

学位の種類	博 士	氏 名	大 隅 大 介
-------	-----	-----	---------

学 位 論 文 題 目

Core fucosylation prolonged the turnover of E-cadherin and enhanced cell-cell adhesion in WiDr cells

(α 1,6-fucosyltransferase 過剰発現ヒト大腸癌細胞 WiDr における E-cadherin の代謝の遅延と細胞間接着の増強)

高橋素子, 横江俊一, 李承喙, 三善英知, 千石一雄, 石川睦男, 谷口直之

未 公 表

研 究 目 的

N 型糖鎖は蛋白質の立体構造, 親水性やレクチン様分子との親和性を変化させることにより蛋白質間相互作用, 細胞内輸送, プロテアーゼに対する感受性など様々な機能に影響すると考えられている. N 型糖鎖には共通の core structure が存在し, 分岐パターンは糖転移酵素によって決定される. α 1,6-fucosyltransferase (以下 Fut8 と表記) は N 型糖鎖還元末端の N アセチルグルコサミンに α 1,6 結合で fucose を転移する糖転移酵素である. α 1,6-fucosylation は特に腫瘍形成との関わりが研究されており卵巣漿液性腺癌において Fut8 の発現レベルが上昇していることなどが報告されている. しかしながら Fut8 の生物学的役割については未だ十分に解明されていない.

E-cadherin はカルシウム依存性の細胞接着分子で組織構造の形成, 維持において中心的な役割を果たしていると考えられている. E-cadherin の細胞外ドメインには 4 箇所の N 型糖鎖付加部位があり, 糖転移酵素 β 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III により N 型糖鎖にバイセクティング N アセチルグルコサミンが導入された E-cadherin は接着活性が増強し癌の転移を抑制することなどが報告され E-cadherin と N 型糖鎖の関連が注目されている.

今回 E-cadherin の α 1,6-fucosylation に伴う細胞接着の変化ならびに癌転移抑制に関し Fut8 遺伝子過剰発現ヒト大腸癌細胞 WiDr を作成し解析した.

材 料 ・ 方 法

1. Fut8 遺伝子過剰発現細胞 WiDr の確立

ヒト大腸癌細胞 WiDr を用いヒト Fut8 遺伝子過剰発現細胞 (以下 Fut8 細胞と表記) および

mock細胞を作成した。クローン化した細胞は抗Fut8抗体によるウエスタンブロットでFut8の発現を確認しFut8活性の測定を行った後に実験に使用した。

2. 細胞形態の観察・免疫染色

光学顕微鏡により細胞形態を観察するとともに、細胞をパラホルムアルデヒドで固定しTritonX-100で処理した後に抗E-cadherin抗体により免疫染色し共焦点レーザー顕微鏡を用い観察した。

3. E-cadherinの解析

Fut8細胞表面でのE-cadherinの発現を解析するため細胞表面の蛋白質をs-NHSピオチン化した培養細胞を回収し抗E-cadherin抗体を用いた免疫沈降を施行した。回収したE-cadherinはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)した後にVectastain ABCキット(Vector Laboratories)とECLキット(Amersham Pharmacia Biotec)により検出した。またE-cadherinの糖鎖の変化を調べるため免疫沈降で回収したE-cadherinにN型糖鎖のfucoseを特異的に認識するレクチン(LCAまたはAAL)によるレクチンブロットを行った。

4. 細胞接着アッセイ

培養細胞をEDTA-PBSで処理した後、細胞懸濁液を無血清培地下で37°C、3時間培養し細胞接着をしている細胞の割合を算出した。またE-cadherin接着阻害抗体を用い、細胞接着がE-cadherin依存性であることを確認した。

5. Fut8ノックダウン膀胱癌細胞TGP49とFut8ノックアウトマウス腎臓細胞

RNAiによりFut8をノックダウンした膀胱癌細胞TGP49とそのワイルドタイプ細胞およびFut8ノックアウトマウスから分離した腎臓細胞とFut8を再導入したコントロール細胞(ともに供与)で上記2-4の実験を行った。

6. リアルタイムPCR

リアルタイムPCRを施行しFut8細胞におけるE-cadherinのmRNA量の変化を検討した。

7. パルスチェイス解析

E-cadherinの生成・分解を解析するため³⁵Sで標識したメチオニンを用いたパルスチェイスを行った。200 μ Ci/mlの濃度で20分間パルスした細胞を余剰なRIを除去した後に0, 8, 24, 32

時間培養し回収, 抗 E-cadherin 抗体で免疫沈降後 SDS-PAGE を行い BAS-2500 システム (FUJI PHOTO FILM) で RI ラベルされた E-cadherin を検出した.

8. 上皮増殖因子 (EGF) 刺激によるベータカテニンのチロシンリン酸化の検討

培養細胞を 50ng/ml の EGF で 0, 5, 15, 60 分の各時間刺激した後に回収し抗ベータカテニン抗体による免疫沈降を行った. 回収したベータカテニンは SDS-PAGE の後に抗チロシンリン酸化抗体でウェスタンブロットを施行し Fut8 細胞と mock 細胞を比較した.

9. Fut8 細胞の転移能解析

細胞間接着状態の変化の癌転移への影響を調べるため胸腺欠損マウスを麻酔下に開腹し脾臓に Fut8 細胞および mock 細胞の懸濁液を注入し, 5 週後に肝転移, 腹腔内リンパ節転移, その他の臓器への転移を解析した.

成 績

Fut8 細胞では mock 細胞に比べ細胞同士が密集して発育しており, また抗 E-cadherin 抗体を用いた免疫染色では細胞と細胞の境界部分で E-cadherin の著しい発現の増強が認められた. レクチンブロットにおいて Fut8 細胞の E-cadherin では α 1,6-fucose が mock 細胞に比べ増加しており, 細胞表面ビオチン化と免疫沈降による細胞表面の E-cadherin 発現量の検討では Fut8 細胞の細胞表面の E-cadherin が増加していることが確認された. 細胞間接着の変化を細胞接着アッセイで検討したところ Fut8 細胞 (62%) は mock 細胞 (18%) に比べ有意に接着細胞の割合が高く, 明らかな細胞間接着の増強が認められた. この現象は E-cadherin 阻害抗体の添加により消失した. 同様の実験を Fut8 ノックダウン膀胱癌細胞 TGP49 で行ったところワイルドタイプ細胞に比べ細胞表面での E-cadherin の発現が低下し細胞間接着が減弱していることが観察された. さらに Fut8 ノックアウトマウスの腎臓細胞においても Fut8 を再導入したコントロール細胞に比べ細胞表面での E-cadherin の発現, 細胞間接着はともに低下が認められた. リアルタイム PCR の検討では, Fut8 細胞と mock 細胞との間で E-cadherin mRNA 量に差は認められず, Fut8 細胞の E-cadherin の増加は post translational なものであると考えられた. ^{35}S で標識したメチオニンを用いたパルスチェイスにおいて Fut8 細胞では mock 細胞に比べ E-cadherin の代謝が遅延しており, また Fut8 細胞では上皮増殖因子 EGF による刺激においてベータカテニンのチロシンリン酸化レベルが mock 細胞に比べ低下していた. 胸腺欠損マウスの脾臓に細胞を注入した癌転移の解析では, mock 細胞は 10 例中 5 例に肝転移, 10 例中 7 例に腹腔内リンパ節転移が確認されたのに対し Fut8 細胞では肝転移および腹腔内リンパ節転移は認められなかった.

考 案

Fut8 遺伝子を過剰発現させたヒト大腸癌細胞 WiDr を用いた本研究から Fut8 により N 型糖鎖の還元末端の N アセチルグルコサミンに $\alpha 1,6$ -fucose が導入された E-cadherin は代謝が遅延することにより細胞表面に蓄積し、細胞表面での発現が増加することが示唆された。またベータカテニンのチロシンリン酸化レベルの変化が E-cadherin の接着活性に影響をおよぼすことは既知のことであるが、今回の検討結果からもベータカテニンのリン酸化レベルの低下が E-cadherin の代謝遅延の原因のひとつであると考えられる。胸腺欠損マウスにおいて Fut8 細胞を注入した群の肝転移が抑制された結果は、Fut8 による E-cadherin の接着活性の増強により脾臓で形成された腫瘍から癌細胞の離脱が困難となった結果であると考えられ E-cadherin の糖鎖構造の変化が癌転移機構に関与することが示唆された。

結 論

Fut8 遺伝子を過剰発現した WiDr 細胞では E-cadherin の代謝が遅延することにより細胞表面での E-cadherin の発現が増加し細胞間接着が増強することが示唆された。E-cadherin の糖鎖構造はその接着活性に影響を及ぼすことが示され、本研究結果は癌の転移メカニズムの解明に寄与するものと考えられる。

引 用 文 献

Overexpression of $\alpha 1-6$ fucosyltransferase in hepatoma cells suppress intrahepatic metastasis after splenic injection in athymic mice

Eiji Miyoshi *et al.*, 1999, *Cancer Research*, 59, 2237-2243

Aberrant glycosylation of E-cadherin enhances cell-cell binding to suppress metastasis

Masafumi Yoshimura *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.*, 271, 13811-13815

A glycomic approach to the identification and characterization of glycoprotein function in cells transfected with glycosyltransferase genes

Naoyuki Taniguchi *et al.*, 2001, *Proteomics*, 1, 239-247

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	大隅 大介
審査委員長 谷口隆信 ㊞ 審査委員 若宮伸隆 ㊞ 審査委員 千石一雄 ㊞			
学 位 論 文 題 目 Core fucosylation prolonged the turnover of E-cadherin and enhanced cell-cell adhesion in WiDr cells (α1,6-fucosyltransferase 過剰発現ヒト大腸癌細胞 WiDr における E-cadherin の代謝の遅延と細胞間接着の増強)			
共著者 高橋素子, 横江俊一, 李承豪, 三善英知, 千石一雄, 石川睦男, 谷口直之			
糖鎖はタンパク質の立体構造を規定し、その親水性やレクチン様分子との親和性などを修飾することにより、細胞内動態やプロテアーゼに対する感受性など様々な影響を与えると考えられている。α1,6- fucosyltransferase は N 型糖鎖還元末端の N アセチルグルコサミンにα1,6 結合で fucose を転移する糖転移酵素であり、最近、腫瘍形成との関連で注目されている。いくつかの癌においてα1,6-fucosyltransferase との関連が報告されているが、その病態的意義については未だ十分に解明されていない。			
E-cadherin はカルシウム依存性の細胞接着分子で、細胞外ドメインには 4 箇所の N 型糖鎖付加部位がある。この糖鎖構造の変化はその接着活性に影響を与え、接着活性の増強から癌の転移を抑制しうることが報告され E-cadherin の N 型糖鎖の構造と癌形質との関連が注目されている。			
今回α1,6- fucosyltransferase による E-cadherin への糖鎖付加に伴う細胞接着性ならびに癌転移能の変化について解析をおこなっている。			

細胞の接着性については、培養細胞を EDTA を用いて一旦個々の細胞に分離して懸濁状態とし3時間の震盪培養の後、再び接着している細胞の割合を計測して評価した。まず、内因性に $\alpha 1,6$ - fucosyltransferase の発現がほとんど認められないヒト大腸癌細胞 WiDr に対しこの酵素を高発現させて検討したところ、発現に伴って細胞接着性の亢進が認められ、細胞塊を形成して増殖する形態が観察された。免疫組織染色像では E-cadherin が細胞と細胞の境界面に集積して発現が亢進しており、これは免疫プロットでも確認された。

次いで、内因性に $\alpha 1,6$ - fucosyltransferase が発現しているヒト膵癌細胞 TGP49 に対しこの酵素の RNAi を用いてノックダウンしたところ、発現の低下に伴って細胞接着性が低下し、塊を形成しない増殖形態を示した。E-cadherin の細胞接着面への集積と全体的な発現量も低下していた。

これらの結果から、 $\alpha 1,6$ - fucosyltransferase の発現は E-cadherin を増加させて細胞接着面へ集積させることにより、細胞接着性を上昇させることが明らかになった。パルスチェイスラベリングによる検討から E-cadherin の増加は分解の遅延すなわち安定化によるものであり、これを補強するデータとして E-cadherin の安定性に関わるベータカテニンのチロシンリン酸化状態についても矛盾しない結果を示している。

最後に、in vivo での癌転移との関連について、ヒト大腸癌細胞 WiDr をヌードマウス脾臓に注入する実験を行い、肝臓、腹腔リンパ節、皮下のいずれへの転移においても $\alpha 1,6$ - fucosyltransferase の発現が転移を強く抑制することを示している。

E-cadherin の欠失や機能低下は様々の癌において普遍的な転移促進を介して悪性化の進展に関わっていると考えられている。本論文によって示された E-cadherin の $\alpha 1,6$ - fucosyltransferase による糖鎖修飾がその安定化を通して細胞接着を強固なものとし、結果的に癌細胞の転移を抑制するというメカニズムは、癌転移を理解する上で E-cadherin の新たな側面を呈示するものであり、同時に、 $\alpha 1,6$ - fucosyltransferase の生理的、病態的機能についても新しい局面を開くものでもあり、本論文にまとめられた研究は価値のあるものと考えられる。

申請者に対して査問を行い、当該分野に関する申請者の知識/経験/見識は課程博士に相応しいものであると判断しました。以上、論文/査問による審査の結果、博士に値すると判定したことを御報告致します。

平成18年5月31日