

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570150

研究課題名（和文） 陽性荷電含有ヘパラン硫酸糖鎖ドメインの細胞増殖・分化・アポトーシスにおける役割

研究課題名（英文） Roles of heparan sulfate glycosaminoglycan containing positive charged domain on cell proliferation, differentiation and apoptosis

研究代表者

京ヶ島 守 (Kyogashima Mamoru)

日本薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50225091

研究成果の概要（和文）：陽性荷電含有ヘパラン硫酸糖鎖 GlcA-GlcNH₃⁺（JM403 抗原）はヒト小腸増殖帯細胞の細胞質に顆粒状に発現し、癌ではその発現は生物学的悪性度と相関する。そこで増殖期にある癌細胞株や胎児（げっ歯類）組織を用いその特徴的発現パターンを調べた。その結果 JM403 抗原の顆粒状発現は、増殖期にあっても椎間板や神経細胞の細胞質にはほとんど認められず上皮系細胞に特徴的に認められたことから上皮系細胞の分化・増殖に密接に関与していると推定された。

研究成果の概要（英文）：Expression of heparan sulfate glycosaminoglycan with positively charged domain (JM403 antigen) in cytoplasm was examined in proliferative and/or differentiated cells of cancers and fetal rodent tissues. The JM403 antigen was limitedly expressed in epithelial cells but not in nervous cells and connective tissue cells, suggesting its involvement with epithelial proliferation and differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物学

キーワード：糖鎖生物学・ヘパラン硫酸糖鎖・陽性荷電

1. 研究開始当初の背景

(1) HS 糖鎖と癌化

癌化に伴う糖鎖発現異常は古くから知られ、臨床で腫瘍マーカーとして用いられている。しかし、ヘパラン硫酸 (HS) プロテオグリカンについては、コア蛋白質の研究はなされてきているものの、シグナル伝達に携わる HS 糖鎖の癌性変化に関する研究は国内外とも乏しい。その理由は、複雑、多様なこのものの糖鎖構造解析が困難な点に集約される。HS

糖鎖は細胞外マトリックスや細胞膜に存在し、硫酸化ドメインを介し増殖因子やサイトカイン等が結合し、これらのシグナルが効率よく細胞に伝達される事から、こうした陰性荷電に富んだ領域が重要と考えられてきた。

(2) JM403 抗原の発現

HS 糖鎖の微量成分とされてきた陽性荷電を帯びた GlcA-GlcNH₃⁺（以下 JM403 抗原）の発現を調べたところ、我々の研究から意外な事に、i) ヒト正常小腸増殖帯上皮細胞では細胞

質内に発現し、増殖細胞マーカーKi-67 抗原の分布と重なること。ii)この発現は、ヒト小腸上皮の終末分化を遂げた細胞やアポトーシスが誘導された細胞においては、細胞膜上で発現が増強することを見出した。また、この糖鎖発現を、ヒト乳癌組織切片を用い検討したところ、正常乳管細胞では全く発現せず、乳癌では約6割で細胞質に陽性所見が見られ生物学的悪性度とも強い相関が見られた。

2. 研究の目的

(1)HS 糖鎖 GlcA-GlcNH₃⁺の機能解析

GlcA-GlcNH₃⁺の細胞質における局在を明確にし、細胞増殖・分化・アポトーシスにおける役割を研究する。

(2) バイオマーカーとしての HS 糖鎖 GlcA-GlcNH₃⁺の役割

乳癌に加え、膵癌、胆管癌、大腸癌等の癌についてもこの糖鎖発現が悪性度の指標となるか検討する。

3. 研究の方法

(1)免疫組織学的研究

免疫組織学的方法（光学顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡、電子顕微鏡）を用い、JM403 抗原に加え、関連の HS 糖鎖抗原エピトープ認識抗体 10E4（抗原エピトープ GlcNS），NAH46（GlcA-GlcNAc），Ki67 抗原，TUNEL 法等で染色を行った。対象は、ヒトでは小腸、乳癌、膵癌、胆管癌、大腸癌、腎癌組織片を用いた。動物ではマウス（C57BL メス）、ラット（SD メス）の成獣（マウス 8 週齢、ラット 21 週齢）を用い、胎児の場合はマウス、ラットとも胎齢 17 日を用いた。

(2)生化学・分子生物学的研究

種々のヒト癌細胞株を用い、増殖期あるいはアポトーシス時における細胞表面 HS 糖鎖抗原を JM403, 10E4, NAH46 等の抗体で検出するとともに、それぞれの HS 糖鎖抗原発現に関与すると思われる遺伝子群の mRNA やタンパク質の発現量を RT-PCR、ウエスタンブロット等で測定した。また、常法に従い HS 糖鎖を抽出後 3 種の HS 糖鎖分解酵素で二糖に消化させ、二種類（C22, C30）の逆相カラムを基にしたイオンペアクロマトグラフィーを用い、その組成を分析した。

4. 研究成果

(1)げっ歯類小腸上皮細胞における JM403 抗原の発現

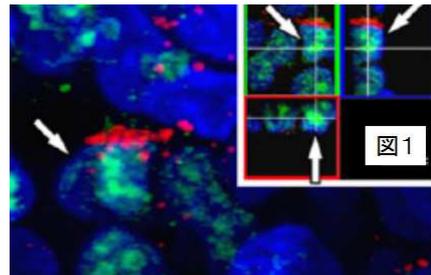
ヒト小腸粘膜上皮における JM403 抗原の細胞質顆粒状発現は、増殖帯の上部に存在する細胞とそれに続く数層の細胞で見られ、絨毛粘膜上層に行くにつれ顆粒状発現パターンは減弱し、変わって細胞膜直下あたりに極めて細かな粒状となって存在する。増殖帯での発現

は一部 Ki67 抗原の発現と一致した。一方、ラットやマウスにおいては Ki67 抗原が主に陰窩の増殖帯に一致して発現するのに対し、JM403 抗原の顆粒状発現は Ki67 抗原の発現が消失した直後の細胞から入れ替わる様に始まり粘膜先端に向かい数層に渡って染色され、粘膜上端ではその染色は消失した。なお、腸管リンパ組織においては胚中心に Ki67 抗原の発現が見られたが JM403 抗原の発現は見られなかった。一方 10E4 抗原は、ほとんど細胞質では見られず、細胞膜に沿ってその発現が見られ（蜂窩状の染色パターン）、NAH46 抗原の発現は、JM403 抗原と 10E4 抗原の中間の染色パターンを示した。10E4, NAH46 二つの抗原発現パターンはヒトの小腸の発現パターンと同じであった。

(2) JM403 抗原の細胞内局在

①共焦点レーザー顕微鏡による検討

ヒト乳癌組織における JM403 抗原の局在をより明らかとするため、共焦点レーザー顕微鏡を用い、Ki67 抗原発現と比較した（図1 矢印は同じ細胞を示す）。JM403 抗原（Alexa594 赤）と Ki67 抗原（Alexa 488 緑）の共存は一

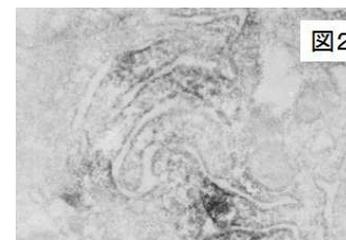


部の癌細胞で認められたが、どちらか片方しか認められない癌細胞も

見られた。また 3 次元的観察により、JM403 抗原は核（TOTO3 青）には認められず、細胞質にのみ存在することが判明した。

②電子顕微鏡による検討

ヒト小腸における JM403 抗原の発現はその光学顕微鏡所見より、ゴルジ装置に局在すると推定された。ラット小腸を用い電子顕微鏡で免疫組織化学的に検討した結果、予想通りゴルジ装置であることが確認できた。一方、乳癌組織所見では極性の乱れのため、光学顕微鏡でその局在を推定することは困難である。電子顕微鏡による免疫組織化学的検討では

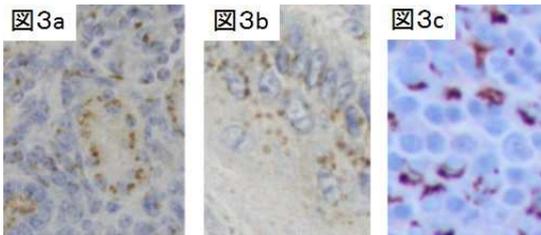


JM403 抗原は層状 vesicle 様構造に特異的に見いだされ（図2）、合成あるいは分泌系の細胞小器官に存在す

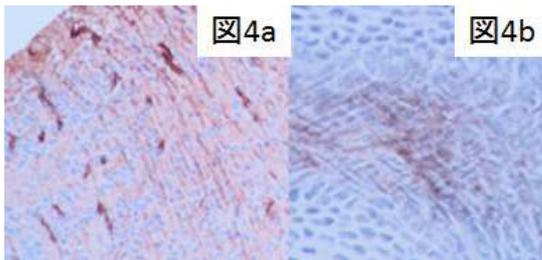
ることが確認された。

(3) JM403 抗原の胎児組織における発現

JM403 抗原は、ヒトにおいては小腸の上皮細



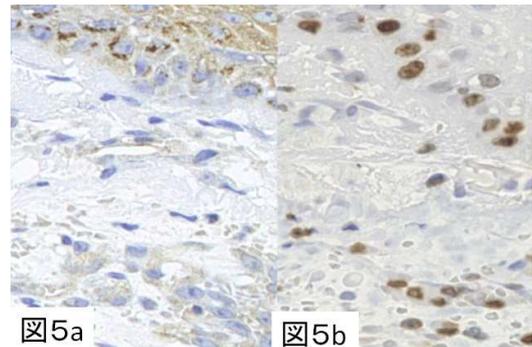
胞増殖帯の一部の細胞や、増殖の激しい癌細胞に発現することから、増殖や分化に密接にかかわっているものと考え、胎児のマウスやラットを用い、その発現を Ki67 抗原や他の HS 糖鎖抗原 (10E4, NAH46) 発現と免疫組織化学的に比較検討した。腎臓においては、Ki67 抗原が尿細管や糸球体原基の上皮性と思われる細胞に比較的広範に染色されるのに対し、JM403 抗原は一部の尿細管や糸球体細胞の細胞質に顆粒状に染色された (図 3 a マウス)。一方他の HS 糖鎖抗原は一部の尿細管や糸球体の基底膜に染色されたが、細胞質に顆粒状に染色されることはほとんどなかった。胃においては、Ki67 抗原が主に基底膜直上の細胞に染色されるのに対し JM403 抗原はさらにその一層上層の細胞の細胞質にまで顆粒状に染色された (図 3 b マウス)。一方、



細胞膜や間質はほとんど染色されなかった。他の HS 抗原は一部の細胞に僅かに細胞質が染色されたにすぎず反対に細胞膜ないしは間質に染色が観察された。肝臓においては、Ki67 抗原が、核が濃染した血球系細胞ならびに細胞質に富み核の大きい肝細胞系の細胞を問わず染色されるのに対し、JM403 抗原は肝細胞系と思われる細胞の細胞質にのみ染色された (図 3 c ラット)。他の HS 糖鎖抗原はわずかに基底膜と思われる部位が染色されるのみであった。また、神経系組織 (図 4 a ラット) や椎間板 (線維輪) (図 4 b ラット) においては、Ki67 抗原が染色された細胞では、JM403 抗原の細胞質における顆粒状の染色は全く観察されず、むしろ通常、HS 糖鎖発現でよく観察される細胞外マトリックスパターンが発現が認められた。

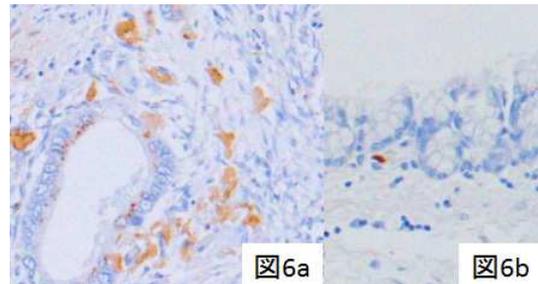
(4) 皮膚創傷治癒モデルにおける JM403 抗原の発現

皮膚創傷時における JM403 発現 (図 5 a) を Ki67 抗原発現 (図 5 b) と対比し調べた。表皮では JM403 抗原は基底層細胞から有棘層細胞にかけて細胞質に顆粒状に発現し、一部は Ki67 抗原発現と一致した。この両抗原の発現



パターンはヒト小腸上皮粘膜における二つの抗原発現パターンに似通っていた。一方同じ創傷治癒過程にありながら真皮側の線維芽細胞では、Ki67 抗原発現細胞が多数認められるにも関わらずこの JM403 の特異的な発現は、ほとんど見られなかった。10E4, NAH46 抗原も創傷治癒部で強く認められるが両者ともその発現は主に細胞膜と基底膜下の結合組織が主体であった。

(5) ヒト悪性腫瘍における JM403 抗原の発現
ヒト乳癌に加え、膵癌、胆管癌、大腸癌につき調べた。いずれの癌においても病理組織学的に悪性度が高く、浸潤の激しい癌細胞の細胞質に顆粒状の発現が見られ (図 6 a)、分化した腫瘍ではほとんど見られなかった (図



6 b)。

(6) 細胞増殖に伴う JM403 抗原ドメイン比率変動の HPLC 解析

組織化学的研究より JM403 抗原の発現は細胞



増殖・分化に伴い変動することが示唆されるが物質レベルにおいても確かに変動するかと調べた。細胞をシャーレに播き 1、2、3 日 (コンフルエント) 後に各々回収し全 HS 糖鎖を抽出し HS 糖鎖分解酵素で完全に消化し

得られた二糖組成をイオンペアクロマトグラフィーで解析した。その結果 Δ HexA-GlcNH₃⁺(GlcN)に相当するピークは、継時的に減少するのに対し(約 40~20%)、 Δ HexA-GlcNAc(0S)構造は相補的に増加した(約 40~60%) (図7 ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 の例 縦軸%)。この結果は細胞の増殖速度が速い段階では、HS 鎖中に占める JM403 抗原ドメイン構造の比率が多く、細胞がコンフルエントに近づき増殖速度が低下するにつれその比率は低下してくるものと考えられた。

(7)増殖期における JM403 抗原発現に影響を及ぼす遺伝子の探索

ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞に HS 糖鎖合成酵素遺伝子群に siRNA を導入し JM403 抗原の細胞膜上の発現量をフローサイトメトリーで調べた(図8 Syndecan-1 は陰性対照)。

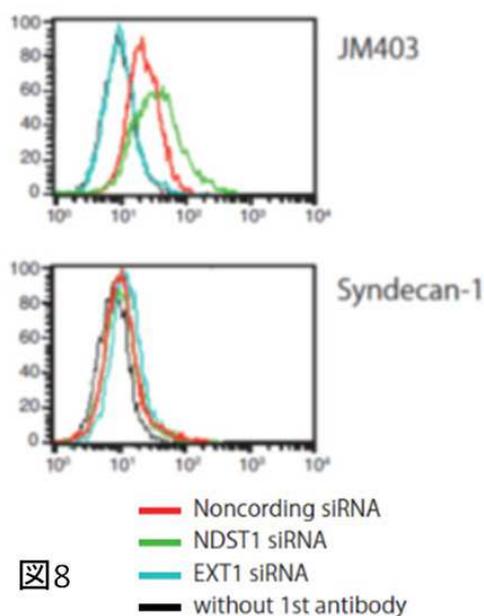


図8

ターゲット遺伝子が EXT1 の場合、JM403 抗体との反応性は完全に消失した。一方 NDST1 がターゲット遺伝子の場合、JM403 の反応性は MFI で 183%と増加した。これらの結果から増殖に伴う特異な JM403 糖鎖抗原ドメイン GlcA-GlcNH₃⁺の発現は、HS 糖鎖合成酵素遺伝子群発現の影響下に置かれているが、その制御様式は複雑であると考えられた。

なお、本研究成果は 2013 年 8 月に開催される第 32 回日本糖質学会年会においても発表予定である。

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)

①Fujii M, Yusa A, Yokoyama Y, Kokuryo T, Tsunoda N, Oda K, Nagino M, Ishimaru T, Shimoyama Y, Utsunomiya H, Iwata H, Itoh Y, Itoh J, Kannagi R, Kyogashima M: Cytoplasmic expression of the JM403 antigen GlcA-GlcNH₃⁺ on heparan sulfate glycosaminoglycan in mammary carcinomas - A novel proliferative biomarker for breast cancers with high malignancy. Glycoconj J. 27:661-672, 2010 doi: 10.1007/s10719-010-9311-4 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①遊佐亜希子、藤井正宏、後藤嘉子、小田高司、宇都宮洋才、京ヶ島 守、神奈木玲児：陽性荷電をもつヘパラン硫酸糖鎖 GlcA-GlcNH₃⁺の細胞生物学的研究：糖鎖科学名古屋拠点「若手の力」フォーラム第 8 回：2010.0906：名古屋

②Akiko Yusa, Masahiro Fujii, Yoshiko Goto, Koji Oda, Hirotohi Utsunomiya, Mamoru Kyogashima, Reiji Kannagi : Different expression of cationic heparan sulfate in the cells at proliferation, differentiation and apoptosis. : BMB2010 : 2010.120 : 神戸

③Akiko Yusa, Masahiro Fujii, Hirotohi Utsunomiya, Kouji Tanaka, Reiji Kannagi, Koji Oda, Mamoru Kyogashima : JM403 antigen GlcA-GlcNH₃⁺ on heparan sulfate glycosaminoglycan may be involved in cell proliferation and apoptosis. : XXI International Symposium on Glycoconjugates : 2011.08.22 : Vienna, Austria

6. 研究組織

(1)研究代表者

京ヶ島 守 (Mamoru Kyogashima)

日本薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：22570150

(2)連携研究者

江原 孝史 (Takashi Ehara)

松本大学・人間健康学部・教授

研究者番号：00203646

小田 高司 (Oda Koji)

愛知県がんセンター (研究所)・

疫学・予防部・研究員

研究者番号：30311715