

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：15401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770120
 研究課題名（和文）リバースグライコミクス的手法を用いた抗癌剤耐性獲得の簡易迅速診断法の開発
 研究課題名（英文）Reverse Glycomic Approach for Development of Simple Diagnostic Method of Antitumor-Drug Resistance
 研究代表者
 中の 三弥子（NAKANO MIYAKO）
 広島大学・先端物質科学研究科・准教授
 研究者番号：40397724

研究成果の概要（和文）：

抗癌剤耐性獲得の簡易迅速診断法の開発のために、我々は抗癌剤耐性を獲得させた白血病細胞株の膜タンパク質糖鎖の構造を調べた。獲得後でシアル糖鎖が減少していた。その変化が白血病患者血液中の白血病細胞上でも起きているかを調べるために LC-ESI MS による糖鎖構造解析の条件検討を行った。その結果 3mL の血液で糖鎖が分析できる条件を見つけた。さらに、シアル酸認識レクチンを用いれば耐性獲得の簡易迅速診断が可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

To develop simple diagnostic method of antitumor-drug resistance, we determined the changes in glycosylation that occur on membrane proteins of drug-resistant T-cell acute lymphoblastic leukemia cell line. Drug-resistant cells showed a significant decrease in sialylated glycans. To ascertain if identical alterations occurred on leukemia cell in the blood of leukemia patients, the analytical conditions for LC-ESI MS of glycan structures were investigated. We established the conditions that could analyze their glycan structures using 3 mL of blood. Moreover, we showed that the lectin recognized sialic acids was useful for investigating a simple diagnostic method of drug-resistance acquisition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：糖鎖生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：糖質

1. 研究開始当初の背景

癌の治療において、抗癌剤による化学療法は癌細胞の増殖を抑え、再発や転移を防ぐことを目的とした治療法である。手術治療や放射線治療が、癌に対する直接的・局所的な治療であるのに対し、化学療法はより広範囲に治療が及ぶことが期待できる。ところが、抗

癌剤に対して癌細胞が耐性を獲得すると、その抗癌剤による治療はほとんど不可能になり、代替薬を用いなければならない。抗癌剤耐性獲得の判断は、癌細胞を生検し実験室的に検査することも可能であるが、実際には抗癌剤を投与し治療の経過から臨床的に判断

する場合が多い。そのために、効かない抗癌剤を投与され副作用で苦しみ、再発、転移さらには死に至る場合もある。そのような抗癌剤耐性で問題になっている癌の1つに急性リンパ性白血病が挙げられる。白血病は小児に生じる癌の約40%を占め、そのうち急性リンパ性白血病はその70%もの割合を占める。現在、その治療として抗癌剤を用いた化学療法が基本となっている。しかし、20%の患者らが抗癌剤耐性を獲得し、悪化、再燃、または死亡している。このため、本研究では急性リンパ性白血病における抗癌剤耐性獲得の簡易診断法の開発を行う。

まず初めに行わなければいけないのが、抗癌剤耐性獲得で変化する生体内分子、つまり耐性獲得マーカーの同定である。我々は白血病細胞上の糖鎖に直目した。白血病細胞、癌細胞も含めて真核細胞の表面は膜糖タンパク質から伸びた糖鎖で覆われている。最近、その糖タンパク質上の糖鎖が、受精や分化、癌化、免疫など生命現象に直結した多くの機能に関与していると報告されている。また、特異的なタンパク質中の糖鎖構造は、正常な状態で観察される糖鎖と異なることが多くの疾患で報告されている。付加される糖鎖構造は遺伝子によって決められているのではなく、遺伝子によって作られた様々な種類の糖転移酵素が協奏的に働くことにより様々な種類の糖鎖構造ができるのである。よって、疾患により生体内状況が変化すると、糖転移酵素の協奏的作業が変化し糖鎖構造が変わると考えられる。これらのことより疾患を知るためには、遺伝子操作の実験から（グライコミクス＝糖転移酵素遺伝子→糖転移酵素→糖鎖）ではなく、結果産物である付加された糖鎖構造を解析することから（リバースグライコミス＝糖鎖→糖転移酵素→糖鎖酵素遺伝子）始めた方が良いと考えた。本研究で

は白血病細胞表面の糖鎖構造を網羅的に解析し、その結果を基に抗癌剤耐性獲得の診断法を開発する。

2. 研究の目的

現在、日本の臨床現場において、特異的な糖鎖構造が疾患の診断マーカーとして使われているのは、大腸癌の CA19-9（血清分泌ムチン上の糖鎖中のシアリル Le^a 構造）と肝臓癌の AFP-L3（血清αフェトプロテイン上の糖鎖中のコアフコース構造）などがある。しかし、これまでに特異的な糖鎖構造が薬物耐性の診断マーカーとして使われたことはない。白血病はフィラデルフィア染色体の出現が原因で起こることが多いため、白血病診断には遺伝子検査が行われる。しかし、抗癌剤耐性診断は、遺伝子により作られた既存の産物の抗癌剤による変化を見るのであるから、遺伝子検査ではなく、2 次的産物の糖鎖を検査する方が利にかなっている。最近、シアル酸はその細胞をアポトーシスまたはネクローシスへ誘導するという報告もあることから、シアル酸が抗癌剤耐性獲得の機序に関連していることが推測される。本研究では、汎用性が高い簡便迅速な急性リンパ性白血病の抗癌剤耐性獲得診断法を開発することを目的とするので、異なった作用機序を持つ 4 種類の抗癌剤を使い、それらの耐性を持たせた CEM 細胞株（白血球 T 細胞由来）の表面の糖鎖構造の差異を調べる。次に、白血病患者血液を用いて、それらの糖鎖の変化が、血液中の白血球 T 細胞でも同じ変化が起きているのかを調べる。それらの結果を元に、最終的には、レクチン（特異的な糖鎖構造と結合するタンパク質）を用いた簡便迅速な抗癌剤耐性獲得診断法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 白血病細胞株を用いて4種の抗癌剤の耐性獲得による細胞表面の糖鎖構造の変化を調べる。細胞株にはCEM細胞株(急性リンパ芽急性白血球T細胞由来)を用いる。抗癌剤にはデオキシエポチロンB(dEpoB、微小管安定化薬)、ビンクリスチン(VCR、微小管重合阻害薬)、メソトレキサート(MTX、葉酸代謝拮抗薬)、ダウノルビシン(DNR、DNAポリメラーゼ阻害薬)を用い、臨床で用いられるそれぞれの濃度でCEM細胞を3週間培養し、生き残った細胞をそれぞれの耐性細胞株とする。耐性細胞株をホモジナイズし、遠心による除核後、上澄を超遠心にかけ、沈殿塊を細胞膜画分とする。さらに細胞膜画分を界面活性剤分配法により脂質を除き細胞膜タンパク質を回収する。その膜タンパク質をPDVFにドットし、PNGaseFによりN型糖鎖を遊離させ、還元して糖アルコール型にしてLC-ESI MSで分析する。さらに、PVDFに残っているタンパク質からβ脱離反応によりO型糖鎖を遊離させ、糖アルコールのままLC-ESI MSで分析する。CEM細胞株と抗癌剤耐性細胞株の糖鎖構造の違いを調べる。

(2) ヒト血液中のT細胞上の糖鎖構造を解析するための分析法の検討を行う。そのために健常者の血液を血漿と血球に分離し、さらに血球はリンパ球とそれ以外に分離し、それぞれにおいて(1)と同じ方法で糖タンパク質の糖鎖の構造を解析する。

(3) 白血病患者および抗癌剤に耐性を示している白血病患者の血液からリンパ球または血漿タンパク質を単離し、その糖タンパク質の糖鎖構造解析を(2)で確立した方法を用いて分析する。抗癌剤耐性獲得の前後の糖鎖構造の違いを調べる。

(4) 簡便迅速な耐性獲得診断法とするために、LC-ESI MSではなく、レクチンを用いて、

(3) で得られた抗癌剤耐性獲得前後の糖鎖構造の違いを識別できる方法を検討する。

4. 研究成果

(1) CEM細胞株の4種の抗癌剤(dEpoB, VCR, MTX, DNR)に対する耐性細胞株を作製する予定であったが、作用機序が複雑であり、最も白血病治療に用いられている抗癌剤の方が良いと考えたため微小管作用の抗癌剤3種に変更した。dEpoB, VCR およびパクリタキセル(TAX、微小管安定化薬)を用いた。CEM細胞株とその3種の抗癌剤耐性細胞株(CEM/dEpoB細胞株, CEM/VCR細胞株, CEM/TAX細胞株)の表面糖鎖構造を解析した結果、それぞれにおいて糖鎖の末端に付加されているシアル酸の数と結合様式に違い

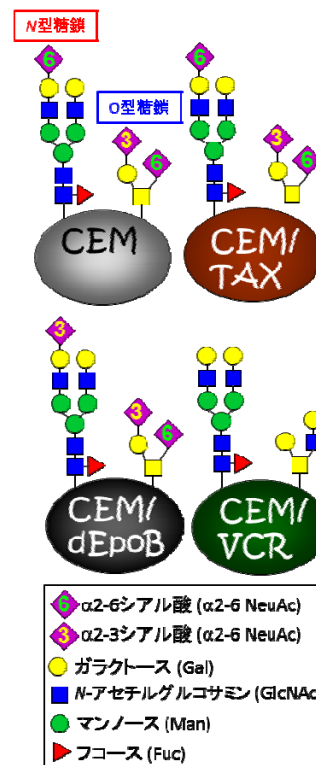


図1. CEM細胞株と3種の抗癌剤耐性細胞株(CEM/dEpoB細胞株, CEM/VCR細胞株, CEM/TAX細胞株)の主なN型糖鎖構造とO型糖鎖構造

があった。図 1 に示したように、CEM 細胞株は、糖鎖の末端に α 2-6 シアル酸を 1 つ持ったコアフコシル化 2 本鎖糖鎖が主な構造であったのに対し、CEM/dEpoB 細胞株は、 α 2-3 シアル酸を 1 つ持ったコアフコシル化 2 本鎖糖鎖が主な構造であった。さらに、CEM/VCR 細胞株は、シアル酸を持たないアシアロコアフコシル化 2 本鎖糖鎖が主な糖鎖構造であった。CEM/TAX 細胞株においては、CEM 細胞株と大きな違いは観察されなかった。

CEM/dEpoB 細胞株と CEM/VCR 細胞株のこれらのシアル酸の変化は、細胞表面の特

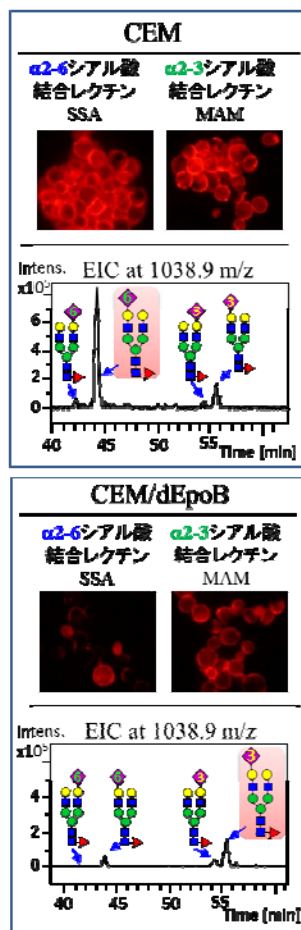


図 2. CEM 細胞株と CEM/dEpoB 細胞株のレクチン (SSA と MAM) 染色とモノシアロコアフコシル化 2 本鎖糖鎖を示す質量数 ($[M-2H]^{2-} = 1038.9 \text{ m/z}$) で抽出したマスクロマトグラム (EIC, Extracted Ion Chromatogram)

定の糖タンパク質でなく、全ての糖タンパク質上で起きていることもわかった。図 2 の CEM 細胞株の EIC at 1038.9 m/z (Extracted Ion Chromatogram at 1038.9 m/z, 1038.9 m/z のイオンのみを抽出してその強度変化を経時的にプロットしたクロマトグラム) では、 α 2-6 シアル酸が α 1-3 マンノース側 (左側) の分岐の先端に付いている糖鎖構造が主であったのに対し、CEM/dEpoB 細胞株では、その糖鎖が減少していることがわかる。我々は、CEM/dEpoB 細胞株の α 2-6 シアル酸の減少の原因は α 2-6 シアル酸を転移する糖転移酵素(ST6Gal1)の減少によるものではないかと考え、リバーズグラライコミクスの 2nd Step として、CEM 細胞株と CEM/dEpoB 細胞株の ST6Gal1 の mRNA の量を調べた。その結果、CEM/dEpoB 細胞株では、その量が減少していた。CEM/VCR 細胞株のシアル酸の減少の原因はまだ不明である (ST6Gal の mRNA の減少は観察されなかった)。ここまでを論文 1 にまとめた。

(2) ヒト血液中の T 細胞上の糖鎖構造を解析するための分析法の検討を行った。実際には少量の患者血液で糖鎖構造解析を行わないといけないので、初めに健常者の血液を用いて、その必要最低量と、どの血球を用いたら良いのかを検討した。その結果、リンパ球 (この中には T 細胞、B 細胞、NK 細胞が含まれる) を用いて行うのが、量的問題を考慮した上で最も良い方法であった。しかし、現在の血液の必要最低量は 3mL であり、今後、患者血液を使用するにあたって、0.5 mL ~ 1mL で分析できる方法を再度検討する必要がある。

(3) そのために本実験では、白血病患者血液中のリンパ球の糖鎖を分析するまでには至らなかった。(健常者の血液 3mL から単離したリンパ球を用いたときは、明白な数種

の糖鎖が検出された。)

(4) 簡便迅速な耐性獲得診断法とするために、CEM/dEpoB 細胞株と CEM/VCR 細胞株において観察されたシアル酸の減少を LC-EIS MS でなく、レクチンを用いた方法で検出できるかを調べた。図 2 に示すように、蛍光色素が結合した SSA レクチン(ニホンニワトコレクチン、 $\alpha 2-6$ シアル酸と結合) と MAM レクチン(イヌエンジュレクチン、 $\alpha 2-3$ シアル酸と結合) を CEM 細胞株と CEM/dEpoB 細胞株に作用させると、CEM/dEpoB 細胞株において SSA レクチンとの結合が減少していることがわかった。これは LC-ESI MS を用いた分析と同様の結果であった。よって、レクチンを用いて耐性獲得で変化する糖鎖構造の検出は可能であると示唆される。しかし、CEM/VCR 細胞株においては、全てのシアル酸の減少が起こっているにも関わらず、SSA レクチンと MAM レクチンとの反応ではそれを示さなかった(両レクチンにおいて強い蛍光が観察された)。よって、レクチンを用いる方法もなんらかの工夫が必要である。

我々は本研究では、単に診断法の開発だけでなく、耐性獲得によるシアル酸の減少の機構解明を知るための実験を行い、その機構を利用した診断法の開発も考えていた。具体的には、細胞膜上の排出ポンプ機能を持ったタンパク質である ABC トランスポーターの増減測定や、アポトーシス関連分子の増減測定である。

本研究では、白血病患者血液中のリンパ球上の糖鎖分析には至らなかった。その理由として、試料に限りがあること、我々が確立した質量分析法の感度が低いことが挙げられる。今後、さらに微量の血液で糖鎖分析できる LC-EIS MS を用いた分析法を開発していくことが必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Nakano M, Saldanha R, Gobel A, Kavallaris M, Packer N, Identification of glycan structure alterations on cell membrane proteins in desoxyepothilone B resistant leukemia cells, **Molecular & Cellular Proteomics** 2011; 10 (11): doi:10.1074/mcp.M111.009001
査読あり

[学会発表] (計 3 件)

1. Nakano M, Shirai R, Ito J, Takahashi S, Alterations of glycan structures on cell membrane glycoproteins in microtubule-targeting drug-resistant leukemia cells, **31st Japanese Carbohydrate Symposium**, 17-20 Sep 2012, Kagoshima, Japan

2. Nakano M, Taniguchi N, Ito J, Shirai R, Kavallaris M, Packer, Identification of alterations in glycan structure on cell membrane proteins in microtubule-targeting drug-resistant leukemia cells, **Human Proteome Organization 11th Annual World Congress**, Boston, MA, U.S.A., 9-13 Sep 2012

3. Nakano M, Ota F, Nakajima K, Taniguchi N, Kavallaris M, Packer N, Drug-resistance inhibits expression of alpha2-6 sialylation on cell membrane glycoproteins, **21st International Symposium glycoconjugates**, Vienna, Austria, 21-26 Aug 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中の 三弥子 (NAKANO MIYAKO)
広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：40397724

(2) 研究分担者

() 研究者番号：

(3) 連携研究者

() 研究者番号：