様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成　21 年　6 月　25 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2007〜2008
課題番号：１９７９１１０６
研究課題名（和文）
　　　腎癌の悪性形質におけるジシアリル糖鎖の作用機構と治療応用の基礎的検討
研究課題名（英文）
　　　Roles of disialyl-glycolipid antigen in malignant phenotype of renal cell cancer

研究代表者
　土田　明子（TSUCHIDA AKIKO）
　（財）野口研究所
　研究者番号：７０３７８０２４

研究成果の概要：
腎癌細胞株に発現している糖脂質糖鎖の解析により、ジシアリル糖鎖の発現パターンの変化が腎癌の悪性化や転移性に関連していることが推測された。約２０種の腎癌細胞株のうち約 70%の細胞株が発現している GalNAc-DSLc4 糖鎖抗原の機能を解明するため、この糖鎖抗原の合成に関わる糖転移酵素遺伝子を、GalNAc-DSLc4 をほとんど発現していない腎癌細胞株に遺伝子導入し、糖鎖リモデリングの結果惹起される表現型の変異を解析した。樹立した GalNAc-DSLc4 安定発現株は、コントロール細胞株と比べ増殖度・浸潤能の亢進が認められ、さらにラミニン固定化プレートに特異的に接着した。この安定発現株ではラミニンとの結合に関わる接着分子インテグリンβ1 の局在が変化していることが明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００７年度	2,100,000	0	2,100,000
２００８年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,200,000	330,000	3,530,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学
キーワード：腫瘍マーカー 腎癌　糖脂質　ジシアリル糖鎖　糖転移酵素

１．研究開始当初の背景
（１）腎癌の多臓器転移症例は、５年生存率 25〜40%と予後不良であり、現在も免疫療法（インターフェロン、インターロイキン２療法）が行われているが、奏功率は 20%前後と治療効果が乏しいため、今後の新規治療薬の開発に期待がもたれている。また、未だ確立した鋭敏な腫瘍マーカーが無いため、早期癌の発見が遅れ、既に進行癌に至っているケースも少なくない。このため、新しい腫瘍マーカーの開発が期待される。

（２）これまでに我々が行った Flow cytometry による細胞表面の糖鎖抗原の発

現パターンの解析から、GalNAc-disialyl Lc4 糖鎖抗原が多くの腎癌細胞株に発現していることを確認した。GalNAc-disialyl Lc4 抗原は、前立腺癌の癌化においても、その発現が上昇してくることが確認されており、臨床的に泌尿器系の腫瘍マーカーとして期待される抗原である。

２．研究の目的

（１）腎癌細胞株における分岐型ジシアリル糖鎖の発現パターンの変化およびその意義を解明することにより、肺への高転移株に発現している GalNAc-disialyl Lc4 の腫瘍マーカーとしての可能性を探る。

（２）GalNAc-DSLc4 糖鎖抗原の機能を解明するため、この糖鎖抗原の合成に関わる糖転移酵素遺伝子を、GalNAc-DSLc4 をほとんど発現していない腎癌細胞株に遺伝子導入し、糖鎖リモデリングの結果惹起される表現型の変異を解析する。

（３）GalNAc-DSLc4 抗原の介在により細胞内でのシグナル伝達にどのような変化がもたらされるのかを解明する。

（４）肺転移への関与およびそのメカニズムについて解析し、新規治療法の開発のための基礎データを構築する。また本抗原に対する良質な抗体を作製することで、抗体治療への可能性を探る。

３．研究の方法

（１）GalNAc-disialyl Lc4 合成に関与する遺伝子β4GalNAc-T2 を細胞に導入して糖鎖リモデリング細胞株を樹立したので、得られた安定発現株を用いて癌性形質（増殖能や浸潤能など）の獲得の有無を検討する。

（２）細胞増殖能や浸潤能の亢進が認められれば、悪性化の増強のメカニズム、特に細胞内シグナル分子の変化と悪性化に関与する分子の同定を試みる。まずは抗リン酸化抗体を用いてリン酸化レベルに変化がみられる分子を探索する。

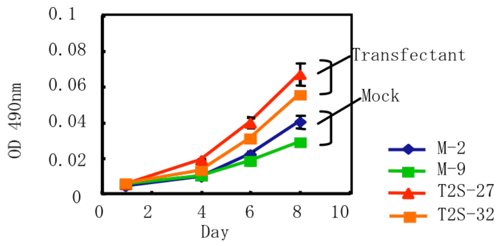
（３）リアルタイム細胞計測システム(RT-CES)を用い、細胞外マトリックス(コラーゲンI、コラーゲンVI、フィブロネクチン、ラミニンなど)存在下での接着変化について細胞の形態を経時的にモニタリングして検討する。

（４）GalNAc-disialyl Lc4 発現細胞に新たな変化が見られたら、接着分子との相互作用や接着時の FAK のリン酸化レベルの変化などについて検討する。

４．研究成果

（１）GalNAc-DSLc4 安定発現株の悪性形質（増殖性および浸潤性）について検討した。MTT アッセイにより、GalNAc-disialyl Lc4 安定発現株はコントロール細胞に比べて増殖能が亢進していることが確認された（図１-a)。また、Chamber 式細胞培養プレートの下層に血清入り培地を添加しておいた場合には、浸潤能も亢進することが分かった（図１-b）。GalNAc-DSLc4 の合成に関与するβGalNAc-T2 糖転移酵素遺伝子の遺伝子導入により悪性形質を獲得した可能性があると考えられる。

a)増殖性



b)　浸潤性

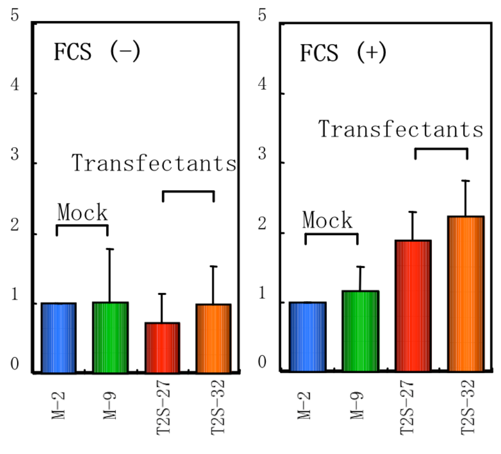


図１ GalNAc-DSLc4安定発現株の
a)増殖性および b)浸潤性

（２）細胞増殖能や浸潤能の亢進が確認されたので、悪性化の増強のメカニズム、特に細

胞内シグナル分子の変化と悪性化に関与する分子の同定を試みた。抗リン酸化抗体(pY-20)を用いて、安定発現株とコントロール細胞との間にリン酸化レベルの変化がみられる分子を探索したが、顕著な変化を示す分子は残念ながら未だ見つかっていない。

（３）リアルタイム細胞計測システム(RT-CES)を用い、細胞外マトリックス(コラーゲンI、コラーゲンVI、フィブロネクチン、ラミニンなど)存在下での接着変化について細胞の形態を経時的にモニタリングしたところ、コラーゲン(I, VI)、フィブロネクチンを金電極表面に固定化した表面に対しては穏やかな接着挙動を示したが、ラミニンを金電極表面に固定化した場合においては、細胞を播種した後、早期に強い接着が観察された。また、ラミニン固定化表面に対するその接着面積は、コントロール細胞株に比べ、安定発現株は２倍程度大きかった。(図は省略)

（４）GalNAc-disialyl Lc4 安定発現細胞株がラミニン固定化表面に特異的に接着することが分かったので、関与すると思われる接着分子について検討した。ラミニンと細胞との接着は、接着分子インテグリンを介しておこることが知られているので、腎癌細胞株におけるインテグリンファミリー分子の発現パターンを Flow cytometry により調べた。その結果、インテグリン β1, α3, α6 が主に発現していることが明らかとなった。細胞表面上の発現量に関しては、大差は見られなかった。(図は省略)

（５）接着時に細胞内で伝達されるシグナルについても調べるため、まずは FAK 分子(Focal Adhesion Kinase)のリン酸化レベルの変化などについて検討を試みた。しかしながら、FAK 分子のリン酸化レベルについては、コントロール細胞と安定発現株の間に顕著な差は見られなかった。(図は省略)

（６）細胞膜上でのインテグリン分子の局在に変化がみられるかどうか調べた。具体的には、ショ糖密度勾配法によりコントロール細胞株および安定発現株の細胞膜成分を分画し、抗インテグリン抗体にて検出した。その結果、インテグリン β1 分子の発現がコントロール細胞株に比べ安定発現株ではラフトドメイン（スフィンゴ糖脂質とコレステロールにトム細胞膜上のドメイン）が含まれる画分(図２ Fr.3)にも多く局在していることが明らかになった（図２　コントロール細胞株(上パネル)、安定発現株(下パネル))。

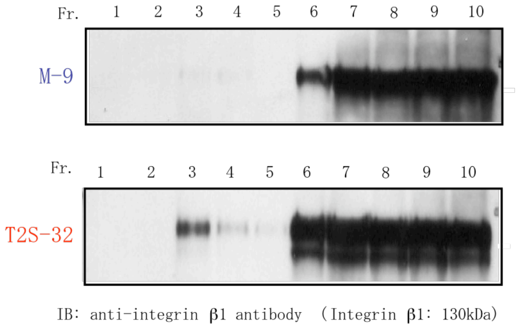


図2　ラミニンに対する接着分子(Integrinβ1)の細胞表面における局在化

（４）腎癌細胞株の細胞膜表面には、ラミニンとの結合に関与すると思われるインテグリン β1, α3, α6 が主に発現していることが明らかとなったが、実際にラミニン固定化表面への接着を阻害するには、どの抗インテグリン抗体が有効なのかをリアルタイム細胞計測システム(RT-CES)を用いモニタリングした。その結果、抗インテグリン β1 抗体よりも抗インテグリン α3 抗体により接着が著しく阻害されることが明らかとなった（図３)。インテグリン分子は、必ず α 分子と β 分子とのヘテロな二量体で存在することが知られているので、これらの結果から、腎癌細胞株では、細胞膜上のインテグリン α3 β1 ヘテロ二量体がラミニンとの接着に関与している可能性が考えられた。

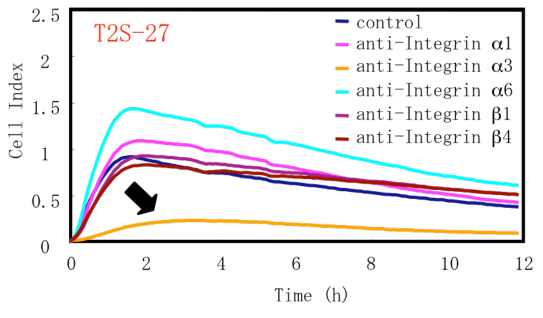


図３ 抗Integrin抗体の存在下、ラミニン表面に対する細胞接着挙動

５．主な発表論文等

〔学会発表〕（計１件）

土田明子，千田基宏、伊藤明宏、斉藤誠一、木曽　真、安藤隆幸、Anne Harduin-Lepers、古川圭子、古川鋼一
第66回　日本癌学会学術総会
（パシフィコ横浜）
２００７年１０月３日ー５日

腎癌細胞株における分岐型ジシアリル糖脂質抗原の役割（Roles of branched-type disialyl-glycolipid antigens in renal cancer cells）

６．研究組織

(1)研究代表者

土田　明子（TSUCHIDA AKIKO）
（財）野口研究所・研究部・研究員
研究者番号：７０３７８０２４

(2)研究分担者

（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者

（　　）

研究者番号：