

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26505008

研究課題名(和文) 白血病細胞耐性機構のリバースグライコミクスの解明と抗癌剤耐性診断法の開発

研究課題名(英文) Reverse Glycomics Clarification of Resistance Mechanism for Leukemia Cell and Development of Diagnosis Method for 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：白血病の治療において、抗癌剤が効かなくなる(耐性を獲得する)ことが多い。そのため耐性獲得の機序を解明ことは重要である。本研究では、抗癌剤(dEpoB)に耐性を持った白血病細胞株(CEM)を作製し、細胞膜上の糖鎖の構造を解析した。耐性細胞株(CEM/dEpoB)は、2-6シアル酸を持った糖鎖が減少していた。この減少は、シアル酸を付ける酵素(ST6GAL1)の遺伝子の減少によるものであった。この糖鎖の減少と抗癌剤耐性の因果関係を知るためにST6GAL1遺伝子を操作した。ST6GAL1遺伝子を導入したCEMは、抗癌剤耐性を獲得した。この結果は、この糖鎖の減少は耐性獲得の原因であることを意味する。

研究成果の概要(英文)：The main treatment of leukemia is chemotherapy using antitumor drugs, but the acquisition of drug resistance often makes treatment continuation impossible. The mechanism of acquired drug resistance must be elucidated. We focused on glycan structures on cell-membrane proteins. A leukemia cell line (CEM) was selected for acquired drug resistance against an antitumor drug (dEpoB), and glycan structures on the cell-membrane proteins was analyzed. The resistant cell line (CEM/dEpoB) showed a significant decrease of 2-6 sialylated N-glycans. The reduction was caused by 2-6 sialyltransferase 1 (ST6GAL1) gene. To ascertain the cause-and-effect relationship between reduction of 2-6 sialylated N-glycans and acquired drug resistance, we knock-downed and transfected the ST6GAL1 gene. The CEM with the knock-down ST6GAL1 gene showed acquired drug resistance. This result suggests that reduction in the 2-6 sialylation could be the cause of dEpoB-resistance acquisition.

研究分野：糖鎖分析

キーワード：糖鎖分析 白血病 薬剤耐性 グライコミクス 診断法

## 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その原因となる癌細胞が広範囲に存在しているにもかかわらず重要な方法である。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、他の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ケースが多い。そのために、効かない抗癌剤を投与され副作用で苦しむ、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が、20%の患者らが何らかの抗癌剤耐性を獲得し、悪化、再発、または死亡している。このため、臨床応用につながる急性リンパ性白血病の抗癌剤耐性獲得の機構解明および診断測定法の開発は現在の急務である。

## 2. 研究の目的

### (1) 疾患で変化する糖鎖構造

白血病細胞などの癌細胞も含めて真核細胞の表面は糖鎖で覆われている。その糖鎖は様々な生命現象に直結していることがわかってきている。さらに、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構造と異なることが多くの疾患で報告されている。私は、その糖鎖が白血病細胞の抗癌剤耐性獲得の機構にも関与しているのではないかと考え、抗癌剤に耐性を持った白血病細胞株を樹立し、耐性獲得の前後で異なった細胞表面糖鎖の構造を探索することを第一の目的とした。その探索方法は、図1に示すようにリバースグライコミクス的手法で行

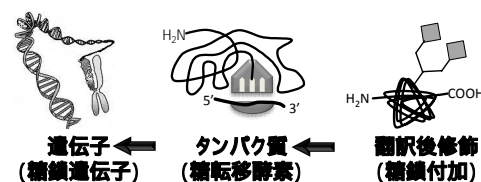


図1. リバースグライコミクス的手法

うことにした。

### (2) 新規抗癌剤耐性獲得マーカー

これまでに私は、急性リンパ性白血病細胞株 (CEM 細胞) と微小管安定化抗癌剤デオキシエ

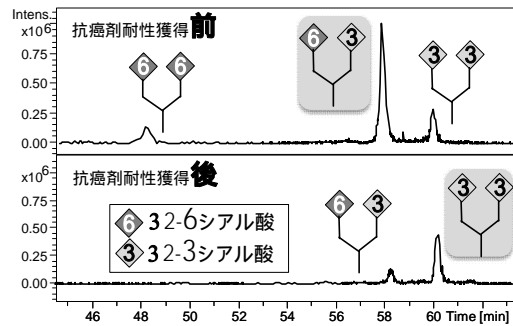


図2. 抗癌剤耐性獲得後に $\alpha$ -2-6シアル糖鎖が減少

ポチロン B (dEpoB) を用いて、耐性獲得で変化する細胞膜上糖タンパク質糖鎖の構造を発見していた。それは図2に示すように、抗癌剤耐性を獲得する前のCEM細胞は、糖鎖の末端に $\alpha$ -2-6シアル酸を持った2本鎖が多かったのに対し、耐性獲得後では $\alpha$ -2-6シアル酸を持った糖鎖が減少していることであった。

### (3) 抗癌剤耐性機構の解明

近年、細胞表面の $\alpha$ -2-6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があったことから、抗癌剤耐性を得た癌細胞は、 $\alpha$ -2-6シアル酸を自ら除去し、抗癌剤によるネクローシスまたは、通常の癌細胞に対する生体内反応であるアポトーシスを回避しているのではないかと考えた。そこで私は、 $\alpha$ -2-6シアル酸を糖鎖に転移する酵素の活性および mRNA 量を測定することにした。次に遺伝子工学技術を用いて抗癌剤耐性と $\alpha$ -2-6シアル酸減少の因果関係を調べた。

### (4) 抗癌剤耐性診断法の開発

現在臨床現場において、特異的な糖鎖構造が腫瘍などの疾患の診断マーカーとして使われているが、抗癌剤の耐性獲得を判断するマーカーとしては使われていない。本研究では、汎用性が高く安全で簡便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した。

## 3. 研究の方法

### (1) 3種の抗癌剤の耐性獲得による糖鎖構造変化とその機序解明

最も白血病で用いられている3種の微小管作用抗癌剤 (デオキシエポチロン B、ビンクリスチン、パクリタキセル) の耐性獲得と糖鎖構造変化を、急性リンパ性白血病細胞株 (CEM

細胞)を用いて調べた。リバースグライコミクス的に、様々な糖転移酵素(ST6Gal1, ST3Gal3, ST3Gal4 など)と糖分解酵素(シアリダーゼ Neu1 ~ Neu4 など)およびABCトランスポーター(薬剤排出ポンプ、P-糖タンパク質)の mRNA およびタンパク質の発現量を測定した。

(2)耐性獲得と糖鎖構造変化の因果関係の解明

図3に示したように、変化していた糖転移酵素(ST6Gal1)の遺伝子をCEM細胞およびCEM耐性細胞に導入またはノックダウン(KO)することで耐性獲得との因果を調べた。さらに、モデル細胞株として、2-6シアル酸を発現していないチャイニーズハムスター卵巣細胞を用い、耐性獲得との因果関係を調べた。

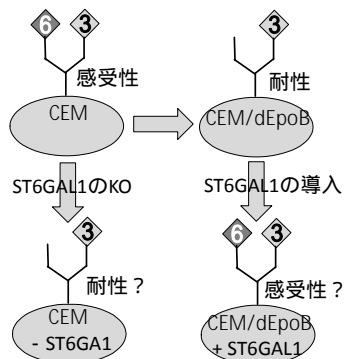


図3. CEM細胞株(CEM)とdEpoB耐性CEM細胞株(CEM/dEpoB)にST6GAL1遺伝子をノックアウトまたは導入すると耐性または感受性は戻るのか？

(3)耐性獲得細胞の抗癌剤の取込能と排出能の変化の解明

蛍光標識分子と図3に示した4種の細胞とチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いて、経時的に取込能と排出能の測定をした。

(4)4種の白血病細胞株を用いた抗癌剤耐性診断法の開発

実際の患者血液中の白血病細胞の耐性獲得前後の糖鎖の変化を調べるようになっていたが、白血病患者から白血病細胞を頂くことが困難になったため、急性リンパ性白血病以外の細胞株において、同じ糖鎖変化起きるかを調べることに変更した。4種の白血病細胞株(急性リンパ性白血病細胞株、慢性リンパ性白血病細胞株、急性骨髄性白血病細胞株、慢性骨髄性白血病株)において、デオキシエポチロンBによる耐性獲得と糖鎖構造変化、およびその変化した因果関係、さらにその原因を調べることにした。

(5)ヒトリンパ球を用いた抗癌剤耐性診断

法の開発

白血病患者血液中の白血病細胞における耐性獲得による糖鎖構造変化を調べることは、本研究を遂行させるために大変重要である。もし、白血病患者血液由来の白血病細胞が入手できたとしても、少量の白血病細胞数で糖鎖解析を行わなければならない。そのために、健常人のヒトリンパ球を用いて、糖鎖試料の調製法と、質量分析の分析条件の検討を行った。さらに、リンパ球上の糖鎖の変化を、簡便に検出するために、レクチンを用いて検討した。

#### 4. 研究成果

(1)3種の抗癌剤の耐性獲得による糖鎖構造変化とその機序解明

デオキシエポチロンB抗癌剤の耐性を獲得したCEM細胞は、シアル酸を $\alpha$ 2-6でガラクトースに転移する糖転移酵素ST6Gal1の減少がmRNAレベルで観察された。それ以外の糖分解酵素やABCトランスポーターにおいて変化はなかった。これらの結果より、抗癌剤耐性獲得後の $\alpha$ 2-6シアリル糖鎖の減少は、糖転移酵素ST6Gal1のmRNAの減少によるものであることがわかった。残念ながら、ピンクリスチンとパクリタキセルの耐性株の樹立が上手く進まなかったために、この2種の抗癌剤耐性の機序解明はできなかった。

(2)耐性獲得と糖鎖構造変化の因果関係の解明

CEM耐性細胞にST6Gal1遺伝子を導入した細胞は、再び抗癌剤感受性を取り戻すことはなかった。しかしながら、CEM細胞のST6Gal1遺伝子をノックダウンした細胞は、抗癌剤耐性を示した。さらに、2-6シアル酸を発現していないチャイニーズハムスター卵巣細胞では、耐性を示した。これらの結果より、CEM耐性細胞には、微小管にすでに変異が入っており、細胞表面の糖鎖が変化しても抗癌剤の微小管への結合は、変異が入っているために起きなかったと考えた。一方で、微小管に変異はないが細胞表面の糖鎖を変化( $\alpha$ 2-6シアリル糖鎖の減少)させた細胞と、本来 $\alpha$ 2-6シアリル糖鎖を持っていないチャイニーズハムスター卵巣細胞では、単に、細胞表面の $\alpha$ 2-6シアリル糖鎖が無いことで、抗癌剤耐性を示したと考えられる。その原因を知るために次の(4)の実験を行った。

(3) 耐性獲得細胞の抗癌剤の取込能と排出能の変化の解明

図3に示した4種の細胞とチャイニーズハムスター卵巣細胞の全てにおいて、抗癌剤の排出能の違いは観察されなかったが、 $\alpha$ 2-6 シアルリ糖鎖が少ないまたは持っていない細胞においては、取込能が低下していた。これらの結果より、 $\alpha$ 2-6 シアル酸が、抗癌剤の取込みを促進している、または、 $\alpha$ 2-6 シアル酸がはずれた後むきだしになったガラクトース残基が、抗癌剤の取込みを阻害していることが考えられる。これは、今後の解明課題である。

(4) 4種の白血病細胞株を用いた抗癌剤耐性診断法の開発

急性リンパ性白血病細胞株のデオキシエポチロンBの耐性株は作製できたが、慢性リンパ性白血病細胞株、急性骨髄性白血病細胞株、慢性骨髄性白血病細胞株の耐性株は樹立できなかった。

(5) ヒトリンパ球を用いた抗癌剤耐性診断法の開発

少量の白血病細胞数で糖鎖解析を行うために、糖鎖試料の調製法と、質量分析装置の分析条件の検討を行った。糖鎖試料の調製法においては、直接糖鎖を細胞から切り出す方法を開発した。質量分析装置の分析条件においては、流速をさらに遅くする技術を開発した。これらの開発により、50 ccの血液に含まれるリンパ球のみで、分析できるようになった。さらに、2種類のレクチンを同時に用いることにより、簡便・迅速にリンパ球上の糖鎖の変化を観察することができた。

## 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 2件)

1. Site-specific and linkage analyses of fucosylated *N*-glycans on haptoglobin in sera of patients with various types of cancer: possible implication for the differential diagnosis of cancer.

Takahashi S, Sugiyama T, Shimomura M, Kamada Y, Fujita K, Nonomura N, Miyoshi E, Nakano M.

**Glycoconjugate Journal** 2016 Jun;33(3):471-82. doi: 10.1007/s10719-016-9653-7. 査読有

2. Comparison of analytical methods for profiling *N*- and *O*-linked glycans from cultured cell lines : HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional.

Ito H, 20 authors, Nakano M, 8 authors, Narimatsu H.

**Glycoconjugate Journal** 2016 Jun;33(3):405-15. doi: 10.1007/s10719-015-9625-3. 査読有

[学会発表](計 4件)

1. Nakano Miyako, Kizuka Yasuhiko, Miura Yuki, Taniguchi Naoyuki, Neural Glycoproteomics and Epigenetic Regulation, Human Proteome Organization 15th Annual World Congress, 2016年9月18日-22日, Taipei, Taiwan

2. 中の三弥子, 高橋 志郎, 白井 亮平, 伊藤 潤, 白井 克典, 山本 彩佳, 三善 英知, 谷口 直之, 疾患のバイオマーカー探索のための LC-ESI MS による糖鎖構造解析, 第35回日本糖質学会, 2016年9月1-3日, 高知市文化プラザ かるぼーと(高知県・高知市)

3. Nakano Miyako, Shirai Katsunori, Fujinawa Reiko, Kobayashi Satoru, Kitazume Shinobu, Taniguchi Naoyuki, Glycan analyses of murine plasma and lung membrane to find biomarker candidate for COPD, Human Proteome Organization 14th Annual World Congress, 2015年9月27日-30日, Vancouver, Canada

4. Nakano Miyako, Shirai Ryohei, Ito Jun, Kavallaris Maria, Packer Nicolle, Acquired drug resistance by decrease of sialylated glycans on acute lymphoblastic leukemia cell-membrane glycoproteins, Joint Meeting of the Society for Glycobiology (SFG) and the Japanese Society of the Carbohydrate Research (JSCR), 2014年11月16日-19日, Honolulu, Hawaii, USA

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中の三弥子 (NAKANO MIYAKO)

広島大学・大学院先端物質研究科・准教授  
研究者番号: 40397724