

審査の結果の要旨

氏名 李 ユリ

「Biological characterization of cells expressing Muc21/epiglycanin (Muc21/epiglycanin 発現細胞の生物学的な特性)」と題する本論文は、癌細胞表面ムチンとして 1975 年に記載されたエピグリカニンを対象に、これを発現する細胞の挙動を明らかにした結果を述べたものである。エピグリカニンはマウス乳がん細胞株である TA3-Ha の表面に見出され、別の垂株で造腫瘍性・可移植性の低い TA3-St には発現していなかったことから、癌細胞の挙動の違いをもたらす原因分子の一つと考えられて来た。さらに、TA3-Ha 細胞は宿主の免疫応答に基づく癌細胞排除機構に抵抗性を示し、これもエピグリカニンが細胞表面を被覆するためであると仮定されていた。これらの報告はその後発見された MUC1 をはじめとする腫瘍細胞表面ムチンを発現する癌が予後不良である原因を考察する上で、しばしば引用されて来た。しかし、エピグリカニンの遺伝子が同定されていなかったため確固たる証明ができないまま30年余が経過していた。エピグリカニンの遺伝子が同定され Muc21 として確認されたが、強制発現細胞を作製してその機能を明らかにするにはいくつかの障壁があった。まず、この巨大な分子の全長 ORF は取得されていなかった。また、発現したタンパク質には約800の糖付加部位があり、最終的に細胞表面に存在する分子は重量比として70%以上が糖である可能性が高いが、この部分の構造多型(グリコフォーム)を簡便に分別検出する方法が当初無かった。学位申請者は、第一の問題を、新たに全長遺伝子を、それぞれクローニングした3部分から人工的に再構築して発現ベクターを作製して解決し、第二の問題をグリコフォーム特異的なモノクローナル抗体を開発することで、部分的にはあるが解決し、発現細胞の挙動解析を可能にした。対象としては、ヒト胎生腎細胞由来 HEK293T 細胞とマウスメラノーマ B16-F1 細胞を用い、これらに Muc21 を一過的または安定に発現させて、細胞の性質の変化を調べた。

HEK293T 細胞に Venus ベクターを用いて Muc21 を一過性に発現させ、蛍光を発する細胞を観察した。その結果、Muc21 発現によって細胞が接着状態から浮遊状態に変化することを明らかにした。この変化は Muc21 の細胞質ドメインを完全に欠失させても起こるが、糖付加を受ける配列の繰り返しであるタンデムリピートドメインを欠失させると欠失部分の割合に比例して細胞を浮遊化する能力が失われたので細胞外の糖鎖を含む部分が重要であることが明らかとなった。Muc21 を強制発現させた細胞では同じ細胞どうしの接着性や、フィブロネクチン、ラミニン、IV 型コラーゲン、及び基底膜のモデルであるマトリゲルへの接着性が低下しており、このような低下はタンデムリピートドメインを短小化した Muc21 ではわずかしか見られなかった(84回繰り返しと4回繰り返しを含むものの比較に基づく)。しか

し、ポリ-L-リジンへの接着性には影響がなかったので Muc21 の影響は、特定の接着分子の機能を修飾していると考えられた。実際に、抗インテグリン $\beta 1$ 鎖抗体の Muc21 を強制発現させた細胞への結合性を見ると有意に低下しており、タンデムリピート部分を欠損させた Muc21 にはこの効果は見られなかった。また、細胞を可溶化し、ウェスタンブロットング法で インテグリン $\beta 1$ 鎖を検出すると、Muc21 強制発現細胞において、非発現細胞と同程度の量が検出された。Muc21 によるインテグリンの機能低下または細胞表面におけるアクセシビリティの低下が細胞浮遊化の原因であることが明らかとなった。293T 細胞に発現した Muc21 は主にガラクトースを末端に持つ短小な糖鎖であるが、シアル酸を持つ糖鎖も含まれることがモノクローナル抗体やレクチンによる解析で明らかになった。そこで抗接着効果が陰性荷電を持つシアル酸に依存する可能性を調べるため、細胞をシアリダーゼ処理した後に接着実験を行った。その結果糖鎖末端のシアル酸残基は Muc21 による細胞浮遊化に貢献していないことが確かめられた。

細胞の増殖や生存への Muc21 の影響は、B16-F1 メラノーマ細胞を背景とする Muc21 安定発現細胞クローンを複数作製し、比較することによって検証した。ここでもタンデムリピート84回繰り返しと4回繰り返しを比較した。これらの細胞の足場非依存的増殖性を比較するためにポリヒドロキシエチルメタクリル酸 (poly-HEMA) 処理した表面上で培養を行った。その結果タンデムリピート84回の繰り返しを持つ Muc21 強制発現細胞では足場非依存的な増殖性が獲得されていることが示された。さらに、Muc21 発現のない細胞では足場非依存状態で経時的にアポトーシスが誘導されるが、強制発現細胞では足場のない状態で高い生存率を保つことが明らかになった。Muc21 発現 B16-F1 メラノーマ細胞は、接着性の低下に起因する細胞相互作用の変化が見られると考えられたが、実際にナチュラルキラー細胞による殺傷効果に対して抵抗性が高い、血管内皮細胞に対する接着性が低い、などの非発現細胞とは異なる性質が認められた。これらの細胞の *in vivo* における振る舞いを、尾静注後の肺転移形成能と皮下注後の造腫瘍能に関して比較した。前者の能力は Muc21 発現細胞では低下しており、後者の能力は変化していなかった。以上より、タンデムリピート84回繰り返しのムチン領域を含む Muc21 を強制発現させた B16-F1 細胞は、少なくとも *in vitro* では生存が脅かされる条件下で生存しやすくなっていることが判明した。一方 *in vivo* では、悪性挙動が増強しているわけではなかった。

これらの結果は、腫瘍ムチンの細胞表面における機能について、徹底的にまたその構造的特徴に注意を払って解析したものである。それらの研究成果は新規ムチン Muc21 の機能を明らかにしたばかりでなく、癌細胞の表面分子として量的に豊富で特徴的な構造を持つムチンが、癌細胞の振る舞いにどのような影響を与えるかに関して新しい知見を与えるものであり、糖鎖生物学、腫瘍学、及び免疫学に資するところが大きい。よって、これらの研究を行った李 ユリは博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。