

論文内容要旨

【目 的】

細胞の癌化に伴い細胞膜糖蛋白質糖鎖の構造変化がおこることが知られている。その変化は、Asn結合型糖鎖の共通のコア構造 $\text{Man } \alpha 1 \rightarrow 6 (\text{Man } \alpha 1 \rightarrow 3) \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4 (\pm \text{Fuc } \alpha 1 \rightarrow 6) \text{GlcNAc-Asn}$ の $\text{Man } \alpha 1 \rightarrow 6$ 残基に結合する $\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 6$ 分岐構造の増加であり、その結果として糖鎖の高分子量化がおこることが、腫瘍ウィルスによるトランスホーマントの解析から明らかとなった (J. Biol. Chem. 259, 10834-10840, 1984)。最近の実験的転移の研究により、この構造変化の増幅が癌細胞の転移能と関連することが指摘されている。

本研究では、これらの実験動物を用いた*in vitro*や*in vivo*の系から得られた新しい知見に着目し、その成果を臨床応用するために、ヒト悪性腫瘍に於る細胞膜表面糖鎖の構造変化の全容を明らかにすることを試みた。その第一歩として、ヒト正常食道上皮粘膜と、食道癌の細胞膜画分より得られたAsn結合型糖鎖の比較構造解析研究を行った。

【方 法】

外科手術により得られた正常食道上皮粘膜 (2例) と食道癌組織 (3例) を低張破碎後、105,000gの超遠心法により膜画分を採取、アセトン処理脱脂後、乾燥膜蛋白 (60mg) とした。この膜蛋白よりヒドラジン分解法によりAsn結合型糖鎖を定量的に遊離し、*N*-アセチル化後、濾紙クロマトグラフィーにより糖鎖を精製した。 NaB^3H_4 及び NaB^2H_4 で糖鎖を還元標識し、高圧濾紙電気泳動、concanavalin A (Con A)-及び*Datura stramonium* agglutinin (DSA)-Sephadexを用いたレクチンアフィニティクロマトグラフィー、及びBio-Gel P-4によるゲル濾過等により分画後、酵素逐次分解法及びGC-MASを用いたメチル化分析法により糖鎖構造を明らかにした。

【結 果】

1) 糖鎖を高圧濾紙電気泳動により分画したところ、シアル酸を含まない中性糖鎖 (N) とシアル酸を含む酸性糖鎖 (A) のモル比は、各々正常上皮で32 : 68, 30 : 70, 食道癌で40 : 60, 38 : 62, 42 : 58であった。

2) 正常上皮と食道癌の中性糖鎖 (N) とシアリダーゼ消化後の酸性糖鎖 (AN) をConAカラムで分画したところ、正常上皮ではカラムに結合し5 mM Methyl α -D-glucosideで溶出される画分 (Con A⁺画分) が主体であるのに対し、食道癌ではいずれもこの画分が約60%に減少

し、代わりにカラムに素通りする画分 (Con A⁻画分) が増加していた。又、中性糖鎖 (N) では、カラムに結合し、100mM Methyl α -D-mannosideで溶出される画分 (Con A⁺画分) も癌で増加していた。

3) Con A⁻画分を更にDSAレクチンカラムで分画したところ、カラムに弱く結合し、遅れて溶出する画分 (DSA⁻画分) と、カラムに強く結合し1%G1cNAc oligomerで溶出される画分 (DSA⁺画分) が癌とともに1.6~2.2倍に増加していた。

4) レクチンカラムによって分画した糖鎖の各画分をBio-Gel P-4カラムによるゲル濾過により更に分画し、糖鎖構造を酵素逐次分解法により解析したところ、正常上皮で主体を占めていたのはCon A⁺画分に含まれている2本鎖複合型糖鎖であり、癌ではこの2本鎖複合型糖鎖が減少し、代わって増加していたDSA⁻画分とDSA⁺画分に含まれる3本鎖、4本鎖複合型糖鎖が主体となることが判明した。

5) 糖鎖のメチル化分析では、3, 6-di-及び3, 4-di-O-methylmannitolが癌で増加しており、これらの結果から、食道癌に於る糖鎖の構造変化は、G1cNAc β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 及びG1cNAc β 1 \rightarrow 4Man α 1 \rightarrow 分岐構造の増加によると推定された。

以上の結果は、*in vitro*腫瘍細胞の解析で明らかにされた細胞表面糖鎖の構造変化が、ヒト食道癌で広くおこっていることを示している。又、細胞表面糖鎖の変化は、細胞接着性の低下や、宿主免疫に対する抵抗性等へ影響を及ぼすことが指摘されていることから、本研究で明らかにされた細胞表面糖鎖の癌性変化は、こうした癌細胞の形質変化に深く関わっていると推定され、今後癌進展の分子機構に解明につながるものと期待される。

審査結果の要旨

癌の細胞生物学的特性を明らかにすることは、癌の診断への応用とともに、癌治療の新しい展開を切り開くことになる。当研究は、細胞膜糖蛋白質に結合するAsn結合型糖鎖に着目し、ヒト正常食道上皮粘膜と食道癌の細胞膜糖蛋白質より糖鎖を遊離し、その構造を詳細に比較検討することによって、食道癌における細胞表面糖鎖の癌性変化を明らかにしようとしたものである。

当研究では、ヒト癌組織からの標本採取の困難さと、細胞表面糖鎖の分子多様性・不均一性による構造解析の困難性にもかかわらず、ヒドラジン分解法を用いて糖鎖を細胞膜画分より定量的に遊離し、高圧濾紙電気泳動法でシアル酸含有糖鎖を分画したのち、DSAレクチンカラム等の新しい手段を用いて糖鎖を更に効率的に分画し、酵素逐次分解法及びメチル化分析法によってその構造の全容を明らかにしている。その結果、ヒト正常粘膜において細胞表面糖鎖は2本鎖複合型糖鎖を主体としているのに対し、食道癌ではGlcNAc β 1 \rightarrow 6 Man α 1 \rightarrow 及びGlcNAc β 1 \rightarrow 4 Man α 1 \rightarrow 分岐構造が増加し、これらの分岐を含む3本鎖・4本鎖複合型糖鎖が主体となることを見出した。

今日まで、動物細胞を用いた転移実験の結果から、癌の転移現象には、癌細胞表面の複合糖質分子が重要な役割りを担っていると推定されている。又、精製された γ -GTP, hCG, transferrin等の糖蛋白質の比較解析から、これらの分子上の糖鎖の癌性変化が見出され、ヒト癌における有用な診断マーカーとなる可能性が示されている。しかしながら、ヒト固型癌の細胞表面糖鎖に関する情報は著しく少いと言わざるを得ない。当研究の結果は、in vitro動物細胞で明らかにされていた細胞表面糖鎖の癌性変化が、ヒト食道癌で広くおこなっていることを示しており、転移実験等で指摘されている細胞表面糖鎖の構造変化の生物学的意義が、ヒト悪性腫瘍においても重要であることを示唆するものである。

以上の研究は、ヒト食道癌の悪性度の高さの原因となる癌細胞側因子の1つを分子レベルで解析し明らかにしたという点だけでなく、ヒト悪性腫瘍進展のメカニズムを解明する上で重要な成果となったと評価することができる。又、細胞表面糖鎖の癌性変化を有効に検出できるDSAレクチンなどの新しい試薬を今後臨床応用していく上での基礎的研究となっていると評価できる。以上の結果は、その独創的研究、および解析の上できわめて優れた内容となっており、さらに対象をヒト（食道）癌にまで及び、近い将来応用への可能性を示唆する優れた論文である。よって本論文は学位授与に値するものであると共に、今後のさらなる発展が期待される。