に関しては幾つか報告されたが (例えば CD44, PSGL-1)、ヒト癌細胞については明確な証拠が得られていない。特に癌細胞の血行性転移においては血管内皮細胞に発現する E-selectin が重要な役割を果たすことから、癌細胞上の E-selectin ligand 分子の同定は必須と思われる。そこで、本研究において私は、特に N-glycan 性の E-selectin ligand 分子の同定に焦点を当てて、以下の研究を行った。

【方法と結果】

1. 各種癌細胞表面に発現する E-selectin ligand の量的比較：

抗 sLe^x 抗体と反応することが知られている癌細胞株の中から、HepG2(肝癌)、LS174T(直腸癌)、NUGC-4(胃癌)、そして HL-60(前骨髄性白血病)の四種類の癌細胞を選んで培養してそれぞれの形質膜を調製した。調製した形質膜を ELISA プレートにコートして E-selectin/Fc キメラタンパク

及び二次抗体を用いて抗原量を測定した。Table 1 に示す様に、LS174T が多量の ligand 量を発現するのに対し、HepG2 と HL-60 が中程度、NUGC-4 が微量に発現することが分かった。

2. N-glycan 性 E-selectin ligand を発現する癌細胞株の選別：

各癌細胞形質膜を ELISA プレートにコートした後、N-glycan を特異的に切断する PNGase F で消化した。酵素処理及びコントロールのウェルに、レクチン或は E-selectin/Fc キメラタンパクと HRP 標識二次抗体との複合体を加え、結合能の変化を解析した。先ず PNGase F 消化効率を N-glycan に親和性を持つ L-PHA 及び O-glycan に親和性を持つ PNA で検討した所、PNA 染色強度が殆ど変わらないのに対して L-PHA の場合には、HepG2 で約 20%、LS174T で約 65%、HL-60 で 10%以下、NUGC-4 で約 40%、に反応性が低下した。一方、E-selectin/Fc キメラタンパクとの結合能は Fig. 1 に示す様に HepG2 で約 20%、NUGC-4 で約 70%に低下した。LS174T と HL-60 では殆ど影響が認められなかった。従って、特に HepG2 の N-glycan は E-selectin との結合に深く関与することが判明した。

3. E-selectin 結合能に及ぼす糖鎖生合成阻害剤の影響：

続いて糖鎖生合成阻害剤を用いた細胞レベルで E-selectin/Fc キメラタンパクとの結合能への影響を観察した。N-glycan 生合成の阻害剤である 1-deoxymannojirimycin 及び O-glycan 生合成の阻害剤である Bz-GalNAc の存在下でそれぞれ HepG2 と LS174T を培養した。48 時間後 0.02% EDTA/PBS で細胞を解離させ、予め E-selectin/Fc キメラタンパクをコートした ELISA プレートに加え、生細胞計測色素法で細胞接着アッセイを行った。HepG2 においては二種の阻害剤により、接着能が低下したが、1-deoxymannojirimycin の阻害作用が Bz-GalNAc よりも顕著であった。一方、LS174T ではちょうど逆の結果が得られた。Bz-GalNAc に関しては更に cellular ELISA 法 (CELISA) で検討した。Fig. 2 に示すように、阻害剤処理なしに対して Bz-GalNAc 存在下で培養すると HepG2 も約 40%の阻害がかかるということが分かった。コントロールとしての LS174T も約 30%の阻害が認められた。従っての E-selectin との結合において HepG2 は N-glycan のみならず、O-glycan もある程度関与するが、但し N-glycan の方がより優位であると思われた。

4. HepG2 sialo N-glycan の構造解析：

形質膜レベル及び細胞レベルでの検討の結果、*in vitro* で E-selectin との結合に深く関与することが明らかになった HepG2 の N-glycan の構造解析を詳細に行った。調製した形質膜からヒドラジン分解法で N-glycan を遊離し、還元末端に蛍光基 2-AB(2-aminobenzamide)を導入した。HiTrap Q 陰イオン交換カラムで分離した酸性糖鎖画分のシアル酸を除去し、TSKgel Amide-80 カラムを用いた順相 HPLC 及び MALDI-TOF/MS で解析を行った。その結果 HepG2 の sialo N-glycan は根元に fucose が付く 2 本鎖、3 本鎖、4 本鎖構造を骨格とすること及びポリ-N-アセチルラクトサミンのリピート構造に富むこと等が明らかになった。次に HepG2 の sialo N-glycan のポリ-N-アセチルラクトサミンのリピート構造部分に sLe^x 及びその関連構造が発現されるか否かについて探索した。Sialo-N-glycan から endo- β -galactosidase (*Escherichia freundii*) 消化で遊離した糖鎖断片に再び蛍光基 2-AB を導入し、精製した標識糖鎖を MALDI-TOF/MS で解析した。その結果、Fig.

3に示す通り、sLe^x(m/z 1102.84)、dimeric sLe^x(m/z 1614.61)、VIM-2(m/z 1468.72)などの構造が含まれることが判明した。

5. E-selectin ligand 候補としての HepG2 の N-glycan 糖タンパク質のスクリーニング：

HepG2 細胞の形質膜タンパクを octyl-β-D-glucopyranoside で可溶化し、SDS-PAGE で展開した後ウェスタンブロットングを行った。転写されたメンブレンを二つに分け、一方を PNGase F で酵素消化し、他方を酵素用バッファのみで処理した。先ず L-PHA レクチンを用いて酵素処理の効率を調べた。引き続き前述のレクチンを剥がし、同じメンブレンを再び抗 sLe^x mAb の CSLEX1 を用いて検出した。LS174T、NUGC-4、HL-60 の三種類の癌細胞株を比較として同時に検討した。L-PHA の染色パターンを調べた結果は Fig. 4 示すように、PNGase F 処理無しに対して PNGase F 処理した四種類の細胞のシグナルが全般的に顕著に減少し、酵素消化条件が適切であることを確認した。この条件における各々の細胞株の PNGase F 処理前後の CSLEX1 による染色パターンの変化を Fig. 5 に示した。HepG2 細胞は主要なバンドが幾つか消失或は染色強度が弱まった。一方、LS174T では殆ど変化していないと言って良い。HL-60 では主要なバンドの染色強度は殆ど変化しなかった。NUGC-4 では CSLEX1 では全くといって良いほど染色されなかった。このように、HepG2 の限られた糖タンパク質が N-glycan 性の sLe^x 構造を発現しており、これらが E-selectin ligands として働いていることが示唆された。

【まとめと展望】

本研究において、HepG2 細胞の形質膜糖タンパク質に含まれる N-glycan が O-glycan よりも E-selectin との結合への関与の度合いが強いことが示された。また、複数の糖タンパク質が E-selectin ligand の候補分子として検出することができた。今後、真の ligand 分子の同定と精製を含め、更にプロテオミクス的手法を導入したコアタンパク質の解析、同定及び詳細な糖鎖構造の解析に興味をもたられる。更に癌の多様性を考えるならば、細胞種によって N-glycan、O-glycan の E-selectin 結合への関与が異なり、これら糖鎖のキャリアタンパク質も異なっている可能性が示唆され、その証明も重要な課題と思われる。

| Relative E-selectin ligand presented by each cell line | |
|--|---------------|
| HepG2 | 0.317 ± 0.018 |
| LS174T | 1.501 ± 0.054 |
| HL-60 | 0.300 ± 0.032 |
| NUGC-4 | 0.115 ± 0.014 |

Table 1
relative amount of E-selectin ligands presented on each cell plasma membrane detected under the same condition

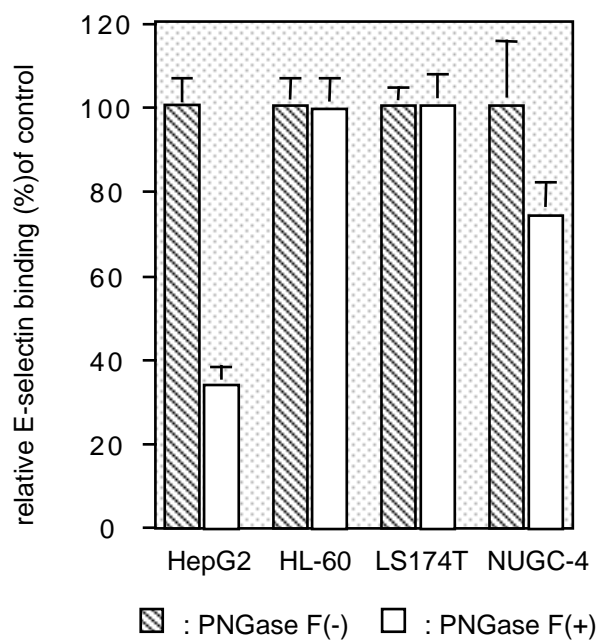


Fig. 1
Effect of PNGase F treatment on E-selectin binding detected by plasma membrane coated ELISA

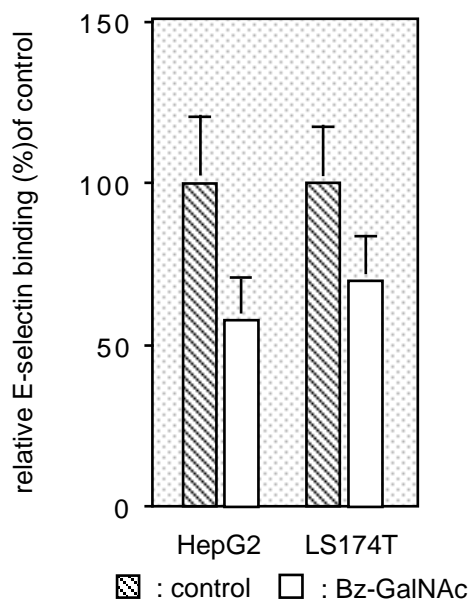
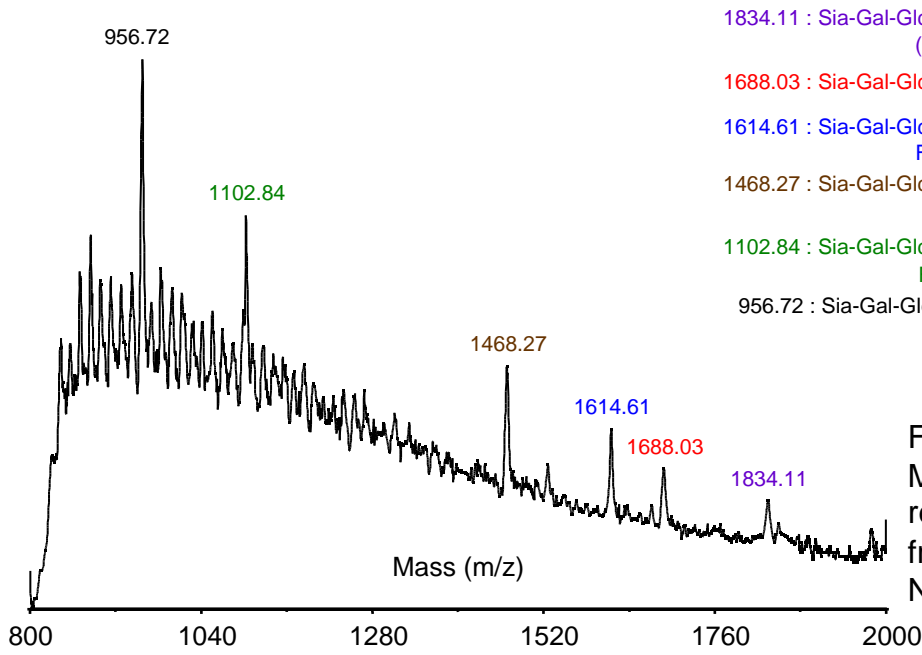


Fig. 2
Effect of Bz-GalNAc treatment on E-selectin binding detected by cellular ELISA



1834.11 : Sia-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAc-Gal-2AB
(Fuc) or (Fuc) or (Fuc)

1688.03 : Sia-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAc-Gal-2AB

1614.61 : Sia-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAc-Gal-2AB
Fuc Fuc

1468.27 : Sia-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAc-Gal-2AB
Fuc

1102.84 : Sia-Gal-GlcNAc-Gal-2AB
Fuc

956.72 : Sia-Gal-GlcNAc-Gal-2AB

Fig. 3
MALDI-TOF/MS of oligosaccharide released by endo-β-galactosidase from poly-N-acetyllactosamine of N-glycans of HepG2

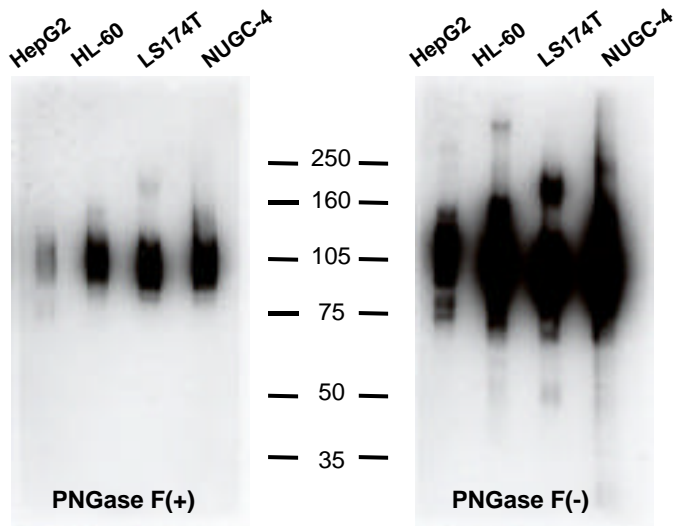


Fig. 4
L-PHA evaluation of each cell line after PNGase F treatment

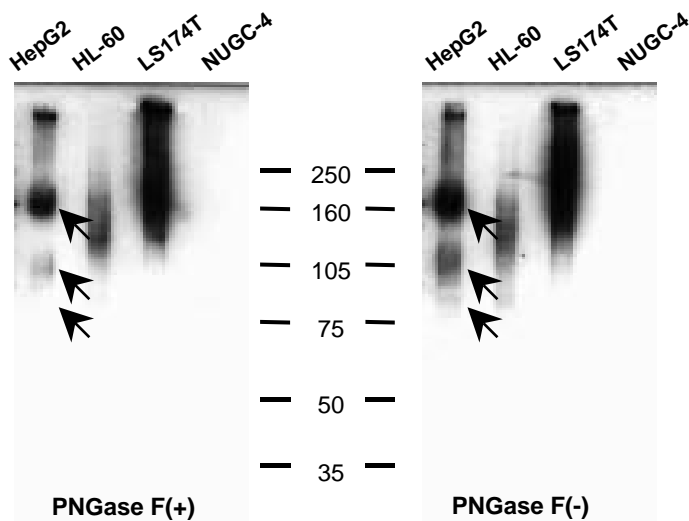


Fig. 5
Decrease of sLe^x antigen on HepG2 detected by CSLEX1