

氏名	いの うえ みず え 井 上 瑞 江
学位の種類	博士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 701 号
学位授与の日付	平成 16 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	癌関連糖鎖抗原の構造, 生成機構, 及び生物学的意義に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教授 川 寄 敏 祐 教授 藤 井 信 孝 教授 伊 藤 信 行

論 文 内 容 の 要 旨

生体を構成する複合糖質には、糖タンパク質、糖脂質、及びプロテオグリカンがある。糖鎖構造は癌化に伴って変化することが指摘されているが、とりわけ糖タンパク質の糖鎖の1つであるムチン型糖鎖においてその変化が顕著に認められる。申請者はヒト腸癌細胞株を免疫原として、3種の癌関連糖鎖抗原を認識する単クローン抗体、MLS128、MLS132、及びMSW113を調製し、これらを用いて癌関連糖鎖抗原の構造解析、生成機構、機能解析を行った。その結果、糖鎖不全により生じる代表的な糖鎖抗原であるTn抗原の発現にはGalNAc残基が3個連続して結合したクラスター構造の形成が必要であること、同構造物の生合成には、現在十数種報告されているUDP-GalNAc:ポリペプチドN-アセチルガラクトサミン転移酵素(ppGalNAc-T)の内ppGalNAc-T3が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、担癌患者の血流中に存在するシアリルルイスa抗原をもつムチンの生物学的意義について興味ある知見を得た。

第一章 癌関連糖鎖抗原, Tn抗原のクラスター構造

赤血球膜の主要糖タンパク質であるグリコホリンAのアミノ酸配列には、ムチン型糖鎖が結合するセリン、トレオニンの連続した配列(クラスター)が2ヶ所存在し、また、Tn症候群と呼ばれる患者のグリコホリンAでは、O-グリカンの伸長がGalNAcで停止し、Tn抗原が発現していることが知られている。そこで、グリコホリンAを用いてMLS128の認識するエピトープの解析を試みた。

グリコホリンAをグリコプロテアーゼ(*Pasteurella Haemolytica* A1)で消化し、糖ペプチドGPA-1~6を得た。GPA-1、GPA-3~6は、2ヶ所あるセリン、トレオニンのクラスターの内、いずれか、もしくは両方を含み、GPA-2にはクラスターが存在しなかった。各糖ペプチドよりシアル酸とガラクトースを除去した後、MLS128を用いてTn抗原活性を調べたところ、GPA-2を除く全ての糖ペプチド(GPA-1、GPA-3~6)にTn抗原活性が認められた。さらに、セリン、トレオニンが3個連続したクラスターを1つの単位としてMLS128の結合量を換算すると、活性が認められた糖ペプチドは、全てほぼ同程度のTn抗原活性をもつことがわかった。このことから、MLS128のエピトープはペプチド鎖上に3個連続して結合したGalNAc残基であることがわかった。

次に、Tリンパ球系細胞であるJurkat細胞のCD43に発現しているTn抗原の構造を解析した。その結果、解析が可能であった糖ペプチドは、いずれもGalNAcが3個連続したクラスター構造をもつことが示唆された。

以上より、Tn抗原活性には、GalNAc残基が3個連続して結合したクラスター構造の発現が重要であることがわかった。

第二章 O-グリカンのクラスター構造の生成機構

O-グリカンの生合成は、糖転移酵素ppGalNAc-TによりGalNAcがペプチド鎖上のセリン、トレオニン残基に転移されることにより開始される。そこで、次に、現在十数種報告されている同酵素の中で、クラスターの形成に関与するppGalNAc-Tの同定とその性質について検討した。まず、結腸癌患者の癌組織と近傍の正常粘膜組織の抽出物を酵素原として、ムチンペプチドをコードするMUC2遺伝子産物のタンデムリピートユニットに対するGalNAc転移活性を調べたこと

ろ、癌組織抽出物において著しいGalNAc転移活性の亢進及びTn抗原形成活性が認められた。さらに、同抽出物においてppGalNAc-T1, -T2, -T3mRNAの発現を比較したところ、ppGalNAc-T3の発現のみが癌組織において亢進していた。このことから、Tn抗原のクラスターの形成には、ppGalNAc-T3が関与している可能性が示された。次に、可溶性ppGalNAc-T1, -T2, -T3を遺伝子組換え体として作製し、それぞれについてMUC2タンデムリピートユニットに対するGalNAc転移活性を調べた。酵素反応を行った後、生成物について、質量分析及びアミノ酸配列分析を行ったところ、ppGalNAc-T3のみが3個連続してGalNAcの結合したクラスター構造を生成した。以上の結果は、ppGalNAc-T3がTn抗原のクラスターの形成に関与する糖転移酵素であることを示している。

第三章 癌関連糖鎖抗原、シアリルルイスa抗原をもつムチンの生物学的意義

癌細胞表面に発現するシアリルルイスaやシアリルルイスx抗原は、血管内皮細胞に発現するE-セレクトインと結合し、癌細胞の血行転移に重要な役割を果たしていることが報告されている。一方、これらの抗原は、可溶性抗原として血液中にも存在することが知られているがその意味については不明である。そこで、シアリルルイスa抗原を認識する単クローン抗体MSW113を用いて、癌患者腹水より同抗原をもつ糖タンパク質(SL-GP)を単離し、これを用いて、ヒト臍帯血管内皮細胞(HUVEC)上に発現するE-セレクトインと腸癌細胞株LS180細胞表面に発現するシアリルルイスa抗原との相互作用に及ぼす影響について検討した。その結果、SL-GPは腸癌細胞株LS180細胞とHUVECとの結合を顕著に阻害することが明らかになった。なお、これらの作用は、シアリルルイスaオリゴ糖では認められず、コアタンパク質上に糖鎖が多価の状態が含まれることが重要であることを示している。

以上、本研究は、癌関連糖鎖抗原の発現、あるいは生物学的活性の発現には、糖鎖のクラスター構造、もしくは、コアタンパク質上で糖鎖が密集し、多価であることが必要であること、さらに、癌化に伴う糖鎖のクラスターの形成には、ppGalNAc-T3が関与することを明らかにしたものである。

論文審査の結果の要旨

上皮性癌細胞の多くは、癌関連糖鎖抗原を含むO-結合型糖鎖が結合した高分子糖タンパク質(ムチン)を産生することが知られている。本研究は、ヒト腸癌由来細胞株LS180細胞を免疫原として作成したマウス単クローン抗体MS128を用いて従来Tn抗原と呼ばれていた糖鎖抗原を解析し、以下の新知見を得た。

Tn抗原は、1959年、DaussetらによりTn症候群とよばれる患者の赤血球膜に見出され、その構造はGalNAc α -Ser/Thrであるとされていた。申請者はまず、羊顎下腺ムチンを用いた実験により、MS128のエピトープは単独のGalNAc α -Ser/Thrではなく、GalNAc α -Ser/Thr (GalNAc α)-Ser/Thr (GalNAc α)-Ser/ThrというTn抗原のクラスター構造であることを示した。また、MS128はTn赤血球を凝集することから、赤血球膜の主要糖タンパク質であるグリコフォリンについて調べたところ、その細胞外領域にSer-The-TheおよびThe-Ser-Thr-Ser配列が存在し、これらのアミノ酸はいずれもGalNAc α を結合していることが示された。これらの結果は、Tn抗原が活性をもつにはGalNAc α 残基がクラスター構造を持つことが重要であることを明らかにしたものである。

申請は次に、このTn抗原の生合成を担う、糖転移酵素の同定を試みた。O-グリカンの生合成はUDP-GalNAc:ポリペプチドN-アセチルガラクトサミン転移酵素(ppGalNAc-T)が、ペプチド鎖上のセリン、トレオニン残基にN-アセチルガラクトサミンを転移することにより形成される、PPGalNAc-Tには10種をこえるアイソザイムの存在が報告されていた。LS180細胞に含まれるPPGalNAc-Tの種類をRT-PCR法により検討したところ、PPGalNAc-T-1, -2, -3の発現が検出されたが、この内、ppGalNAc-T-3の発現が癌組織において著しく亢進していた。さらに、可溶性ppGalNAc-T-1, -2, -3をCOS-1細胞を用いて遺伝子組換え体として作成し、MUC2ペプチドを基質としてそれぞれの受容体基質特異性を調べたところ、ppGalNAc-T-3のみが3個連続しGalNAcの結合したクラスター構造を形成した。すなわち、ppGalNAc-T-3がTn抗原のクラスターの形成に関与する糖転移酵素であることを明らかにした。

申請者は次に、癌関連糖鎖抗原として良く知られているシアリルルイスa抗原を持つムチンの生物学的意義の解明をすすめるため、血液中に存在する可溶性シアリルルイスa抗原がE-セレクトインと相互作用することにより、E-セレクトインを介するリンパ球と血管内皮細胞との結合を調節していることを明らかにした。

以上の研究は、ムチン型癌関連糖鎖抗原の発現機構とその生物学的意義とを明らかにしたものである。よって本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。更に、平成15年12月22日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。