

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590045
 研究課題名（和文） グライコミクス技術を用いた腫瘍関連糖タンパク質の特異的検出と同定
 研究課題名（英文） Detection and identification of cancer-related glycoproteins by glycomic approaches
 研究代表者
 川崎 ナナ（KAWASAKI NANA）
 国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・室長
 研究者番号：20186167

研究成果の概要：

大腸癌等に特異的に発現しているシアリルルイス x 付加タンパク質として、ヘテロ核リボ核酸タンパク質 A3 が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
18年度	1,500,000	0	1,500,000
19年度	1,000,000	0	1,000,000
20年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計			3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：腫瘍マーカー，大腸癌，乳癌，膵癌，ヘテロ核リボ核酸タンパク質，糖鎖

1. 研究開始当初の背景

癌化に伴い糖タンパク質等の糖鎖が変化することが知られており，癌に特異的に発現する様々な糖鎖や糖タンパク質は，腫瘍マーカーとして利用されている．中でも，SLX, CSLEX, NCC-ST-439は，比較的性質が明らかにされている糖鎖関連腫瘍マーカーで，シアリルルイスxと呼ばれる糖鎖部分構造（NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fcu α 1-3)GlcNAc）が付加していることが知られている．シアリルルイスxは，細胞接着分子セレクチンのリガンドで，細胞の癌化に伴い増加し，癌細胞の血行性転

移に係わっていると考えられている癌関連糖鎖抗原の一つである．一般に，糖鎖の機能はタンパク質本体の機能と密接な関係があることから，シアリルルイスxを介した接着と転移の過程にも，タンパク質本体が重要な役割を果たしていることが予想される．しかし，シアリルルイスx付加タンパク質として実際に特定されたものは，白血球に発現するPSGL-1やムチン様タンパク質などの一部にすぎない．従って，癌化に伴って発現が増加するシアリルルイスx糖鎖付加タンパク質，あるいはシアリルルイスx付加が更新されるタンパク質を特定することができれば，

癌転移機構の解明や、特異性の高い診断マーカーや治療法の開発につながるものと期待されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、癌転移機構の解明、並びにより優れたがん診断法、転移予測法、予後の判定法の開発をめざし、レクチン、糖鎖抗体、2次元電気泳動法、及びLC/MS/MS等を用いたグライコミクスの技術を利用して、癌細胞に特異的に発現しているシアリルルイスx付加タンパク質を同定することである。

3. 研究の方法

ヒト大腸癌肺転移部位由来 T84 細胞株、ヒト膵臓癌原発部位由来 BxPC-3 細胞株、ヒト膵臓癌肝転移部由来 Capan-1 細胞株、ヒト大腸癌原発部位由来 HT-29 細胞株、及びヒト乳腺管癌腹水転移部由来 ZR-75-30 細胞株、正常細胞として、ヒト乳腺上皮細胞、ヒト気管支上皮細胞、ヒト表皮角化細胞、及びヒト血管内皮細胞等をシアリルルイスx付加タンパク質のスクリーニングに用いた。

T84 細胞の核画分を 2D 電気泳動で展開し、抗シアリルルイスx抗体で染色されたスポットを切り出し、LC/MS/MS 及びデータベース検索により、タンパク質部分を同定した。

4. 研究成果

各種癌細胞の細胞質画分、核画分及び膜画分について、抗シアリルルイスx抗体を用いたウエスタンブロット法を行ったところ、核画分の約 35K 及び 45K に共通するバンドが認められた。そこで、大腸癌細胞を用いて 2D 電気泳動を行い、抗シアリルルイスx抗体により染色されるスポットを切り出した。ゲル内トリプシン消化後、ペプチド断片を抽出し、LC/MS/MS とデータベース検索を行った結果、35K 及び 45K のタンパク質は、それぞれヘテロ核リボ核酸タンパク質(hnRNP) A1 及び A3 であることが示唆された。そこで、抗ヒト hnRNP A1 抗体及び抗ヒト hnRNP A3 抗体を用いて染色したところ、抗シアリルルイスx抗体で染色されたスポットと一致した。

つぎに、抗シアリルルイスx抗体、抗ヒト hnRNP A1 抗体及び抗ヒト hnRNP A3 抗体を用いて正常細胞のウエスタンブロット法を行ったところ、抗シアリルルイスx抗体及び抗ヒト hnRNP A1 抗体の両方と反応するバンドがあることが確認されたが、抗シアリルルイスx抗体と反応する hnRNP A3 は発現していないことが明らかとなった。

本研究により、核タンパク質である hnRNPA1 及び A3 にシアリルルイスxが付加

していることが示唆された。シアリルルイスxが付加した hnRNPA1 は癌細胞と正常細胞に共通して存在するが、シアリルルイスxが付加した hnRNPA3 は癌細胞にしか存在しないことから、シアリルルイスxが付加した hnRNPA3 を利用することにより、シアリルルイスxのみをターゲットとする従来の診断法よりも陽性的中率の高い診断法を提供できる可能性が示唆された。

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)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:腫瘍の検査法

発明者:川崎ナナ,高倉大輔,橋井則貴,
山口照英

権利者:財団法人ヒューマニクス振興財団

出願年月日平成21年5月28日

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

川崎 ナナ (KAWASAKI NANA)

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・室長

研究者番号:20186167

(2)研究協力者

高倉大輔 (TAKAKURA DISUKE)

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・
博士研究員