

学位論文題名

*N*-glycan alterations are associated with drug resistance in human hepatocellular carcinoma

(抗癌剤耐性肝癌細胞株における *N*-結合型糖鎖の変化)

学位論文内容の要旨

【背景・目的】

癌の化学療法は手術、放射線などとともに癌治療の柱として位置づけられ、外科領域においても術後の補助療法や再発・転移の治療で効果を上げている。化学療法において大きな障壁となるのが抗癌剤耐性である。耐性の一因として挙げられるのは、癌細胞において MDR1/ABCB1, BCRP/ABCG2 などの ABC トランスポーターが過剰発現することである。これらの分子は *N*-結合型糖鎖を結合する膜蛋白質である。

糖鎖の構造や発現量は癌の性質と密接に関連するといわれている。これまでの研究で、癌細胞における *N*-結合型糖鎖の変化は転移、浸潤などの癌の性質に関係することが明らかにされてきている。特に糖転移酵素 *N*-acetylglucosaminyltransferase (GnT)-V や  $\alpha$  1,6-Fucosyltransferase( $\alpha$ 1,6-FucT)などとそれらによって合成される糖鎖について、その構造と機能の関係についての研究が進んでいる。ただ、抗癌剤耐性と *N*-結合型糖鎖の関連についての研究は少ない。ABC トランスポーターに結合する糖鎖の有無による抗癌剤感受性の変化、あるいは抗癌剤耐性癌細胞における糖鎖構造変化のレクチンを用いた探索、などが散見されるが、抗癌剤耐性に関与しうる *N*-結合型糖鎖の変化について、糖鎖構造を含めた詳細な検討は皆無に等しい。本研究では抗癌剤耐性のメカニズムにおける糖鎖の役割を明らかにすることを目的として、肝細胞癌培養細胞株とその抗癌剤耐性株について、その *N*-結合型糖鎖を分析し、抗癌剤耐性能に影響する可能性のある糖鎖構造を探索した。また同定された糖鎖変化に関連する糖転移酵素について各細胞株での mRNA レベルの発現量を比較検討した。

【材料・方法】

ヒト肝癌細胞株 HLE (親株) と、HLE から樹立したエピルピシン耐性株(HLE-EPI)、ミトキサントロン耐性株(HLE-MIT)の *N*-結合型糖鎖分析を行い、その結果を比較することで抗癌剤耐性に関与する可能性のある糖鎖構造を同定した。各耐性株の抗癌剤耐性能は継代の 2 日前に各薬剤を 32ng/ml の濃度で添加することで耐性能を維持した。糖鎖分析には  $4 \times 10^6$  個の細胞を用いた。細胞に含まれる糖蛋白質に Trypsin, Chymotrypsin, *N*-Glycosidase F, Pronase を作用させ *N*-結合型糖鎖とペプチドに分解し、ゲルろ過による精製の後 2-aminopyridine を用いて蛍光誘導体化して、ODS カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離し、その相対量を算出した。さらに Amide カラムを用いた HPLC 分析

を行い、2次元マッピング法でより詳細に糖鎖構造を決定した。構造決定した複合型糖鎖の合成に必要な糖転移酵素である $\alpha$ 1,6-FucTやGnT-IV・GnT-Vの活性を、HPLC分析で算出した各糖鎖の量比から計算し推定した。これらの糖転移酵素のmRNAレベルの発現はRT-PCR法を用いて検討した。またReal-time RT-PCR法も行い、酵素の発現をより定量的に比較した。

#### 【結果】

1. HPLCを用いた糖鎖プロファイルの分析では、各細胞株に共通する糖鎖を含んだ9本のピークのうち、フコシル化された3本鎖糖鎖310.8が抗癌剤耐性株(特にHLE-MIT)で増加していた。またAmideカラムを用いた分析の結果、15種類のN-結合型糖鎖を同定した。このうち複合型糖鎖は2本鎖糖鎖(200.4, 210.4)、3本鎖糖鎖(300.8, 310.8)、4本鎖糖鎖(400.16, 410.16)の6種類であった。耐性株で増加している糖鎖は310.8のみで、HLEでの含有量は6.01%だったがHLE-EPIでは11.29%、HLE-MITでは13.97%であった。2本鎖糖鎖、フコシル化されていない3本鎖糖鎖(300.8)は耐性株での量的変化を認めなかったが、4本鎖糖鎖はHLE-MITでの減少を認めた。
2. 1.で構造決定されたN-結合型糖鎖の合成に重要な役割を果たす3種の糖転移酵素( $\alpha$ 1,6-FucT・GnT-IV・GnT-V)について、フコシル化糖鎖(210.4, 310.8, 410.16)と非フコシル化糖鎖(200.4, 300.8, 400.16)の比から $\alpha$ 1,6-FucTの、3本鎖・4本鎖糖鎖と2本鎖糖鎖の比からGnT-IVの、4本鎖糖鎖と3本鎖糖鎖の比からGnT-Vの活性をそれぞれ計算したところ、耐性株においては親株よりも $\alpha$ 1,6-FucTとGnT-IVの活性が高く、GnT-Vの活性が低いということが推定された。
3. 各糖転移酵素のRT-PCRでは、親株と耐性株で発現の差を明らかにできなかった。このためReal-time RT-PCR法を用い、さらに定量的にそのmRNAの発現量を比較した。 $\alpha$ 1,6-FucTの発現は耐性株、特にHLE-MITで高かった。GnT-IVaは耐性株で低く、GnT-IVbはHLE-EPIでは高くHLE-MITでは低かった。GnT-Vは耐性株で低かった。

#### 【考察】

N-結合型糖鎖におけるフコシル化は肝細胞癌におけるIgG、 $\alpha$ -fetoprotein(AFP)や膵癌におけるhaptoglobinで増加するとされ、癌化のメカニズムとの関連がさらに検討されている。フコシル化は抗癌剤耐性機構にも何らかの関わりを持つことが示唆されたが、本研究では3本鎖糖鎖のみでフコシル化の変化が生じており、2本鎖糖鎖での変化を来すIgG、AFP、haptoglobinとは傾向を異にした。フコシル化3本鎖糖鎖310.8を結合する蛋白質は抗癌剤から細胞を保護する何らかの機能を有している可能性が推察された。

310.8の合成に必要なとされるもう一つの糖転移酵素がGnT-IVである。その活性は大腸癌の転移、絨毛癌、腎癌などで変化するという報告がある。膵癌細胞ではGnT-IVのアイソザイムの挙動が異なり、GnT-IVaは発現減少、GnT-IVbは発現増加すると報告されている。本研究ではGnT-IVによって合成される3本鎖糖鎖は耐性株で増加したが、GnT-IVaとGnT-IVbのmRNA発現は糖鎖存在量の傾向と一致しなかった。糖鎖合成は糖ヌクレオチド、糖転移酵素、結合する蛋白質、糖鎖と糖転移酵素の分解などの諸条件によって左右されるため、さらに詳細な検討を要すると思われた。

GnT-Vは腫瘍の悪性度の指標であるという報告の一方、Squamous cell carcinomaではGnT-V活性とシスプラチンの感受性が一致するという報告や、膀胱癌では予後良好の指標であるという報告もある。本研究では、GnT-Vとその産物の糖鎖は少なくともエピルピシ

ン、ミトキサントロンに対して抗癌剤耐性を生ずる方向に機能しないことが示唆された。

N-結合型糖鎖は蛋白質と結合して存在するため、糖と蛋白質の組み合わせがその機能に重大な影響を及ぼすことが推察されている。本研究で量的変化を来した糖鎖は様々な蛋白質と結合して抗癌剤耐性に関与する可能性が考えられるため、それらの糖蛋白質分子の同定が課題の一つである。また HLE-EPI、HLE-MIT でそれぞれ強発現している ABC 輸送ポンプ MDR1/ABCB1, BCRP/ABCG2 はいずれも糖蛋白質であり、これらの分子に関しては N-結合型糖鎖の有無による発現、局在、機能の変化が検討されている。しかし、N-結合型糖鎖の構造変化と分子の性質との関係については検討されていない。ABC 輸送ポンプ分子に結合する糖鎖構造の同定と、その構造と機能の関係についての研究がさらなる課題である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博  
副 査 教 授 秋 田 弘 俊  
副 査 教 授 藤 堂 省

## 学位論文題名

### *N*-glycan alterations are associated with drug resistance in human hepatocellular carcinoma

(抗癌剤耐性肝癌細胞株における *N*-結合型糖鎖の変化)

癌の化学療法は手術、放射線などとともに癌治療の柱として位置づけられ、外科領域においても術後の補助療法や再発・転移の治療で効果を上げている。化学療法において大きな障壁となるのが抗癌剤耐性である。耐性には ABC トランスポーターを初めとする糖蛋白質が関与している。他方、糖鎖の構造や発現量は癌の性質と密接に関連するといわれており、*N*-結合型糖鎖の変化は癌の転移、浸潤などの性質に関係することが明らかにされてきている。しかし抗癌剤耐性に関与する糖鎖構造を詳細に検討した研究はこれまで無く、本研究では、ヒト肝癌培養細胞株 HLE とその epirubicin, mitoxantrone 耐性株の *N*-結合型糖鎖を分析し、抗癌剤耐性に関与する可能性のある糖鎖構造を探索した。また糖鎖の生合成に関わる糖転移酵素について、活性を糖鎖存在量から推定した上で、RT-PCR 法、Real-time RT-PCR 法を用いて mRNA レベルの発現を測定した。その結果、抗癌剤耐性機構に関与する糖鎖としてフコシル化 3 本鎖糖 310.8 が同定された。また糖転移酵素 *N*-acetylglucosaminyltransferase (GnT-V) の発現が抗癌剤耐性株で低下していることから、GnT-V は抗癌剤耐性機構に抑制的に作用することが示唆された。

公開発表にあたり、副査の秋田教授より 1) 同定された糖鎖 310.8 が結合する可能性のある蛋白質分子は何か、2) 結合する蛋白質分子を構造決定する今後の方法論、について質問があった。これらの質問に対し、1) 糖鎖の量的変化には糖蛋白質全体の量的変化が反映されていることが考えられるため、major な蛋白質の可能性が高いが、ABC transporter 分子であることも十分考えられる、2) 特定の糖鎖構造と結合するレクチンを用いる方法と、最近開発されてきた糖鎖末端のシアル酸と糖鎖補足担体を化学的に結合させて結合する蛋白質分子の構造決定する方法がある、と回答した。

主査の浅香教授からは、1) 抗癌剤耐性機構が epigenetic な変化が主体であると考えるか、それとも genetic、あるいは蛋白質レベルか、2) 他の細胞株や他の抗癌剤に関する検討ではどのような結果が出ているか、3) GnT-V は転移・浸潤に関与すると言われているが

抗癌剤耐性に抑制的に作用する可能性があるという結果についてはどう考えるか、という質問があった。これらの質問には、1) (epigenetic な)糖鎖構造変化が抗癌剤耐性の原因ではなく結果となっている可能性があり判断が難しいが、ABC transporter の糖鎖であればその変化が機能の変化につながる可能性がある、2) シスプラチン耐性癌細胞株で  $\alpha 5 \beta 1$  integrin の GnT-V 関連糖鎖構造が変化していたという報告や GnT-III 関連糖鎖を発現する脳腫瘍細胞でレクチンを反応させると抗癌剤感受性が改善するという報告がある、3) GnT-V による組織の免疫染色を行った研究では、肺癌の stage I では予後不良の因子となるという報告があり、また食道癌では癌化の初期で発現が増強し進行すると低下するという報告がある。マーカーとしての方向性はまだ controversial であると回答した。

最後に副査の藤堂教授より、本研究を通して得られた結果をどのように発展させていくかという点について質問があった。この質問に対し、近未来的には糖鎖が結合している蛋白質の同定と機能の変化を追求し、創薬や遺伝子治療につなげていくことが考えられるが、抗癌剤治療後の手術材料を得ることが難しいため、臨床検体を用いた研究という部分が壁になると考えられる。また糖鎖・蛋白質研究についてはグライコミクス、プロテオミクスの手法が発達してきており、ハイスループットな分析を行って検体数をこなすことで解明を図っていくことが良いと考える、と回答した。

本研究は、抗癌剤耐性に関与する糖鎖構造と、抑制的に作用する糖転移酵素をそれぞれ明らかにした。これらを key molecules として、抗癌剤耐性機構の解明がさらに進むことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。