

平成 23 年 6 月 20 日現在

機関番号：72690

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791534

研究課題名(和文)

腎癌における分岐型ジシアリル糖鎖の作用機序の解明と治療応用の基礎的検討

研究課題名(英文)

Roles of branched-type disialyl-glycolipid antigen in renal cell cancer

研究代表者

土田 明子 (TSUCHIDA AKIKO)

公益財団法人野口研究所・研究部・研究員

研究者番号：70378024

研究成果の概要(和文)：腎癌細胞株に発現している糖脂質糖鎖の解析により、Disialyl糖鎖の発現パターンの変化が腎癌での悪性化や転移性に関連していることが推測されている。本研究では、Lacto系列のDisialyl Lc4(DSLc4)の末端にGalNAcが β 1-4結合した新しいDisialyl糖鎖(GalNAc-DSLc4)の合成機構と機能の解析を行ってきた。とくに、GalNAc-DSLc4の合成に関わる糖転移酵素遺伝子 β 4GalNAc-T2を、GalNAc-DSLc4糖鎖抗原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てきた。様々な細胞外マトリックス上への接着挙動を解析した結果、ラミニン固定化表面に特異的に接着することが明らかになったので、ラミニンとの結合に関わる接着分子の細胞表面における局在を調べたところ、安定発現株ではインテグリン β 1がraft domainにも局在していることが分かった。このことからラミニン表面に対する安定発現株の強い接着にはインテグリン β 1が関与している可能性が示唆された。さらに、細胞がラミニン表面に接着する際のインテグリン β 1とGalNAc-DSLc4抗原の局在変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、安定発現株ではGalNAc-DSLc4抗原は膜上に、インテグリン β 1はラミニン固定化表面の近くに多く局在していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that novel antigen GalNAc-disialyl Lc4 (GalNAc-DSLc4) is associated with malignant features of renal cancers. The stable transfectant of GalNAc-T2 cDNA using TUHR14TKB cells, resulting in the high expression of GalNAc-DSLc4, was established to analyze their phenotypes. To date, specific adhesion of transfectants onto laminin-coating plates among those with various extracellular matrices was observed by the dynamic monitoring using real-time cell electronic sensing (RT-CES). To explain the specific adhesion of GalNAc-DSLc4 transfectants on the laminin-coating plate, we investigated various adhesion molecules such as integrins known to interact with laminin. And recently, we revealed the localization of integrin β 1 and GalNAc-DSLc4 antigen on the cell surface by immunofluorescence assay with confocal laser microscopy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腎癌 糖脂質 糖転移酵素 ジシアルル糖鎖 腫瘍マーカー

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 糖鎖抗原は、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。

(3) GalNAc-disialyl Lc4 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 β 4GalNAc-T2 を、GalNAc-disialyl Lc4 糖鎖抗原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について解析を進めている。

これまでに、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, IV)、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。

2. 研究の目的

(1) 腎癌細胞株における分岐型ジシアル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 糖鎖抗原の腫瘍マーカーとしての可能性を探る。

(2) 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、腎癌が悪性化する過程における GalNAc-disialyl Lc4 糖鎖抗原の発現意義を具体的に明らかにしていく。なかでも、ラミニン固定化表面に対する接着が強いことが明らかになっているので、ラミニンと細胞表面上に存在する接着分子との結合に GalNAc-disialyl Lc4 糖鎖抗原がどのように関与しているかどうかを調べる。

(3) 腎癌細胞株における GalNAc-disialyl Lc4 糖鎖抗原の発現量および β 4GalNAc-T2 DNA の異常メチル化のレベルを調べ、相関性の有無を確認し、GalNAc-disialyl Lc4 糖鎖抗原の発現制御機構を明らかにする。

(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 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、ラミニンとの結合に関与すると思われる接着分子インテグリンや EGF レセプターの発現量や局在について、細胞表面タンパクをビオチン化することにより調べる。

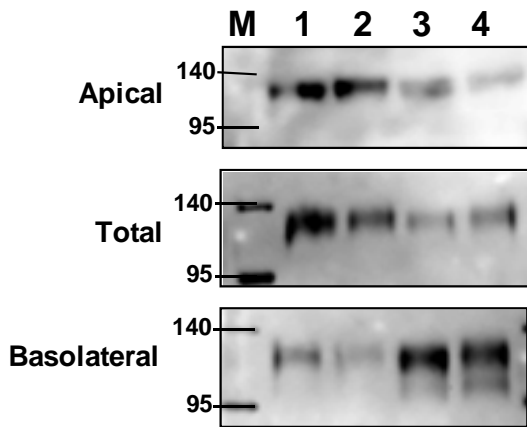
(2) インテグリン分子と GalNAc-disialyl Lc4 糖鎖抗原について、各抗体を用いて多重染色し、ラミニン表面接着時における分子の局在の様子を、共焦点レーザー顕微鏡により観察する。

(3) Bisulfate sequence 法および COBRA 法を用いて、腎癌細胞株における GalNAc-disialyl Lc4 抗原の発現量と $\beta 4$ GalNAc-T2 遺伝子の CpG アイランドの異常メチル化のレベルとの関係を調べることで、GalNAc-disialyl Lc4 抗原の発現制御機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) GalNAc-disialyl Lc4 安定発現株およびコントロール細胞の接着状態について調べるため、接着細胞の上側から、あるいは下側からビオチン化処理を行ない、接着分子インテグリンや EGF レセプターの発現量や局在について調べた。細胞膜表面全体に存在するインテグリン $\beta 1$ の発現量は、安定発現株およびコントロール細胞株のどちらも同じくらいであったが、接着した後は膜上に局在する量に偏りが見られた。(図1)

図1 インテグリン $\beta 1$ の局在変化



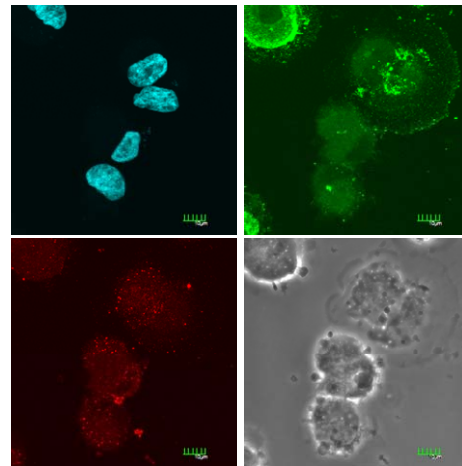
IP: Avidin sep.
IB: ITGB1

Lane:

1. M-2 (コントロール)
2. M-9 (コントロール)
3. T2S-27 (安定発現株)
4. T2S-32 (安定発現株)

(2) ラミニン表面接着時における分子の局在の様子を、共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、GalNAc-disialyl Lc4 安定発現株においては、GalNAc-disialyl Lc4 糖鎖抗原は細胞表面に強く発現しており、インテグリン $\beta 1$ は細胞全体に存在していたが、とくに接着面側に局在している様子が確認された。(図2)

図2 GalNAc-DSLc4安定発現株におけるインテグリン $\beta 1$ とGalNAc-DSLc4糖鎖抗原の局在



GalNAc-DSLc4 (Green)

インテグリン $\beta 1$ (Red)

(3) Bisulfate sequence 法および COBRA 法を用いて、腎癌細胞株における GalNAc-disialyl Lc4 抗原の発現量と $\beta 4$ GalNAc-T2 遺伝子の CpG アイランドの異常メチル化のレベルとの関係を調べたところ、メチル化レベルが高い細胞株 (SK-RC-29, 827, ACHN) では、GalNAc-disialyl Lc4 抗原の発現制御が著しく抑制されていることが明らかになった。(図3)

図3 腎癌細胞株のDNAメチル化レベル

Renal cancer cell lines	SK-RC-29		735		827		1051		ACHN	
	U	M	U	M	U	M	U	M	U	M
RM2 antigen	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++

U: Unmethylated, M: Methylated

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)

K. Furukawa, A. Tsuchida, T. Okajima, and
K. Furukawa,
“Glycoconjugate Glycosyltransferases”,
Glycoconjugate. J., 987-998 Review (2009)
査読無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土田 明子 (TSUCHIDA AKIKO)
公益財団法人野口研究所・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：