

—— 教授就任記念講演 ——

2019年6月3日（月）：医学部百周年開設記念ホール  
星陵オーデトリウム 講堂

## 泌尿器癌の糖鎖研究から

東北大学教授  
伊 藤 明 宏



## 略 歴

- 1990年 3月 東北大学医学部卒業
- 1990年 5月 東北大学医学部附属病院 医員（研修医） 泌尿器科
- 1991年 4月 関連病院で研修（白河厚生，石巻赤十字，磐城共立，八戸市民）
- 1997年 3月 東北大学学位（医学博士）取得
- 1999年 12月 米国ワシントン大学留学（糖鎖生物学について箱守仙一郎教授に師事）
- 2003年 4月 東北大学医学部附属病院 助手
- 2004年 4月 京都大学医学部附属病院 助手
- 2005年 4月 東北大学病院 助教
- 2008年 4月 東北大学病院 講師
- 2014年 4月 東北大学大学院医学系研究科泌尿器科学分野 准教授
- 2018年 12月 16日 東北大学大学院医学系研究科 泌尿器科学分野 教授

— 教授就任記念講演 —

## 泌尿器癌の糖鎖研究から

### Glycobiological Research of Urological Cancer

伊 藤 明 宏

東北大学大学院医学系研究科 泌尿器科学分野

#### はじめに

細胞膜の脂質二重層に存在する糖鎖は、単糖が鎖状につながった分子であり、糖タンパク質や糖脂質という形で存在している。血液型の ABO 型は、糖鎖の違いにより区別されており、たった 1 個の糖鎖の違いが、人と人との相性にまで影響するということが驚くべきことである。癌細胞においても、1 個の糖鎖の違いで、癌の悪性度や予後が変わることが知られており、このような糖鎖に着目して泌尿器癌の研究に携わってきた。

#### 腎癌の糖鎖研究

泌尿器癌における糖鎖発現と臨床像とを比較検討した結果、腎癌においては、長い糖鎖を持つ糖脂質が増加していると術後に転移しやすいという知見が得られ、腎癌組織から糖脂質を抽出して構造解析を行ったところ、新規構造を持つ糖脂質糖鎖として Disialosyl globopentaosyl ceramide (DSGb5) が同定された<sup>1)</sup>。私の学位研究で、DSGb5 に対するモノクローナル抗体を作成し、臨床的意義についての検討を行ったが、新鮮凍結切片に対する免疫染色で腎癌原発巣や腎癌転移巣だけでなく正常腎組織にも発現しているということが確認されたが、DSGb5 がどのような形で腎癌の転移に関わっているのか、DSGb5 の持つ役割については不明であった<sup>2)</sup>。

DSGb5 は、2 個のシアル酸が一連の糖鎖の末端に結合する構造となっている。シアル酸を認識する分子として、いくつかの Siglec (sialic-acid binding immunoglobulin-like lectin) が報告されており、この中で Siglec-7 はナチュラルキラー (NK) 細胞表面に細胞障害活性の抑制性レセプターとして存在している。DSGb5 が腎癌の転移に関わっているならば、Siglec-7 を介して NK 細胞を抑制する経路に参与しているの

はないかと考えられたため、種々の糖鎖と Siglec-7 との結合特異性を調べたところ、DSGb5 が Siglec-7 と結合する知見を得ることができた<sup>3)</sup>。次の段階として、実際に DSGb5 が NK 細胞の細胞障害活性を抑制することを明らかとするために、自分の血液から分離した NK 細胞を用いて何度も実験を行ったが、なかなか期待した結果を得ることはできなかった。たまたま、インフルエンザワクチン接種後の血液を使用した時のみ、NK 細胞を抑制する結果を得ることができたが、その後一度も再現することができなかった。この実験は中止することとなった。しかし、その数年後に新発見が報告された。Siglec-7 は NK 細胞表面に存在する細胞自体のシアル酸と結合することで結合部位がマスキングされているが、シアル酸を切断する酵素 (ノイラミニダーゼ) でシアル酸を切ることによって、Siglec-7 のシアル酸結合部位のマスキングが解除されて、NK 細胞障害活性が抑制されるということであった<sup>4)</sup>。実は、インフルエンザウイルス表面にはノイラミニダーゼが存在しており、ウイルス感染に必要な物質であることから、ノイラミニダーゼ阻害薬がインフルエンザ治療薬 (タミフル<sup>®</sup>、リレンザ<sup>®</sup>、イナビル<sup>®</sup>) として開発されている。すなわち、一度だけ成功した実験は、インフルエンザウイルス表面のノイラミニダーゼが NK 細胞のシアル酸を切ったために、NK 細胞障害活性の抑制が確認されたものであったと判明した。そこで、NK 細胞をノイラミニダーゼ処理して再度実験を行ったところ、DSGb5 が NK 細胞の細胞障害活性を抑制するという結果を得ることができた<sup>5)</sup>。一度は断念していた実験が、数年後に失敗の原因が判明したことで、たった一度だけ成功した実験が正しかったことが立証され、目的の結果を得ることができたという事例であり、印象深い研究であった。

## 偶然の失敗から得られた新知見

DSGb5 糖鎖を高発現している腎癌細胞は、グルコース高濃度の培地を使用して培養を行っているが、その年のゴールデンウィーク中に培地を切らしてしまったために、グルコース低濃度の培地で急場を凌がざるを得なくなった。そのため、連休明けには、DSGb5 高発現細胞はダメになってしまい、当時の研究者（大学院生）は、かなり落胆してしまった。ところがよく見ると、DSGb5 低発現細胞は、いつも通りに普通に増殖している状態であった。この違いを突き詰めて明らかとすることで、DSGb5 がグルコース経路に関係しているという知見を得ることができた。

## 逆境を乗り越えて新展開

糖脂質の抗体を用いた免疫染色は、ホルマリン固定パラフィン包埋（formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE）切片では染色されにくいいため、凍結切片を用いた免疫染色を行うのが一般的と考えられていた。そのため、手術で得られた組織の凍結切片を以前から実験室の冷凍庫にストックしていた。ところが東日本大震災で実験室が長期に停電となった際に、凍結切片を保管していた冷凍庫は室温化し、凍結切片が使用できないという事態に陥ってしまった。そこで凍結切片は諦めて、FFPE 切片を使用する方法を探ることとし、糖脂質抗体での FFPE 切片に対する免疫染色では、何が問題で染色されないのか、その行程を検証することとした。その結果、抗原賦活時に切片を緩衝液に入れて 121°C で 5 分の処理を行うが、その際に緩衝液が高温になると酸性化してしまい、DSGb5 の様に末端にシアル酸を持つ糖鎖は、酸による加水分解を受けてシアル酸が外れてしまい、抗体には認識されなくなるという事実が判明した。そこで、高温条件でも加水分解が起こらないように緩衝液を工夫することで FFPE 切片でも安定した免疫染色を行うことができるようになった。すなわち凍結切片を失ったことをきっかけにして、FFPE 切片を用いることが可能となり、その結果、ホルマリンプロックとしてストックされている多数の症例を後向きに解析することが可能となった。これにより、腎癌組織で DSGb5 を高発現している患者では、術後に転移が多く認められることを明らかとすることができ<sup>6)</sup>、前立腺癌においても術後の再発と相関するという知見を得ることができた<sup>7)</sup>。現在は、凍結切片としては存在し得ない、前立腺癌診断時の針生検組織を用いて、研究を進めている最中である。

## おわりに

我々臨床医が基礎研究を行う際には、臨床における問題点を解決することを目的として研究を行う。臨床の現場だけでなく、基礎研究においても患者から貴重な知見を授かることが経験される。私が担当医として初めて臨終に立ち会った患者さんからは、初期研修医として多くのことを学ばせていただいたが、生前の手術で摘出された組織から腎癌培養細胞株が樹立され<sup>8)</sup>、その細胞から新規構造をもつ糖鎖を報告させていただいた<sup>9)</sup>。患者さんへの感謝の気持ちを忘れずに、真摯な気持ちで研究を進めていけば、前述のような山あり谷ありの経過を辿りつつも、何とかなるものではないかと思われる。

## 文 献

- 1) Saito, S., Levery, S.B., Salyan, M.E., et al. (1994) Common tetrasaccharide epitope NeuAc alpha 2-->3Gal beta 1-->3 (Neu-Ac alpha 2-->6) GalNAc, presented by different carrier glycosylceramides or O-linked peptides, is recognized by different antibodies and ligands having distinct specificities. *J. Biol. Chem.*, **269** (8), 5644-5652.
- 2) Ito, A., Saito, S., Masuko, T., et al. (2001) Monoclonal antibody (5F3) defining renal cell carcinoma-associated antigen disialosyl globopentaosylceramide (V3NeuAcIV6NeuAcGb5), and distribution pattern of the antigen in tumor and normal tissues. *Glycoconj. J.*, **18** (6), 475-485.
- 3) Ito, A., Handa, K., Withers, D.A., et al. (2001) Binding specificity of siglec7 to disialogangliosides of renal cell carcinoma: possible role of disialogangliosides in tumor progression. *FEBS Lett.*, **504** (1-2), 82-86.
- 4) Nicoll, G., Avril, T., Lock, K., et al. (2003) Ganglioside GD3 expression on target cells can modulate NK cell cytotoxicity via siglec-7-dependent and -independent mechanisms. *Eur. J. Immunol.*, **33** (6), 1642-1648.
- 5) Kawasaki, Y., Ito, A., Withers, D.A., et al. (2010) Ganglioside DSGb5, preferred ligand for Siglec-7, inhibits NK cell cytotoxicity against renal cell carcinoma cells. *Glycobiology*, **20** (11), 1373-1379.
- 6) Itoh, J., Ito, A., Shimada, S., et al. (2017) Clinicopathological significance of ganglioside DSGb5 expression in renal cell carcinoma. *Glycoconj. J.*, **34** (2), 267-273.
- 7) Shimada, S., Ito, A., Kawasaki, Y., et al. (2014) Ganglioside disialosyl globopentaosylceramide is an independent predictor of PSA recurrence-free survival following radical prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **17** (2), 199-205.

- 8) Satoh, M., Nejad, F.M., Nakano, O., et al. (1999) Four new human renal cell carcinoma cell lines expressing globo-series gangliosides. *Tohoku J. Exp. Med.*, **189** (2), 95-105.
- 9) Ito, A., Levery, S.B., Saito, S., et al. (2001) A novel ganglioside isolated from renal cell carcinoma. *J. Biol. Chem.*, **276** (20), 16695-16703.