

## 審査の結果の要旨

氏名 林 啓 智

selectin familyに属する細胞接着分子であるE-selectinは、血管内皮細胞に発現し、sialyl Lewis X (sLe X)あるいは sialyl Lewis a (sLe a) 糖鎖を認識する反応を介して白血球の血管外遊走や癌細胞の浸潤、転移などに関与することが知られている。これまで E-selectin 分子のリガンドとして働くタンパク質の探索がなされ、マウスの好中球前駆細胞の ESL-1、ヒト血液系細胞の数種の分子 (CD44, PSGL-1 等) が候補にあげられてきている。しかし、ヒト上皮系癌細胞のリガンド分子については十分に解析されておらず、大腸癌細胞におけるムチン系糖タンパク質が示唆されているに過ぎない。申請者は、癌の悪性化に伴って増加する N-glycan の 2,6-分岐構造の延長上に sLeX 構造が形成され易いという特徴に着目し、N-glycan 性の E-selectin のリガンドに焦点を当てて探索を行った。

第一章では、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)、HL-60 (前骨髄性白血病)の四種類の癌細胞を選んで、先ず E-selectin/Fc キメラタンパク質をコートしたウエルへの結合を確認した。次に、細胞の形質膜を ELISA プレートにコートして、E-selectin/Fcキメラタンパク質をプローブとしてE-selectin のリガンド量を測定し、LS174T 細胞が多量のリガンドを発現するのに対し、HepG2 細胞と HL-60 細胞が中程度、NUGC-4 細胞が微量に発現することを観察した。

第二章では、ELISA プレートにコートした癌細胞形質膜を N-glycan を特異的に遊離する PNGaseF で消化し、遊離効率をレクチン (L-PHA) をプローブにして調べながら、E-selectin/Fc キメラタンパク質との結合能の変化を解析した。その結果、HepG2 細胞では対照 (酵素未処理) の約 20%に E-selectin 結合能が低下し、他の 3 種の細胞では殆ど変化が無いが活性低下が微弱であった。この変化に対応して抗 sLe X 抗体との反応性の変化が見られ、HepG2 細胞の sLe X 構造含有 N-glycan が E-selectin との結合に深く関与するを示した。

第三章では、癌細胞の E-selectin 結合能に及ぼす糖鎖生合成阻害剤の影響を検討した。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 HepG2 細胞を培養し、48 時間後に E-selectin/Fc キメラタンパク質をコートした ELISA プレートへの結合能を調べた。その結果、1-deoxymannojirimycin が HepG2

細胞の結合を顕著に阻害することが分かった。また Bz-GalNAc も結合の阻害を示すがその程度は低く、部分的な関与を示すものであった。1-deoxymannojirimycin 処理した HepG2 は、IL-1 で刺激した血管内皮細胞への接着能も低下することを観察し、N-glycan 性リガンドの生理的な重要性を示唆した。

第四章では、HepG2 細胞の形質膜糖タンパク質の N-glycan の構造解析について述べている。形質膜糖タンパク質から N-glycan を遊離し、蛍光基を導入した後、HPLC による分画を行い、MALDI-TOF/MS による解析を行った。その結果、N-アセチルラクトサミンの繰り返し構造（ポリラクトサミン構造）に富む N-glycan を有し、ポリラクトサミン部分には sLe X や sialyl dimeric Le X 構造等が含まれることを示した。

第五章では、E-selectin のリガンドとして機能する HepG2 細胞の膜タンパク質の解析について述べている。形質膜タンパク質の SDS-PAGE、メンブレンへの転写後、PNGaseF 消化を行ない、抗 sLe X 抗体や E-selectin/Fc キメラタンパク質をプローブとした染色像の変化を観察した。その結果、HepG2 細胞は HL-60 細胞や LS174T 細胞とは異なり N-glycan 性の sLeX 構造を発現し、E-selectin/Fc キメラタンパク質に結合する少なくとも 4 種類（90kDa、120kDa、180kDa、800kDa）の糖タンパク質を発現していることを示した。

以上のように申請者は、ヒト肝癌細胞の形質膜糖タンパク質に含まれる N-glycan が E-selectin への結合に関与することを示し、N-glycan の詳細な解析を行い構造の特徴を明らかにした。また、N-glycan 性リガンド糖鎖を発現し、E-selectin への結合に関与する候補分子として複数の糖タンパク質が存在することを示した。本研究の成果は、癌細胞の転移に関わる分子の理解に貢献するものであり、博士（薬学）の学位を受けるに値するものと判断した。