

学位論文 博士（理学）

糖鎖プライマー法によるマウス FBJ 骨肉腫細胞に
発現する糖鎖の探索および細胞遊走能
に関する糖鎖の機能解析

2013 年 3 月

慶應義塾大学大学院理工学研究科

王 毅楠

目次

第1章	序論.....	1
1.1	糖鎖とがん転移.....	1
1.2	糖鎖プライマー法.....	2
1.3	マウス骨肉腫 FBJ 細胞について.....	5
1.4	本研究の目的と方針.....	6
第2章	FBJ 細胞における糖鎖プライマー法による糖鎖伸長生成物の構造解析.....	8
2.1	緒言.....	8
2.2	実験方法および材料.....	9
2.2.1	細胞培養.....	9
2.2.2	糖鎖プライマー法.....	9
2.2.3	糖鎖伸長生成物の回収と精製.....	10
2.2.4	内在性糖脂質の抽出と精製.....	11
2.2.5	タンパク質の定量.....	12
2.2.6	高速液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC-MS/MS).....	12
2.2.7	糖加水分解酵素処理.....	14
2.3	結果.....	17
2.3.1	GalNAc-Thr-C12 由来の糖鎖伸長生成物の比較解析.....	17
2.3.2	GlcNAc-C12 由来の糖鎖伸長生成物の比較解析.....	20
2.3.3	Lac-C12 由来の糖鎖伸長生成物の比較解析.....	25
2.3.4	FBJ 細胞に発現する糖脂質の比較解析.....	31
2.3.5	Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖生成物の比較解析.....	37
2.4	考察.....	48
2.5	結言.....	50
第3章	FBJ 細胞におけるガングリオシド GD1a による肝細胞増殖因子の発現調節.....	51
3.1	緒言.....	51
3.2	実験材料と方法.....	53
3.2.1	細胞培養.....	53
3.2.2	GD1a 添加実験.....	53
3.2.3	<i>Caveolin1</i> siRNA およびトランスフェクション.....	53
3.2.4	<i>Caveolin1</i> 強制発現ベクターの構築および細胞への導入.....	54
3.2.5	RNA 抽出および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応.....	54
3.2.6	Western Blotting.....	55
3.2.7	Wound Healing Assay.....	56
3.2.8	統計的解析.....	56
3.3	実験結果.....	57
3.3.1	siRNA による <i>Caveolin1</i> の発現抑制.....	57
3.3.2	<i>Caveolin1</i> の発現抑制による細胞の遊走能の向上.....	58
3.3.3	<i>Caveolin1</i> の発現抑制による肝細胞増殖因子発現の向上.....	58
3.4	考察.....	63

3.5	結言	64
第4章	FBJ細胞におけるグリコサミノグリカン合成酵素および遊走能解析	65
4.1	緒言	65
4.2	実験方法	67
4.2.1	FBJ細胞のRNAの回収および逆転写反応	67
4.2.2	ポリメラーゼ連鎖反応	68
4.2.3	アガロースゲル電気泳動	68
4.2.4	リアルタイムPCR	69
4.2.5	フローサイトメトリー	70
4.2.6	トランスフェクション	70
4.2.7	Western Blotting	71
4.2.8	WST Assay	71
4.2.9	Wound Healing Assay	72
4.2.10	Transwell Assay	72
4.2.11	統計的解析	73
4.3	結果	74
4.3.1	FBJ細胞におけるGAG鎖合成酵素の発現の比較	74
4.3.2	フローサイトメトリーによるFBJ細胞におけるヘパラン硫酸の発現の比較	75
4.3.3	<i>Ext1</i> siRNA導入によるFBJ細胞に与える影響	76
4.3.4	ヘパラーナーゼとFBJ細胞の遊走能との関連	82
4.4	考察	89
4.5	結言	92
第5章	結論	93
	参考文献	95
	略称一覧	102
	本研究に関する業績	103
	謝辞	105

第1章 序論

1.1 糖鎖とがん転移

糖鎖は核酸、タンパク質につぐ第三の生命鎖と呼ばれ、これはグルコース、ガラクトースなどの単糖同士がグリコシド結合により結合した構造体である。糖鎖はタンパク質や脂質と結合した複合糖質として、様々な生命機能に関与している。特に、細胞—細胞間の相互作用、細胞—基質接着、ウィルス—宿主相互作用において極めて重要な働きをしている[1]。また細胞増殖・分化の制御にも深く関わっており、細胞膜の表面に係留されたヘパラン硫酸はマウス胚の発生過程において FGF シグナルを時空間特異的に活性化する働きを担っている[2, 3]。また、糖鎖はがんの発生や転移にも深く関係していることが数多く報告されている。

がんの怖さはがん細胞がコントロールを失って無制限に増殖することだけではなく、原発巣から他の正常組織に浸潤して、転移することである。如何にがん転移を抑制するかということはがん治療の最も重要な課題で、がん細胞の転移のメカニズムの解明はがんの診断や治療において大変重要な意義を持っている。転移には血行性転移、リンパ行性転移、管腔性転移などがある。がん細胞の転移は基本的に下記の過程から構成されている。

- ①原発巣での増殖
- ②原発巣からのがん細胞の離脱と脈管（血管やリンパ管）への浸潤
- ③脈管内での移動
- ④転移臓器の血管内皮への接着
- ⑤転移臓器への浸潤
- ⑥転移臓器内での増殖

転移は以上のすべての過程が連続的に起こった結果である。また、全ての過程においてがん細胞の免疫監視回避機構の寄与が必要となる[4-6]。

がん細胞が転移する際に糖鎖は重要な役割を果たしている。例えば、血行性転移において血流中のがん細胞が血管内皮と接着する際にセレクチンとそ

の糖鎖リガンドが重要な役割を演じる[7-9]。まず、がん細胞の表面に発現するシアリルルイス X やシアリルルイス a 抗原などの糖鎖と、その受容体である標的臓器の血管内皮細胞上のセレクチン (E-セレクチン、P-セレクチン) との接着が誘導される。それに続いてインテグリン分子を通じて血管へ強く接着する[10]。これらは、がん細胞が原発巣で増殖し、局所での浸潤と血管外脱出を経て転移巣を形成する過程において、重要な作用機序と考えられている[7, 8]。一方、細胞膜表面に発現している酸性糖脂質であるガングリオシドはがん細胞の接着、浸潤、増殖、転移、あるいは悪性度との関連において多数の報告がある。例としてヒトメラノーマ細胞にガングリオシド GD3 を高発現させると、細胞の増殖および浸潤能の亢進が認められている[11]。また、糖脂質生合成の阻害剤である D-PDMP (D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol) で高転移性のルイス肺がん細胞を処理すると、転移性が顕著に抑制される[12]。よって、がん細胞の増殖や転移と糖鎖との相関を調べることは診断や創薬において重要な研究課題である。転移の際に特定の糖鎖の割合が変化することが観察されており[7]、転移のメカニズムの解明につながるとともに、転移のリスクを評価するマーカーとしても有用だと考えられる。

1.2 糖鎖プライマー法

近年、生体内における糖鎖の重要性が示唆され、がんなどの疾患の進行度検査や予後の診断など医療分野での応用が期待されている。糖鎖の構造と機能の研究の為には解析材料として十分な量を獲得し、それらを精製する必要がある。しかし糖鎖は分岐構造を持ち、化学的な合成によって様々な天然型の糖鎖を入手する事は難しい。また、複合糖質における糖鎖は細胞含有量がタンパク質と比べると非常に少なく、マイナーな成分を天然から抽出して獲得するためには大量の供給源と高度な抽出・精製技術が必要となる。

そのような問題を解決するために、細胞に機能性オリゴ糖を作らせる糖鎖プライマー法が開発された。これは細胞の糖質生合成経路に基づいて、糖転移酵素の基質のアナログである糖鎖プライマーを培養細胞に投与し、細胞内に存在する糖転移酵素や糖ヌクレオチドを用いてオリゴ糖鎖を作らせ、その後細胞

外へ分泌されることを利用して糖鎖を得る方法である。生体内において、スフィンゴ糖脂質の生合成では、前駆体であるグルコシルセラミドがまず合成される。そして、ゴルジ体に存在する糖転移酵素の作用によって単糖が順次付加され、最終的に細胞表面への提示に至る。このような細胞の糖鎖生合成機能を利用して人工的に機能性のオリゴ糖鎖を得るために、糖脂質生合成の前駆体を模倣して設計された糖鎖プライマーが用いられている (Fig. 1-1)。糖鎖プライマーは細胞に取り込まれる必要があるため、細胞膜を出入りするためには両親媒性でなければならない、さらに糖転移酵素の基質となる必要がある[13]。

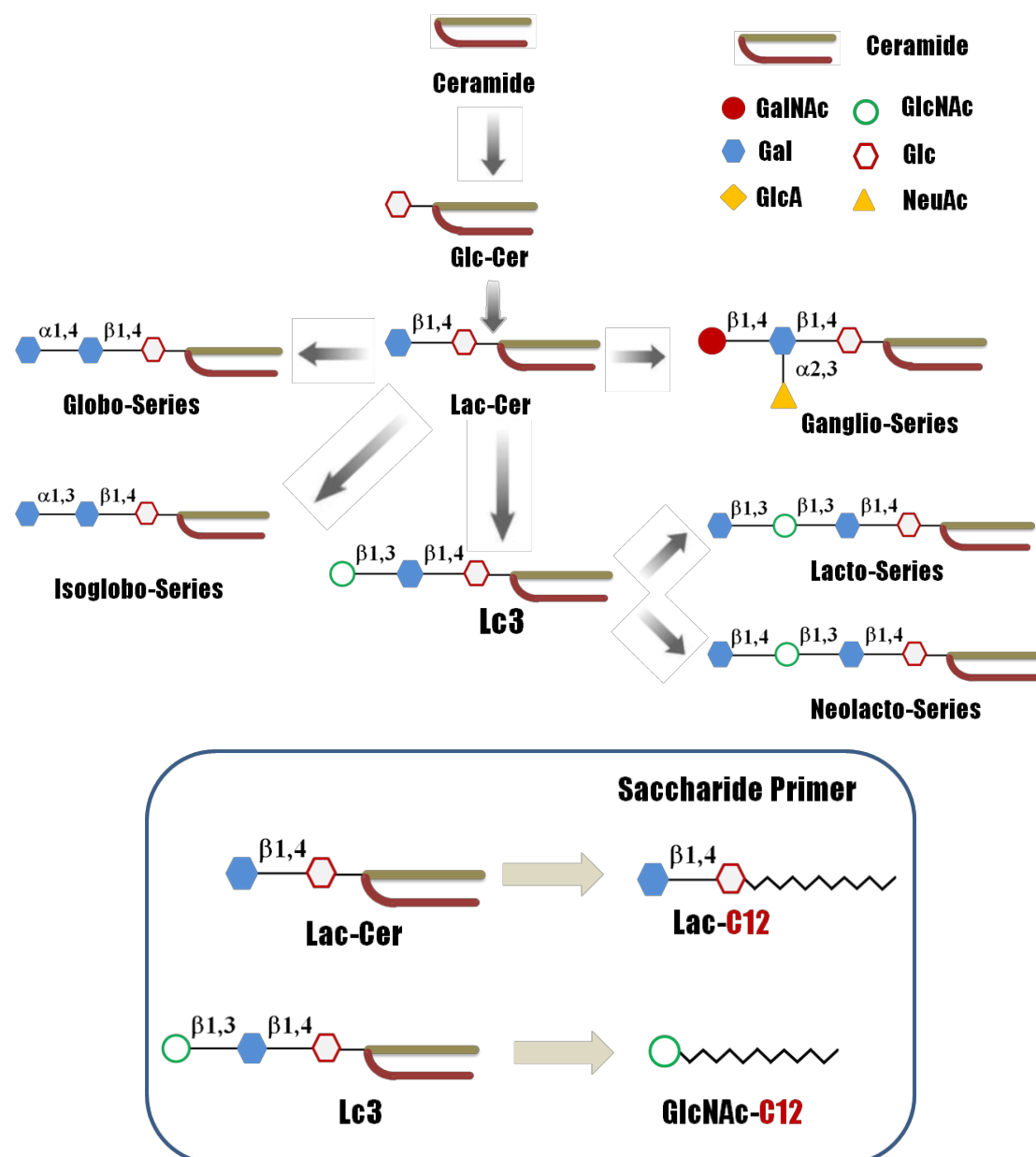


Fig. 1-1 糖脂質の生合成経路および糖鎖プライマーの設計

1996年に Miura らは、糖脂質の分野においてラクトシルセラミドがほとんど全てのスフィンゴ糖脂質の生合成前駆体である事に注目し、両親媒性のラクトシルセラミド誘導体を合成して培養細胞に投与した。その結果、誘導体は細胞内において糖転移され、細胞外へと放出される事を見出した[14]。この考えに基づき、スフィンゴ糖脂質生合成経路の前駆体であるラクトシルセラミドを模倣して、親水部にラクトース、疎水部にアルキル鎖を持つラクトース型糖鎖プライマーが設計された (Fig. 1-1)。これを B16 細胞[15]、PC12 細胞[16]、および COS-7 細胞などに投与することで、それぞれの細胞において特異的に発現しているガングリオ系列等の糖鎖に相当する糖鎖伸長生成物が得られている。また、ラクト系列およびネオラクト系列のスフィンゴ糖脂質生合成経路は、ラクトシルセラミドに *N*-アセチルグルコサミンが結合した構造が起点となっている。これに基づき、*N*-アセチルグルコサミンにアルキル鎖を結合させた糖鎖プライマーが合成された (Fig. 1-1)。これを B16 細胞および HL60 細胞に投与して得られた糖鎖伸長生成物の構造解析が既に行われている[17]。さらに糖脂質型の糖鎖だけではなく、糖タンパク質型糖鎖を糖鎖プライマーで得るための検討も行われている。アミノ酸結合型糖鎖プライマーとして合成された GalNAc-Thr-C12 (Fig. 1-2)は糖タンパク質の *O*-結合型糖鎖を模倣している。本研究では、グリコサミノグリカン(GAG)の基幹構造に基づいて設計された *N*^α-Lauryl-*O*-(β-D-xylopyransyl)-L-serinamide (Xyl-Ser-C12、Fig. 1-2) を用いた。糖鎖プライマーの種類と細胞の種類を変えることで、細胞に発現する様々な糖鎖の合成による糖鎖ライブラリーの構築が可能となる。さらに各々の細胞に固有の糖鎖生合成経路のモニタリングおよび糖鎖の機能解析に貢献すると考えられる。

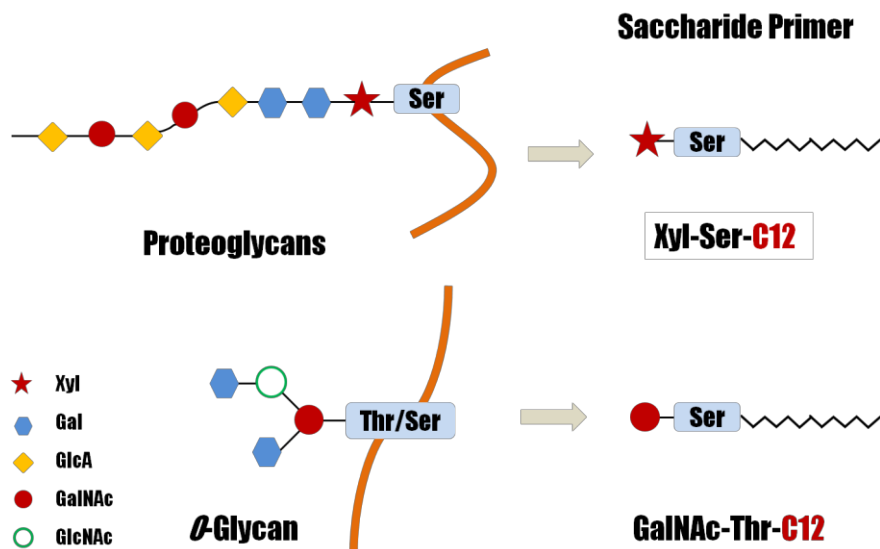


Fig. 1-2 本研究で用いた他の糖鎖プライマー

1.3 マウス骨肉腫 FBJ 細胞について

FBJ ウイルスにより C57 Black マウスに引き起こされた骨肉腫から転移性の高い細胞 FBJ-LL 細胞と低い細胞 FBJ-S1 細胞が単離されている[18]。この二種類の転移性の異なった細胞に着目し、細胞からそれぞれの糖脂質を抽出して分析したところ、単純なガングリオシドである GM3 は両者でともに発現しているのに対し、より複雑な GD1a (Fig. 1-3) は低転移性 FBJ-S1 細胞では高発現しているが、高転移性 FBJ-LL 細胞には殆どないことが見出された。GD1a を持たない高転移性 FBJ-LL 細胞を GD1a であらかじめ 24 時間処理すると、細胞外基質への接着や遊走能などが低転移性 FBJ-S1 細胞に近づいた[19]。そして、高転移性 FBJ-LL 細胞に GM2/GD2 合成酵素(β 1,4-GalNAcT)の遺伝子をトランスフェクトして、GD1a を発現する細胞 (LA5-30 細胞) が作製され、ガングリオシド発現の効果が調べられた。このトランスフェクタントの細胞運動能は、コントロールベクターが導入された細胞 (M5 細胞) と比べ、GD1a の発現が増すほど低下していた。またビトロネクチンとの接着も GD1a の発現が増すほど低下しており、GD1a を添加した実験と一致していた。このようにして作ったトランスフェクタントをマウスの大腿部に移植して、細胞の転移能を評価すると、コントロールの細胞 (M5 細胞) を注入した場合に、4-5 週間後に

は移植した腫瘍のほかに肝臓や肺に転移像が多数観察されていた。しかし、GD1aを高発現するようになったトランスフェクタント (LA5-30) を移植した大腿部ではコントロールと同じ大きさの腫瘍が出来ていたが、転移が見られなかった。このように、GD1aががん細胞の運動性、細胞外基質への接着性だけではなく、がん細胞の転移性も制御していることが明らかになっている[19-24]。

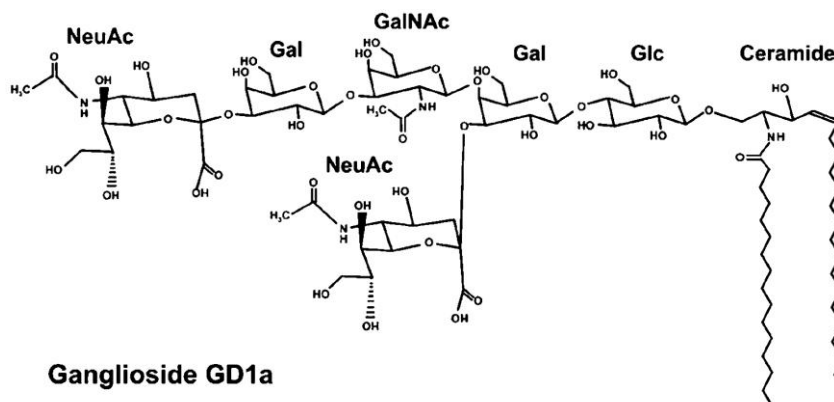


Fig. 1-3 ガングリオシド GD1a の構造[25]

1.4 本研究の目的と方針

マウス FBJ 骨肉腫細胞の転移性の制御因子として糖鎖が注目されているが、転移に関わる糖鎖の解析および糖鎖が関与する転移のメカニズムは十分には解明されていない。そこで本研究では、糖鎖プライマー法を用いて、転移性の異なる FBJ 細胞における発現糖鎖の比較解析を実施した。得られた結果を基にして、ガングリオシド GD1a やグリコサミノグリカン鎖が細胞の遊走性に与える影響を解析することで、骨肉腫細胞が転移性を獲得する分子機構の解明を目指した。

本論文は、本章を含め、合わせて5章で構成されている。

第2章では、糖鎖プライマーとして GalNAc-Thr-C12、GlcNAc-C12、Lac-C12、Xyl-Ser-C12 をマウス骨肉腫 FBJ 細胞に投与し、得られた糖鎖伸長生成物の構造解析を行った。低転移性の FBJ-S1 細胞と高転移性の FBJ-LL 細胞間での糖鎖プライマー由来の生成物の比較解析を行った。

第2章では、ガングリオシド GD1a が FBJ 細胞の転移性を制御するシグナル伝達経路として、Caveolin1 や、肝細胞増殖因子 HGF の関与について検討した。

第4章では、第2章で検討した FBJ 細胞における Xyl-Ser-C12 由来の生成物の構造解析および比較解析に基づいて、グリコサミノグリカンの生合成に関与する糖転移酵素および分解酵素の発現と細胞遊走能の関連性について検討した。

第5章では、結論として、以上の知見を総括した。

第2章 FBJ 細胞における糖鎖プライマー法による糖鎖伸長生成物の構造解析

2.1 緒言

先行研究において転移性の異なったマウス骨肉腫 FBJ-S1 細胞と FBJ-LL 細胞において、酸性糖脂質ガングリオシドの一種である GD1a の発現量が顕著に高く、GD1a が FBJ 細胞の転移の制御において重要な役割を果たしていることが明らかになってきた[19]。一方で、転移に関与する糖鎖には多様性があると考えられる。マウス FBJ 骨肉腫細胞の転移性の制御因子として糖鎖が注目されているが、転移に関わる糖鎖の解析は十分には行われていない。そこで、糖鎖プライマー法を用いて、転移性の異なる FBJ 細胞における発現糖鎖の比較解析を実施した。得られた結果を基にして、ガングリオシド GD1a やグリコサミノグリカン鎖が細胞の遊走性に与える影響を解析することで、骨肉腫細胞が転移性を獲得する分子機構の解明を目指した。

本章では、FBJ 細胞において、細胞の転移に関与する糖鎖を見出すために、糖鎖プライマーである *N*^α-lauryl-*O*-(2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threoninamide (以後 GalNAc-Thr-C12)、dodecyl β -lactoside (以後 Lac-C12)、dodecyl-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (以後 GlcNAc-C12)、および *N*^α-lauryl-*O*-(β -D-xylopyranosyl)-L-serinamide (以後 Xyl-Ser-C12)を使用して得られる糖鎖伸長生成物の構造解析を LC-MS および糖加水分解酵素処理により行った。また、転移性の異なる細胞株間で内在性糖脂質の種類と発現の割合を比較することで、転移性と糖鎖との関係について検討した。

2.2 実験方法および材料

2.2.1 細胞培養

FBJ-S1 細胞と FBJ-LL 細胞の培養は、非働化した 10%ウシ胎児血清 fetal bovine serum (FBS) (04-001-1A、BIOLOGICAL INDUSTRIES)、ペニシリン G カリウム 5 万 unit/mL (28-0008、明治製菓)、およびストレプトマイシン 100 g/L (32204-92、nacalai)を含有させた RPMI-1640 (30264-14、nacalai)を培地として用い、37 °C、5% CO₂、95% air 下の無菌恒温槽で培養した。

細胞の継代は 100 mm ディッシュ (3020-100、IWAKI)を用いて行った。細胞を継代する際は、培地を吸引除去した後、PBS (-) 溶液を加えて細胞表面を洗い、トリプシン/EDTA 溶液 (0.05% トリプシン、0.02% EDTA 入りの PBS (-) 溶液) (35544-81、nacalai)を加えて細胞をディッシュから剥離した。FBJ 細胞の細胞浮遊液をトリプシン溶液の 2 倍量の RPMI-1640 培地(10% FBS 含有)に懸濁してトリプシンを不活性化させた。4 °C、1000 rpm で 5 分間遠心分離をして、上清を取り除いてから新しい培地に適当な濃度で播種した。

2.2.2 糖鎖プライマー法

本研究では、糖鎖プライマーとして GalNAc-Thr-C12、Lac-C12、GlcNAc-C12 および Xyl-Ser-C12 は当研究室の合成品を用いた。糖鎖プライマー溶液は、それぞれの糖鎖プライマーは 50 mM になるように dimethyl sulfoxide (DMSO) (D2650、SIGMA) に溶解させ、0.22 μm メンブレンフィルター (MILLIPORE) を用いて滅菌した。その後、バイアルに入れて-20 °C で保存した。糖鎖伸長反応の操作は以下のように行った。トリパンブルー染色により、生細胞数を計測し、10% FBS 含有 RPMI-1640 培地で 2.0×10^6 個の細胞数になるように調整して、播種した。これを 15~17 時間培養して細胞を接着させた。その後、PBS(-) 、1% Insulin-Transferrin-Selenium-A Supplement (ITSA) (51300-044、GIBCO)を含有した RPMI-1640 培地 (11835-055、GIBCO)を用いて細胞を洗浄し、それぞれの

糖鎖プライマー含有の RPMI-1640 培地を 5 mL 加えた。これを 48 時間インキュベーションすることで細胞と糖鎖プライマーを相互作用させた。

2.2.3 糖鎖伸長生成物の回収と精製

糖鎖プライマーを細胞に投与してから 48 時間後、氷冷することで反応を停止した。ディッシュ内に PBS (-) 3 mL を加えてセルスクレイパーで細胞を剥がし、細胞懸濁液を 15 mL チューブに回収した。この操作をもう一度繰り返した。得られた細胞懸濁液を 1,000 rpm、4 °C で 5 分間遠心分離して、上清のみを別の 15 mL チューブに移した。この上清を培地画分とした。沈澱した細胞に PBS (-) 500 μ L を加えて懸濁し、タンパク質定量用に 50 μ L を分取した。残った細胞懸濁液を 1,000 rpm、4 °C で 5 分間遠心分離した。上清を培地画分として回収し、残った沈澱を細胞画分とした。

培地画分から Sep-Pak C18 カラム (WAT023035, Waters) を用いて糖鎖伸長生成物を抽出した。まず、10 mL シリンジを用いて Sep-Pak C18 カラムにメタノール 10 mL を流して、カラムを活性化した。続いて水 10 mL を流して、カラムを平衡化した。ここに回収した培地画分を二度流し、生成物をカラムに吸着させた。水 10 mL を流して脱塩処理した後、メタノール 5 mL を流して生成物をカラムから抽出した。これを 15 mL チューブに回収して、遠心エバポレーターを用いて溶媒を減圧留去した。減圧留去後は 4 °C で保存した。培地画分から抽出した糖鎖伸長生成物は、さらにアミノプロピルカラム DSC-NH2 (52635-U, SUPELCO) を用いて酸性成分と中性成分に分離した。始めに、カラムをクロロホルムに浸けた状態で真空にし、カラム内の脱気を行った。続いて 1 mL シリンジを用いてカラムにクロロホルム 1 mL を 2 回流することで、カラムを活性化および平衡化処理した。培地画分から抽出した糖鎖伸長生成物をメタノール 50 μ L に溶解し、さらにこれをクロロホルム 950 μ L に溶解して全量をカラムに流した。この操作を二度繰り返し、生成物をカラムに吸着させた。その後、クロロホルム 1 mL を二度流してカラム内の不純物を除去した。そして、メタノール 1 mL を二度流して生成物中の中性成分を抽出した。最後に、メタ

ノール／酢酸／トリエチルアミン (TEA) = 93/3/4 (v/v/v) 1 mL を二度流して生成物中の酸性成分を抽出した。それぞれの抽出溶液はガラス製チューブに回収し、遠心エバポレーターを用いて減圧留去して、4 °C で保存した。

2.2.4 内在性糖脂質の抽出と精製

2.2.3 と同様にディッシュより細胞懸濁液を回収し、1,000 rpm、4 °C で5 分間遠心分離して上清を除去した。沈殿した細胞に PBS (-) 500 μ L を加えて懸濁させ、タンパク質定量用に 50 μ L を分取した。残った細胞懸濁液を 1,000 rpm、4 °C で5 分間遠心分離し、上清を除去した。

沈殿した細胞画分に、クロロホルム／メタノール = 2/1 (v/v) を 1 mL 加えて 30 分間超音波で処理した。これを 15,000 rpm、4 °C で 20 分間遠心分離し、上清に含まれる糖脂質を回収した。続いて、クロロホルム／2-プロパノール／水 = 7/11/2 (v/v/v) を 1 mL 加えて同様に超音波処理および遠心分離処理を行い、上清に含まれるリン脂質を回収した。回収後、ヒートブロックを用いて 60 °C にて溶媒を揮発させ、4 °C で保存した。なお、上記の溶媒は全てスペクトル測定用の純度の試薬を用いた。

抽出した内在性糖脂質は、まずアミノプロピルカラム DSC-NH2 (52367-U, SUPELCO) によって酸性成分と中性成分に分離した。基本的な操作は 2.2.3 と同様に行った。なお、各操作に用いた液量を糖鎖伸長生成物の場合の 2 倍 (2 mL) にして行った。

減圧留去して得られた中性成分からのリン脂質の除去はアルカリ分解処理により行った。分離後の中性成分にクロロホルム／メタノール = 2/1 (v/v) 1 mL を加えてよく溶解させた。ここに、予め調製しておいた 2 M 水酸化カリウム／メタノール 200 μ L を加えて軽く攪拌した。これを、振盪培養機 (BioShaker BR-13UM, TAITEC) を用いて 37 °C で 3 時間振盪させた。3 時間後、白い沈殿ができていることを確認し、1,000 g、4 °C で 15 分間遠心分離した。分離後、上清のみを別のガラス製チューブに移し、これを遠心エバポレーターで減圧留去した。乾燥したサンプルは 4 °C で保存した。

酸性成分およびアルカリ分解後の中性成分から、さらに Sep-Pak C18 カラム (WAT023035, Waters) を用いて糖脂質を抽出した。基本的な操作は 2.2.3 と同様に行った。サンプルの溶出は、メタノール 100 μ L および水 10 mL で行った。

2.2.5 タンパク質の定量

タンパク質の定量方法は Lowry 法のスタンダードアッセイに従った。キットは BIO-RAD 社の DC protein assay キットを用いた。標準物質には bovine serum albumin (BSA) を、界面活性剤には sodium dodecyl sulfate (SDS) を用いた。試料は 96 well マイクロプレート (IWAKI) に分注した。各ウェルに Reagent S/Reagent A = 1/50 (v/v) 25 μ L ずつ加えておき、予め段階希釈して調製した 2.0 mg/mL、1.0 mg/mL、0.5 mg/mL、0.25 mg/mL、0.125 mg/mL、0.0625 mg/mL、および 0.03125 mg/mL の BSA/PBS (-) を 5 μ L/well で分注した。試料 (2.2.3 と 2.2.4 で得られた細胞懸濁液) も 5 μ L/well で分注した。最後に Reagent B を 200 μ L/well を添加し、室温で 20 分間遮光した。マイクロプレートリーダー (Multiskan MS, Labsystems) を用いて測定波長 690 nm で吸光度を測定した。BSA 標準品の濃度と吸光度より検量線を作成し、各試料中のタンパク質量を算出した。標準物質および試料の測定はそれぞれ n=4 で行った。

2.2.6 高速液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC-MS/MS)

本研究で使用する LC-MS/MS オンラインシステムは、高速液体クロマトグラフィー Agilent 1100 series LC system (LC) と、エレクトロスプレーイオン化法/イオントラップ質量分析装置 (ESI-IT-MS) Esquire 3000 plus および両者を接続したインターフェイス部分で構成されている。アミノカラムによって分離した脂質の酸性成分と中性成分を、順相カラム (imtakt UK-silica, 150 mm \times 2 mm) を装着した HPLC により分離した。固定相のカラムにはシリカゲルを、移動相には有機溶媒系と水系との混合溶媒を用いた。溶媒の組成を時間と共に変化させることで移動相の極性を上げ、試料を溶出した。溶媒の組成の時間変化を Fig. 2-1

に示した。また、分離条件を以下にまとめた。

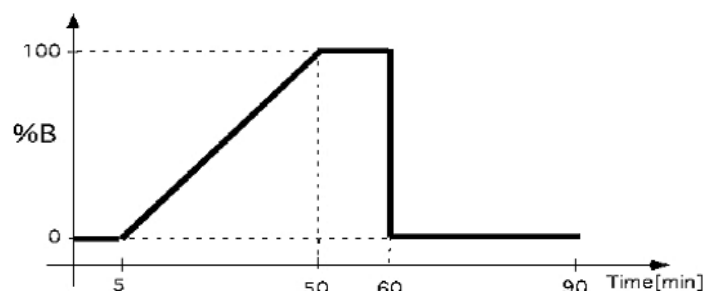


Fig. 2-1 HPLC の溶出グラジエント

[HPLC における分離条件]

移動相 A: クロロホルム/メタノール/50 mM 酢酸—トリエチルアミン水溶液 (pH 4.2) = 83/16/1, 移動相 B: メタノール/50 mM 酢酸—トリエチルアミン水溶液 (pH 4.2) = 3/1, 流速: 0.1 mL/min, injection: 5 μ L

[ESI-IT-MS による分析条件]

測定モード: negative ion mode, scan range : m/z = 100~2500

target mass: m/z = 800

移動相を調製する際、使用した 50 mM AcOH-TEA 水溶液 (pH 4.2)は、予め水 100 mL の入ったフラスコに酢酸 0.855 mL を加えて溶解させた。そして TEA を滴下して pH 4.2 になったことを確認し水を加えて 300 mL になるように調製した。Fig. 2-1 に示した通り、HPLC における溶出グラジエントは移動相 B の割合を 45 分間で 100%になるように設定した。解析の際は、サンプルに移動相 A を加えて測定に用いた。測定後、対象の m/z の値における extract ion chromatography (以後、EIC)を作成した。ピーク面積は Compound list の値を参照した。さらにこの値はタンパク質 1 mg 当たりで補正して細胞間で比較した。

2.2.7 糖加水分解酵素処理

アミノプロピルカラムによって分離した糖鎖伸長生成物の中性成分また酸性成分をメタノールに溶解して所定量に分注し、60 °C のヒートブロック上でメタノールを揮発させた。その後、種々の糖加水分解酵素を以下述べる条件で反応させ、LC-MS/MS によって生成物のピーク面積の変化を確認した。それぞれの反応条件を以下に示した。

β-ガラクトシダーゼ (β-galactosidase)

サンプルの入ったチューブに Table 2-1 の組成で β-ガラクトシダーゼ (072-04141、Wako、E.C. 3.2.1.23) 等の各試薬を加えて、55 °C で 16 時間反応させた。反応後、水 10 mL を加えて反応を止め、Sep-Pak C18 カラムによって精製してから LC-MS/MS によって酵素反応に関与する成分のピーク強度の増減を測定した。なお、コントロールとして Lac-C12 を用いた。

Table 2-1 β-ガラクトシダーゼの反応条件 (55 °C、16 時間)

溶液	使用量 (μL)	
	β-galactosidase (-)	β-galactosidase (+)
0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)	250	250
3.36 M mercaptoethanol aq.	10	10
30 mM MgCl ₂ aq.	10	10
50 mM phosphate buffer (pH 7.3)/ 1 mM MgCl ₂	50	–
β-galactosidase (1 U/mL)	–	50
合計	320	320

α2,3-ノイラミニダーゼ (α2,3-neuraminidase)

サンプルの入ったチューブに Table 2-2 の組成で α2,3-ノイラミニダーゼ (N7271、SIGMA、E.C. 3.2.1.1.8) 等の各試薬を加えて、37 °C で 16 時間反応させた。反応後、水 10 mL を加えて反応を止め、Sep-Pak C18 カラムで精製してから LC-MS/MS によって酵素反応に関与する成分のピーク強度を測定した。なお、コントロールとして GM3 を用いた。

Table 2-2 α 2,3-ノイラミニダーゼの反応条件 (37 °C、16 時間)

溶液	使用量 (μ L)	
	neuraminidase (-)	neuraminidase (+)
0.25 M sodium phosphate buffer (pH 6.0)	4	4
α 2,3-Neuraminidase	–	2
water	16	14
合計	20	20

 β -グルクロニダーゼ (β -glucuronidase)

サンプルの入ったチューブに Table 2-3 の組成で β -グルクロニダーゼ (075-04631、Wako、E.C. 3.2.1.31) 等の各試薬を加えて、25 °C で2 時間反応させた。反応後、Sep-Pak C18 カラムによって精製してから LC-MS/MS によって酵素反応に参与する成分のピーク強度を測定した。

Table 2-3 β -グルクロニダーゼ(β -GlcUAase)の反応条件 (25 °C、2 時間)

溶液	使用量	
	β -GlcUAase (-)	β -GlcUAase (+)
20 mM phosphate buffer (pH 6.5)/10 mM mercaptoethanol	1.5 mL	–
100 mU β -GlcUAase	–	1.5 mL
合計	1.5 mL	1.5 mL

 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ (β -N-acetylhexosaminidase)

サンプルの入ったチューブに Table 2-4 の組成で β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ (100094、生化学バイオビジネス、E.C. 3.2.1.52)等の各試薬を加えて、37 °C で6 時間反応させた。反応後、水 10 mL を加えて反応を止め、Sep-Pak C18 カラムによって精製してから LC-MS/MS によって酵素反応に参与する成分のピーク強度を測定した。なお、コントロールとして GlcNAc-C12 を用いた。

Table 2-4 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ(β -HexNAcase)の反応条件 (37 °C、24 時間)

溶液	使用量 (μ L)	
	β -HexNAcase (-)	β -HexNAcase (+)
50 mM sodium citrate buffer (pH 5.0)	200	200
100 mU β -HexNAcase	100	–
0.1% BSA	–	100
合計	300	300

α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (α -N-acetylgalactosaminidase)

サンプルの入ったチューブに Table 2-5 の組成で α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (100086、生化学バイオビジネス、E.C. 3.2.1.30) 等の各試薬を加えて、37 °C で 24 時間反応させた。反応後、水 10 mL を加えて反応を止め、Sep-Pak C18 カラムによって精製してから LC-MS/MS によって酵素反応に参与する成分のピーク強度を測定した。なお、コントロールとして、GalNAc-Thr-C12 を用いた。

Table 2-5 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ(α -N-GalNAcase)の反応条件 (37 °C、24 時間)

溶液	使用量 (μ L)	
	α -GalNAcase (-)	α -GalNAcase (+)
50 mM sodium citrate buffer (pH 4.3)	50	50
100 mU α -GalNAcase	–	10
0.1% BSA	10	–
合計	60	60

ヘパリチナーゼ (heparitinase)

サンプルの入ったチューブに Table 2-6 の組成でヘパリチナーゼ (生化学バイオビジネス、E.C. 4.2.2.8) 等の各試薬を加えて、37 °C で 24 時間反応させた。反応後、水 10 mL を加えて反応を止め、Sep-Pak C18 カラムによって精製してから LC-MS/MS によって酵素反応に参与する成分のピーク強度を測定した。

Table 2-6 ヘパリチナーゼ(HSase)の反応条件 (37 °C、24 時間)

溶液	使用量 (μ L)	
	HSase (-)	HSase (+)
0.1 M sodium acetate buffer (pH7.0)	100	100
10 mM calcium acetate 水溶液	100	100
0.1% BSA	10	–
1 mU heparitinase	–	10
合計	210	210

2.3 結果

2.3.1 GalNAc-Thr-C12 由来の糖鎖伸長生成物の比較解析

2.3.1.1 FBJ-S1 細胞で作られた GalNAc-Thr-C12 由来の糖鎖伸長生成物の解析

まずFBJ-S1細胞に対してGalNAc-Thr-C12を投与して得られた糖鎖伸長生成物について、それぞれの extract ion chromatography (EIC)と、それに対応するMSスペクトルをFig. 2-2に示した。EICではそれぞれの質量電荷比の値に相当するピークを表示している。また、これらの生成物におけるMSのデータをTable 2-7に示す。個々の生成物におけるMS/MSスペクトルの帰属はTable 2-8に示した。図中の矢印は生成物のピークであることを示している。また、表中の構造はMS/MSスペクトルによって推定した。Fig. 2-2とTable 2-7に示したように、FBJ-S1細胞において、 m/z 793.8 (sTn抗原型)、 m/z 955.7 (sialylT抗原型)、 m/z 624.0 (disialyl T抗原型)、 m/z 725.1、および m/z 805.7の5種類の酸性の糖鎖伸長生成物が検出された。

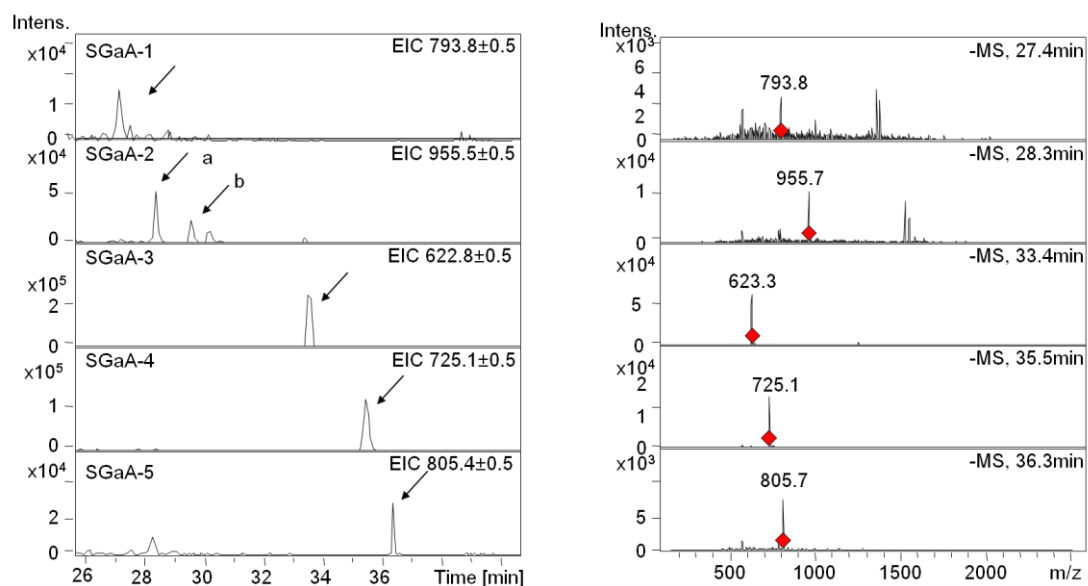


Fig. 2-2 FBJ-S1 細胞に作らせた GalNAc-Thr-C12 酸性生成物の LC/MS
左 : extract ion chromatogram (EIC)、右 : MS スペクトル

Table 2-7 FBJ-S1 細胞に作らせた GalNAc-Thr-C12 由来の糖鎖生成物の解析結果

名称	構造 (P: Primer)	価数	m/z		Ion Type	R.T. (min)	Relative Area
			測定値	理論値			
SGaA-1	NeuAc-P	1	793.8	793.8	[M-H] ⁻	27.4	2,377,178
SGaA-2a	NeuAc-Hex-P	1	955.7	955.5	[M-H] ⁻	28.4	5,842,525
SGaA-2b	NeuAc-(Hex-)P	1	955.7	955.5	[M-H] ⁻	30.1	3,018,021
SGaA-3	NeuAc-Hex-(NeuAc)-P	2	623.3	622.8	[M-2H] ²⁻	33.4	43,495,446
SGaA-4	NeuAc-Hex-(NeuAc-HexNAc)-P	2	725.1	724.3	[M-2H] ²⁻	35.5	24,135,060
SGaA-5	NeuAc-Hex-(NeuAc-Hex-HexNAc)-P	2	805.7	805.4	[M-2H] ²⁻	36.3	3,164,900

protein amount: 0.123 mg, Relative Area=area/protein amount, R.T.; retention time

Table 2-8 GalNAc-Thr-C12 由来の糖鎖生成物の MS/MS スペクトル帰属

Product	Fragments
SGaA-1	511.0 ([C ₂ -H] ⁻), 290.1 ([B ₁ -H] ⁻)
SGaA-2	665.1 ([Y ₂ -H] ⁻), 452.7 ([B ₂ -H] ⁻), 290.0 ([B ₁ -H] ⁻)
SGaA-3	956.5 ([Y _{2α} -H] ⁻), 956.5 ([Y _{1β} -H] ⁻), 793.5 ([Z _{1α} -H] ⁻), 451.9 ([C ₂ -H] ⁻), 289.7 ([B ₁ -H] ⁻)
SGaA-4	1158.1 ([Y _{2α} -H] ⁻), 955.3 ([Y _{1β} -H] ⁻), 867.3 ([Y _{2α} , Y _{2β} -H] ⁻), 493.2 ([B _{2β} -H] ⁻), 289.7 ([B ₁ -H] ⁻)
SGaA-5	1320.3 ([Y _{2β} -H] ⁻), 1158.9 ([Y _{2α} -H] ⁻), 1020.4 ([Y _{3α} , Y _{2β} -H] ⁻), 858.3 ([Y _{1β} , C ₄ -H] ⁻), 671.3 ([C _{3α} -H] ⁻), 289.9 ([B ₁ -H] ⁻)

2.3.1.2 FBJ-LL 細胞で作られた GalNAc-Thr-C12 由来の糖鎖生成物の解析

FBJ-LL 細胞に対して GalNAc-Thr-C12 を投与して得られた糖鎖伸長生成物について、それぞれの EIC と、それに対応する MS スペクトルを Fig. 2-3 に示した。EIC ではそれぞれの質量電荷比の値に相当するピークを表示している。また、これらの生成物における MS のデータを Table 2-9 に示した。また、表中の推定構造は MS/MS スペクトルによって帰属した。FBJ-LL 細胞における GalNAc-Thr-C12 由来の糖鎖生成物は4種類確認できた。FBJ-S1 細胞と同様に、中性糖は検出されなかった。細胞株間での具体的な比較に関しては後述する。

Table 2-9 FBJ-LL 細胞に作らせた GalNAc-Thr-C12 由来の糖鎖生成物の解析結果

名称	構造 (P: Primer)	価数	m/z		Ion Type	R.T. (min)	Relative Area
			測定値	理論値			
LGaA-1	NeuAc-P	1	794.0	793.8	[M-H] ⁻	27.1	1,582,967
LGaA-2a	NeuAc-Hex-P	1	955.6	955.5	[M-H] ⁻	28.1	12,756,036
LGaA-2b	NeuAc-(Hex-)P	1	955.6	955.5	[M-H] ⁻	29.9	3,116,893
LGaA-3	NeuAc-Hex-(NeuAc)-P	2	623.5	622.8	[M-2H] ²⁻	33.5	59,494,579
LGaA-4	NeuAc-Hex-(NeuAc-Hex-HexNAc)-P	2	805.7	805.4	[M-2H] ²⁻	36.4	18,350,933

protein amount: 0.116 mg, Relative Area=area/protein amount, R.T.; retention time

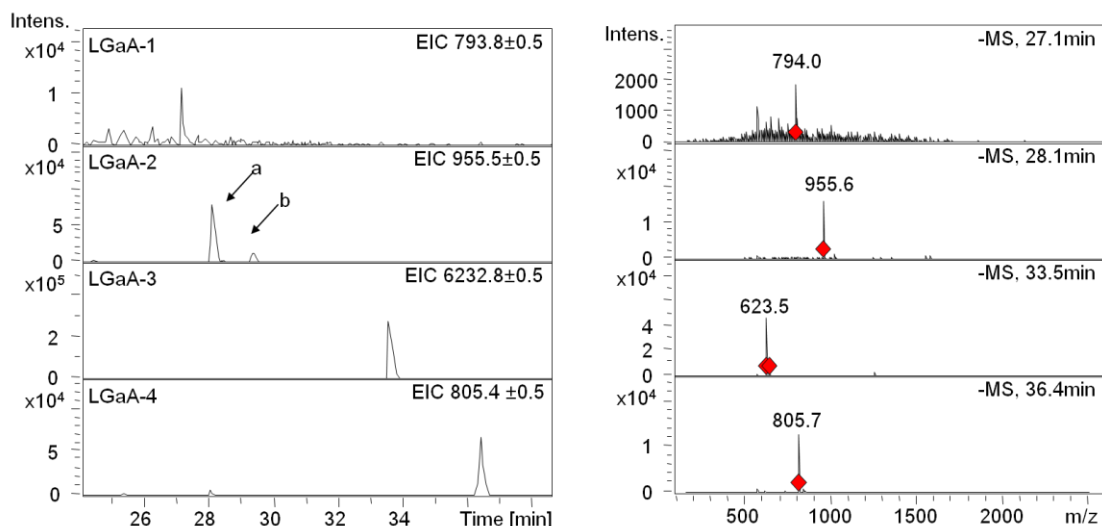


Fig. 2-3 FBJ-LL 細胞に作らせた GalNAc-Thr-C12 酸性生成物の LC/MS

左：extract ion chromatogram (EIC)、右：MS スペクトル

2.3.1.3 GalNAc-Thr-C12 由来の糖鎖伸長生成物の両細胞間での比較

FBJ-S1 細胞と FBJ-LL 細胞に GalNAc-Thr-C12 糖鎖プライマーを投与して得られた糖鎖伸長生成物の結果 (Table 2-7 と Table 2-9) を元にして、総生成量に対する各生成物の割合を Table 2-10 にまとめた。

高転移性の FBJ-LL 細胞において、NeuAc-Hex-(NeuAc-HexNAc)-P は検出されなかった。NeuAc-Hex-P と NeuAc-Hex-(NeuAc-Hex-HexNAc)-P の発現量が低転移性の FBJ-S1 細胞より増加していた。

Table 2-10 GalNAc-Thr-C12 由来の糖鎖生成物の比較

Products (P:GalNAc-Thr- C12)		Percentage (%)	
		FBJ-S1 (低転移性)	FBJ-LL (高転移性)
NeuAc-P	sialyl Tn型	2.8	3.4
NeuAc-Hex-P	sialyl T型	6.6	17.9
NeuAc-Hex-(NeuAc)-P	disialyl T型	57.8	63.5
NeuAc-Hex-(NeuAc-HexNAc)-P	Core2	27.4	—
NeuAc-Hex-(NeuAc-Hex-HexNAc)-P		5.5	15.2

2.3.2 GlcNAc-C12 由来の糖鎖伸長生成物の比較解析

2.3.2.1 FBJ-S1 細胞で作られた GlcNAc-C12 由来の糖鎖生成物の解析

FBJ-S1 細胞に対して GlcNAc-C12 を投与して得られた糖鎖伸長生成物について、それぞれの EIC と、それに対応する MS スペクトルを Fig. 2-4 (中性糖) と Fig. 2-5 (酸性糖) に示した。EIC ではそれぞれの質量電荷比の値に相当するピークを表示している。また、これらの生成物における MS のデータを Table 2-11 (中性糖) と Table 2-12 (酸性糖) に示した。個々の生成物における MS/MS スペクトルの解析結果は Table 2-13 に示した。また、表中の推定構造は MS/MS スペクトルによって帰属した。Fig. 2-4 において、中性糖は塩素イオンが付加したイオン種として検出された。

LC-MS により、FBJ-S1 細胞において、GlcNAc-C12 由来の中性糖鎖生成物は 6 種類検出され、酸性生成物は 7 種類の検出された。糖脂質の生合成経路によって、SGIN-5 はフォルスマン抗原型、SGIN-6 は iGb4 型だと考えられる。

Table 2-11 FBJ-S1 細胞に作らせた GlcNAc-C12 由来の中性糖鎖生成物の解析結果

名称	構造	価数	m/z		Ion Type	R.T. (min)	Relative Area
			測定値	理論値			
Primer	—	1	424.6	424.2	[M+Cl] ⁻	6.1	1,142,285,183
SGIN-1	Hex-P	1	586.8	586.3	[M+Cl] ⁻	16.3	2,900,397,707
SGIN-2	HexNAc-P	1	627.4	627.3	[M+Cl] ⁻	18.1	89,337,467
SGIN-3	Hex-Hex-P	1	748.9	748.4	[M+Cl] ⁻	23.3	4,698,491,569
SGIN-4	HexNAc-Hex-Hex-P	1	951.8	951.4	[M+Cl] ⁻	26.8	5,242,095,210
SGIN-5	HexNAc-HexNAc-Hex-Hex-P	1	1154.6	1154.5	[M+Cl] ⁻	30.4	10,155,566
SGIN-6	HexNAc-Hex-Hex-Hex-P	1	1113.6	1316.6	[M+Cl] ⁻	29.6	8,319,892

protein amount: 0.123 mg, Relative Area=area/protein amount, R.T.; retention time

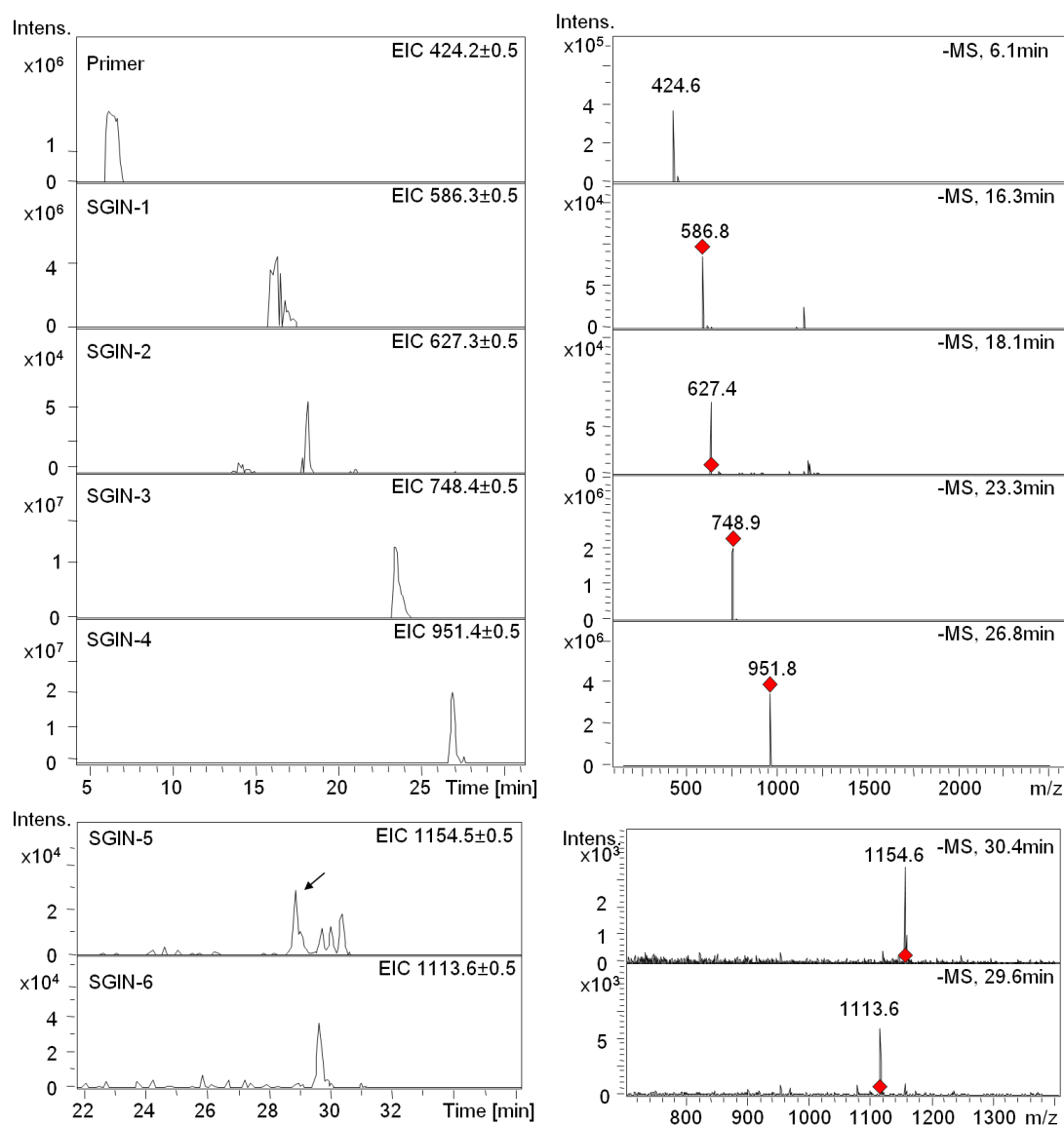


Fig. 2-4 FBJ-S1 細胞に作らせた GlcNAc-C12 由来の中性糖鎖生成物の LC/MS
左 : extract ion chromatogram (EIC)、右 : MS スペクトル

Table 2-12 FBJ-S1 細胞に作らせた GlcNAc-C12 由来の酸性糖鎖生成物の解析結果

名称	構造 (P: Primer)	価数	m/z		Ion Type	R.T. (min)	Relative Area
			測定値	理論値			
SGIA-1	HSO ₃ +Hex-P	1	630.8	630.3	[M-H] ⁻	21.5	28,116,674
SGIA-2	Ac+NeuAc-Hex-P	1	883.9	884.4	[M-H] ⁻	26.0	12,087,760
SGIA-3	NeuAc-Hex-P	1	841.8	841.4	[M-H] ⁻	27.1	2,046,286,020
						28.4	260,526,208
SGIA-4	NeuGc-Hex-P	1	857.8	857.4	[M-H] ⁻	27.6	123,892,579
SGIA-5	NeuAc-HexNAc-Hex-P	1	1045.0	1044.5	[M-H] ⁻	28.6	286,724,823
						29.7	7,789,944
SGIA-6	NeuAc-Hex-HexNAc-Hex-P	2	1206.6	1206.6	[M-2H] ²⁻	29.4	12,077,360
						30.1	37,368,450
SGIA-7	HSO ₃ +NeuAc-Hex-P	1	921.6	921.4	[M-H] ⁻	29.7	18,496,536

protein amount/dish: 0.123 mg, Relative Area=area/protein amount, R.T.; retention time

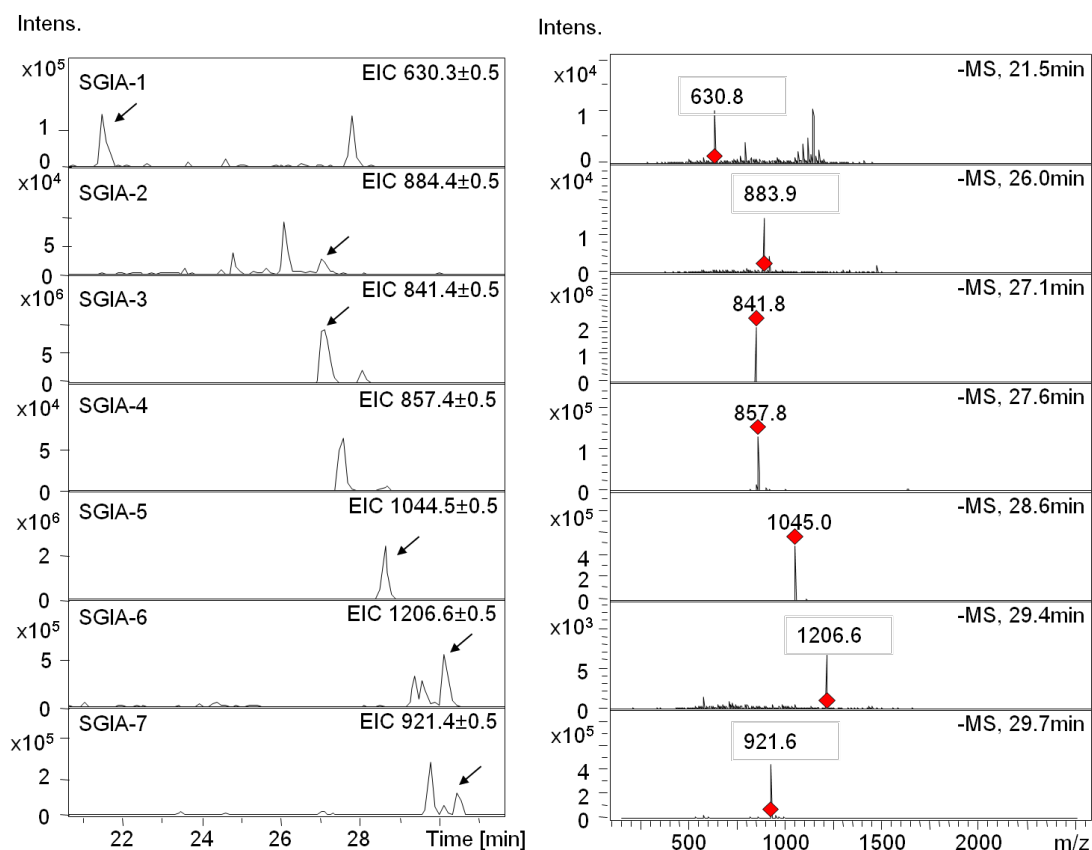


Fig. 2-5 FBJ-S1 細胞に作らせた GlcNAc-C12 由来の酸性糖鎖生成物の LC/MS
左 : extract ion chromatogram (EIC)、右 : MS スペクトル

Table 2-13 GlcNAc-C12 由来の糖鎖生成物の MS/MS スペクトル帰属

Product	Fragments
SGIN-1	551.4 ($[M-H]^-$), 388.6 ($[Y_1-H]^-$)
SGIN-2	592.2 ($[M-H]^-$), 388.5 ($[Y_1-H]^-$), 202.4 ($[B_1-H]^-$)
SGIN-3	713.3 ($[M-H]^-$), 550.3 ($[Y_2-H]^-$), 388.2 ($[Y_1-H]^-$), 323.4 ($[B_2-H]^-$)
SGIN-4	915.5 ($[M-H]^-$), 712.3 ($[Y_3-H]^-$), 550.6 ($[Y_2-H]^-$), 388.7 ($[Y_1-H]^-$), 382.0 ($[C_2-H]^-$)
SGIN-5	1118.6 ($[M-H]^-$), 712.3 ($[Y_3-H]^-$), 405.1 ($[B_2-H]^-$)
SGIN-6	1077.6 ($[M-H]^-$), 874.5 ($[Y_4-H]^-$), 712.3 ($[Y_3-H]^-$), 526.2 ($[C_3-H]^-$)
SGIA-1	388.1 ($[Y_1-H]^-$), 241.0 ($[B_1-H]^-$)
SGIA-2	842.7 ($[M-Ac-H]^-$), 550.1 ($[Z_2-H]^-$), 331.9 ($[C_1-H]^-$)
SGIA-3	550.1 ($[Y_2-H]^-$), 452.1 ($[C_2-H]^-$), 388.3 ($[Z_1-H]^-$), 290.0 ($[B_1-H]^-$)
SGIA-4	388.7 ($[Z_1-H]^-$), 306.0 ($[C_1-H]^-$)
SGIA-5	753.2 ($[Y_3-H]^-$), 550.6 ($[Y_2-H]^-$), 388.8 ($[Y_1-H]^-$), 289.9 ($[B_1-H]^-$)
SGIA-6	916.6 ($[Y_4-H]^-$), 550.1 ($[Z_2-H]^-$), 388.3 ($[Z_1-H]^-$)
SGIA-7	841.3 ($[M-HSO_3-H]^-$), 630.3 ($[Y_2-H]^-$), 550.2 ($[Z_2-HSO_3-H]^-$)

2.3.2.2 FBJ-LL 細胞で作られた GlcNAc-C12 生成物の解析

FBJ-LL 細胞に対して GlcNAc-C12 を投与して得られた糖鎖伸長生成物について、それぞれの EIC と、それに対応する MS スペクトルを Fig. 2-6 (中性糖) と Fig. 2-7 (酸性糖) に示した。EIC はそれぞれの質量電荷比の値に相当するピークを表示している。また、これらの生成物における MS のデータを Table 2-20 (中性糖) と Table 2-12 (酸性糖) に示した。また、表中の推定構造は MS/M スペクトルによって帰属した。Fig. 2-6 において、中性糖は塩素イオン種として検出された。

FBJ-LL 細胞に作らせた GlcNAc-C12 由来の中性糖鎖生成物は 3 種類が検出され、酸性糖鎖生成物は 5 種類が確認された。

Table 2-14 FBJ-LL 細胞に作らせた GlcNAc-C12 由来の中性糖鎖生成物の解析結果

名称	構造	価数	m/z		Ion Type	R.T. (min)	Relative Area
			測定値	理論値			
Primer	—	1	424.7	424.2	[M+Cl] ⁻	6.4	1,156,831,583
LGIN-1	Hex-P	1	586.8	586.3	[M+Cl] ⁻	16.2	1,904,973,906
LGIN-2	Hex-Hex-P	1	748.8	748.4	[M+Cl] ⁻	23.5	424,393,232
LGIN-3	HexNAc-Hex-Hex-P	1	951.9	951.4	[M+Cl] ⁻	26.8	522,964,437

protein amount: 0.093 mg, Relative Area=area/protein amount, R.T.; retention time

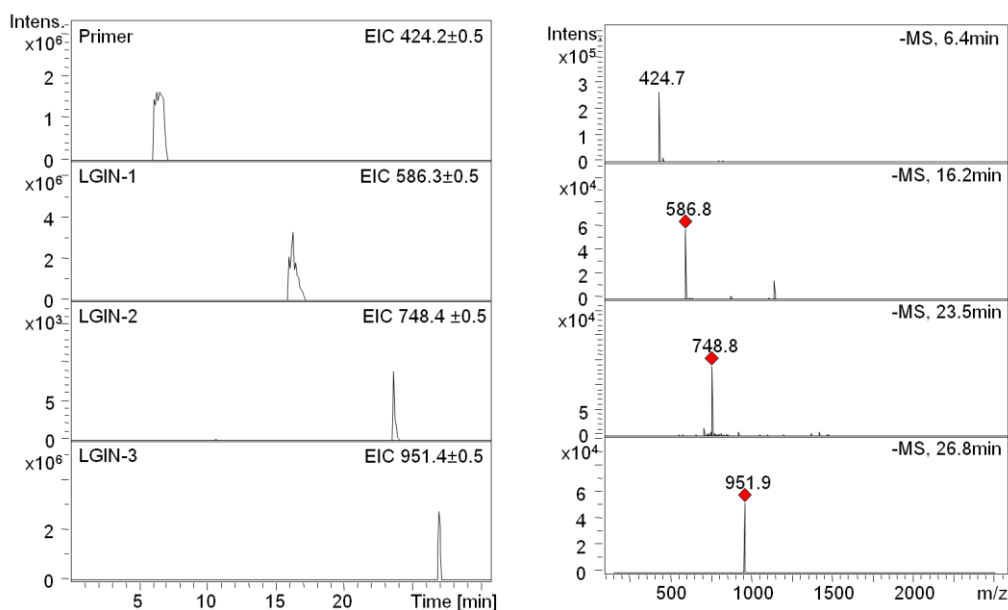


Fig. 2-6 FBJ-LL 細胞に作らせた GlcNAc-C12 由来の中性糖鎖生成物の LC/MS
左: extract ion chromatogram (EIC)、右: MS スペクトル

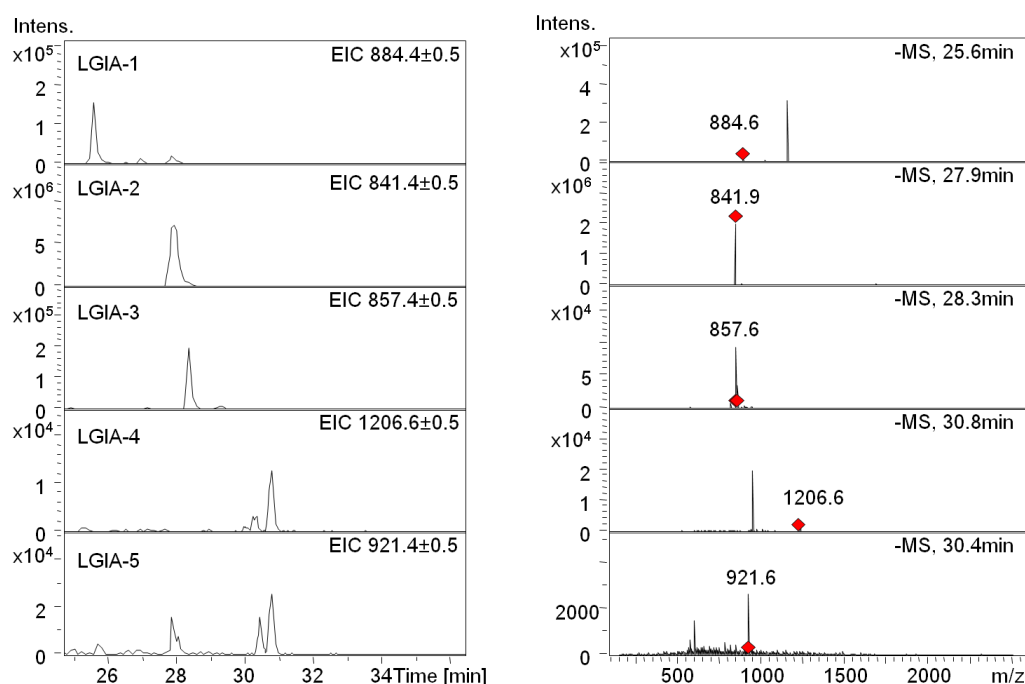


Fig. 2-7 FBj-LL 細胞に作らせた GlcNAc-C12 由来の酸性糖鎖生成物の LC/MS
左 : extract ion chromatogram (EIC)、右 : MS スペクトル

Table 2-15 FBj-LL 細胞に作らせた GlcNAc-C12 由来の酸性糖鎖生成物の解析結果

名称	構造	価数	m/z		Ion Type	R.T. (min)	Relative Area
			測定値	理論値			
LGIA-1	Ac+NeuAc-Hex-P	1	884.6	884.4	[M-H]	25.6	51,652,490
LGIA-2	NeuAc-Hex-P	1	841.9	841.4	[M-H]	27.9	2,773,962,325
LGIA-3	NeuGc-Hex-P	1	857.6	857.4	[M-H]	28.3	38,534,674
LGIA-4	NeuAc-Hex-HexNAc-Hex-P	1	1206.6	1206.6	[M-H]	30.8	2,520,998
LGIA-5	HSO ₃ +NeuAc-Hex-P	1	921.6	921.4	[M-H]	30.4	4,434,421
						30.6	5,094,778

protein amount/dish: 0.093 mg, Relative Area=area/protein amount, R.T.; retention time

2.3.2.3 GlcNAc-C12 由来の糖鎖伸長生成物の両細胞間での比較

FBj-S1 細胞と FBj-LL 細胞に GlcNAc-C12 糖鎖プライマーを投与して得られた糖鎖伸長生成物の結果 (Table 2-11、Table 2-12、Table 2-14 および Table 2-15) を元にして、総生成量 (酸性生成物と中性生成物毎に 100%とした) に対する各生成物の割合を Table 2-16 にまとめた。

Table 2-16 から、FBj-LL 細胞では、Gal-P は主たる中性生成物であったが、FBj-S1 細胞では、より長い糖鎖を持つ生成物 (Hex-Hex-P と Hex-HexNAc-Gal-P)

の割合が顕著に高いことが明らかとなった。酸性生成物に関しては、FBJ-S1細胞とFBJ-LL細胞ともに、NeuAc-Hex-Pが主なる酸性生成物であった。FBJ-S1細胞においてより長い糖鎖を持つ構造の割合が高く、硫酸化された生成物(HSO₃+Hex-PとHSO₃+NeuAc-Hex-P)も多く検出された。

Table 2-16 GlcNAc-C12 由来の糖鎖生成物の比較

Products (P: GlcNAc-C12)	Percentage (%)	
	FBJ-S1 (低転移性)	FBJ-LL (高転移性)
HSO ₃ +Hex-P	1.0	—
Ac+NeuAc-Hex-P	0.4	1.8
NeuAc-Hex-P	81.4	96.4
NeuGc-Hex-P	4.4	1.3
NeuAc-HexNAc-Hex-P	10.1	—
NeuAc-Hex-HexNAc-Hex-P	0.7	0.1
HSO ₃ +NeuAc-Hex-P	2.0	0.3
Hex-P	22.4	66.8
HexNAc-P	0.7	—
Hex-Hex-P	36.3	14.9
Hex-GlcNAc-Hex-P	40.5	18.3
HexNAc-HexNAc-Hex-Hex-P	0.1	—
HexNAc-Hex-Hex-P	0.1	—

*破線を境として上側の生成物は酸性生成物、下側の生成物は中性生成物である。

2.3.3 Lac-C12 由来の糖鎖伸長生成物の比較解析

2.3.3.1 FBJ-S1 細胞で作られた Lac-C12 由来の糖鎖生成物の解析

FBJ-S1細胞に対してLac-C12を投与して得られた糖鎖伸長生成物について、それぞれのEICと、それに対応するMSスペクトルをFig. 2-8(中性糖)とFig. 2-9(酸性糖)に示した。EICではそれぞれの質量電荷比の値に相当するピークを表示している。また、これらの生成物におけるMSのデータをTable 2-17(中性糖)とTable 2-18(酸性糖)に示した。個々の生成物におけるMS/MSスペクトルの解析結果はTable 2-19に示した。また、表中の推定構造はMS/MSスペクトルによって帰属した。Fig. 2-8において、中性糖は塩素イオンが付加したイオン種として検出された。

Table 2-17 と Fig. 2-8 に示したように、FBJ-S1 細胞に作らせた Lac-C12 由来の中性糖鎖伸長生成物として 3 種類を検出した。SLN-2 の発現量が最も多かった。酸性糖鎖伸長生成物については、GM3 型、GM2 型、GM1 型、および GD1a 型などの 7 種類が検出された。SLA-6 (m/z 1327.7) の構造のシアル酸の結合部位は MS/MS スペクトルでは、特定できなかった。またグリコリル型のシアル酸を含有した生成物 SLA-3 も検出された。

Table 2-17 FBJ-S1 細胞に作らせた Lac-C12 由来の中性糖鎖生成物の解析結果

名称	構造 (P: Primer)	価数	m/z		Ion Type	R.T. (min)	Relative Area
			測定値	理論値			
Primer	—	1	546.4	545.8	$[M+Cl]^-$	13.2	8,310,900,730
SLN-1	Hex-P	1	707.8	707.3	$[M+Cl]^-$	22.0	3,895,460,599
SLN-2	HexNAc-Hex-P	1	910.9	910.4	$[M+Cl]^-$	26.6	6,541,103,715
SLN-3	HexNAc-HexNAc-Hex-P	1	1113.7	1113.4	$[M+Cl]^-$	28.8	5,683,532
						30.1	7,385,453

protein/amount: 0.122 mg, Relative Area=area/protein amount, R.T.; retention time

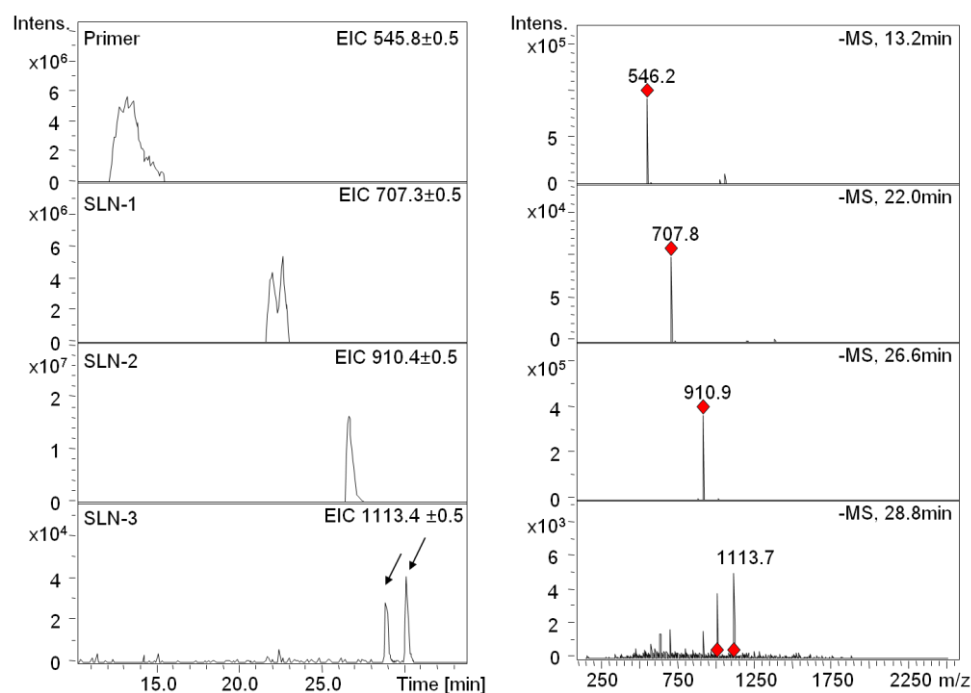


Fig. 2-8 FBJ-S1 細胞に作らせた Lac-C12 由来の中性糖鎖生成物の LC/MS
左 : extract ion chromatogram (EIC)、右 : MS スペクトル

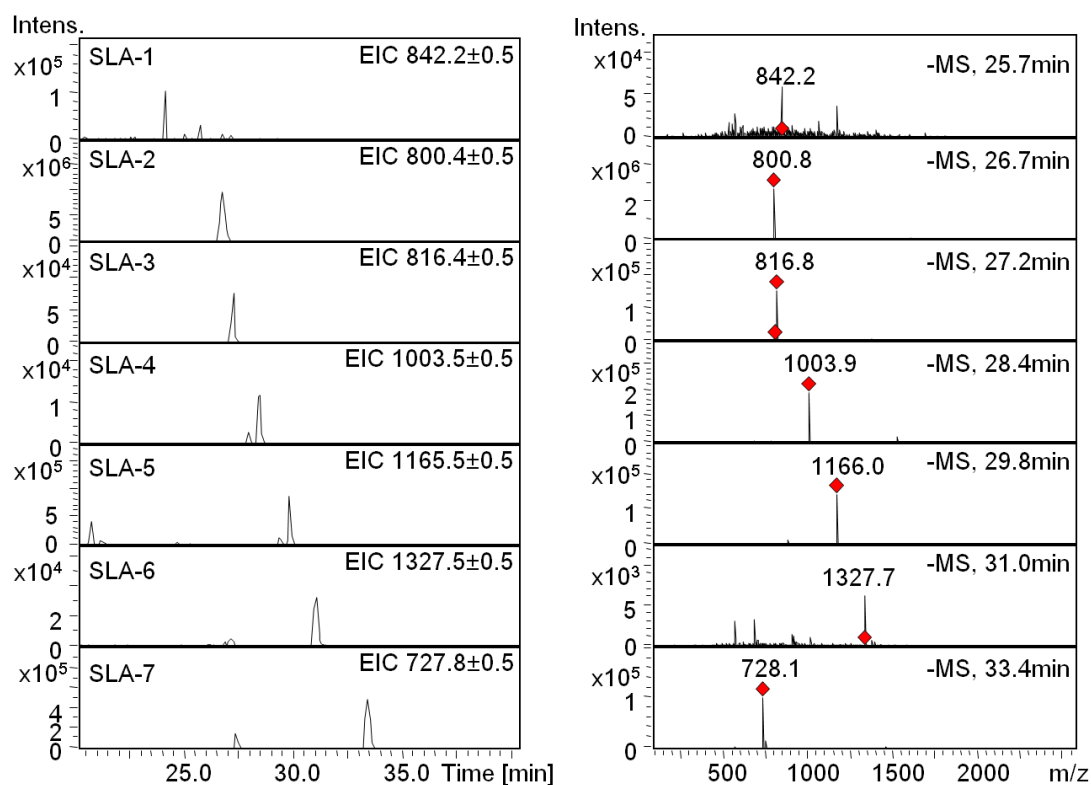


Fig. 2-9 FBJ-S1 細胞に作らせた Lac-C12 由来の酸性糖鎖生成物の LC/MS
左 : extract ion chromatogram (EIC)、右 : MS スペクトル

Table 2-18 FBJ-S1 細胞に作らせた Lac-C12 由来の酸性糖鎖生成物の解析結果

名称	構造 (P: Primer)	価数	m/z		Ion Type	R. T. (min)	Relative Area
			測定値	理論値			
SLA-1	Ac-NeuAc-P	1	842.2	842.2	[M-H] ⁻	25.7	30,633,649
SLA-2	NeuAc-P	1	800.8	800.4	[M-H] ⁻	26.7	2,983,729,220
SLA-3	NeuGc-P	1	816.8	816.4	[M-H] ⁻	27.2	132,133,722
SLA-4	HexNAc-(NeuAc-)P	1	1003.9	1003.5	[M-H] ⁻	28.4	325,170,851
SLA-5	Hex-HexNAc-(NeuAc-)P	1	1166.0	1165.5	[M-H] ⁻	29.8	181,898,595
SLA-6	NeuAc+Hex-HexNAc-Hex-P	1	1327.7	1327.5	[M-H] ⁻	31.0	8,798,636
SLA-7	NeuAc-Hex-HexNAc-(NeuAc-)P	2	728.1	727.8	[M-2H] ²⁻	33.4	133,437,723

protein amount: 0.122 mg, Relative Area=area/protein amount, R.T.; retention time

Table 2-19 Lac-C12 由来の糖鎖生成物の MS/MS スペクトル帰属

Product	Fragments
SLN-1	671.3 ([M-H] ⁻), 510.2 ([Y ₂ -H] ⁻), 347.3 ([Y ₁ -H] ⁻)
SLN-2	874.4 ([M-H] ⁻), 671.3 ([Y ₃ -H] ⁻), 509.2 ([Y ₂ -H] ⁻)
SLN-3	1077.2 ([M-H] ⁻), 671.2 ([Y ₃ -H] ⁻), 509.2 ([Y ₂ -H] ⁻), 405.2 ([B ₂ -H] ⁻)
SLA-1	509.2 ([Y ₂ -H] ⁻), 332.1 ([B ₁ -H] ⁻)
SLA-2	509.1 ([Y ₂ -H] ⁻), 347.3 ([Y ₁ -H] ⁻), 290.1 ([B ₁ -H] ⁻)
SLA-3	509.0 ([Y ₂ -H] ⁻), 305.8 ([B ₁ -H] ⁻)
SLA-4	800.4 ([Y _{2β} -H] ⁻), 712.6 ([Y _{2α} -H] ⁻), 509.1 ([Y _{2α} , Y _{2β} -H] ⁻), 289.9 ([B _{1α} -H] ⁻)
SLA-5	1003.3 ([Y _{3α} -H] ⁻), 874.3 ([Y _{2β} -H] ⁻), 782.3 ([Y _{2α} -H] ⁻), 695.0 ([Z _{3α} , Y _{2β} -H] ⁻), 509.2 ([Y _{2α} , Y _{2β} -H] ⁻)
SLA-6	1037.5 ([Y _{2β} -H] ⁻), 874.7 ([Y _{4α} , Y _{2β} -H] ⁻), 671.4 ([Y _{3α} , Y _{2β} -H] ⁻), 509.2 ([Y _{2α} , Y _{2β} -H] ⁻)
SLA-7	1165.6 ([Y _{4α} -H] ⁻), 1003.5 ([Y _{3α} -H] ⁻), 783.5 ([Y _{2α} -H] ⁻), 509.1 ([Y _{2α} , Y _{3β} -H] ⁻) 290.0 ([B _{1α} -H] ⁻), 290.0 ([B _{1β} -H] ⁻)

2.3.3.2 FBJ-LL 細胞で作られた Lac-C12 由来の糖鎖生成物の解析

FBJ-LL 細胞に対して Lac-C12 を投与して得られた糖鎖伸長生成物について、それぞれの EIC と、それに対応する MS スペクトルを Fig. 2-10 (中性糖) と Fig. 2-11 (酸性糖) に示した。EIC ではそれぞれの質量電荷比の値に相当するピークを表示している。また、これらの生成物における MS のデータを Table 2-20 (中性糖) と Table 2-21 (酸性糖) に示した。表中の推定構造は MS/MS スペクトルによって帰属したものである。Fig. 2-10 において、中性糖は塩素イオンが付加したイオン種として検出された。

FBJ-LL 細胞における Lac-C12 由来の糖鎖中性生成物が 2 種類、酸性糖鎖生成物は 7 種類が確認された。酸性糖鎖伸長生成物について、ジアセチル化生成物も検出された。

Table 2-20 FBJ-LL 細胞に作らせた Lac-C12 由来の中性糖鎖生成物の解析結果

名称	構造 (P: Primer)	価数	m/z		Ion Type	R.T. (min)	Relative Area
			測定値	理論値			
Primer	—	1	546.1	545.8	[M+Cl] ⁻	13.0	5,630,567,603
LLN-1	Hex-P	1	707.6	707.3	[M+Cl] ⁻	22.2	2,422,738,012
LLN-2	HexNAc-Hex-P	1	910.4	910.4	[M+Cl] ⁻	27.0	104,259,338

protein amount: 0.110 mg, Relative Area=area/protein amount, R.T.; retention time

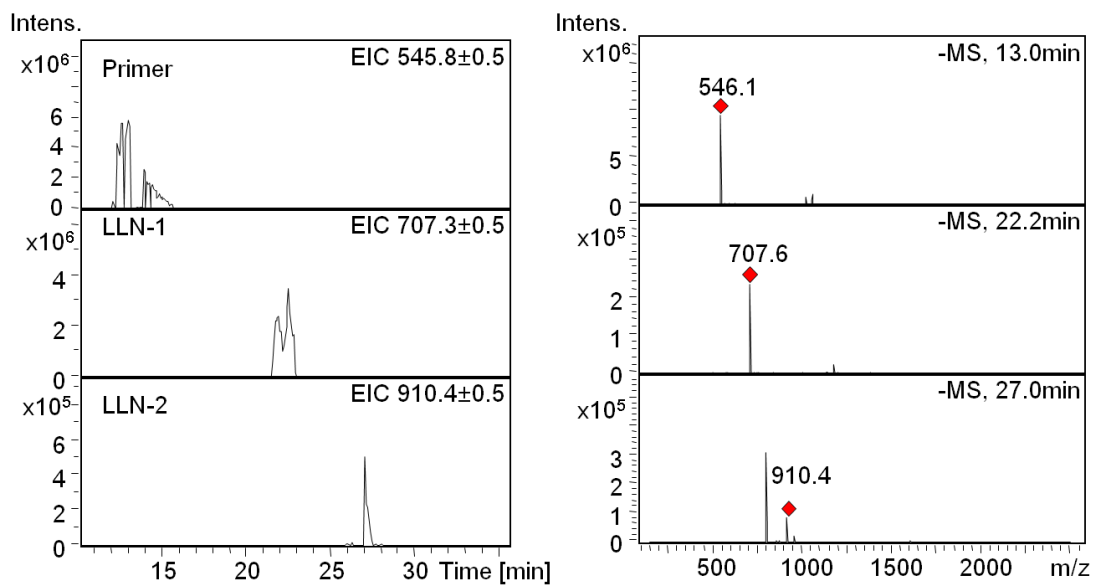


Fig. 2-10 FBJ-LL 細胞に作らせた Lac-C12 由来の中性糖鎖生成物の LC/MS
左 : extract ion chromatogram (EIC)、右 : MS スペクトル

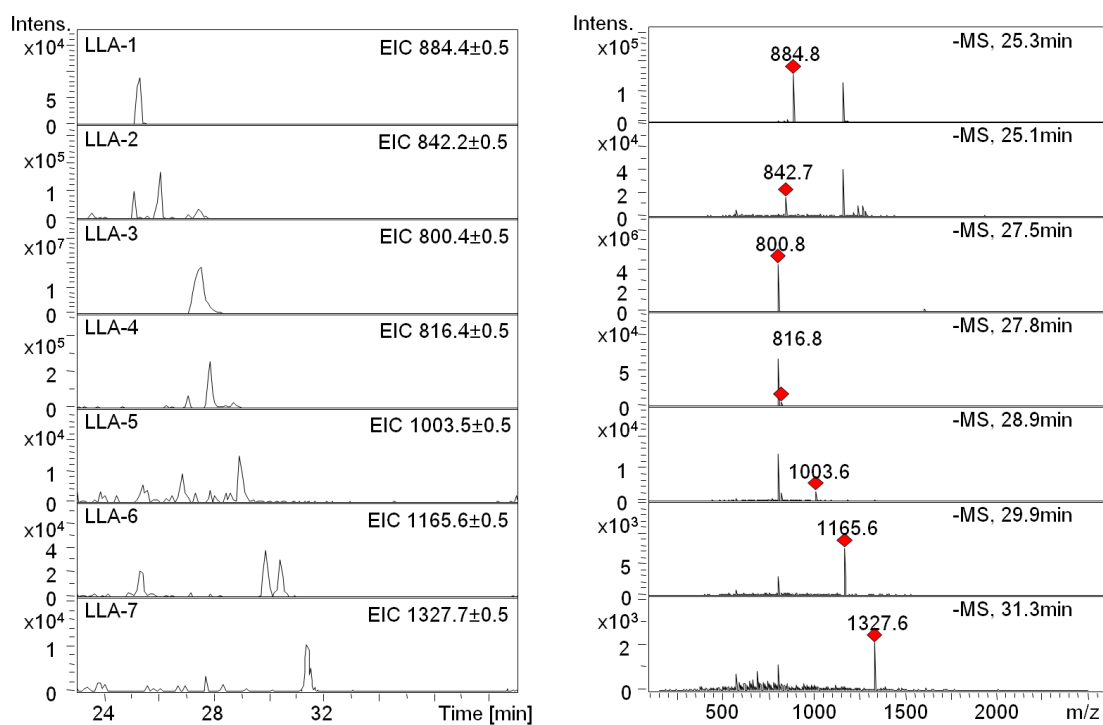


Fig. 2-11 FBJ-LL 細胞に作らせた Lac-C12 由来の酸性糖鎖生成物の LC/MS
左 : extract ion chromatogram (EIC)、右 : MS スペクトル

Table 2-21 FBJ-LL 細胞に作らせた Lac-C12 由来の酸性糖鎖生成物の解析結果

名称	構造 (P: Primer)	価数	m/z		Ion Type	R.T. (min)	Relative Area
			測定値	理論値			
LLA-1	2Ac-NeuAc-P	1	884.8	884.4	[M-H] ⁻	25	117,599,978
LLA-2	Ac-NeuAc-P	1	842.7	842.2	[M-H] ⁻	25	29,402,209
						26	78,815,741
LLA-3	NeuAc-P	1	800.8	800.4	[M-H] ⁻	28	8,643,560,939
LLA-4	NeuGc-P	1	816.8	816.4	[M-H] ⁻	28	56,989,199
LLA-5	HexNAc-(NeuAc-)P	1	1003.6	1003.5	[M-H] ⁻	29	3,324,113
						29	6,139,829
LLA-6	Hex-HexNAc-(NeuAc-)P	1	1165.6	1165.5	[M-H] ⁻	30	5,448,137
LLA-7	NeuAc+Hex-HexNAc-Hex-P	1	1327.6	1327.5	[M-H] ⁻	31	2,553,022

protein amount: 0.110 mg, Relative Area=area/protein amount, R.T.; retention time

2.3.3.3 Lac-C12 由来の糖鎖伸長生成物の両細胞間での比較

FBJ-S1 細胞と FBJ-LL 細胞に Lac-C12 糖鎖プライマーを投与して得られた糖鎖伸長生成物の結果 (Table 2-17、Table 2-18、Table 2-20 および Table 2-21) を元にして、総生成量 (酸性生成物と中性生成物毎に 100%とした) に対する各生成物の割合を Table 2-22 にまとめた。

Table 2-22 Lac-C12 由来の糖鎖生成物の比較

Products (P: Lac-C12)	Percentage (%)	
	FBJ-S1 (低転移性)	FBJ-LL (高転移性)
Hex-P Gb3型	37.3	95.9
HexNAc-Hex-P Gb4型	62.6	4.1
HexNAc-HexNAc-Hex-P	0.1	—
NeuAc-P GM3型	78.6	96.6
NeuGc-P	3.5	0.6
Ac+NeuAc-P	0.8	1.2
2Ac+NeuAc-P	—	1.3
HexNAc-(NeuAc-)P GM2型	8.6	0.0
Hex-HexNAc-(NeuAc-)P GM1型	4.8	0.1
NeuAc+Hex-HexNAc-Hex-P	0.2	0.0
NeuAc-Hex-HexNAc-(NeuAc-)P GD1a型	3.5	—

*破線を境として上側の生成物は中性生成物、下側の生成物は酸性生成物である。

Lac-C12 由来の中性糖では、両細胞ともグロボ系列と推定される Gb3 や Gb4 が検出されたが、低転移性の FBJ-S1 細胞において、鎖長の長い Gb4 の生成物の相対発現量が多いことが分かった。酸性糖に関しては、GD1a 型の生成物が低転移性の FBJ-S1 細胞において検出されたが、高転移性の FBJ-LL 細胞では検出されなかった。なお、全体の傾向として、低転移性の FBJ-S1 細胞において、より長い糖鎖を持つ生成物 (Gb4 や GM1 型) の割合が顕著に多いことがわかった。

2.3.4 FBJ 細胞に発現する糖脂質の比較解析

一般には細胞に発現している糖脂質の解析は薄層クロマトグラフィーにより行われてきたが[19]、薄層クロマトグラフィーは検出感度の面では不十分である。そこで、糖鎖プライマー法による糖脂質生合成の解析結果を元にして、更に FBJ 細胞に発現する糖脂質に関するより詳しい情報を得るために、LC-MS/MS を用いた細胞内在性糖脂質の解析を行った。

2.3.4.1 FBJ-S1 細胞に発現する糖脂質の解析

低転移性 FBJ-S1 細胞と高転移性 FBJ-LL 細胞を用い、各細胞から抽出した糖脂質を LC-MS/MS を用いて解析した。FBJ-S1 細胞由来の糖脂質のそれぞれの EIC と、それに対応する MS スペクトルを Fig. 2-12 および Fig. 2-13 に示した。また、これらの糖脂質における MS のデータを Table 2-23 および Table 2-24 に示す。個々の糖脂質における MS/MS スペクトルの解析結果は Table 2-25 に示した。

FBJ-S1 細胞から抽出したスフィンゴ糖脂質は主に 3 種類のセラミド (d18:1/16:0、d18:1/24:1 と d18:1/24:0) から構成されていた。各糖脂質においてセラミド組成が異なる構造も検出されているが、どの糖脂質でも d18:1/16:0 のセラミドの組成が最も多く検出されていた。主成分であった d18:1/16:0 と d18:1/24:1 の 2 種類のセラミドからなる糖脂質の解析結果を本節に示した。中性糖が 8 種類および酸性糖 10 種類が確認できた。

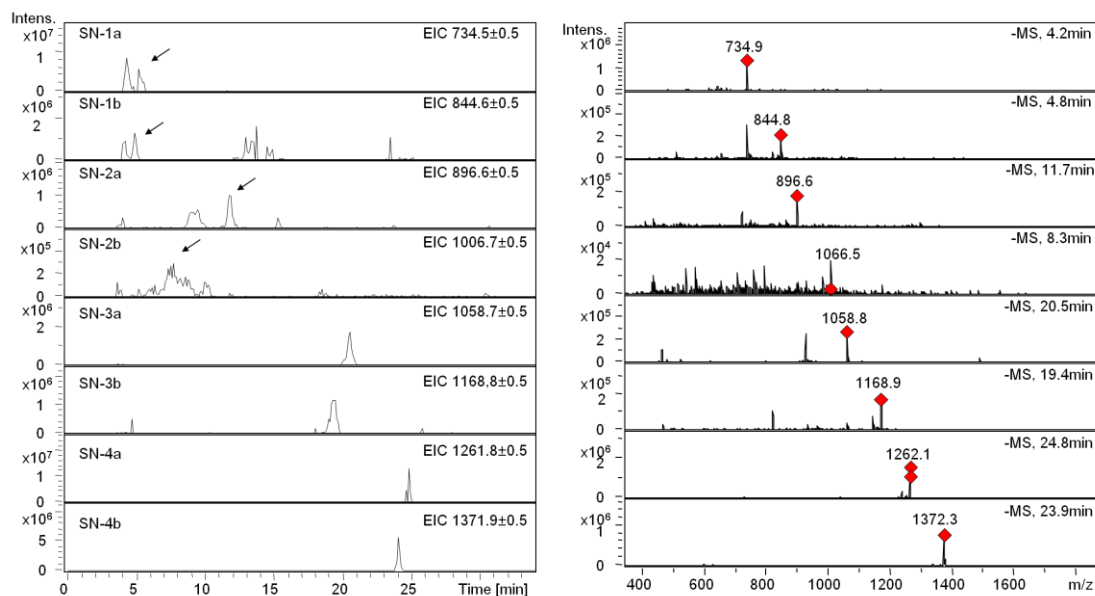


Fig. 2-12 FBJ-S1 細胞に発現する中性糖脂質の LC/MS
左 : extract ion chromatogram (EIC)、右 : MS スペクトル

Table 2-23 FBJ-S1 細胞に発現する中性糖脂質の解析結果

名称	構造	価数	m/z		Ion Type	R.T. (min)	Relative Area
			測定値	理論値			
SN-1a	GlcCer (16)	1	734.9	734.5	[M+Cl] ⁻	4.2	62,130,765
SN-1b	GlcCer (24)	1	844.8	844.6	[M+Cl] ⁻	4.8	6,906,779
SN-2a	LacCer (16)	1	896.6	896.6	[M+Cl] ⁻	11.7	8,056,754
SN-2b	LacCer (24)	1	1006.5	1006.7	[M+Cl] ⁻	8.3	4,814,993
SN-3a	Gb3Cer (16)	1	1058.8	1058.7	[M+Cl] ⁻	20.5	6,790,418
SN-3b	Gb3Cer (24)	1	1168.9	1168.8	[M+Cl] ⁻	19.4	6,488,672
SN-4a	Gb4Cer (16)	1	1262.1	1261.8	[M+Cl] ⁻	24.8	65,108,481
SN-4b	Gb4Cer (24)	1	1372.3	1371.9	[M+Cl] ⁻	23.9	13,757,408

構造項目下の(16)、(24)は糖脂質のセラミド部分が d18:1/16:0 (a)と d18:1/24:1 (b)のものを示した。protein amount : 2.49 mg; Relative area=area/protein amount, R.T.; retention time

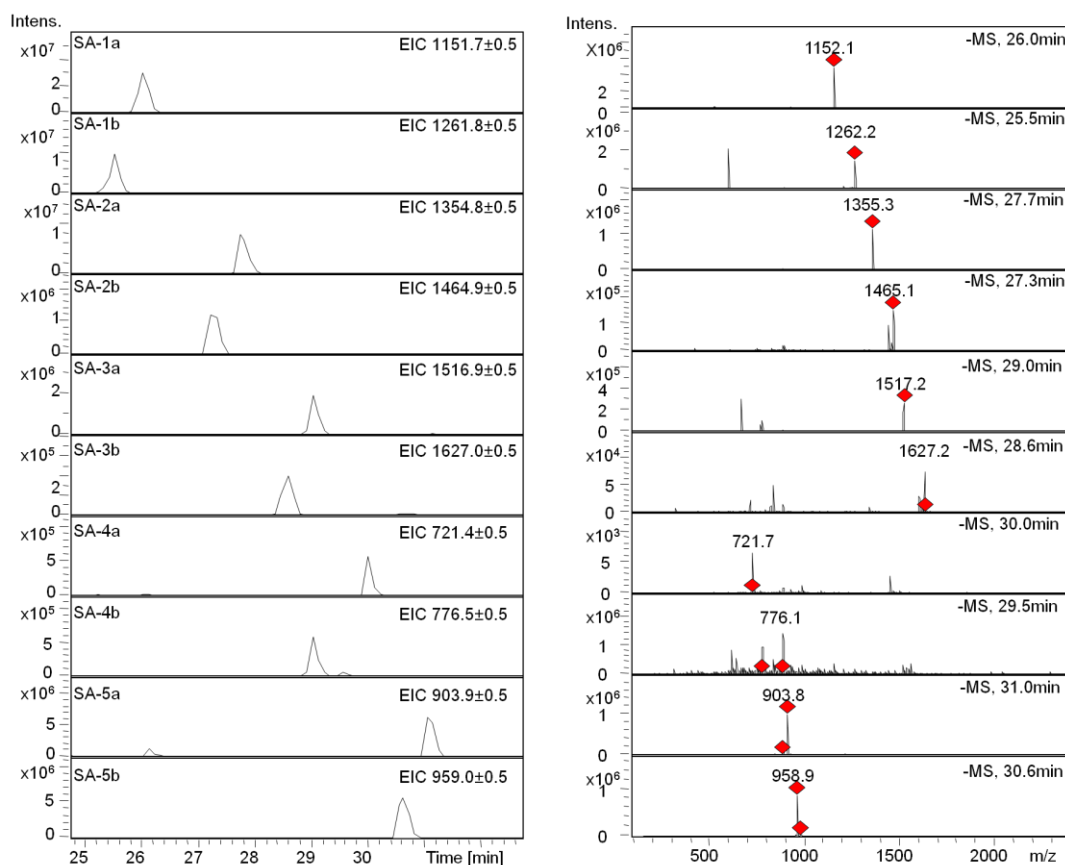


Fig. 2-13 FBJ-S1 細胞に発現する酸性糖脂質の LC/MS
左 : extract ion chromatogram (EIC)、右 : MS スペクトル

Table 2-24 FBJ-S1 細胞に発現する酸性糖脂質の解析結果

名称	構造	価数	m/z		Ion Type	R.T. (min)	Relative Area
			測定値	理論値			
SA-1a	GM3 (16)	1	1152.1	1151.7	[M-H] ⁻	26.0	84,328,645
SA-1b	GM3 (24)	1	1262.2	1261.8	[M-H] ⁻	25.5	16,341,225
SA-2a	GM2 (16)	1	1355.3	1354.8	[M-H] ⁻	27.7	20,100,008
SA-2b	GM2 (24)	1	1465.1	1464.9	[M-H] ⁻	27.3	3,404,441
SA-3a	GM1 (16)	1	1517.2	1516.9	[M-H] ⁻	29.0	4,459,143
SA-3b	GM1 (24)	1	1627.2	1627.0	[M-H] ⁻	28.6	998,819
SA-4a	GD3 (16)	2	721.7	721.4	[M-2H] ²⁻	30.0	739,511
SA-4b	GD3 (24)	2	776.1	776.5	[M-2H] ²⁻	29.5	106,329
SA-5a	GD1a (16)	2	903.8	903.9	[M-2H] ²⁻	31.0	33,030,172
SA-5b	GD1a (24)	2	958.9	959.0	[M-2H] ²⁻	30.6	22,975,523

構造項目下の(16)、(24)は糖脂質のセラミド部分が d18:1/16:0 (a)と d18:1/24:1 (b)のものを示した。protein amount : 2.49 mg; Relative area=area/protein amount, R.T.; retention time

Table 2-25 FBJ-S1 細胞に発現する糖脂質の MS/MS スペクトル帰属

Product	Fragments
SN-1a	698.4 ([M-H] ⁻), 536.2 ([Y ₀ -H] ⁻)
SN-1b	808.7 ([M-H] ⁻), 646.6 ([Y ₀ -H] ⁻)
SN-2a	860.7 ([M-H] ⁻), 698.7 ([Y ₁ -H] ⁻), 536.7 ([Y ₀ -H] ⁻)
SN-2b	970.6 ([M-H] ⁻), 808.7 ([Y ₁ -H] ⁻), 646.7 ([Y ₀ -H] ⁻)
SN-3a	1022.7 ([M-H] ⁻), 860.2 ([Y ₂ -H] ⁻), 698.1 ([Y ₁ -H] ⁻), 536.8 ([Y ₀ -H] ⁻), 487.2 ([B ₃ -H] ⁻)
SN-3b	1132.7 ([M-H] ⁻), 970.4 ([Y ₂ -H] ⁻), 808.4 ([Y ₁ -H] ⁻), 646.6 ([Y ₀ -H] ⁻)
SN-4a	1226.1 ([M-H] ⁻), 860.1 ([Y ₂ -H] ⁻), 698.9 ([Y ₁ -H] ⁻), 536.4 ([Y ₀ -H] ⁻), 525.3 ([B ₃ -H] ⁻)
SN-4b	1336.9 ([M-H] ⁻), 1134.4 ([Y ₃ -H] ⁻), 970.4 ([Y ₂ -H] ⁻), 688.5 ([B ₄ -H] ⁻), 525.7 ([B ₃ -H] ⁻)
SA-1a	860.4 ([Y ₂ -H] ⁻), 698.5 ([Y ₁ -H] ⁻), 536.1 ([Y ₀ -H] ⁻)
SA-1b	970.3 ([Y ₂ -H] ⁻), 808.4 ([Y ₁ -H] ⁻), 646.3 ([Y ₀ -H] ⁻)
SA-2a	1152.1 ([Y _{2β} -H] ⁻), 860.6 ([Y _{2α} , Y _{2β} -H] ⁻), 698.6 ([Y ₁ -H] ⁻), 536.0 ([Y ₀ -H] ⁻), 306.5 ([C ₁ -H] ⁻)
SA-2b	1262.1 ([Y _{2β} -H] ⁻), 970.7 ([Y _{2α} , Y _{2β} -H] ⁻), 808.6 ([Y ₁ -H] ⁻), 646.6 ([Y ₀ -H] ⁻), 290.4 ([B ₁ -H] ⁻)
SA-3a	1355.7 ([Y _{3α} -H] ⁻), 1255.9 ([Y _{2β} -H] ⁻), 860.6 ([Y _{2α} , Y _{2β} -H] ⁻), 698.5 ([Y ₁ -H] ⁻), 536.0 ([Y ₀ -H] ⁻)
SA-3b	1465.2 ([Y _{3α} -H] ⁻), 1336.8 ([Y _{2β} -H] ⁻), 970.7 ([Y _{2α} , Y _{2β} -H] ⁻), 646.7 ([Y ₀ -H] ⁻)
SA-4a	1151.7 ([Y ₃ -H] ⁻), 860.6 ([Y ₂ -H] ⁻), 580.9 ([B ₂ -H] ⁻), 536.0 ([Y ₀ -H] ⁻), 290.6 ([B ₁ -H] ⁻)
SA-4b	1261.7 ([Y ₃ -H] ⁻), 970.3 ([Y ₂ -H] ⁻), 580.9 ([B ₂ -H] ⁻), 289.7 ([B ₁ -H] ⁻)
SA-5a	1517.0 ([Y _{4α} -H] ⁻), 1152.5 ([Y _{2α} -H] ⁻), 656.0 ([B _{3α} -H] ⁻), 536.2 ([Y ₀ -H] ⁻), 290.6 ([B _{1α} -H] ⁻)
SA-5b	1259.5 ([Y _{2α} -H] ⁻), 655.2 ([B _{3α} -H] ⁻), 646.6 ([Y ₀ -H] ⁻), 290.3 ([B _{1α} -H] ⁻)

2.3.4.2 FBJ-LL 細胞に発現する糖脂質の解析

FBJ-LL 細胞由来の糖脂質のそれぞれの EIC と、それに対応する MS スペクトルを Fig. 2-14 に示した。また、これらの糖脂質における MS のデータを Table 2-26 および Table 2-27 に示した。

FBJ-LL 細胞から抽出したスフィンゴ糖脂質について、中性糖 4 種類および酸性糖 6 種類が確認できた。

Table 2-26 FBJ-LL 細胞に発現する中性糖脂質の解析結果

名称	構造	価数	m/z		Ion Type	R.T. (min)	Relative Area
			測定値	理論値			
LN-1a	GlcCer (16)	1	734.8	734.5	[M+Cl] ⁻	4.1	54,456,269
LN-1b	GlcCer (24)	1	844.8	844.6	[M+Cl] ⁻	3.9	10,589,697
LN-2a	LacCer (16)	1	896.7	896.6	[M+Cl] ⁻	8.5	8,457,604
LN-2b	LacCer (24)	1	1006.7	1006.7	[M+Cl] ⁻	8.0	5,560,855

構造項目での(16)、(24)は糖脂質のセラミド部分が d18:1/16:0 (a)と d18:1/24:1 (b)のものを示した。protein amount: 2.78 mg; Relative Area=area/protein amount, R.T.; retention time

Table 2-27 FBJ-LL 細胞に発現する酸性糖脂質の解析結果

名称	構造	価数	m/z		Ion Type	R.T. (min)	Relative Area
			測定値	理論値			
LA-1a	GM3 (16)	1	1152.1	1151.7	[M-H] ⁻	25.3	167,721,224
LA-1b	GM3 (24)	1	1262.2	1261.8	[M-H] ⁻	24.9	121,969,607
LA-2a	GM2 (16)	1	1354.9	1354.8	[M-H] ⁻	27.0	243,702
LA-3b	GD3 (16)	1	1442.8	1442.8	[M-H] ⁻	29.3	485,767
LA-3a	GD1a (16)	2	903.8	903.9	[M-2H] ²⁻	30.3	225,365
LA-3b	GD1a (24)	2	958.6	959.0	[M-2H] ²⁻	29.9	148,068

構造項目での(16)、(24)は糖脂質のセラミド部分が d18:1/16:0 (a)と d18:1/24:1 (b)のものを示した。protein amount: 2.78 mg; Relative Area=area/protein amount, R.T.; retention time

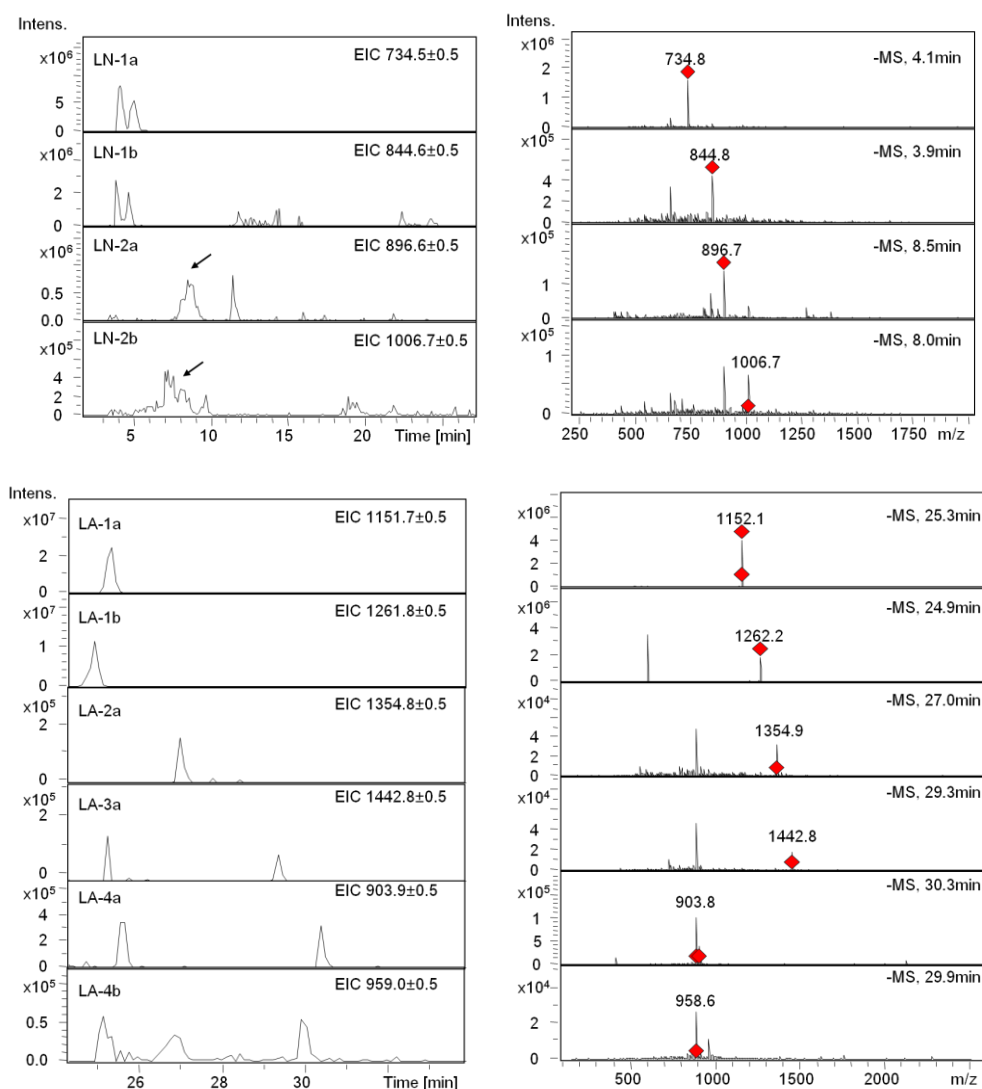


Fig. 2-14 FBJ-LL 細胞に発現する糖脂質の LC/MS
左 : extract ion chromatogram (EIC)、右 : MS スペクトル

2.3.4.3 両細胞間での内在性糖脂質の比較

FBJ-S1 細胞と FBJ-LL 細胞に発現する糖脂質の結果 (Table 2-23、Table 2-24、Table 2-26 および Table 2-27) を元にして、総生成量 (酸性糖脂質と中性糖脂質毎に 100%とした) に対する各糖脂質の割合を Table 2-28 にまとめた。

Table 2-28 FBJ 細胞に発現する糖脂質の比較

Structure	Percentage (%)	
	FBJ-S1 (低転移)	FBJ-LL (高転移)
GlcCer	39.7	82.3
LacCer	7.4	17.7
Gb3Cer	7.6	—
Gb4Cer	45.3	—
GM3	54.0	99.6
GM2	12.6	0.1
GM1	2.9	—
GD3	0.5	0.2
GD1a	30.0	0.1

*破線を境として上側は中性糖脂質、下側は酸性糖脂質である。

中性糖脂質においてグロボ系列である Gb3Cer や Gb4Cer の相対発現量が FBJ-S1 細胞において高かった。一方、GlcCer および LacCer の相対発現量が FBJ-S1 細胞において低かった。これは FBJ-S1 細胞においてグロボ系列の糖鎖生合成能が高い事を示唆している。GlcCer や LacCer は糖鎖生合成経路の上流に配置されており、ほとんどのスフィンゴ糖脂質の根幹となる。これは Lac-C12 と GlcNAc-C12 を用いて作成された糖鎖パネル (Table 2-16 と Table 2-22) においても同様の傾向があった。そのため、細胞内の糖転移が活発であれば、生合成の原料となる。GlcCer や LacCer の量が減少すると考えられる。酸性糖脂質においては、GM3 などのガングリオシドの相対発現量が FBJ-LL 細胞において高かった。一方、他のガングリオシド GM2、GM1、GD1a の相対発現量が FBJ-S1 細胞において顕著に高かった。これは、薄層クロマトグラフィーの結果および高級ガングリオシド合成酵素である GM2/GD2 合成酵素の発現量が

転移性の高い細胞株において減少していた結果と一致している[5, 20, 21]。また、前述した糖鎖プライマー法の結果は内在性糖脂質における発現パターンと類似していることにより、糖鎖プライマー法による解析の有用性も示された。なお、LC-MS による内在性糖脂質の解析で得られたセラミド組成などの情報は糖鎖機能の更なる解析に寄与すると考えられる。

2.3.5 Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖生成物の比較解析

2.3.5.1 FBJ-S1 細胞で作られた Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖生成物の解析

FBJ-S1 細胞に対して Xyl-Ser-C12 を投与して得られた糖鎖伸長生成物について、それぞれの EIC と、それに対応する MS スペクトルを Fig. 2-15 に示した。EIC ではそれぞれの質量電荷比の値に相当するピークを表示している。また、これらの生成物における MS のデータを Table 2-29 に示した。個々の生成物における MS/MS スペクトルは Table 2-30 に示した。図中の矢印は生成物のピークである事を示している。また、表中の推定構造は MS/MS スペクトルによって帰属した。

Table 2-29 FBJ-S1 細胞に作らせた Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖生成物の解析結果

名称	構造 (P: Primer)	価数	m/z		Ion Type	R.T. (min)	Relative Area
			測定値	理論値			
SXN-1	Hex-P	1	615.8	615.3	[M+Cl] ⁻	25.3	170,505,989
SXN-2	Hex-Hex-P	1	777.7	777.3	[M+Cl] ⁻	32.0	158,732,883
SXA-1	HSO ₃ -Hex-P	1	659.7	659.3	[M-H] ⁻	29.7	12,464,925
SXA-2	NeuAc-Hex-P	1	870.8	870.8	[M-H] ⁻	33.0	124,109,063
SXA-3	NeuAc-Hex-Hex-P	1	1032.9	1032.8	[M-H] ⁻	34.1	52,783,937
SXA-4	HexA-Hex-Hex-P	1	917.9	917.6	[M-H] ⁻	34.3	24,746,460
SXA-5	HexNAc-HexA-Hex-Hex-P	1	1120.8	1120.5	[M-H] ⁻	37.6	256,147,417
SXA-6	HexNAc-(HexA-HexNAc)-HexA-Hex-Hex-P	2	749.4	749.3	[M-2H] ²⁻	39.4	17,197,621

protein amount: 0.103 mg, Relative Area=area/protein amount, R.T.; retention time

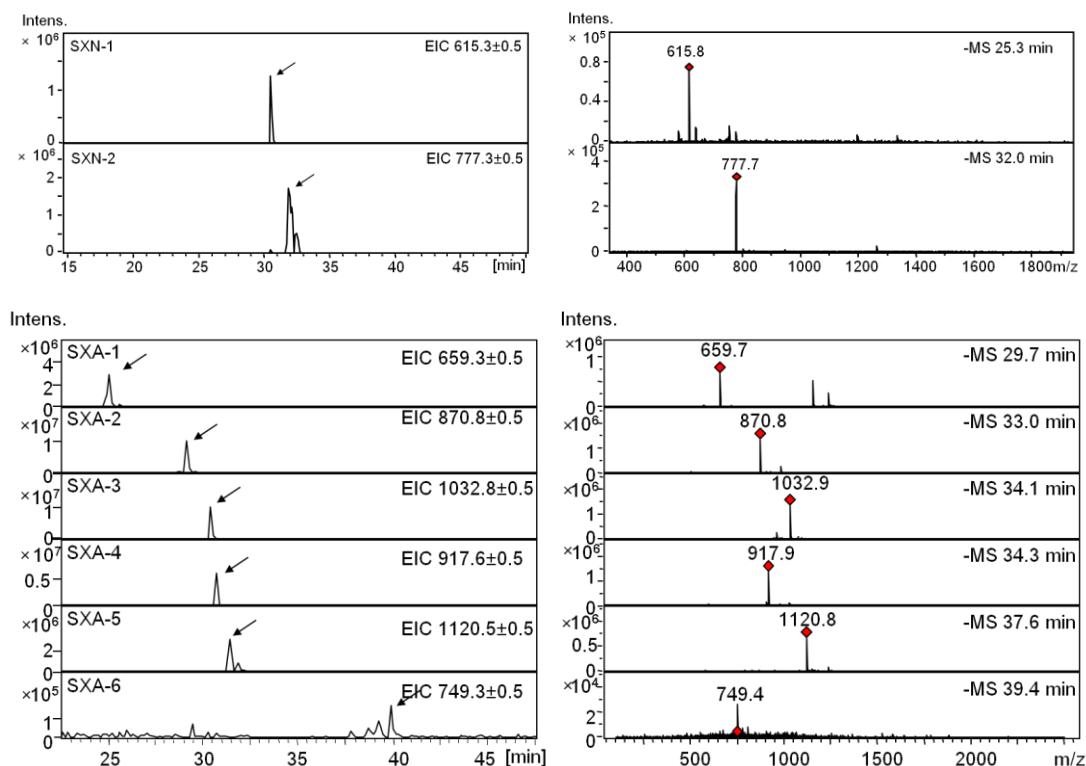


Fig. 2-15 FBJ-S1 細胞に作らせた Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖生成物の LC/MS
左 : extract ion chromatogram (EIC)、右 : MS スペクトル

Table 2-30 Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖生成物の MS/MS スペクトル帰属

Product	Fragments
SXN-1	579.1 ([M-H] ⁻), 310.9 ([C ₂ -H] ⁻), 267.1 ([Z ₀ -H] ⁻), 178.7 ([C ₁ -H] ⁻),
SXN-2	742.3 ([M-H] ⁻), 472.7 ([C ₃ -H] ⁻), 340.6 ([C ₂ -H] ⁻), 322.9 ([B ₂ -H] ⁻)
SXA-1	390.9 ([C ₂ -H] ⁻), 240.7 ([B ₁ -H] ⁻)
SXA-2	614.2 ([B ₂ -H] ⁻), 451.4 ([B ₂ -H] ⁻), 290.2 ([B ₁ -H] ⁻),
SXA-3	578.4([Y ₂ -H] ⁻), 451.5 ([B ₂ -H] ⁻), 289.8 ([B ₁ -H] ⁻)
SXA-4	649.4 ([C ₄ -H] ⁻), 336.8 ([B ₂ -H] ⁻), 354.8 ([C ₂ -H] ⁻)
SXA-5	899.6 ([Z ₄ -H] ⁻), 852.1 ([C ₅ -H] ⁻), 742.0 ([Y ₃ -H] ⁻), 720.3 ([C ₄ -H] ⁻), 558.3 ([C ₃ -H] ⁻)
SXA-6	1278.5 ([Z ₆ -H] ⁻), 1120.6 ([Y ₅ -H] ⁻), 1099.4 ([C ₆ -H] ⁻), 937.4 ([C ₅ -H] ⁻), 899.5 ([Z ₄ -H] ⁻), 599.1 ([C ₃ -H] ⁻), 395.7 ([C ₂ -H] ⁻)

FBJ-S1 細胞の Xyl-Ser-C12 由来の生成物において、中性糖は 2 種類、酸性糖は 6 種類が検出された。GAG 鎖の生合成経路と照合すると、SXN-1、SXN-2、SXA-1、SXA-3 から SXA-6 は GAG の基幹構造が伸長していると考えられる。SXA-2 と SXA-3 は構造中に NeuAc を含む等、GAG 鎖とは異なる構造であった。4-methylumbelliferyl (MU) または *p*-nitrophenyl (pNP) β-D-xylosides などの

β -D-xylosides を細胞へ投与することにより、得られた生成物においても、シアル酸を有した生成物が検出されたことが報告されている[26-28]。これらの現象はシアル酸転移酵素 α 2,3-sialyltransferase が GAG 鎖特異的 galactosyltransferase I とゴルジに共局在することに起因すると考えられる[29, 30]。

2.3.5.2 FBJ-LL 細胞で作られた Xyl-Ser-C12 生成物の解析

FBJ-LL 細胞に Xyl-Ser-C12 を投与して得られた糖鎖伸長生成物について、EIC とそれに対応する MS スペクトルを Fig. 2-16 に示した。EIC ではそれぞれの質量電荷比の値に相当するピークを表示している。また、これらの生成物における MS のデータを Table 2-31 に示した。表中の推定構造は MS/MS スペクトルによって帰属した。

FBJ-S1 細胞の Xyl-Ser-C12 由来の生成物において、中性糖は 2 種類、酸性糖は 5 種類が検出された。両細胞間での比較について後述する。

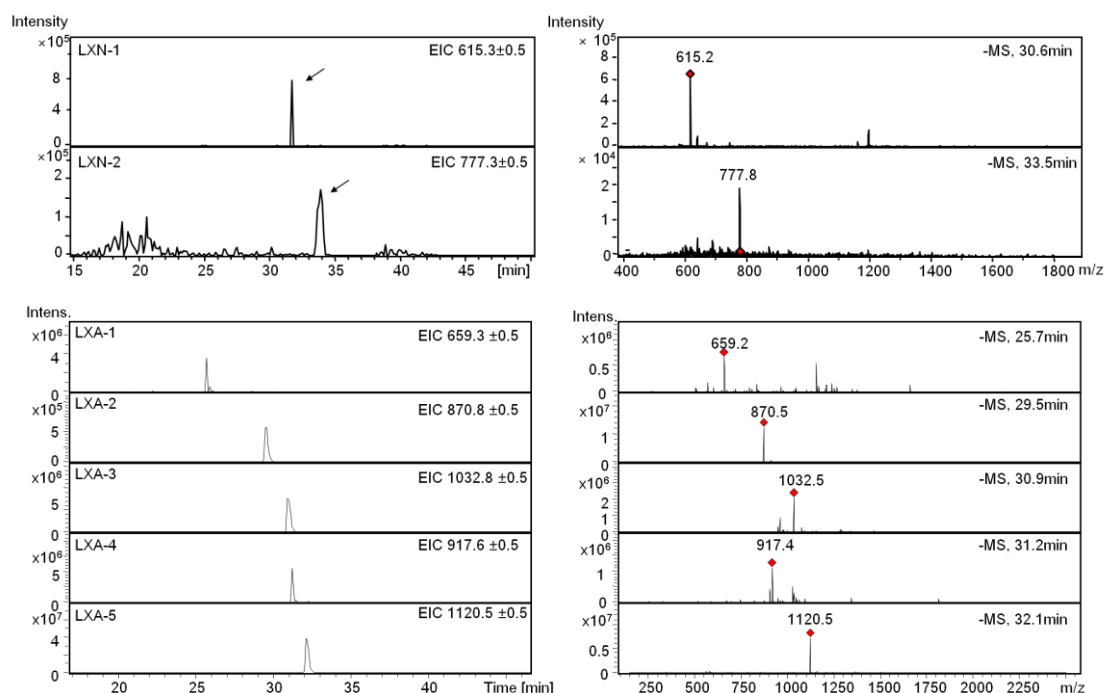


Fig. 2-16 FBJ-LL 細胞に作らせた Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖生成物の LC/MS
左 : extract ion chromatogram (EIC)、右 : MS スペクトル

Table 2-31 FBJ-LL 細胞に作らせた Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖生成物の解析結果

名称	構造 (P: Primer)	価数	m/z		Ion Type	R.T. (min)	Relative Area
			測定値	理論値			
LXN-1	Hex-P	1	615.2	615.3	[M+Cl] ⁻	30.6	76,727,695
LXN-2	Hex-Hex-P	1	777.8	777.3	[M+Cl] ⁻	33.5	15,873,288
LXA-1	HSO ₃ -Hex-P	1	659.2	659.3	[M-H] ⁻	25.7	1,869,739
LXA-2	NeuAc-Hex-P	1	870.5	870.8	[M-H] ⁻	29.5	67,018,894
LXA-3	NeuAc-Hex-Hex-P	1	1032.5	1032.8	[M-H] ⁻	30.9	1,583,518
LXA-4	HexA-Hex-Hex-P	1	917.4	917.6	[M-H] ⁻	31.2	6,186,615
LXA-5	HexNAc-HexA-Hex-Hex-P	1	1120.5	1120.5	[M-H] ⁻	32.1	25,614,742

protein amount: 0.119 mg, Relative Area=area/protein amount, R.T.; retention time

2.3.5.3 糖加水分解酵素を用いた FBJ 細胞で作られた Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖生成物の構造解析

FBJ-S1 細胞および FBJ-LL 細胞に Xyl-Ser-C12 を投与して、得られた糖鎖生成物を LC-MS/MS を用いて構造解析することで、枝分かれ構造の無い GAG 型の糖鎖伸長生成物が得られることを確認した。また、クロマトグラムのピーク面積の値から、細胞の生合成経路における GAG 鎖伸長過程に一定の傾向があることが伺えた。しかし、それぞれの糖の組成や結合様式を十分に解明できていない。例えば、分子量と MS/MS のフラグメントパターンでは、Xyl から Hex が 2 糖と HexA が伸長した橋渡し 4 糖部分や、HexNAc と HexA で構成される繰り返し構造部分の単糖の種類を決定することはできない。

そこで本節では、エキソグリコシダーゼである β-ガラクトシダーゼ、β-グルクロニダーゼ、α2,3-ノイラミニダーゼ、β-N-アセチルヘキソサミニダーゼ、α-N-アセチルガラクトサミニダーゼおよびエンド型 GAG 分解酵素であるヘパリチナーゼを用いて、2.2.7 に示した条件で Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖伸長生成物を処理し、処理後の生成物を LC-MS/MS を用いて解析することで橋渡し部分および繰り返し部分の構造決定を行った。

2.3.5.3.1 β-ガラクトシダーゼ処理による構造決定

末端に Gal を有する Xyl-Ser-C12 由来の中性糖鎖伸長生成物を β-ガラクトシダーゼで処理した時の検出量 (LC-MS) を未処理のサンプルと比較した結果を

Fig. 2-17 に示した。

Fig. 2-17 に示したように、SXN1 と SXN2 が β -ガラクトシダーゼ処理により、検出量が減少して、 β -ガラクトシダーゼにより切断されたと考えられた。SXN1 と SXN2 とともに非還元末端に β -ガラクトシド結合を有し、構造が Gal β -Xyl-Ser-C12、Gal β -Gal β -Xyl-Ser-C12 である事が明らかとなった。Xyl から伸長した Hex2 分子は両方とも Gal β であることが示され、Xyl-Ser-C12 由来生成物が、GAG 鎖の生合成経路に沿って糖鎖伸長を受けていると考えられる。

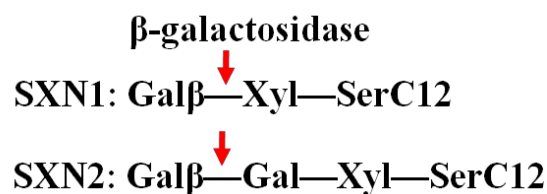
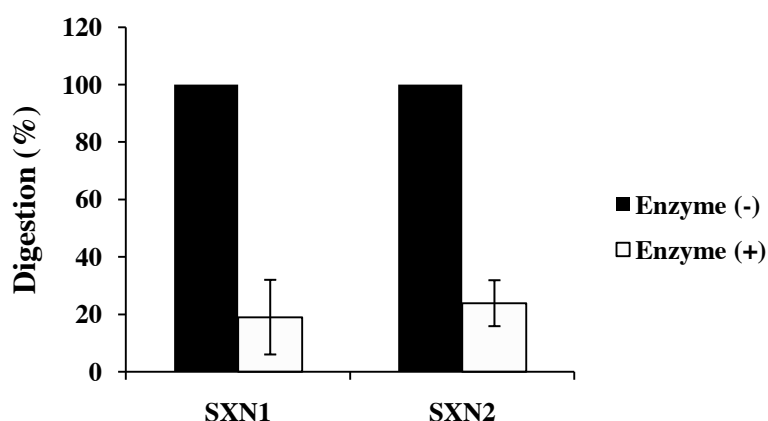


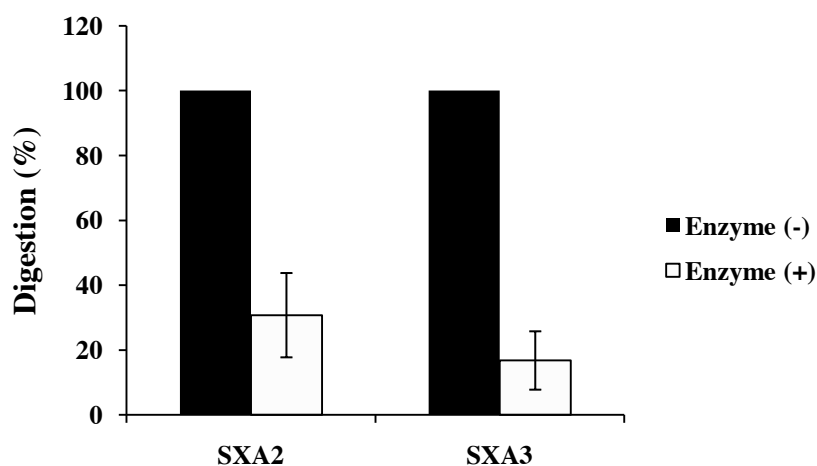
Fig. 2-17 β -ガラクトシダーゼによる Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖生成物(SXN1 と SXN2)の切断

FBJ-S1 細胞で作られた Xyl-Ser-C12 中性生成物 (SXN1 あるいは SXN2) を β -ガラクトシダーゼで処理し、その処理前後による各生成物の量を、LC-MS により測定した。この検出量を元にして、 β -galactosidase による各生成物の切断率を算出した。矢印は予想される切断部位を示す。

2.3.5.3.2 α 2,3-ノイラミニダーゼ処理による構造決定

末端にシアル酸を有する構造を持つ Xyl-Ser-C12 由来の酸性糖鎖伸長生成物 (SXA2 と SXA3) を α 2,3-ノイラミニダーゼで処理した時の検出量 (LC-MS により) は未処理のサンプルと比較した結果を Fig. 2-18 に示した。Fig. 2-18 に示したように、シアル酸を有する 2 つの生成物 SXA2 と SXA3 (SXA2: NeuAc-Gal-P、

SXA3: NeuAc-Gal-Gal-P) が α -2,3 ノイラミニダーゼにより、切断されたことから、シアル酸の結合様式は α 2-6 結合ではなく α 2-3 結合であることが強く示唆される。SXA2 は α 2-3 ノイラミニダーゼ処理により SXN1 を与えたので、構造の推定が間違っていないことが保証された。



α 2,3-Neuraminidase



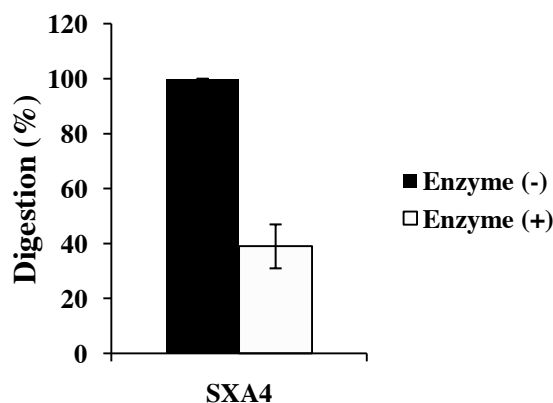
Fig. 2-18 α 2,3-ノイラミニダーゼによる Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖生成物 (SXA2 と SXA3) の切断

FBJ-S1 細胞で作られた Xyl-Ser-C12 由来の酸性生成物 (SXA2 と SXA3) を α 2,3-ノイラミニダーゼで処理して、LC-MS により基質の分解量を測定した。この検出量を元にして、 α 2,3-ノイラミニダーゼによる切断率を算出した。矢印は予想される切断部位を示す。

2.3.5.3.3 β -グルクロニダーゼ処理による構造決定

末端に HexA を有する構造を持つ Xyl-Ser-C12 由来の酸性糖鎖伸長生成物 SXA4 を β -グルクロニダーゼで処理した時の検出量 (LC-MS により) は未処理のサンプルと比較した結果を Fig. 2-19 に示した。Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖生成物が、GAG 鎖の生合成経路に沿って糖鎖伸長を受けている場合、Gal-Gal-Xyl から伸長した HexA は GlcA β なので、 β -グルクロニダーゼによって HexA-Gal-Gal-P の構造を持つ SXA4 の酸性糖が切断を受けると予想された。 β -

グルクロニダーゼ処理により、SXA4 の量は 60%減少した(Fig. 2-19)。よって、Gal-Gal-Xyl から伸長した HexA は GlcA β であることが示された。



β -Glucuronidase



Fig. 2-19 β -グルクロニダーゼによる Xyl-Ser-C12 由来の酸性生成物 (SXA4) の切断

FBJ-S1 細胞で作られた Xyl-Ser-C12 由来の HexA を有する酸性糖鎖生成物 (SXA4) を β -グルクロニダーゼで処理して SXA4 の量の減少を LC-MS により測定した。この検出量を元にして、 β -グルクロニダーゼによる切断率を算出した。矢印は予想される切断部位を示す。

2.3.5.3.4 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ処理による構造決定

末端に HexNAc を有する構造を持つ Xyl-Ser-C12 由来の酸性糖鎖生成物 (SXA5 と SXA6) を β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ (β -HexNAcase) で処理した時の検出量を未処理のサンプルと比較した結果を Fig. 2-20 に示した。

β -HexNAcase は糖鎖の非還元末端の β -アセチルヘキソサミンを切断する酵素である。 β -HexNAcase の処理によって、生成物の末端 HexNAc の切断状況から、GAG 鎖の構造を判断できる。コンドロイチン硫酸型の繰り返し部分の構造は GalNAc β 1-4GlcA であり、ヘパラン硫酸型の繰り返し部分の構造は GlcNAc α 1-4GlcA である。前者は β -HexNAcase で末端の N-アセチルヘキソサミンが切断されるが、後者は酵素作用を受けない。FBJ 細胞から得られた Xyl-Ser-C12 由来の酸性生成物の中で、 β -HexNAcase の作用を受けるものがあるとすれば SXA5 と SXA6 であると考えられる。Fig. 2-20 に示すように、この

二つの生成物はこの酵素作用を受けなかった。そこで、SXA5 と SXA6 の末端 HexNAc の結合様式は β 結合ではなく α 結合である可能性が示唆された。これは伸長糖鎖がコンドロイチン硫酸型ではなく、ヘパラン硫酸型であることを暗示している。

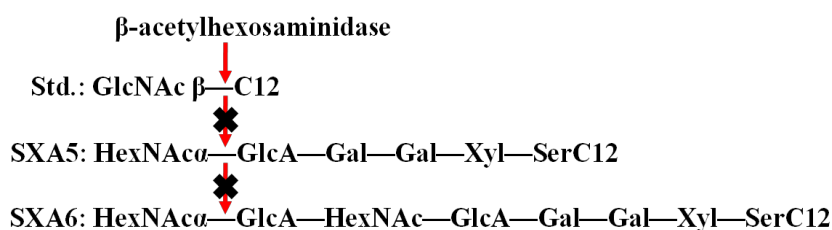
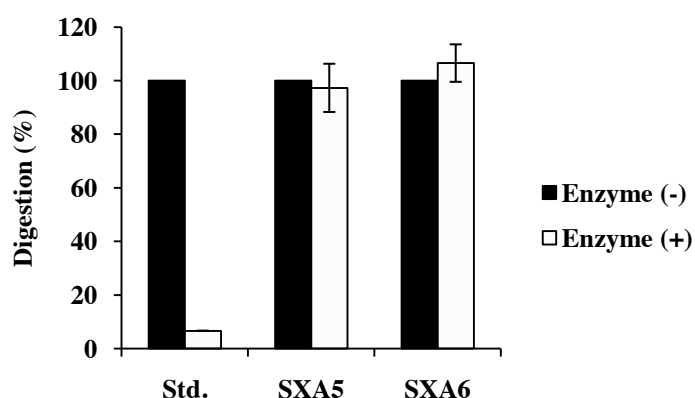
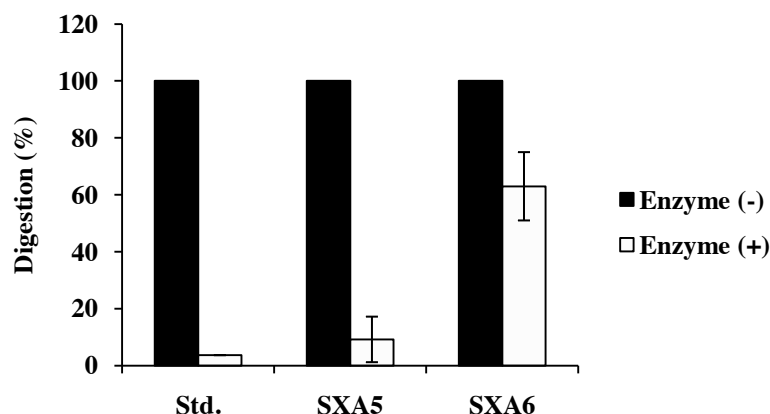


Fig. 2-20 β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼによる Xyl-Ser-C12 由来の酸性生成物(SXA5 と SXA6)の切断

FBJ-S1 細胞で作られた HexNAc を有する Xyl-Ser-C12 由来の酸性生成物 (SXA5 あるいは SXA6) を β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼで処理して、SXA5 および SXA6 の分解を LC-MS により測定した。この検出量を元にして β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼによる切断率を算出した。矢印は予想される切断部位を示す。

2.3.5.3.5 α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ処理による構造決定

末端に HexNAc を有する構造を持つ HexNAcXyl-Ser-C12 由来の酸性糖鎖伸長生成物、SXA5 および SXA6 の *N*-アセチルヘキソサミンが α 結合であることを確認するため、これらを α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ (α -GalNAcase) で処理した。実験結果を Fig. 2-21 に示した。



α -acetylgalactosaminidase

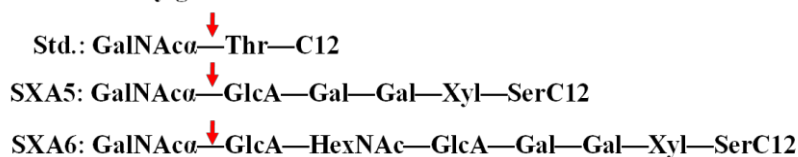


Fig. 2-21 α -N-acetylgalactosaminidase による Xyl-Ser-C12 由来の酸性生成物(SXA5 と SXA6)の切断。

FBJ-S1 細胞で作られた HexNAc を有する Xyl-Ser-C12 酸性生成物(SXA5 および SXA6) を α -N-アセチルガラクトサミニダーゼで処理して、SXA5 および SXA6 の分解を LC-MS により測定した。この検出量を元にして、 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼによる切断率を算出した。矢印は予想される切断部位を示した。酵素作用のポジティブコントロールとして GalNAc α -The-C12 を用いた。

α -GalNAcase は糖鎖の非還元末端の α -アセチルガラクトサミンを切断する酵素である。非還元末端の α -アセチルグルコサミンには作用しない。FBJ 細胞から得られた Xyl-Ser-C12 由来の非還元末端に HexNAc を有する酸性糖鎖生成物の中で、 α -GalNAcase の作用を受ける可能性があるのは、SXA5 と SXA6 である。Fig. 2-21 に示したように、SXA5 の切断率は 91%、SXA6 の切断率は 38% であった。SXA5 のほとんどと SXA6 のすなわち一部は末端が α -GalNAc であることが示唆された。ヘパラン硫酸の糖鎖骨格の生合成に関与する糖転移酵素 EXTL2 は GlcNAcT-I 活性だけでなく、 α -N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (α -GalNAcT) 活性も有することが知られている[31]。そこで、 α -GalNAcT は、結合領域四糖あるいはヘパラン硫酸オリゴ糖にも α 1-4 で GalNAc 残基を転移することが考えられる。また、 α -GalNAc 転移活性は α -GlcNAc 転移活性より高いことも報告されている[31, 32]。しかし一方で、SXA6 の非還元末端の HexNAc の一部が α -アセチルグルコサミンである可能性も残っている。この場

合には、橋渡し構造 (GlcA-Gal-Gal-Xyl-) の先にヘパラン硫酸の基本構造を伸長した可能性もある。

2.3.5.3.6 ヘパリチナーゼ処理による構造決定

Fig. 2-22 に GAG 鎖の繰り返し構造を持つ上に非還元末端に HexNAc を有する Xyl-Ser-C12 由来の酸性糖鎖伸長生成物 (SXA6) をヘパリチナーゼ (heparitinase) で処理した結果を示す。

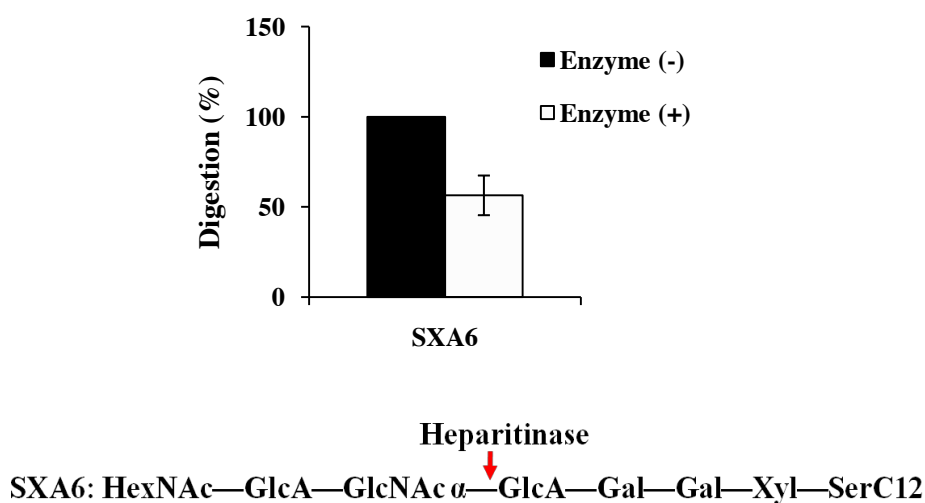


Fig. 2-22 ヘパリチナーゼによる Xyl-Ser-C12 由来の酸性糖鎖生成物(SXA6)の切断

FBJ-S1 細胞で作られた Xyl-Ser-C12 由来の酸性糖鎖生成物 (SXA6) をヘパリチナーゼで処理して、基質の分解を LC-MS により測定した。この検出量を元にして、ヘパリチナーゼによる切断率を算出した。矢印は予想される切断部位を示す。

ヘパリチナーゼはヘパラン硫酸の GlcNAc1-4GlcA のグリコシド結合を加水分解するエンド型の酵素である。反応によって GAG 鎖特有の 2 糖繰り返し構造の部分が切り出され、ヘキスロン酸を非還元末端に持つオリゴ糖を生成する。生成物がヘパラン硫酸型であれば、GAG の繰り返し構造を持つ SXA6 が Heparitinase 処理によって切断されるし、SXA5 あるいは SXA6 の上記の実験 (Fig. 2-21) で見るとヘキソサミンが α グルコサミンではなく α ガラクトサミンであるときは分解を受けないと思われる。Fig. 2-22 に示すように、Heparitinase 処理で、SXA6 の量が約 40%減少していた。分解を受けなかったものは、分解不十分のためか、ヘキソサミンが α グルコサミンではなく α ガラ

クトサミンであるためかわからない。SXA5の末端には α ガラクトサミンがあることが示されているが (Fig. 2-21)、さらに二糖が伸長してSXA6になるときは、還元末端に α グルコサミンを持つものが選択的に選ばれてそれに糖鎖が伸長してSXA6となっている可能性がある (つまりこのものはHeparitinaseで橋渡し構造を生じやすい)。ともかく、少なくともXyl-Ser-C12由来の酸性生成物の一部にはヘパラン硫酸型の糖鎖が含まれていることが示された。

2.3.5.4 Xyl-Ser-C12由来の糖鎖伸長生成物の両細胞間での比較

FBJ-S1細胞とFBJ-LL細胞にXyl-Ser-C12糖鎖プライマーを投与して糖鎖伸長生成物を得て分析した。その解析結果 (Table 2-29 と Table 2-31) を元にして、総生成量 (酸性生成物と中性生成物毎に100%とした) に対する各生成物の割合をTable 2-32にまとめた。

FBJ細胞におけるXyl-Ser-C12由来の糖鎖生成物中性生成物としては、両細胞において、Gal β -Xyl-Ser-C12とGal β -Gal β -Xyl-Ser-C12が検出されていた。GAG鎖の生合成経路と照合すると、生成物はGAGのコア構造を有していると考えられる。酸性生成物では、GAGのコア構造を伸長している生成物は低転移性のFBJ-S1細胞で多いことから、FBJ-S1細胞においてGAG鎖の生合成が活発であることが予想される。よって、GAG鎖がFBJ細胞の転移性に関与する可能性があると考えられた。

Table 2-32 Xyl-Ser-C12由来の糖鎖生成物の比較

Products (P:Xyl-Ser-C12)	Percentage (%)	
	FBJ-S1 (低転移)	FBJ-LL (高転移)
Gal β -P	51.8	82.9
Gal β -Gal β -P	48.2	17.1
Gal β S-P	2.6	1.8
NeuAc α -Gal β -P	25.5	65.5
NeuAc α -Gal β -Gal β -P	10.8	1.5
GlcA β -Gal β -Gal β -P	5.1	6.0
GalNAc α -GlcA β -Gal β -Gal β -P	52.5	25.0
GalNAc α -(GlcA β -GlcNAc α)-GlcA β -Gal β -Gal β -P	3.5	—

*破線を境として上側の生成物は中性生成物、下側の生成物は酸性生成物である。

2.4 考察

本章では、転移性の異なったマウス骨肉腫由来の FBJ-S1 細胞と FBJ-LL 細胞を用い、糖鎖の発現パターンの違いから転移性と相関のある糖鎖構造を探索した。両細胞における GalNAc-Thr-C12、GlcNAc-C12、Lac-C12 および Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖伸長生成物の構造解析の結果を両細胞間で比較した。各糖鎖プライマーを投与すると、細胞内在性の糖鎖に相当する糖鎖が伸長していた。特筆すべきことは、Lac-C12 投与の結果より、低転移性の FBJ-S1 細胞において、Gb4、GM1 型、GD1a 型などの割合が顕著高いことが見出された。内在性糖脂質の解析結果を併せて考えると、低転移性の FBJ-S1 細胞において糖脂質の生合成が活発であることが示唆された。なお、GalNAc-Thr-C12 また GlcNAc-C12 投与の結果より、細胞間で複数の生成物の生成量に差異が見出された。例えば、HSO₃+Hex-GlcNAc-C12 が FBJ-S1 細胞において多く検出された。FBJ-LL 細胞において、SGaA-4 (NeuAc-Hex-(NeuAc-HexNAc)-GalNAc-Thr-C12) が検出されなかった。SGaA-2 (NeuAc-Hex-GalNAc-Thr-C12) と SGaA-5 (NeuAc-Hex-(NeuAc-Hex-HexNAc)-GalNAc-Thr-C12) の発現量が FBJ-S1 細胞より増加していた。これらの O-グリコシド型糖鎖は FBJ 細胞の転移につながる可能性があると考えられる。

これまで、*p*-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside (Xyl-pNP)[33]、methylumbelliferyl β-D-xylopyranoside[34]、β-estradiol xylopyranoside[35]、naphthol xyloside derivatives (XylNapOH) [36-38]など複数の β-D-xyloside は GAG の生合成のイニシエーターまたは GAG の生合成阻害剤として開発された。外来性の β-D-xyloside を培養細胞に添加して得られた生成物が主に GAG の橋渡し部分構造と類似した構造など(Gal-Xyl-R、Gal-Gal-Xyl-R、NeuAc-Gal-Xyl-R)を持つ短いオリゴ糖であった[39, 40]。こうした背景から、Xyl-Ser-C12 が糖鎖プライマーとして開発され、GAG オリゴ糖の生合成を誘導する優れた能力が期待される。Xyl-Ser-C12 および Xyl-pNP を CHO 細胞に投与して得られたそれぞれの糖鎖伸長生成物を解析して比較を行ったところ、Xyl-pNP より、Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖伸長生成物に長い糖鎖を持つ生成物が検出された。Xyl-Ser-C12 がより良い GAG 鎖オリゴ糖を合成する能力が示された[41]。本研究では

Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖伸長生成物の構造も糖加水分解酵素や MS フラグメントパターンの解析などにより特定することができた。その結果、Xyl-Ser-C12 には GAG 鎖特有の橋渡し 4 糖構造が伸長していることが示され、ヘパラン硫酸型の GAG 鎖が伸長していることが示唆された。

4-methylumbelliferyl (MU) また *p*-nitrophenyl (pNP) β -D-xylosides などの β -D-xylosides を細胞へ投与することにより、コンドロイチン硫酸型の生成物が多く検出されたことが多く報告されている[26, 33]。一方、Estradiol β -D-xyloside と naphthol β -D-xyloside などの疎水性のアグリコン構造を持つ β -D-xylosides を細胞に投与することにより、効率良くヘパラン硫酸型の生成物が得られている[35, 42]。 β -D-xylosides のアグリコン構造を修飾することで、アグリコン構造の疎水性などの性質が変わったに伴い、ヘパラン硫酸型の生成物の生成量を向上したことが実証された。しかし、アグリコン構造と生成物の組成（ヘパラン硫酸型またはコンドロイチン硫酸型）への影響は未だに不明である。また、SXA1(GalS-Xyl-Ser-C12)のように、GAG 鎖のコア構造での硫酸化がコンドロイチン硫酸の生合成に特徴的な修飾であることが報告されているが[30]、ヘパラン硫酸の橋渡し部分には、このような硫酸化は発見されなかった。以上のことから FBJ 細胞において、Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖伸長生成物がヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸の両方の生合成経路を経由していることが考えられる。糖加水分解酵素による構造解析より、Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖伸長生成物にヘパラン硫酸型の GAG 鎖が含まれていると結論付けたが、コンドロイチン硫酸型の糖鎖伸長生成物の存在は否定することができないと考えられる。

シアル酸を含めた生成物 (SXA2: NeuAc-Gal-Xyl-R) については、含まれる NeuAc は α 2-3 結合であることが示された。他の β -D-xylosides 由来の生成物の解析結果と一致している[29, 30]。NeuAc を付加する α 2,3-sialyltransferase が GAG 鎖特異の galactosyltransferase I とゴルジ体に共局在することが知られており[29]、シアル酸を含めた生成物が検出されたことに繋がっていると考えられる。SXA3 (SXA3:NeuAc-Gal-Gal-Xyl-R) にはシアル酸が含まれているが、この構造はこれまで報告されていない。この生成物の検出は GAG 特異な GlcA transferase I と α 2,3-sialyltransferase に共局在することが示唆された[29, 30]。

FBJ細胞における Xyl-Ser-C12 の生成物の比較解析により、GAG鎖に属する糖鎖（中でもコンドロイチン硫酸鎖ではなくおそらくヘパラン硫酸鎖の）の発現量が高転移性の FBJ-LL 細胞において低下している事実が初めて見出された。今後は、細胞内の GAG 鎖の発現レベルと転移性の関連性を調べる事が重要となる。

2.5 結言

本章では、糖鎖プライマー GalNAc-Thr-C12、GlcNAc-C12、Lac-C12、Xyl-Ser-C12 を用いて、低転移性の FBJ-S1 細胞と高転移性の FBJ-LL 細胞における生成物の比較を検討した。各糖鎖プライマーを投与すると、細胞内在性の糖鎖に相当する糖鎖が得られた。Lac-C12 投与の結果より、低転移性の FBJ-S1 細胞において、Gb4、GM1 型、GD1a 型などの発現が顕著に高いことがわかった。また、Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖伸長生成物の解析により、高転移性の FBJ-LL 細胞においてヘパラン硫酸型 GAG 鎖に属する糖鎖の発現量が低下している事が見出された。これらの糖鎖は FBJ 細胞の転移に関与する可能性が考えられる。

第3章 FBJ 細胞におけるガングリオシド GD1a による肝細胞増殖

因子の発現調節

3.1 緒言

第2章の結果より、Lac-C12の投与により、低転移性のFBJ-S1細胞において、GD1aなどのガングリオ系列の発現が顕著に高いことを見出した。また、ガングリオシドGD1aはマウス骨肉腫FBJ細胞の運動性、細胞外基質への接着性および転移性をも制御していることが既に報告されている[19, 20, 43]。またこれまでに、FBJ細胞において、GD1aはTNF α (tumor necrosis factor α)を介してMMP9 (matrix metalloprotease 9)の発現を調節することが見出されている[44]。MMP9は細胞周辺の細胞外基質の分解に関与するタンパク質分解酵素であり、がん組織で過剰発現しており、がん細胞の浸潤や転移に深く関与している[24, 45]。MMP9がGD1aによるFBJ細胞転移の制御に関与することは示唆されたが、その制御機構についてまだ不明な点が多く、GD1aがFBJの転移機構を抑える経路の全体像はまだ掴めていない。

FBJ細胞において、腫瘍抑制因子であるCaveolin1の発現量はGD1aにより影響されていることが報告されている[23]。Caveolin1はCaveolaeと呼ばれる細胞膜陥没構造を形成する分子量20 kD程度の主要タンパクで、Caveolaeに集積する様々な受容体やシグナルの活性を制御することが知られている。Caveolin1はほとんど全ての細胞に発現しているが、腫瘍細胞ではその発現が抑えられている。腫瘍細胞にCaveolin1を発現させるとその転移性が抑えられることも知られている[46, 47]。ただし最近では前立腺がんではがんの悪性度とCaveolin1の発現に相関性があることが分かっている[48]。

高転移性のFBJ-LL細胞では、ガングリオシドGD1aによってCaveolin1の発現が制御されていることが示されている[23]。すなわち、GD1aの発現量の少ないFBJ-LL細胞に比べて、GD1aを多く発現しているFBJ-S1細胞でのCaveolin1の量は5倍であった。また、FBJ-LL細胞にGD1aを与えて培養すると48時間後にはCaveolin1の量が上昇していた。糖脂質の生合成の阻害剤

D-PDMP で低転移性の FBJ-S1 細胞を処理すると、GD1a の量が減るだけでなく Caveolin1 の生産が抑えられていた。よって Caveolin1 の発現は FBJ 細胞の転移に関与する可能性が考えられる。

Caveolin1 の発現レベルは様々ながんの転移と相関することが報告されているが[46, 47, 49], FBJ 細胞における役割は未だにはっきりわかっていない。そこで本章では、GD1a による細胞の転移制御機構における Caveolin1 の関与を知るために、Caveolin1 が高発現している FBJ-S1 細胞において、RNA 干渉によって *Caveolin1* をノックダウンさせ、Caveolin1 の発現低下が FBJ 細胞に及ぼす影響について検討した。

3.2 実験材料と方法

3.2.1 細胞培養

FBJ-S1 細胞と FBJ-LL 細胞の培養は、非働化した 10%ウシ胎児血清 fetal bovine serum (FBS) (TBD-Tianjin Hao Yang Biological Company)、ペニシリン G カリウム 5 万 unit/mL、およびストレプトマイシン 100 g/L を含有させた RPMI-1640 (GIBCO)を培地として用い、37 °C、5% CO₂、95% air 下の無菌恒温槽 (SANYO)で培養した。LA5-30 細胞は β 1-4GalNAcT-1 (GM2/GD2-synthase) cDNA を FBJ-LL 細胞に導入して得られた安定過剰発現株である[20]。M5 細胞はコントロールベクターを FBJ-LL 細胞に導入して樹立された細胞である。LA5-30 細胞と M5 細胞は FBJ 細胞と同様の条件で培養した。

細胞の継代は 60 mm ディッシュ(BD Falcon)を用いて行った。細胞を継代する際は、培地を吸引除去した後、PBS (-)を加えて細胞表面を洗い、0.05%トリプシン/PBS (-) 0.02% EDTA を加えて細胞をディッシュの底から剥離した。FBJ 細胞の細胞浮遊液をトリプシン溶液の 2 倍量の RPMI-1640 培地 (10% FBS 含有) に懸濁してトリプシンを不活性化させた。4 °C、1,000 rpm で 5 分間遠心分離をして、上清を取り除いてから新しい培地に適当な濃度で播種した。

3.2.2 GD1a 添加実験

FBJ-LL 細胞を播種し、24 時間培養後、無血清培地で細胞を洗浄し、所定の濃度の GD1a (和光純薬工業)を含んだ無血清培地で細胞を 4 時間培養した。その後、血清 5%になるように添加して、さらに細胞を 20 時間培養した。必要に応じて、同様の操作を繰り返した。

3.2.3 *Caveolin1* siRNA およびトランスフェクション

FBJ-S1 細胞を 60 mm ディッシュに播種して 24 時間後に、ベクターに挿入された mouse *Caveolin1* に対する siRNA (5'-CACACAGTTTCGACGGCATCT-3')

(500 ng/mL)を Fugene 6 (Roche)を用いて細胞に導入した。同時に、コントロールとして、ベクターに挿入されたコントロール配列 (5'-TCGCGCTCCACATGATGACTA-3')を同様にトランスフェクションした。トランスフェクション後 G418 (200 µg/mL) (AMRESCO) を用いて、二週間培養して耐性クローンを単離し、RT-PCR により *Caveolin1* の発現の抑制効果を調べた。抑制効果の高いクローンを *Caveolin1* siRNA 安定発現株として単離した。

3.2.4 *Caveolin1* 強制発現ベクターの構築および細胞への導入

FBJ-S1 細胞から抽出した mRNA より、逆転写反応と PCR により *Caveolin1* をコードする cDNA を得て、ベクター pIRESpuro3 に挿入することで、*Caveolin1* 強制発現ベクターを構築した。構築したベクターを *Caveolin1* siRNA 安定発現細胞株 B2A にトランスフェクションし、48 時間後、RT-PCR で *Caveolin1* 強制発現を確認した。またコントロールとしてベクターのみをトランスフェクションさせた細胞を使用した。

3.2.5 RNA 抽出および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

各種条件で細胞を培養した後、total RNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて添付のプロトコールに従って抽出した。抽出した RNA (1 µg)より、TAKARA AMV RT-PCR Kit (TAKARA)を用い、逆転写反応による cDNA の作製を行った。PCR は、TaKaRa Ex Taq (TAKARA)を用い、添付のプロトコールに従って PC707 Program Temp Control System (ASTECH, Japan)で行った。PCR 反応産物は 2% アガーロスゲルで電気泳動し、ethidium bromide 染色で可視化した。検出されたバンドを Bio-profile Bio 1D image analyzer (Vilber Lourmat) により定量化した。各遺伝子の定量値は β -actin を用いて補正した。用いたプライマーの配列を Table 3-1 に示す。

Table 3-1 本章で使用したプライマーの配列

Gene	Sequences (5'-3') of forward primer	Sequences (5'-3') of reverse primer
<i>Actin</i>	ACACTGTGTGCCCATCTACGAGG	AGGGGCCCGACTCGTCGTCATACT
<i>Arhgdib</i>	CGACCTGGACAGCAAGCTCA	CCTGCCAACCATGAATGTGG
<i>Arhgdig</i>	AGACGTGCCTGCTGATCGTG	GTCGCTGCGCAGGTCTTTTT
<i>Bcl-2</i>	GTCGCATCGTGGCCTTTTTTC	CGTCTAGGCCCAACCCTGTG
<i>Catenin-a</i>	TGGAAGCCACCAAGTCCTC	GCTTGGCCAGCACAATGATG
<i>Catenin-b</i>	TCATTCTGGCCAGTGGTGGA	GAGCACAGATGGCAGGCTCA
<i>Caveolin-1</i>	CTACAAGCCCAACAACAAGGC	AGGAAGCTCTTGATGCACGGT
<i>HGF</i>	GAAGAAGGGGGACCCTGGTG	TCCCAACGCTGACAGGGAAT
<i>PKN1</i>	AGCCTTCAGCGCCATACTGC	TGGTCTCGCCAGAACACAGC
<i>PKN2</i>	ATTGGCGTGATTGGCGATCT	GGGCTGGAGGAGGTTTCAGGT
<i>PDGF-a</i>	GGGCGCTCTTCCTTCCTCTC	GGCATTGCACATTGCGGTTA
<i>RhoA</i>	GTGGCGGATATCGAGGTGGA	CAGCTCTCGTGGCCATCTCA
<i>RhoB</i>	AGACGTGCCTGCTGATCGTG	GTCGCTGCGCAGGTCTTTTT
<i>RhoC</i>	GTGGACCCACAGGTGAAGC	GCAGTCCTGGGCAGAAAGGA
<i>RhoG</i>	GCGCACCGTGAACCTAAACC	ACAGCCTCCGCAAACACCTC
<i>Stat1</i>	CTGGCAGCTGAGTTCCGACA	TGCTCAGCTGGTCTGCGTTC
<i>Stim-1</i>	GCTGTTTGGGCCTCCTCTC	CCTCCACCTCATGGGTGAGC
<i>Twist1</i>	CTGCCCTCGGACAAGCTGAG	CTCTGTCCACGGGCCTGTCT
<i>VEGF-a</i>	CTGCACCCACGACAGAAGGA	ACGCACTCCAGGGCTTCATC
<i>VEGF-b</i>	CGCCTGCCTGTCTTGTTCTT	CCAGTGGGCACACATTCCAG
<i>Vim</i>	AGCTGCAGGCCAGATTCAG	CTGCTCTCCTCGCCTTCCAG

3.2.6 Western Blotting

PBS(-)で細胞を二回洗浄し、Laemmli sample buffer [50] (62.5 mM Tris、10% Glycerol、2% SDS、0.02% bromophenol blue)を加え、37 °C で、30 分間インキュベートして、タンパク質抽出液とした。タンパク質抽出液を 12.5% SDS-PAGE で電気泳動し、その後ニトロセルロース膜にブロッティングして、抗 Caveolin1 抗体 (1:2,000) (Santa Cruz)または抗 β -actin 抗体 (1:2,000) (Santa Cruz)で室温 1 時間反応させた。洗浄後、5,000 倍希釈した二次抗体 (HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体または HRP 標識抗 mouse IgG 抗体) (Cell Signalling) と室温で 1 時間反応させた。さらに洗浄した後、ECL (Amersham Bioscience) で蛍光発色させ、検出されたバンドを Bio-profile Bio 1D image analyzer (Vilber Lourmat) により定量化した。

3.2.7 Wound Healing Assay

細胞の遊走能を wound healing assay により評価した。35 mm ディッシュ(BD Falcon)に 2×10^5 細胞を播種し、コンフルエントになるまで単層培養した。その後、培地を取り除き、滅菌済みのマイクロチップの先端で細胞の層を優しく傷つけた。12 時間毎に細胞の遊走状態を顕微鏡で観察した。さらに細胞の遊走能を定量化するため、傷内に侵入した細胞数を数えることで、細胞の遊走能を比較した。また実験は $n=3$ で行い、細胞増殖による影響を抑えるために、培地中の FBS を 0.5%にした。

3.2.8 統計的解析

統計的解析は Excel (Microsoft 社) を用い、t 検定を行った。統計学的処理を行った結果は、平均 \pm 標準偏差で示した。

3.3 実験結果

3.3.1 siRNA による *Caveolin1* の発現抑制

FBJ 細胞における *Caveolin1* の役割を調べるために、*Caveolin1* 高発現の低転移性 FBJ-S1 細胞において、*Caveolin1* siRNA を用いたノックダウンアッセイを行った。3.2.3 で樹立された *Caveolin1* siRNA 安定発現させた FBJ-S1 細胞 C2A, A1A, A3C, B2A から RNA を抽出し、それぞれの細胞における *Caveolin1* mRNA の発現を RT-PCR により評価した。コントロールと比べて、四つの安定発現クローン株において、*Caveolin1* mRNA の発現が低下していた(Fig. 3-1)。また western blotting により *Caveolin1* siRNA を導入した FBJ-S1 細胞では、*Caveolin1* のタンパク質の発現が抑制されていた(Fig. 3-2)。

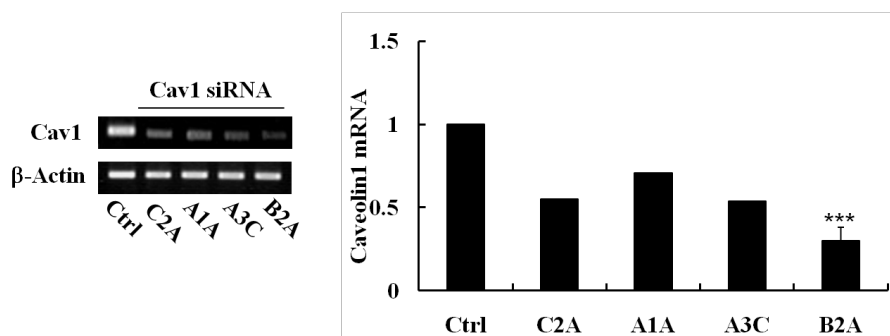


Fig. 3-1 FBJ-S1 細胞(C2A, A1A, A3C, B2A)における siRNA による *Caveolin1* (*Cav1*)の発現抑制効果の RT-PCR での評価

Ctrlはコントロール配列が導入された FBJ-S1 細胞。*Caveolin1* の定量値は β -actin の定量値で補正した。コントロール細胞における *Caveolin1* の発現量を 1 とした。B2A の結果は平均 \pm 標準偏差で示した(n=3)。*** p <0.001.

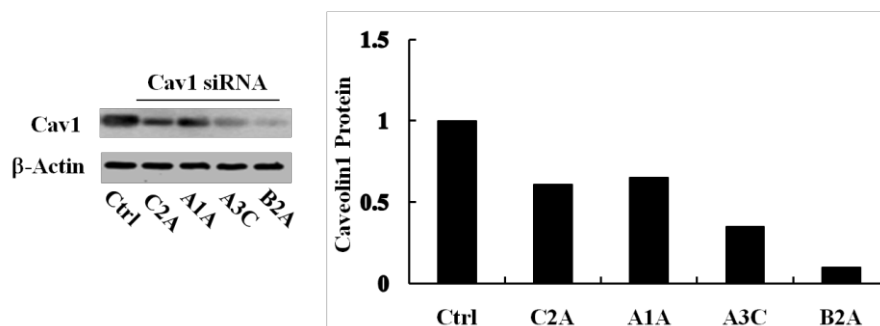


Fig. 3-2 FBJ-S1 細胞(C2A, A1A, A3C, B2A)における siRNA による *Caveolin1* の発現抑制効果の western blotting での評価

Ctrlはコントロール配列が導入された FBJ-S1 細胞。*Caveolin1* の定量値は β -actin の定量値で補正した。コントロール細胞における *Caveolin1* の発現量を 1 とした。

3.3.2 *Caveolin1* の発現抑制による細胞の遊走能の向上

転移性の高い FBJ-S1 細胞において、*Caveolin1* は FBJ-LL 細胞よりはるかに多く発現している。*Caveolin1* の発現レベルは FBJ 細胞の転移に関与する可能性が考えられる。がん細胞の遊走能の変化は転移能評価の重要な指標である。そこで、wound healing assay で *Caveolin1* ノックダウンによる細胞遊走能の変化を評価した。*Caveolin1* siRNA 安定発現株 B2A 細胞はコントロール細胞と比べ、アッセイ開始 24 時間後、wound エリアに侵入した細胞の数は明らかに多かった(Fig. 3-3)。*Caveolin1* siRNA を導入した FBJ-S1 細胞の遊走能が向上したことが分かった。従って、*Caveolin1* が FBJ 細胞の遊走能に関与することが示唆された。

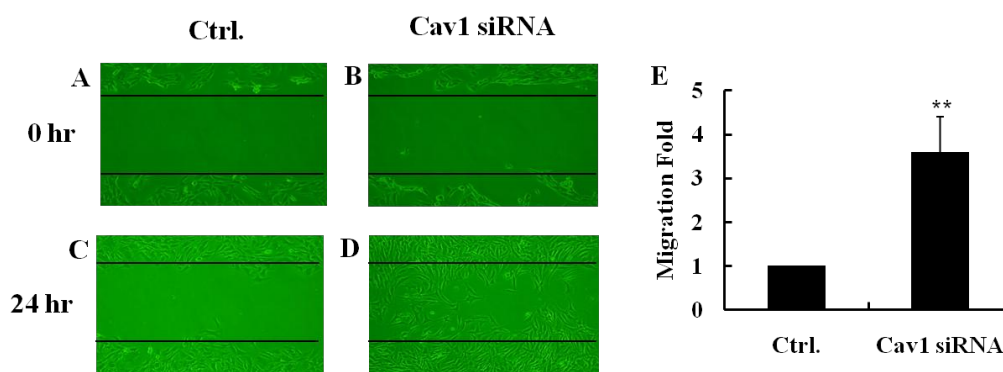


Fig. 3-3 FBJ-S1 細胞(B2A) での *Caveolin1* の発現抑制による遊走能の wound healing assay による評価

Ctrl.はコントロール配列が導入された FBJ-S1 細胞。実験開始から 0 (A, B), 24(C, D)時間経過後の wound closure の状態を観察した。(C, D)における Wound エリアに侵入した細胞の数を計測し、比較した(E)。結果は平均±標準偏差で示した(n=3)。** $p < 0.01$ 。

3.3.3 *Caveolin1* の発現抑制による肝細胞増殖因子発現の向上

遊走能評価の結果から、*Caveolin1* の発現は FBJ 細胞の転移に関与することが示唆された。しかしながら *Caveolin1* がどのような経路を経て、FBJ 細胞の転移に関与するかは不明である。FBJ 細胞における *Caveolin1* の役割を解明するために、*Caveolin1* の発現低下による細胞の増殖や転移に関わる成長因子と細胞シグナル伝達分子の発現の変化を RT-PCR で調べた。特に、血小板由来成

長因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、Rho タンパク質、肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor, HGF)などについて検討した。その結果、*Caveolin1* siRNA を安定発現させた FBJ-S1 細胞のクローン B2A において、肝細胞増殖因子が著しく増加していた(Fig. 3-4)。更に、複数の *Caveolin1* siRNA の安定発現株において、*HGF* の発現が向上していた(Fig. 3-5)。

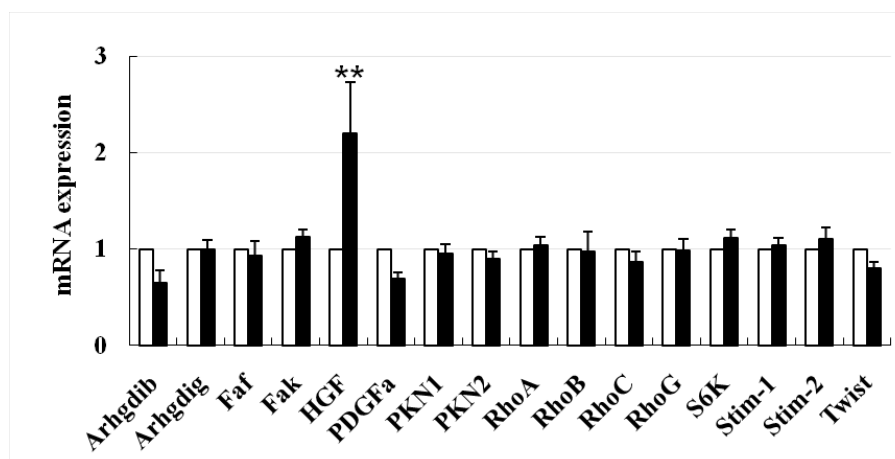


Fig. 3-4 *Caveolin1* の発現抑制による成長因子またはシグナル分子の発現の変化
Caveolin1 siRNA を安定発現させた FBJ-S1 細胞 B2A (黒) とコントロール細胞 (白) における各遺伝子の mRNA 発現レベルを RT-PCR により比較した。各遺伝子の定量値は β -actin の定量値で補正した。コントロール細胞における各遺伝子の発現量を 1 とした。結果は平均 \pm 標準偏差で示した(n=3)。** p <0.01。

以上より、FBJ 細胞において *Caveolin1* の発現低下が *HGF* 発現向上を引き起こしていたことを見出し、*Caveolin1* が *HGF* の発現を調節していることが示唆された。これを確かめるために、*Caveolin1* siRNA を安定発現した FBJ-S1 細胞に *Caveolin1* を強制発現させ、*HGF* の発現への影響を RT-PCR で検討した。その結果、*Caveolin1* siRNA を安定発現させた FBJ-S1 細胞への *Caveolin1* の発現ベクターの導入により、*Caveolin1* の発現量が増加し、その回復に伴い、*HGF* の発現量は低下した(Fig. 3-6)。以上の結果から、FBJ 細胞において *Caveolin1* が *HGF* の発現を制御することが確認された。一方、GD1a によって *Caveolin1* の発現が制御されていることが既に明らかとなっていることから、GD1a と *HGF* の発現との関連が考えられた。それを実証するために、GD1a の発現量が異なった FBJ-LL 細胞と FBJ-S1 細胞における *HGF* の発現を RT-PCR により調べた。その結果 FBJ-LL 細胞において、*HGF* の mRNA 発現量は FBJ-S1 細胞より高いことが示された(Fig. 3-7)。

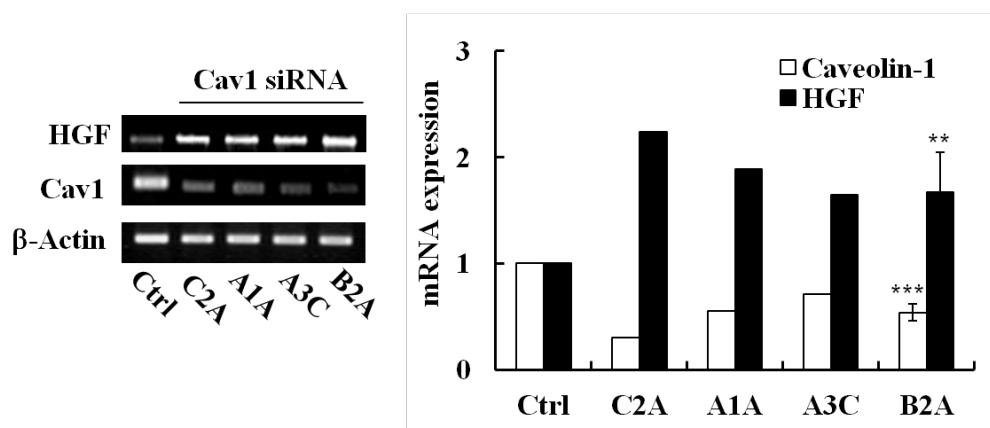


Fig. 3-5 *Caveolin1* の発現抑制による HGF の発現の向上

Caveolin1 siRNA を安定発現させた FBJ-S1 細胞 C2A, A1A, A3C, B2A とコントロール細胞における *HGF* (黒) および *Caveolin1* (白) の mRNA 発現レベルを RT-PCR により比較した。各バンドの定量値は β -actin の定量値で補正した。コントロール細胞における *HGF* または *Caveolin1* の発現量を 1 とした。B2A の結果は平均 \pm 標準偏差で示した(n=3)。*** p <0.001; ** p <0.01.

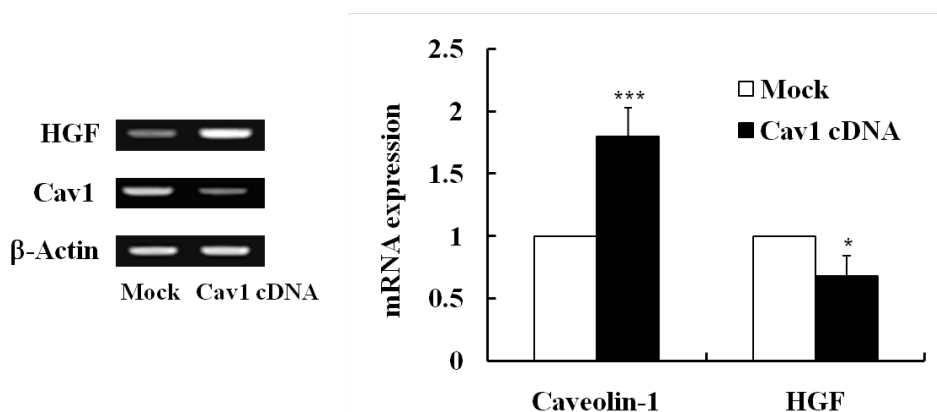


Fig. 3-6 *Caveolin1* の発現向上による *HGF* の発現変化

RT-PCR により、3.2.4 で構築した *Caveolin1* 発現ベクターが導入された B2A 細胞 (*Caveolin1* siRNA を安定発現させた FBJ-S1 細胞のクローン) (*Cav1* cDNA) とコントロール細胞(Mock)における *Caveolin1* と *HGF* の発現を調べた。各バンドの定量値は β -actin の定量値で補正した。コントロール細胞における *HGF* または *Caveolin1* の発現量を 1 とした。結果は平均 \pm 標準偏差で示した(n=3)。*** p <0.001; * p <0.05.

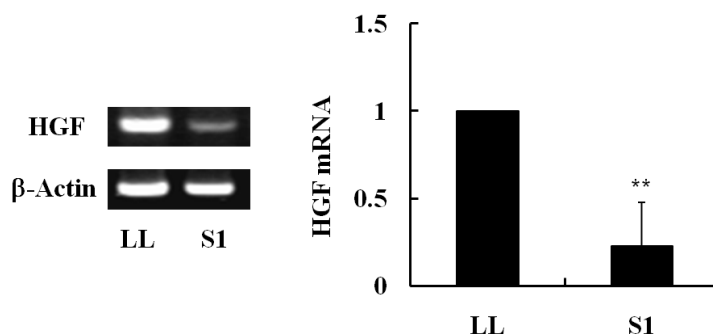


Fig. 3-7 RT-PCR による FBJ 細胞における *HGF* の発現の比較

FBJ-S1 細胞と FBJ-LL 細胞より、total RNA を抽出し、RT-PCR により、両細胞における *HGF* の mRNA レベルを比較した。各バンドの定量値は β -actin の定量値で補正した。FBJ-LL 細胞における *HGF* の発現量を 1 とした。結果は平均 \pm 標準偏差で示した(n=3), ** p <0.01.

更に、GD1a の発現量の低い高転移性 FBJ-LL 細胞に GM2/GD2 合成酵素遺伝子の発現ベクターを導入し、GD1a が高発現している 5-30 細胞が得られている[20]。FBJ-LL 細胞にコントロールベクターを導入した M5 細胞はコントロール細胞として用いた。これらの二種類の細胞を用いて、内在性の GD1a と *HGF* の発現量の関連性について検討した。5-30 細胞と M5 細胞から total RNA を抽出して、*HGF* の発現レベルを RT-PCR により評価した。その結果、GD1a が高発現している 5-30 細胞において、*HGF* の発現量が低下していた (Fig. 3-8)。

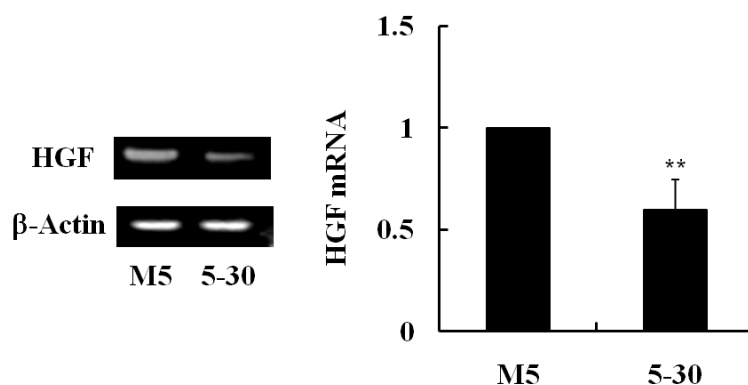


Fig. 3-8 GD1a の発現向上による *HGF* の発現の変化

5-30 細胞 (GM2/GD2 合成酵素遺伝子を強制発現させた FBJ-LL 細胞の安定株) と M5 細胞 (コントロールベクターを導入した FBJ-LL 細胞) より、total RNA を抽出し、RT-PCR により、両細胞における *HGF* の発現を評価した。各バンドの定量値は β -actin の定量値で補正した。M5 細胞における *HGF* の発現量を 1 とした。結果は平均 \pm 標準偏差で示した(n=3)。** p <0.01.

FBJ-LL 細胞を GD1a で処理して、*HGF* の発現量の変化を RT-PCR により調べた。3.2.2 に示したように、50 μ M の GD1a で FBJ-LL 細胞を 48 時間処理し、RNA を抽出し、*HGF* の mRNA レベルの発現の変化を RT-PCR により確認したところ、*HGF* の発現は GD1a 添加により抑制されていた (Fig. 3-9)。

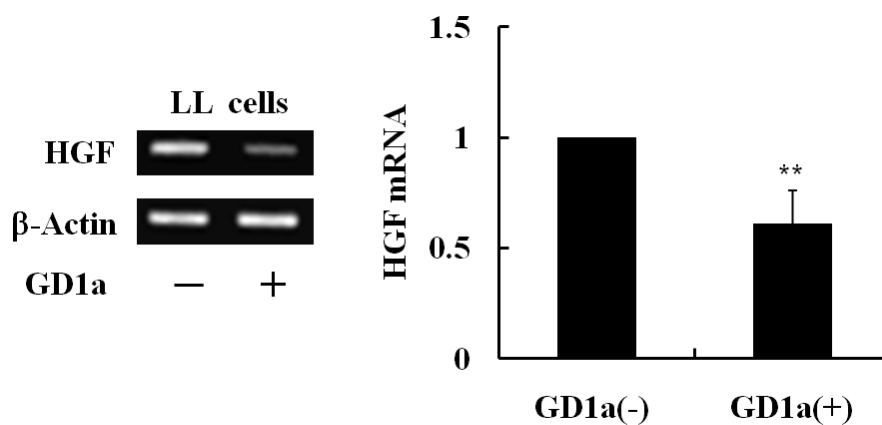


Fig. 3-9 FBJ-LL 細胞における *HGF* の発現における GD1a 添加の効果
GD1a (50 μ M) で 48 時間 (3.2.2 参照) 処理された FBJ-LL 細胞と未処理の FBJ-LL 細胞における *HGF* の発現レベルを RT-PCR により比較した。未処理の FBJ 細胞における *HGF* の発現量を 1 とした。結果は平均 \pm 標準偏差で示した(n=3)。** p <0.01.

3.4 考察

ガングリオシド GD1a がマウス骨肉腫 FBJ 細胞の運動性、細胞外基質への接着性および転移性に関与していることが既に報告されている[5, 20, 21]。また GD1a が Caveolin1 の発現を制御していることも明らかとなっている[23]。Caveolin1 は細胞膜に存在する Caveolae の主要な構成タンパク質であり、腫瘍抑制因子である[47, 49]。そこで本章では、Caveolin1 が高発現している FBJ-S1 細胞において、siRNA による *Caveolin1* のノックダウンを行ったところ、細胞の遊走能が亢進していたことを見出した。さらに、Caveolin1 が肝細胞増殖因子(*HGF*)の発現を抑制することも見出した。*HGF* は種々の細胞の増殖および運動性を促進活性を有することから、がん細胞の増殖、浸潤・転移への関与がしていると考えられている[51, 52]。以上の結果よりこの FBJ 細胞においては Caveolin1 も腫瘍抑制因子であることが支持された。

FBJ 細胞において、GD1a が MMP9、TNF- α 、NOS2 などの分子を制御することが既に明らかになっているが、その制御のメカニズムはまだ解明されていない[24, 44, 53]。本章の結果より、高転移性の FBJ-LL 細胞では低転移性の FBJ-S1 細胞と比較して *HGF* が高発現していたことが明らかになった。よって *HGF* の発現亢進は FBJ-LL 細胞の高転移能に寄与していると考えられる。また、この結果は *HGF* の受容体である c-Met が FBJ-LL 細胞において多く活性化されていることと関係していると考えられる。FBJ 細胞において、GD1a が *HGF* の受容体である c-Met のリン酸化を抑制することで、細胞の遊走能を制御することが既に実証されている[21]。更に、GD1a 添加実験および GM2/GD2 合成酵素の強制発現実験結果より、GD1a が *HGF* の発現を抑制していたと考えられる。また、さらには GD1a が *HGF* を介して細胞の転移を制御する可能性も考えられる。以上より FBJ 細胞において、GD1a が Caveolin1 を介して *HGF* を制御していることが明らかになった。

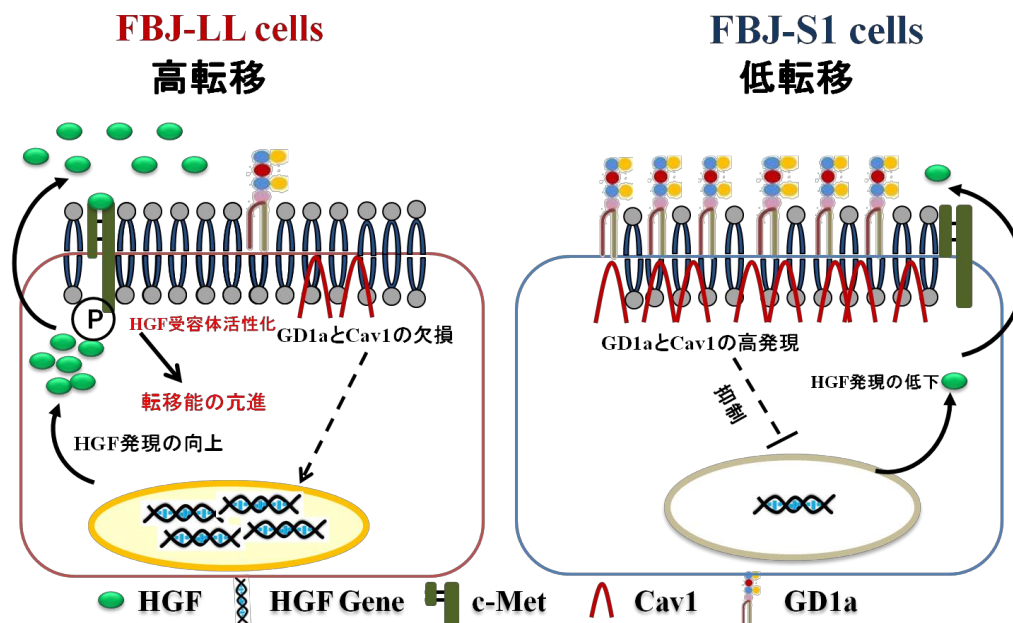


Fig. 3-10 FBJ細胞におけるGD1aによるHGFの調節のモデル図

高転移性のFBJ-LL細胞において、Caveolin1の発現量がGD1aの欠如により低下していることで、*HGF*の発現量が向上していた。また、*HGF*の受容体c-MetがCaveolin1の発現の低下により活性化されて、*HGF*による転移を促進するシグナルが活発になっていると考えられる[54]。低転移性のFBJ-S1細胞において、GD1aが高発現していることで、Caveolin1の発現量が向上しており、*HGF*の発現もc-Metの活性化も抑制されて、*HGF*による転移を促進するシグナル経路が阻害されると考えられる。

3.5 結言

本章では、FBJ細胞においてガングリオシドGD1aがFBJ細胞の転移性を制御する機構の解明を目指した。FBJ-S1細胞に遊走能がCaveolin1の発現抑制により向上していた。また、Caveolin1の発現の低下に伴い、肝細胞増殖因子*HGF*の発現が向上していた。*Caveolin1*ノックダウン細胞に*Caveolin1*を再び強制発現させると、亢進していた*HGF*の発現が抑制された。一方、GD1a低発現の高転移性FBJ-LL細胞では、*HGF*が高発現していた。FBJ-LL細胞でGD1aの添加およびGM2/GD2合成酵素の強制発現を行うことで、*HGF*の発現は低下した。以上の結果から、FBJ細胞において、GD1aがCaveolin1を介して*HGF*の発現を抑制していたことが示された。この結果はGD1aがFBJ細胞の転移性を制御しているメカニズムの解明に寄与するものと考えられる。

第4章 FBJ 細胞におけるグリコサミノグリカン合成酵素および遊走能解析

4.1 緒言

第2章では、転移性の異なったマウス骨肉腫由来の FBJ-S1 細胞と FBJ-LL 細胞を対象とし、糖鎖の発現パターンの違いから転移性と関連のある糖鎖構造の探索を行った。両細胞に GalNAc-Thr-C12、GlcNAc-C12、Lac-C12 および Xyl-Ser-C12 の4種類の糖鎖プライマーを投与して得られた糖鎖伸長生成物の構造解析を行った。

Xyl-Ser-C12 を与えて生成物を分析するに、低転移性の FBJ-S1 細胞からはグリコサミノグリカン型 (GAG 型) の生成物が多く検出された。ヘパラン硫酸などのグリコサミノグリカンが細胞接着分子やプロテアーゼ、多様な分子と相互作用することで腫瘍の成長や転移にも関与していることが報告されている [55-58]。しかしながら、マウス骨肉腫細胞では GAG と転移性との関係は知られていない。糖鎖プライマー伸長生成物がヘパラン硫酸型であると推定されたことから、その発現と FBJ 細胞の転移性との関連に興味を持たれた。

GAG 鎖は、ウロン酸あるいはガラクトースとアミノ糖との二糖繰り返し構造を持つ酸性多糖である。その基本骨格は (i)ヒアルロン酸型 (ii)コンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸型 (iii)ヘパラン硫酸/ヘパリン型 (iv)ケラタン硫酸型の4種類に分類することができる (Fig. 4-1)。糖の持つ多くの官能基が生体内での種々の生合成によって様々な修飾を受けることで構造に多様性がもたらされ、生体内で多くの機能を獲得していると考えられている。コンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸およびヘパラン硫酸は、コアタンパク質のセリン残基に結合したキシロースにガラクトース2分子とグルクロン酸を持つ共通の結合領域の先にさらに、20~200 個の二糖単位が伸長している (Fig. 4-1)。ヘパラン硫酸では結合領域の次に *N*-アセチルグルコサミンが、コンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸では *N*-アセチルガラクトサミンが転移される [30, 59]。

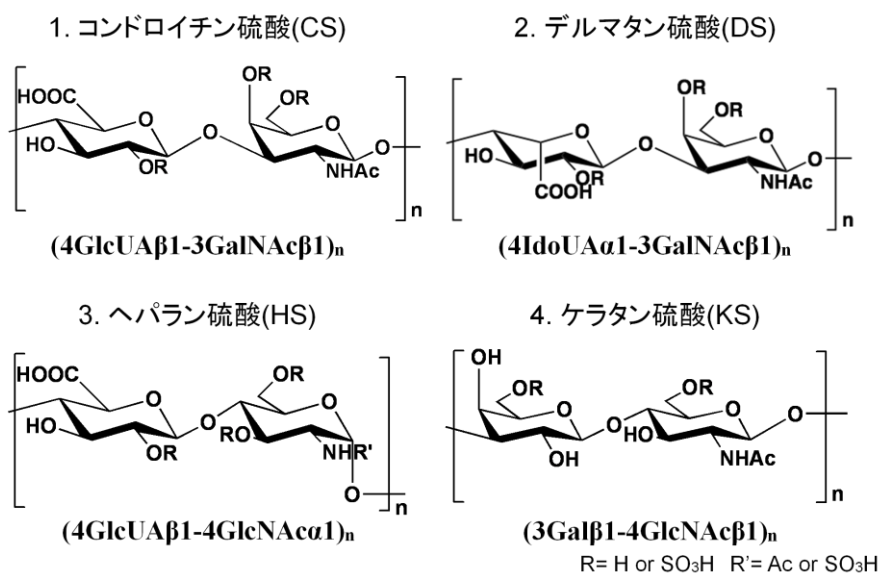


Fig. 4-1 グリコサミノグリカンの二糖繰り返し構造

また、ここ数年の研究で、GAG鎖の生合成に関与する多くの酵素群の機能解析が行われ、GAGが成長因子などのシグナル伝達を介して、様々な生理機能に関わっていることも証明されている[57, 59, 60]。例として、ヘパラン硫酸合成酵素の遺伝子 *EXT1* と *EXT2* は遺伝性多発性外骨腫 (HME) の発生に関連しており、ガン抑制遺伝子であることも知られている[31, 59, 61, 62]。ヘパラーゼはヘパラン硫酸特異的なエンドβ-グルクロニダーゼ活性を有し、腫瘍細胞の基底膜分解を伴う浸潤に重要な役割を果たし、腫瘍の転移に関与することが報告されている[60, 63, 64]。

そこで、本章では、FBJ細胞におけるGAG合成酵素の発現量を比較した。その結果に基づいて、ヘパラン硫酸合成酵素 *Ext1* をsiRNAでノックダウンし、FBJ細胞の遊走能への影響を評価することで、FBJ細胞の転移性との関連について検討した。

4.2 実験方法

4.2.1 FBJ 細胞の RNA の回収および逆転写反応

total RNA の抽出は、RNeasy Mini Kit (74104、QIAGEN) を用い、添付のプロトコールに従って行った。培養細胞をトリプシン処理によってディッシュから剥離し、 1×10^6 cells を 1.5 mL エッペンドルフチューブに回収した。これを、1,000 rpm、4 °C で 5 分間遠心した。上清を除去し、Kit 付属の RLT 溶液 (1% 2-メルカプトエタノール含有) 350 μ L を加えた。vortex によって細胞を分散した後、1 mL シリンジで 10 回ピペッティングした。ここに、70% エタノール (nacalai tesque) 350 μ L を加えて全量を RNeasy スピンカラムにアプライし、10,000 rpm、室温で 15 秒間遠心してカラムに RNA を吸着させた。RW1 (700 μ L) を加えて、10,000 rpm、室温で 15 秒間遠心した。フロースルーを捨て、4 倍量のエタノールを加えて調製した RPE (500 μ L) を加えて 10,000 rpm、室温で 15 秒間遠心した。フロースルーを捨て、RPE (500 μ L) を加えて 10,000 rpm、室温で 2 分間遠心した。スピнкаラムを新しい 2 mL コレクションチューブにセットし、添付の RNase free water 50 μ L を加えて、10,000 rpm、室温で 1 分間遠心で RNA を溶出した。吸光度測定により RNA 濃度を測定した

逆転写反応による cDNA の合成は、Rever Tra Ace qPCR RT kit (FSQ-101、TOYOBO) を用い、添付のプロトコールに従って行った。まず、total RNA を 65 °C で 5 分間インキュベートし、氷上で急冷する事により RNA を変性させた。次に PCR チューブ内で、total RNA 0.5 μ g、5 \times RT Buffer 2 μ L、Primer Mix 0.5 μ L、RT Enzyme Mix 0.5 μ L および Nuclease-free Water を混合し、計 10 μ L になるように調製した。これを TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (タカラバイオ) にセットして [37 °C, 15 min \rightarrow 98 °C, 5 min \rightarrow 4 °C] の条件で逆転写反応および酵素失活反応を行った。反応後のサンプルは -20 °C で保存した。

4.2.2 ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

PCR は、TaKaRa Ex Taq (RR001B、タカラバイオ) を用い、添付のプロトコールに従って行った。各 PCR チューブ内で、cDNA 溶液 1 μ L、10 \times Ex Taq Buffer 1 μ L、dNTP Mixture 0.8 μ L、forward primer (10 μ M) 0.5 μ L、reverse primer (10 μ M) 0.5 μ L、TaKaRa Ex Taq 0.05 μ L、distilled water (10977、GIBCO) を混合し、それぞれ 10 μ L になるように調製した。これを、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (タカラバイオ) で DNA の変性、プライマーのアニーリング、およびポリメラーゼ伸長反応を行った。用いたオリゴプライマーの配列とプロダクトサイズを Table 4-1 に示す。

Table 4-1 本研究で用いたプライマー

Gene	Product Size (bp)	Sequence (5'-3')	
		Forward	Reverse
<i>β-actin</i>	517	ATATCGCTGCGCTGGTCGTC	AGGATGGCGTGAGGGAGAGC
<i>Ext1</i>	530	TCCTGGAGGATTGTTCGTC	TAGCAGCTCCTGTCAACAC
<i>Ext2</i>	228	CCTACAGATCATCAATGACAGG	AGCAGCTTGGACAGACTGG
<i>Chsy1</i>	340	TTGCTCTTCTTCTGTGATGT	CCTGGCTCCTGAATGICT
<i>Chpf</i>	425	CTGCTGCTGCTGTATGAG	GCCACATAGTCGGAGTTG
<i>Chpf2</i>	415	CTCGGTTACTCTACTTCACA	CAGGCTTGGTTGATGCTA
<i>Gapdh</i>	205	CATCTGAGGGCCCACTG	GAGGCCATGTAGGCCATGA
<i>Ext1</i>	153	GGAGTTGCCATTCTCCGA	TAAGCCTCCCACAAGAAGCTG
<i>Hpse</i>	72	GTTCTGTCCATCACCATCGA	CTTGGAGAGCCCAGGAAGGT

4.2.3 アガロースゲル電気泳動

50 \times TAE (ニッポンジーン) を水で 50 倍希釈し、1 \times Tris-acetate-EDTA (TAE) バッファーを調製した。アガロース S (312-01193、ニッポンジーン) と 1 \times TAE バッファーを用いて 2.5%アガロースゲルを作製した。PCR 終了後のサンプル 5 μ L とゲルローディングバッファー (タカラバイオ) 1 μ L を混合してウェルにチャージした。マーカーは 100 bp Ladder Marker (3407A、タカラバイオ) を用い、マーカー 1 μ L とゲルローディングバッファー 2 μ L を混合しウェルにチャージした。泳動槽 (mupid2、コスモバイオ) を用い、100 V で 30 分間泳動し

た。その後ゲルをエチジウムブロマイド溶液に浸して 20 分間染色し、Molecular Imager FX (BIO-RAD) で解析した。

4.2.4 リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は SYBR Premix Ex Taq II (RR081A、タカラバイオ) を用い、LightCycler (Roche Diagnostics) で行った。LightCycler Capillaries (Roche Diagnostics)内で、SYBR Premix Ex Taq II (2×) 10 μ L、forward primer (10 μ M) 0.8 μ L、reverse primer (10 μ M) 0.8 μ L、cDNA テンプレート 1.0 μ L、distilled water (10977、Gibco) 7.4 μ L を混合し、それぞれ計 20 μ L になるように PCR 反応液を調製した。調製した反応液を LightCycler (Roche)にセットし、Table 4-2 の条件で反応させた。

Table 4-2 リアルタイム PCR のプロトコール

Program	Cycles	Number	Temperature (°C)	Hold Time (sec.)
Denature	1	1	95	20
PCR	50	1	95	5
		2	62	20
		3	72	10
Melting	1	1	60	10
		2	98	10
Cooling	1	1	40	30

リアルタイム PCR による結果は、 $\Delta\Delta C_t$ 法に従って評価した。まず、それぞれの増幅曲線における C_t 値を各条件 3 サンプルずつ測定し、 C_t 値の平均値を算出した。そして各条件における GAPDH と各遺伝子の C_t 値の差を ΔC_t 値として算出した。さらに各条件における ΔC_t 値とコントロールの ΔC_t 値との間の差を算出し、これを $\Delta\Delta C_t$ 値とした。最後に 2 の $-\Delta\Delta C_t$ 乗の値を算出し、これをグラフ化する事で発現レベルを評価した。

4.2.5 フローサイトメトリー

500 mL の PBS (-) に 10 mM EDTA (15111-32, nacalai tesque) と 0.1% アジ化ナトリウム (31233-42, nacalai tesque) を添加して細胞洗浄用 PBS として用いた。また、1% BSA と 0.1% アジ化ナトリウムを添加した PBS 50 mL を調製し、これを抗体希釈用 PBS とした。一次抗体として Monoclonal anti-Heparan Sulfate (270426, 生化学バイオ Mouse IgM)、二次抗体として goat anti-mouse IgM-FITC (sc-2082, Santa Cruz) を用い、予め抗体希釈用 PBS で 200 倍希釈した。

培養細胞 (100 mm ディッシュ 1 枚分) をそれぞれトリプシン処理し、培地に懸濁した。これを 1,000 rpm、4 °C で 5 分間遠心し、新たな培地に置換して細胞数を数えた。その後、 1×10^5 cells となるように細胞懸濁液を 1.5 mL チューブに加えた。これらを細胞洗浄用 PBS 1 mL によって 2 回洗浄した。次に、予め調製しておいた一次抗体を、各チューブに 80 μ L ずつ加えて氷上で 1 時間反応させた。なお、blank 用と二次抗体のみのチューブには PBS 1 mL を加えて氷上に静置した。細胞洗浄用 PBS 1 mL によって 2 回洗浄した後、blank 以外のチューブに二次抗体を 80 μ L ずつ加え、遮光して氷上で 30 分間静置した。反応後、洗浄操作を 2 回行って洗浄用 PBS 1 mL に懸濁した。この懸濁液をナイロンメッシュ (100 μ m) に通して FCM テストチューブに移した。これを Beckman Coulter EPICS (Beckman Coulter) にセットして測定を行い、488 nm Ar レーザーで励起、525 BP フィルターで検出した。1 サンプルにつき 10,000 個の細胞を測定した。解析には EXPO32 (Beckman Coulter) と FlowJo (Tree Star Inc.) を用い、ピークのシフト率を算出した。

4.2.6 トランスフェクション

FBJ-S1 細胞または FBJ-LL 細胞を 6-well プレート (IWAKI) に播種して、24 時間後、10 nM の濃度で mouse *Ext1* に対する siRNA (Sequence #1, 5'-UUC CGUAGUUGAAAGCACAGUGUCC-3'; Sequence #2, 5'-UGUCACAGCAGAC ACCAGGAAAUUC-3')、mouse *Hpsc* に対する siRNA (5'-UAUCAUGGUUGA

CUUGAGAUUCCA-3') (Invitrogen)を Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)を用いて細胞に導入し、24~96 時間培養した。同時に、コントロールとして S-t ealth RNAi Negative Universal Control LO/Med (Invitrogen)を用いた。

4.2.7 Western Blotting

PBS(-)で細胞を二回洗浄し、6-well plate (IWAKI) に 200 μ L の SDS-PAGE sample buffer (62.5 mM Tris, 10 % glycerol, 2% SDS, 0.02% bromophenol blue) を加え、37 $^{\circ}$ C、30 分間インキュベートし、タンパク質抽出液とした。タンパク質抽出液を 10% SDS-PAGE で電気泳動し分離した後、PVDF 膜にブロッティングした。PVDF 膜を 5%スキムミルク/PBS(-)-Tween (0.1%)バッファーで 4 $^{\circ}$ C 一晚処理後、抗体 (1:2,000 希釈) (anti-Ext1 および anti-actin: santa cruz) と室温で 1 時間反応させた。PBS(-)-Tween バッファーで洗浄後、5,000 倍希釈した二次抗体と室温で 1 時間反応させた。さらに PBS(-)-Tween バッファーで洗浄した後、ECL (Amersham Bioscience)で蛍光発色させた。Image Jにより検出されたバンドを定量した。

4.2.8 Cell Proliferation Assay (WST Assay)

この方法の原理は、生細胞のミトコンドリア内の酸化還元酵素により生成した NADH (nicotinamide adenine dinucleotide)が 1-methoxy PMS (1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate)を還元して PMS 還元型が生成され、それが WST-1 (テトラゾリウム塩) を水溶性のホルマザンに変えることによる。このホルマザンの生成量と生細胞数が有意に相関することから、細胞の定量に用いられている。

1-methoxy PMS (DOJINDO) 3.5 mg を水 5 mL に、WST-1 (DOJINDO) 33 mg を PBS(-) 9 mL に溶解させた。これらの溶液を 1:9 の割合で混合し、0.22 μ m フィルターで滅菌した後 1 mL ずつ分注し、遮光して-30 $^{\circ}$ Cで保存した。溶液は使用直前に融解して用いた。

細胞数と吸光度の検量線を作成するため、96 well プレート (IWAKI) に FBJ-S1 細胞を 1.6×10^4 、 8×10^3 、 4×10^3 、 2×10^3 、 1×10^3 、0 cells/well ずつ播種した。24 時間後、培地を 1-methoxy PMS/WST-1 含有培地 (v/v=1:10) 110 μ L/well に交換した。4 時間後、microplate reader で 690 nm と 450 nm における吸光度を測定し細胞数と吸光度の検量線を作成した。

WST assay を行う際、96 well プレートに各細胞を 2,000 cells/well で播種し 24 時間培養して接着させた。24 時間、48 時間、72 時間培養後に培地をアスピレーターで除き、1-methoxy PMS/WST-1 含有 (終濃度 10 μ L/well) 培地 110 μ L/well に交換した。それぞれ 4 時間後に、microplate reader で 690 nm と 450 nm における吸光度を測定した。

4.2.9 Wound Healing Assay

6-well plate($\Phi=35$ mm、IWAKI)の各ウェルに 2×10^5 細胞を播種し、4.2.6 と同様の方法で siRNA を導入した。コンフルエントになるまで (約 48 時間)、単層培養した。その後、培地を取り除き、滅菌済みのマイクロチップの先端で、細胞の層を優しく傷つけた。12 時間ごとに光学顕微鏡(Nikon ECLIPSE TS100)を用いて細胞の遊走状態を観察した。さらに細胞の運動能を定量化するため、傷内に侵入した細胞数により、細胞の遊走能を比較した。また、細胞増殖による影響を抑えるために、培地中の FBS を 0.5%にした。

4.2.10 Transwell Assay

Transwell assay では、24-well format insert (8 μ m pore size、ポリカーボネート膜、BD Falcon)を用いた。トランスフェクション 48 時間後、trypsin で細胞を消化し、 1×10^4 cells/250 μ L/well の細胞 (0.5% FBS 含有培地) を upper chamber に播種して、培養を行った (lower chamber に 1% FBS 含有培地を入れた)。24 時間後、細胞を固定し (0.1% crystal violet、20% ethanol PBS、15 分間)、綿で upper chamber のフィルターの上面の細胞を除去し、フィルターの下面に遊走

した細胞数を顕微鏡下で計測した。

4.2.11 統計的解析

統計的解析は Excel (Microsoft 社) を用い、t 検定を行った。統計的処理を行った結果は、平均±標準偏差で示した。

4.3 結果

4.3.1 FBJ 細胞における GAG 鎖合成酵素の発現の比較

FBJ-S1 細胞と FBJ-LL 細胞における GAG 鎖合成酵素の発現に違いがあるか調べるために、Fig. 4-2 に示された候補遺伝子の発現を RT-PCR により確認した。ヘパラン硫酸/ヘパリンの二糖繰り返し領域の合成に関与する Ext1/2、コンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸の二糖繰り返し領域の重合化に関与する Chsy1 および Chpf1/2 を候補として選んだ[30]。両細胞における候補糖転移酵素の mRNA 発現量の比較は Fig. 4-3 に示した。

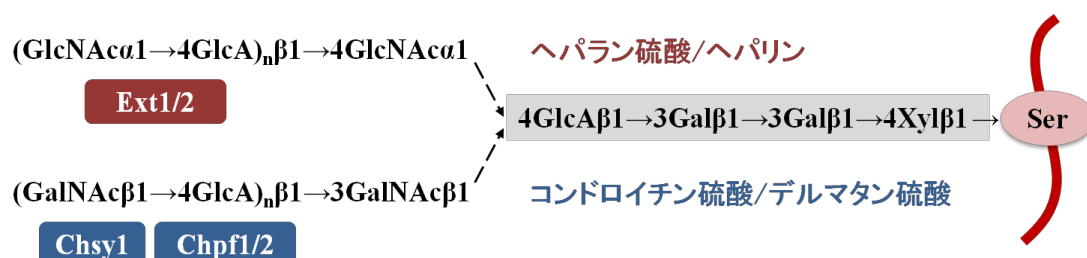


Fig. 4-2 グリコサミノグリカンの生合成に関与する糖転移酵素 Ext1/2 はヘパラン硫酸/ヘパリン鎖の生合成に関与している。Chsy1 および Chpf1/2 はコンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸鎖の生合成に関与している。

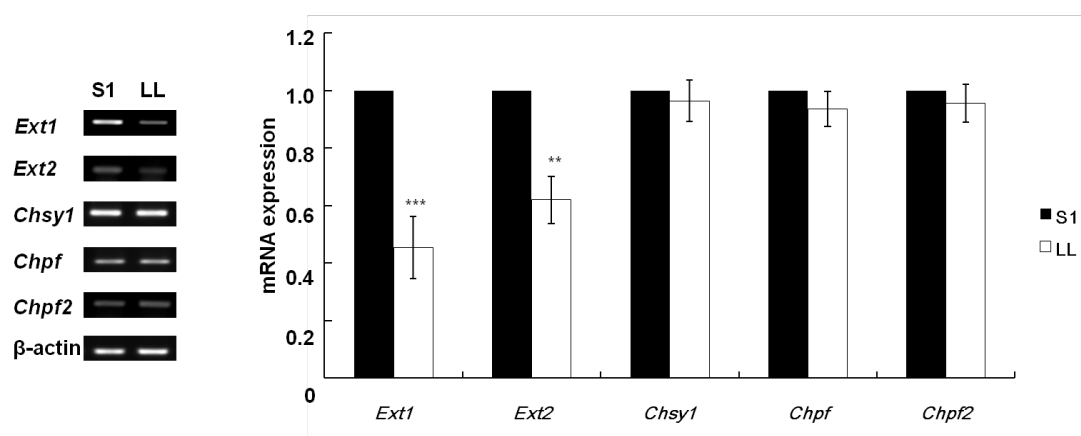


Fig. 4-3 FBJ 細胞における GAG 合成酵素の mRNA 発現レベルの比較 FBJ-S1 細胞と FBJ-LL 細胞より、total RNA を抽出し、RT-PCR により、両細胞における各糖転移酵素の mRNA レベルを比較した。各バンドの定量値は β -actin の定量値で補正した。FBJ-LL 細胞における遺伝子の発現量を 1 とする。結果は平均±標準偏差で示した(n=3)。*** p <0.001, ** p <0.01.

コンドロイチン硫酸の伸長に関わる酵素は FBJ-S1 細胞と FBJ-LL 細胞で違いはなかったが、ヘパラン硫酸の生合成に関与する Ext1 と Ext2 の mRNA 発現は FBJ-S1 細胞では FBJ-LL 細胞よりほぼ二倍高いことが確認された (Fig. 4-3)。Ext1/2 およびこれに基づくヘパラン硫酸の発現は FBJ 細胞の転移に関与する可能性が示唆されたといえる。Ext1 と Ext2 はヘテロ複合体として GlcA と GlcNAc の重合活性を有しており、ヘパラン硫酸鎖の伸長を制御するため、本研究ではまず Ext1 に着目して機能解析を行った。

次に、FBJ 細胞における Ext1 のタンパク質発現レベルの比較は western blotting により行った。Fig. 4-4 に示したように、タンパク質レベルにおいても、Ext1 は FBJ-S1 細胞において高発現していた。

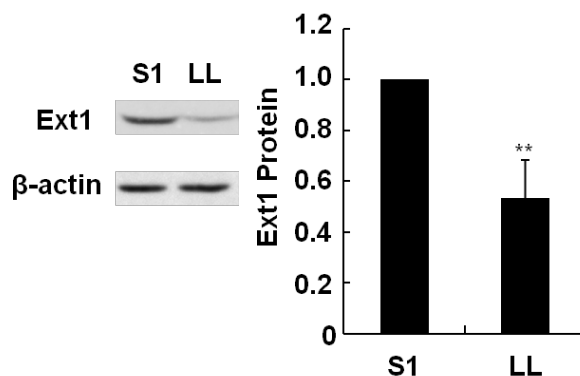


Fig. 4-4 FBJ 細胞における Ext1 のタンパク質レベルの比較
FBJ-S1 細胞と FBJ-LL 細胞での Ext1 の発現を western Blotting により比較した。各バンドの定量値は β -actin の定量値で補正した。FBJ-LL 細胞における Ext1 タンパク質の発現量を 1 とする。結果は平均 \pm 標準偏差で示した(n=3)。** p <0.01.

4.3.2 フローサイトメトリーによる FBJ 細胞におけるヘパラン硫酸の発現の比較

前述の結果から、FBJ-S1 細胞における GAG 鎖の合成能力が向上したことが示された。FBJ 細胞におけるヘパラン硫酸の発現量を調べるために、各 FBJ 細胞株において、抗ヘパラン硫酸抗体を用いたフローサイトメトリーを行った。低転移性の FBJ-S1 細胞の細胞表面のヘパラン硫酸が FBJ-LL 細胞より多く検出された (シフト率: FBJ-S1 細胞, 78%; FBJ-LL 細胞, 42%) (Fig. 4-5)。

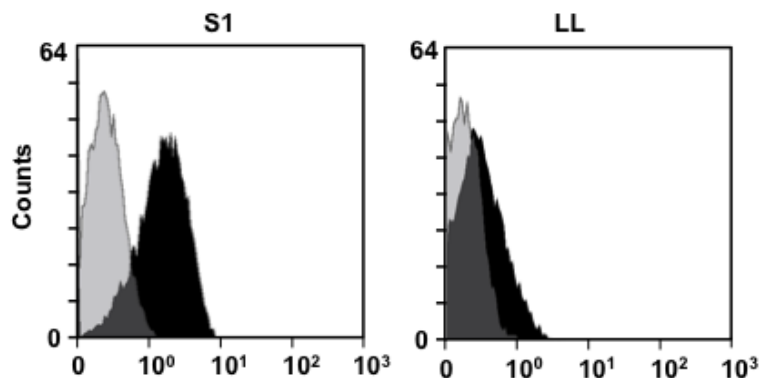


Fig. 4-5 フローサイトメトリーによる FBJ 細胞における細胞表面のヘパラン硫酸の比較

抗ヘパラン硫酸抗体を用いて、FBJ-S1 細胞および FBJ-LL 細胞表面におけるヘパラン硫酸の発現をフローサイトメトリーにより調べた。黒: 抗ヘパラン硫酸抗体、灰色: Blank。

4.3.3 *Ext1* siRNA 導入による FBJ 細胞に与える影響

4.3.3.1 *Ext1* siRNA 導入の効果の確認

Ext1 やヘパラン硫酸の発現と細胞の遊走能の関係を調べるために、*Ext1* を高発現していた低転移性 FBJ-S1 細胞において、*Ext1* siRNA によるノックダウンを行った。

ノックダウンを評価する最適な時間を決めるために、トランスフェクション後 48 時間、72 時間、96 時間に細胞を回収し、RNA を抽出した。RT-PCR で *Ext1* の mRNA 発現レベルを調べた。*Ext1* siRNA 導入された FBJ-S1 細胞、親細胞 (mock) またネガティブコントロール (neg.) における *Ext1* の mRNA 発現量の経時変化を Fig. 4-6 に示した。トランスフェクション 48 時間、72 時間および 96 時間後で siRNA による発現抑制効果が確認された。特に 48 時間後の siRNA による発現抑制効果 (約 70%) が高かったため、48 時間を最適培養時間とした。

次にオフターゲット効果[65]を回避するため、二つの異なった siRNA 配列を用いて、ノックダウンを行った。なお、mRNA レベルのノックダウン効果 (#1, 85%; #2, 73%) はリアルタイム PCR により確認した (Fig. 4-7)。さらに、トランスフェクション後 48 時間で、細胞を回収して、*Ext1* のタンパク質の発現量

を western blotting により調べた。タンパク質レベルにおいても、siRNA のノックダウン効果が見られた (#1, 65%; #2, 44%) (Fig. 4-8)。

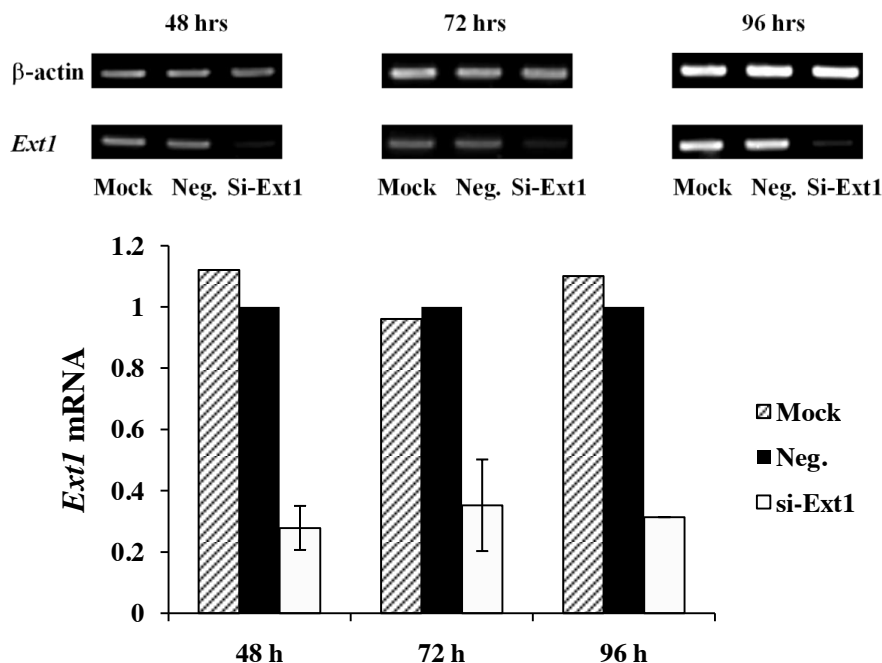


Fig. 4-6 *Ext1* siRNA を導入した FBJ-S1 細胞における *Ext1* mRNA 発現の経時変化 RT-PCR により、*Ext1* siRNA をトランスフェクションしてから 48 時間、72 時間および 96 時間で FBJ-S1 細胞における *Ext1* mRNA の発現 (si-Ext1) を調べた。各バンドの定量値は β -actin の定量値で補正した。ネガティブコントロール細胞 (Neg.) における *Ext1* mRNA の発現量を 1 とした。親細胞 (Mock) もコントロールとして用いた。結果は平均 \pm 標準偏差で示した (n=2)。

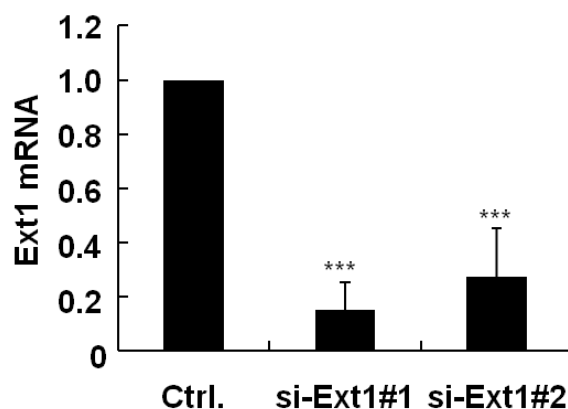


Fig. 4-7 リアルタイム PCR による FBJ-S1 細胞における *Ext1* ノックダウン効果二種類の *Ext1* siRNA 配列 (si-Ext1#1、si-Ext1#2) をそれぞれ FBJ-S1 細胞にトランスフェクションして 48 時間後に、リアルタイム PCR で *Ext1* siRNA によるノックダウン効果を評価した。コントロール配列を導入した細胞をコントロール (Ctrl.) として用いた。結果は平均 \pm 標準偏差で示した (n=3)。*** p <0.001。

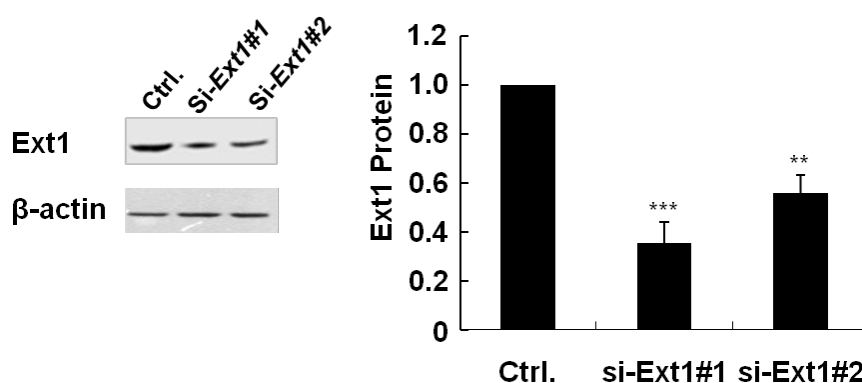


Fig. 4-8 Western blotting による FBJ-S1 細胞における *Ext1* ノックダウン効果
二種類の *Ext1* siRNA 配列をそれぞれ FBJ-S1 細胞にトランスフェクションして 48 時間後に、*Ext1* siRNA ノックダウン効果を western blotting により確認した。コントロール配列を導入した FBJ-S1 細胞をコントロール (Ctrl.) として用いた。結果は平均±標準偏差で示した (n=3)。*** p <0.001、** p <0.01.

Ext1 のノックダウンによる細胞表面のヘパラン硫酸の発現量の変化を調べるために、抗ヘパラン硫酸抗体を用いたフローサイトメトリーを行った。それぞれのサンプルのヒストグラムを Fig. 4-9 に示した。

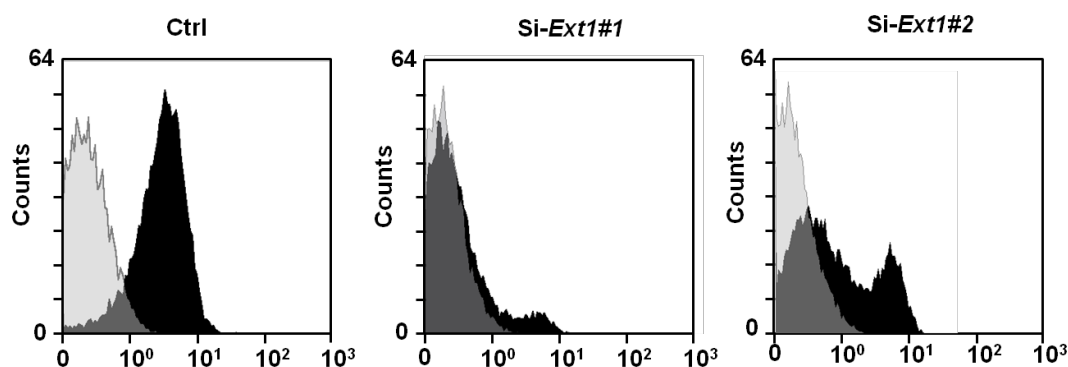


Fig. 4-9 *Ext1* をノックダウンした FBJ-S1 細胞表面のヘパラン硫酸の
フローサイトメトリーによる検出

二種類の *Ext1* siRNA 配列 (si-Ext#1 と si-Ext#2) をそれぞれ FBJ-S1 細胞にトランスフェクションして 48 時間後に、抗ヘパラン硫酸抗体を用いてヘパラン硫酸の発現量をフローサイトメトリーにより調べた。コントロール配列を導入した細胞をコントロール (Ctrl.) として用いられた。黒: 抗ヘパラン硫酸抗体、灰色: Blank。

Ext1 siRNA により、FBJ-S1 細胞表面のヘパラン硫酸の減少が観察された (シフト率: コントロール, 95%; #1, 7%; #2, 35%).)。二ツ山があることから、細胞の一部には siRNA が導入されずに *Ext1* の発現がもとのままの細胞もあること

が分かる。Fig. 4-8に示すように、#1の配列の方が効果的に *Ext1* を抑えている。この実験でFBJ細胞では *Ext1* がヘパラン硫酸の生合成に関わっていることが示された。さらに、*Ext1* siRNAによりGAG合成酵素 (*Ext1*)、ひいてはヘパラン硫酸の発現が抑制されることが確認できた。

4.3.3.2 *Ext1* siRNAの導入がFBJ細胞の遊走能に与える影響

がん細胞の遊走能はがん転移の重要な指標であることから、wound healing assay と transwell assay で細胞遊走能の変化を評価した。両実験ともにトランスフェクション後48時間でアッセイを行った。結果は Fig. 4-10 (transwell assay) と Fig. 4-11 (wound healing assay) に示した。

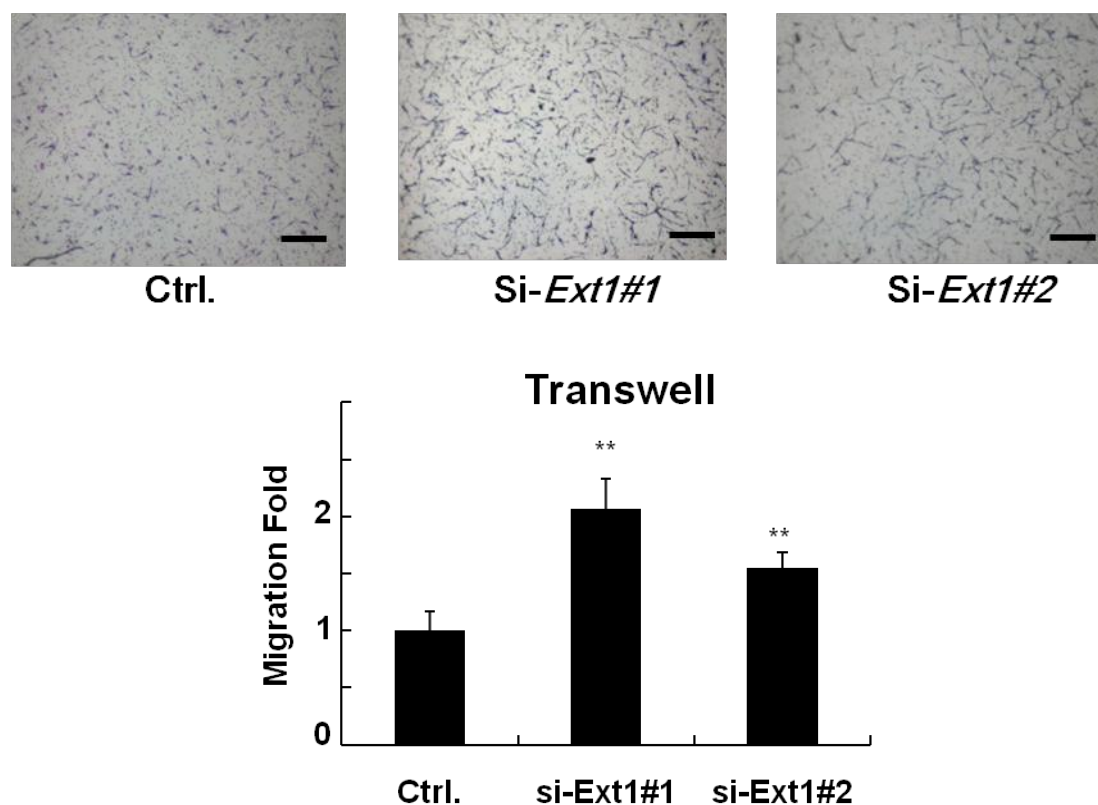


Fig. 4-10 *Ext1* のノックダウンによるFBJS1 遊走能の変化 (transwell assay)
二種類の *Ext1* siRNA 配列 (si-Ext#1 と si-Ext#2) をFBJS1 細胞にトランスフェクションして48時間後に、transwell assayにより、細胞の遊走能を評価した。コントロール配列を導入したFBJS1細胞をコントロール(Ctrl.)に用いた。データは平均±標準偏差で示した (n=3)。** $p < 0.01$.

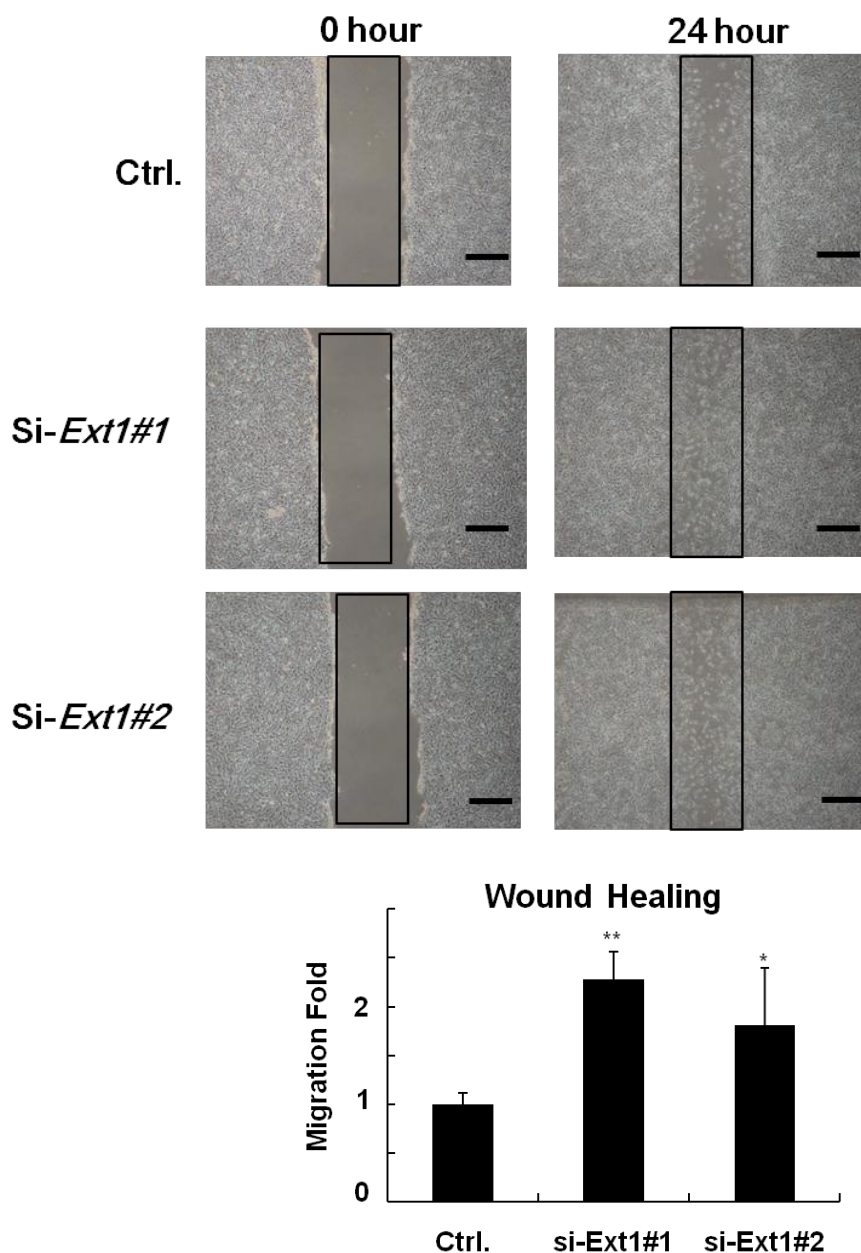


Fig. 4-11 *Ext1* のノックダウンによるFBJ-S1細胞遊走能の変化(wound healing assay) 二種類の *Ext1* siRNA 配列 (si-Ext1#1 と si-Ext1#2) をそれぞれFBJ-S1細胞にトランスフェクションして48時間後に、細胞の遊走能の変化をwound healing assayにより評価した。コントロール配列を導入したFBJ-S1細胞をコントロール(Ctrl.)として用いた。結果は平均±標準偏差で示した (n=3)。** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

コントロールと比べ、どちらの方法においても *Ext1* siRNA を導入したFBJ-S1細胞での遊走能が向上した(約2倍)。Ext1がFBJ細胞の遊走能に関与することが示された。別の言い方をすると、ヘパラン硫酸の高発現は細胞の遊走能を抑えている。

4.3.3.3 *Ext1* siRNA の導入が FBJ-S1 細胞増殖に与える影響

Ext1 のノックダウンによる FBJ-S1 細胞増殖への影響を調べるために、WST assay を行った。96-well プレートに 2,000 cells/well になるように細胞を播種した翌日に、トランスフェクションを行った。0 時間、24 時間、48 時間、72 時間、96 時間、120 時間培養後に WST assay を行った。各細胞間での増殖にはコントロールとの差は見られなかった (Fig. 4-12)。また、遊走能を評価する際には、トランスフェクション後 48 時間から 72 時間において、0.5% FBS 含有培地で細胞を培養していた。そこでこの条件で、細胞の増殖 (生存) への影響を WST assay により評価した。Fig. 4-13 に示したように、トランスフェクション後 48 時間から、0.5% FBS 含有培地で培養した条件において、各細胞間の増殖には差は見られなかった。細胞間の増殖能の差による遊走能への影響はほとんどないと考えられる。

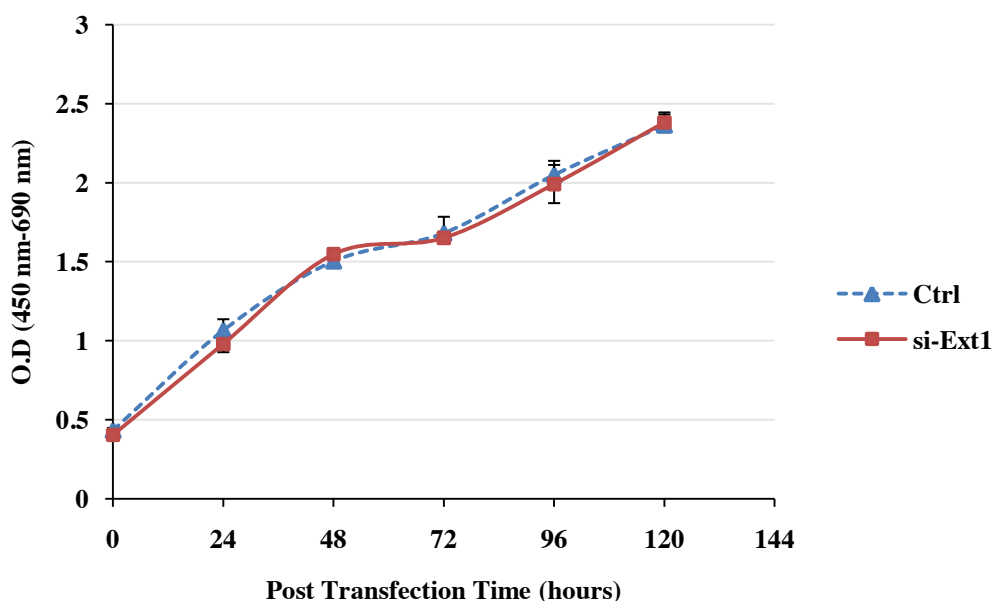


Fig. 4-12 *Ext1* ノックダウンによる FBJ-S1 細胞増殖能の変化
(10%FBS 含有培地で培養)

通常培養 (10% FBS 含有培地で) の条件で、*Ext1* siRNA (si-Ext1、■、実線) を FBJ-S1 細胞に導入してから 0 時間、24 時間、48 時間、72 時間、96 時間、120 時間で、WST assay を行った。コントロール配列を導入した FBJ-S1 細胞をコントロール (Ctrl、▲、点線) として用いた。

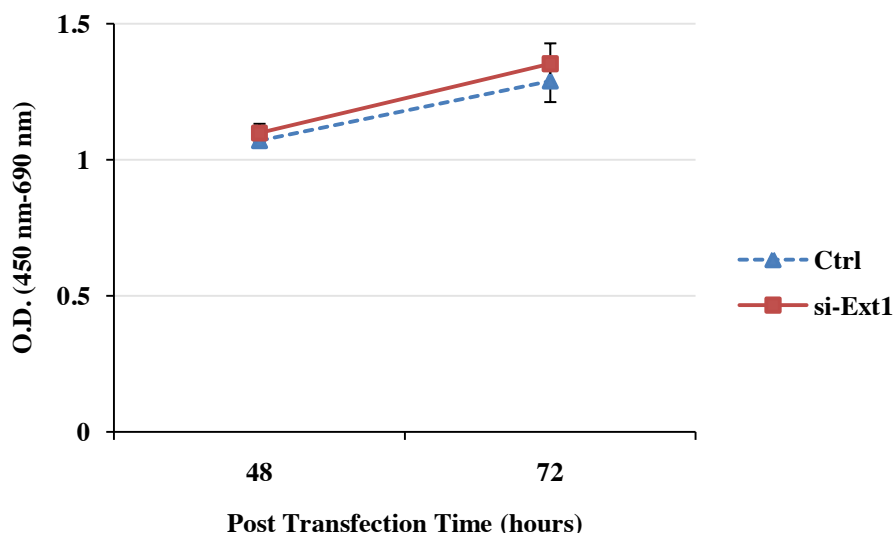


Fig. 4-13 WST assay による細胞増殖能の測定
(0.5%FBS 含有培地で培養)

Ext1 siRNA(si-Ext1、■、実線)を FBJ-S1 細胞に導入して 48 時間培養してから、0.5 % FBS 含有培地で細胞をさらに 24 時間培養した。トランスフェクション後 48 時間と 72 時間に、WST assay を行った。コントロール配列を導入した FBJ-S1 細胞をコントロール(Ctrl、▲、点線)として用いた。

4.3.4 ヘパラナーゼと FBJ 細胞の遊走能との関連

ヘパラナーゼ (heparanase、Hpse) はヘパラン硫酸の分解酵素で、ヘパラン硫酸特異的なエンド β -グルクロニダーゼ活性を有しており、腫瘍細胞の基底膜の分解を伴う浸潤に重要な役割を果たしており、腫瘍の転移に関与することが知られている。転移性の異なる FBJ 細胞におけるヘパラン硫酸の発現の違いは、ヘパラン硫酸分解酵素であるヘパラナーゼが関与している可能性がある。この仮説を実証するために、FBJ 細胞におけるヘパラナーゼの発現をリアルタイム PCR により比較した。その結果、ヘパラナーゼの発現は FBJ-LL 細胞では FBJ-S1 細胞と比較して顕著に高かった (Fig. 4-14)。これにより、ヘパラナーゼが FBJ 細胞の転移に関与する可能性が示唆された。

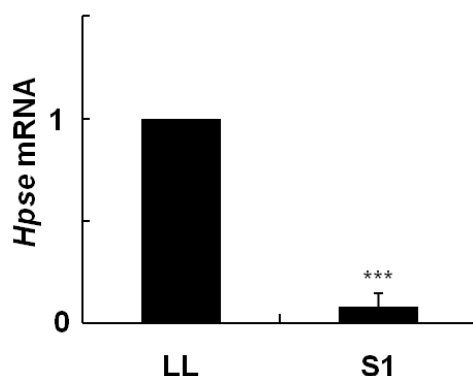


Fig. 4-14 FBJ 細胞におけるヘパラナーゼ遺伝子 (*Hpse*)の発現のリアルタイム PCR による比較

FBJ-S1 細胞と FBJ-LL 細胞から、total RNA を抽出し、リアルタイム PCR により、ヘパラナーゼ(*Hpse*)の mRNA レベルを比較した。*Hpse* の定量値は β -actin の定量値で補正した。FBJ-LL 細胞における遺伝子の発現量を 1 とした。結果は平均 \pm 標準偏差で示した(n=3)。*** $p < 0.001$.

次に、ヘパラナーゼに対する siRNA を FBJ-LL 細胞に導入し、ヘパラナーゼ遺伝子のノックダウンが FBJ-LL 細胞の遊走能に及ぼす影響を検討した。Fig. 4-15 に示したように、*Hpse* siRNA が導入された FBJ-LL 細胞ではヘパラナーゼ遺伝子の発現が顕著に抑制されていた。次に、ヘパラナーゼ遺伝子の発現を抑制した FBJ-LL 細胞の遊走能の変化を wound healing assay と transwell assay により評価した。どちらの方法で調べても FBJ-LL 細胞の遊走能はヘパラナーゼの発現の抑制により低下していた (Fig. 4-16 と Fig. 4-17)。これにより、ヘパラナーゼの働きは FBJ 細胞の遊走を盛んにすることが証明された。

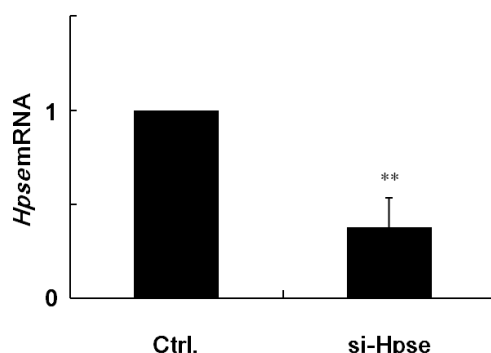


Fig. 4-15 *Hpse* siRNA を導入した FBJ-LL 細胞でのヘパラナーゼ遺伝子の発現抑制
Hpse siRNA を FBJ-LL 細胞にトランスフェクションしてから 48 時間後に、ヘパラナーゼの mRNA 発現をリアルタイム PCR により調べた。コントロール配列を導入した FBJ-LL 細胞をコントロール(Ctrl.)として用いた。結果は平均 \pm 標準偏差で示した (n=3)。** $p < 0.01$.

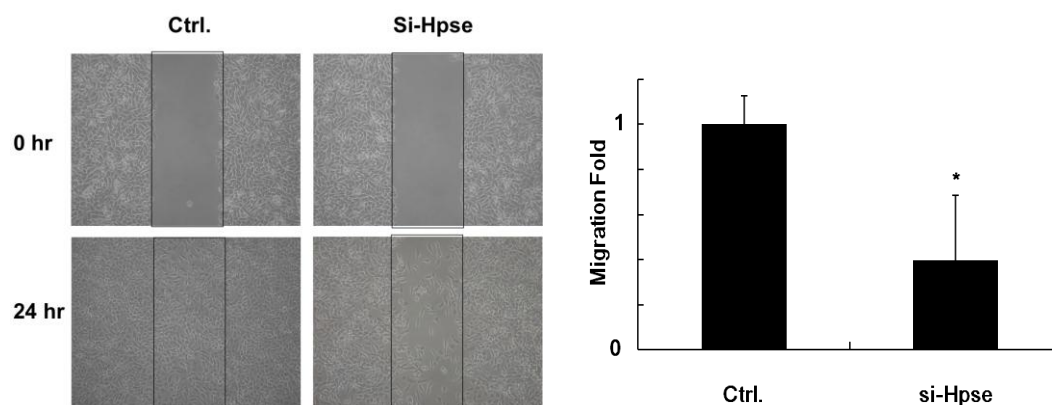


Fig. 4-16 ヘパラーゼ遺伝子のノックダウンしたFBJ-LL 遊走能の変化(wound healing assay)

Hpse siRNA をFBJ-LL 細胞にトランスフェクションしてから 48 時間後に、細胞の遊走能の変化を wound healing assay により検討した。コントロール配列を導入したFBJ-LL 細胞をコントロール(Ctrl.)として用いた。結果は平均±標準偏差で示した (n=3)。* $p < 0.05$.

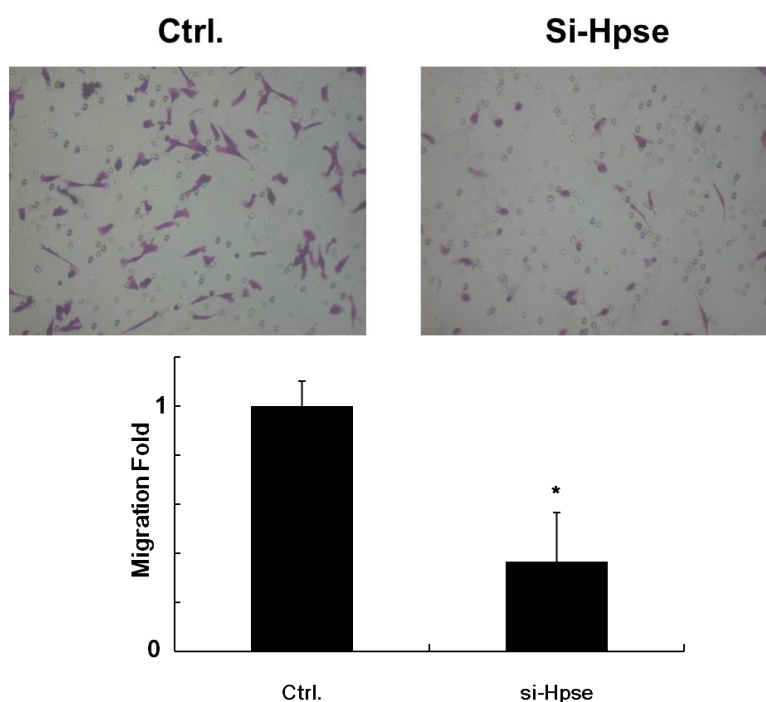


Fig. 4-17 ヘパラーゼノックダウンによるFBJ-LL 遊走能の変化 (Transwell assay)
Hpse siRNA をFBJ-LL 細胞にトランスフェクションしてから 48 時間に、4.2.9 に示したように transwell assay により、細胞の遊走能の変化を検討した。コントロール配列を導入したFBJ-LL 細胞がコントロール(Ctrl.)として用いられた。結果は平均±標準偏差で示した (n=3)。* $p < 0.05$.

前述の結果より、Ext1 とヘパラーゼはそれぞれにFBJ 細胞の遊走に関与することが明らかになった。つまり、Ext1 の発現とそれに基づくヘパラン硫酸の合成促進はFBJ 細胞の遊走を抑え、ヘパラーゼの発現とそれに基づく

ヘパランの硫酸の分解は FBJ 細胞の遊走を促進することが示された。転移性の低い FBJ-S1 細胞では *Ext1* が高発現し、転移性の高い FBJ-LL 細胞ではヘパラーゼが高発現しているのは意味があると思われる。*Ext1* とヘパラーゼは共にヘパラン硫酸の発現に関わっているが、両者の間に何かの関連があると考えられる。そこで、*Ext1* を抑制した FBJ-S1 細胞でのヘパラーゼの mRNA 発現の変化を調べた。*Ext1* siRNA を FBJ-S1 細胞に導入した 48 時間後に、ヘパラーゼの mRNA 発現をリアルタイム PCR で評価した。Fig. 4-18 に示したように、FBJ-S1 細胞での *Ext1* のノックダウンにより、ヘパラーゼの発現が向上していた。ヘパラン硫酸の合成遺伝子の発現は分解酵素の遺伝子発現を調節している可能性が示された。

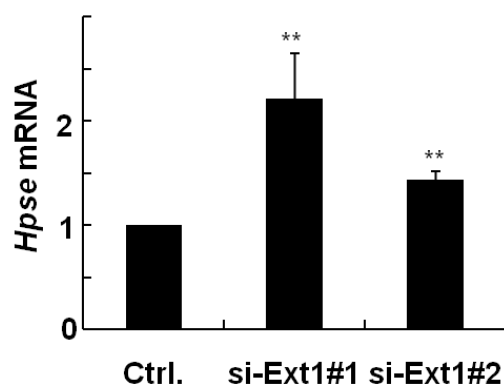


Fig. 4-18 *Ext1* siRNA が導入された FBJ-S1 細胞におけるヘパラーゼ遺伝子の発現二種類の *Ext1* siRNA 配列(si-Ext1#1、si-Ext1#2)をそれぞれ FBJ-S1 細胞にトランスフェクションしてから 48 時間後に、ヘパラーゼの発現をリアルタイム PCR により調べた。コントロール配列を導入した FBJ-S1 細胞をコントロール(Ctrl.)として用いた。結果は平均±標準偏差で示した (n=3)。** $p<0.01$

さらに、*Ext1* をノックダウンした FBJ-S1 細胞の遊走能にヘパラーゼが関わっているかを確認するために、*Hpse* siRNA と *Ext1* siRNA を同時に FBJ-S1 細胞に導入して、トランスフェクション 48 時間後に、*Ext1* とヘパラーゼ遺伝子の発現をリアルタイム PCR により調べた。Fig. 4-19 に示すように、*Ext1* とヘパラーゼ遺伝子の発現はそれぞれの siRNA により発現が抑制された。二つの siRNA を同時に導入すると、*Ext1* とヘパラーゼの両方の mRNA の発現が抑制された。Fig. 4-18 にも示したように *Ext1* siRNA によりヘパラーゼは顕著に増加したが、ヘパラーゼの siRNA により *Ext1* が増加することはな

かった。つまり、*Ext1* の発現はへパラナーゼを抑える（負の方向に制御）が、へパラナーゼの発現は *Ext1* の発現を制御していない。なお *Ext1* siRNA の導入でへパラナーゼ遺伝子の発現は向上するが *Hpse* siRNA の導入によりこの増加は相殺された。*Ext1* siRNA の導入により、へパラナーゼ遺伝子の発現の向上したことが *Hpse* siRNA の導入により相殺された。

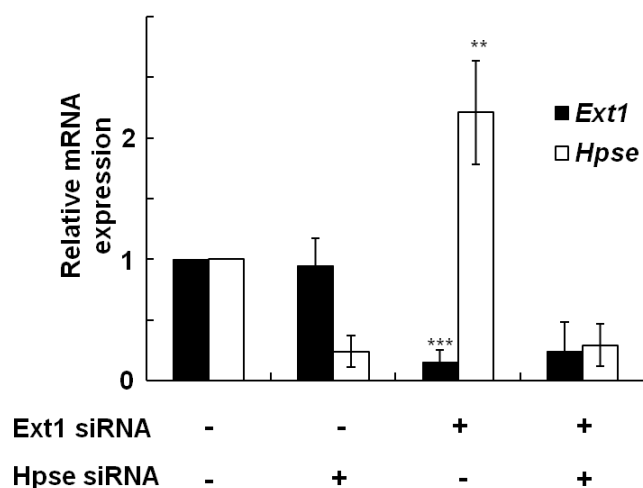


Fig. 4-19 *Ext1* siRNA と *Hpse* siRNA の共導入による *Ext1* と *Hpse* の mRNA 発現の変化

Ext1 siRNA と *Hpse* siRNA を FBJ-S1 細胞に共導入また単独で導入してから 48 時間後に、それぞれの細胞における *Ext1* (黒) とへパラナーゼ (白) の mRNA 発現をリアルタイム PCR により調べた。コントロール配列を導入した FBJ-S1 細胞をコントロールとして用いた。結果は平均±標準偏差で示した (n=3)。** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$ 。

さらに、wound healing assay と transwell assay により、*Ext1* siRNA と *Hpse* siRNA を共導入した際の遊走能の変化を観察した。Fig. 4-21 と Fig. 4-20 に示したように、*Ext1* siRNA が FBJ-S1 細胞に導入された場合、細胞の遊走能が亢進していた。*Ext1* siRNA と *Hpse* siRNA が共投与された場合には、細胞の遊走能はコントロールと比べて、ほとんど変わらなかった。*Ext1* のノックダウンによる遊走能の向上が *Hpse* siRNA の導入により相殺されていた。以上より *Ext1* のノックダウンによる遊走能の向上にへパラナーゼが関わっていることが示された。また、*Hpse* siRNA が単独で導入された場合には、FBJ-S1 細胞の遊走能はほとんど変わらなかった。FBJ-S1 細胞ではへパラナーゼ遺伝子の発現が低いので、へパラナーゼ siRNA による遊走能の抑制効果が観察されなかったと考えられる。

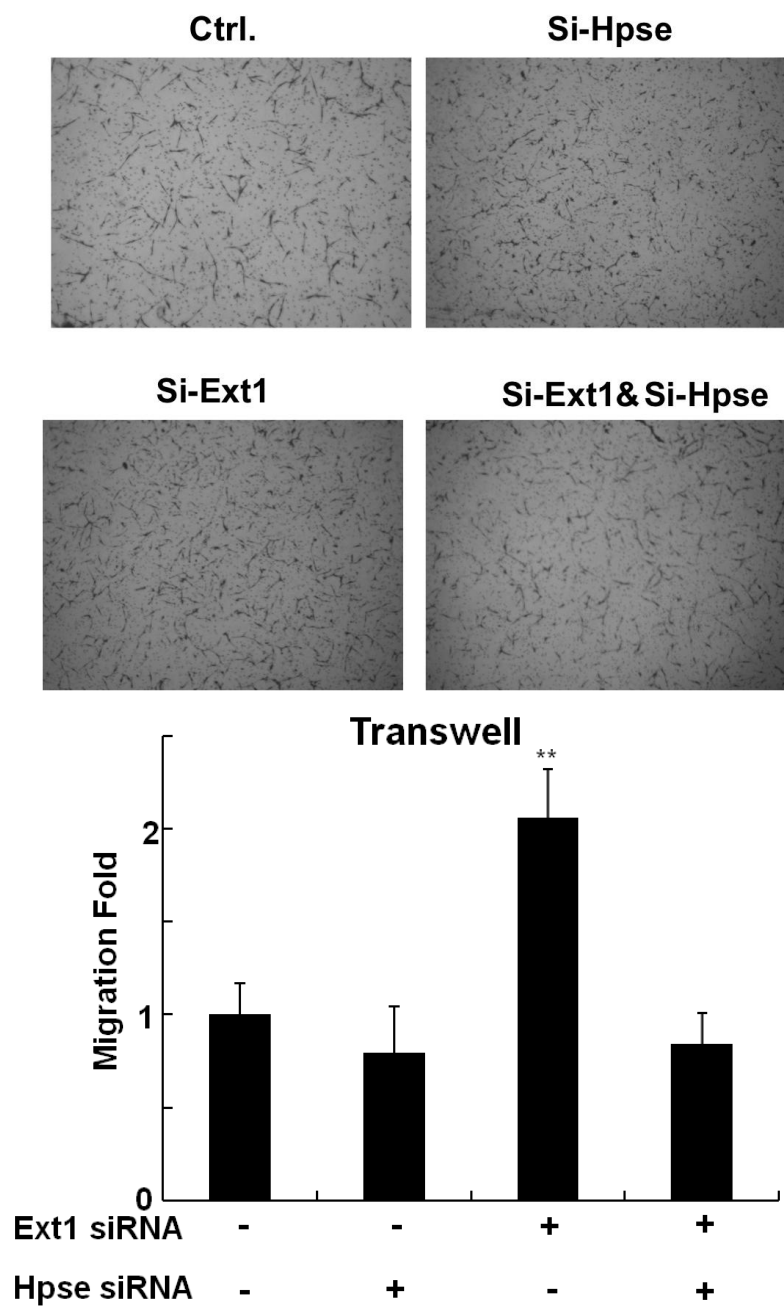


Fig. 4-20 *Ext1* siRNA と *Hpse* siRNA の共導入による FBJ-S1 細胞の遊走能の変化 (transwell assay)

Ext1 siRNA と *Hpse* siRNA を FBJ-S1 細胞に共導入また単独で導入してから 48 時間後に、それぞれの細胞の遊走能を transwell assay により調べた。コントロール配列を導入した FBJ-S1 細胞をコントロール (Ctrl.) として用いた。結果は平均±標準偏差で示した (n=3)。** $p < 0.01$.

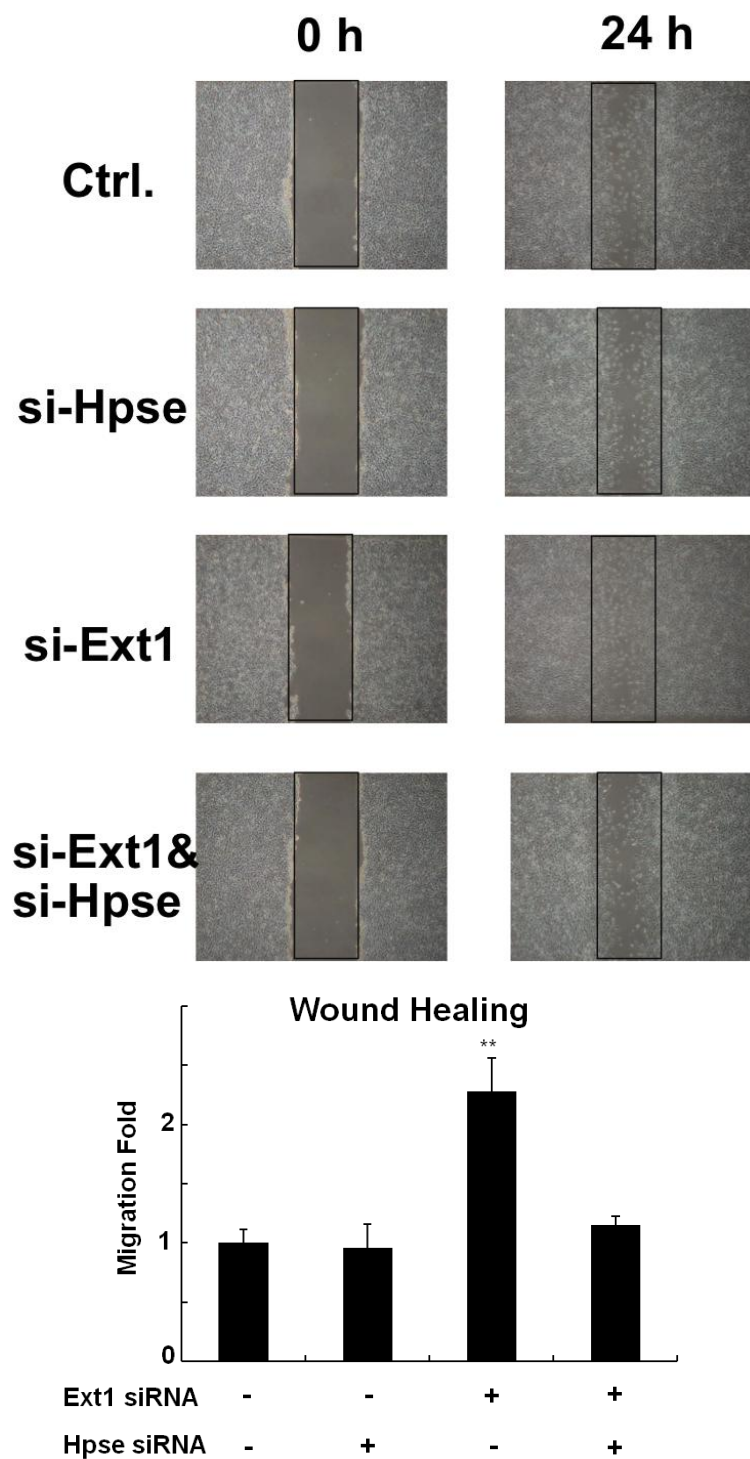


Fig. 4-21 *Ext1* siRNA と *Hpse* siRNA の共導入による FBJ-S1 細胞の遊走能の変化 (wound healing assay)

Ext1 siRNA と *Hpse* siRNA を FBJ-S1 細胞に共導入または単独で導入してから 48 時間後に、それぞれの細胞の遊走能を wound healing assay により調べた。コントロール配列を導入した FBJ-S1 細胞をコントロール (Ctrl.) として用いた。結果は平均±標準偏差で示した (n=3)。** $p < 0.01$ 。

4.4 考察

前章では、転移性の異なった FBJ 細胞に糖鎖プライマー Xyl-Ser-C12 を投与したところ、GAG 型糖鎖伸長生成物が低転移性の FBJ-S1 細胞において多く検出された。その結果、FBJ-S1 細胞における GAG の生合成能力の向上および GAG が FBJ 細胞の転移性を抑制する可能性が示唆された。この結果を踏まえて、本章では GAG の生合成酵素に着目して研究を行った。FBJ-LL と FBJ-S1 両細胞における GAG 合成酵素の発現を比較した結果、ヘパラン硫酸合成酵素である Ext1 は FBJ-S1 細胞において高発現していたことが示された。よって、この結果は Xyl-Ser-C12 由来の GAG 型の糖鎖伸長生成物が FBJ-S1 細胞において多く検出されたことと非常に高い相関を示している。また、フローサイトメトリーにより、FBJ-S1 細胞における細胞表面のヘパラン硫酸の発現量が FBJ-LL 細胞よりも高いことがわかった。この結果より、FBJ 細胞における Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖伸長生成物の生成量および糖転移酵素の発現の差異に関する知見が支持された上に、FBJ-S1 細胞が高発現しているヘパラン硫酸合成酵素 Ext1 とその結果のヘパラン硫酸の高発現が FBJ-LL 細胞に比べて転移性を抑えている可能性が高くなった。

ヘパラン硫酸／ヘパラン硫酸プロテオグリカンは生体において細胞表面または細胞外マトリックスに存在して、細胞外マトリックスの形成や細胞接着に関与している[55, 57, 66]。また、ヘパラン硫酸がトランスフォーミング増殖因子、血管内皮細胞増殖因子などの多くの増殖因子と特異的に結合し、増殖因子を安定化して、その蓄積や放出、会合などを調節することにより、細胞の接着、増殖、分化および転移に重要な役割を果たしている(Fig. 4-22) [2, 56, 57, 67]。細胞表面のヘパラン硫酸が細胞間接着または細胞外マトリックスとの接着を通じて、細胞遊走を阻害し、細胞の転移を抑制することが報告されている[55-57]。ヘパラン硫酸の発現の低下はメラノーマ[68]や横紋筋肉腫[69]などの高転移性の腫瘍にしばしば見られている[57, 67, 70, 71]。

ヘパラン硫酸の合成酵素である Ext2 の mRNA 発現は FBJ-S1 細胞において、FBJ-LL 細胞と比較して高く検出されていた。Ext1 と Ext2 はヘテロ複合体としてヘパラン硫酸の二糖繰り返し単位 (GlcA-GlcNAc) を重合する活性をもち、

ヘパラン硫酸鎖の伸長を触媒している。Ext1 と Ext2 のいずれかを抑制すると、ヘパラン硫酸の生合成が低下することが報告されている[31, 62, 72]。そこで本章では、ヘパラン硫酸と FBJ-S1 細胞の転移性との関連性を解明するために、まず Ext1 に焦点を当てて、siRNA により *Ext1* をノックダウンを行ったところ、FBJ-S1 細胞の遊走能が向上することを見出した。今回の結果は骨肉腫細胞の転移性にヘパラン硫酸またはその合成酵素 Ext1 が関与していることを明らかにすることができた。つまり、Ext1 の発現および結果としてのヘパラン硫酸の合成促進は転移を抑え、逆に Ext1 発現の低下と結果としてのヘパラン硫酸の合成量の低下は転移を促進するという知見である。ヘパラン硫酸が高発現していることは FBJ-S1 細胞の低転移性機構の一つの説明となると考えられる。

一方、*Ext1* ノックダウンによりヘパラーゼの発現が向上していたことも見出された。ヘパラーゼはヘパラン硫酸などの基質を分解することにより、ヘパラン硫酸が結合している増殖因子を遊離、活性化し、血管新生や細胞の浸潤や転移を促進する[55, 60, 66, 73]。また、ヘパラーゼにより分解されたヘパラン硫酸の分解産物は線維芽細胞増殖因子がその受容体との結合およびシグナル伝達を促進し、がん化、腫瘍の転移に関与していることが報告されている[56, 74]。ヒトメラノーマ、乳がんなど多くの悪性腫瘍において、ヘパラーゼの過剰発現または活性亢進が見られている[75, 76]。

FBJ-LL 細胞と FBJ-S1 細胞におけるヘパラーゼの発現の差異および FBJ-LL 細胞におけるヘパラーゼのノックダウンの結果から、ヘパラーゼが FBJ 細胞の遊走に関与することが証明された。つまり、高転移性の FBJ-LL 細胞ではヘパラーゼを高発現し(したがって細胞表面におけるヘパラン硫酸の発現も少ない)、細胞の遊走性も高いし、低転移性の FBJ-S1 細胞ではヘパラーゼの発現が低く、遊走性は低い。FBJ-S1 細胞で Ext1 発現を抑制するだけで遊走性は増加するし、FBJ-LL 細胞でヘパラーゼを抑えるだけで遊走性は抑制される。すでに述べた[77]ように Ext1 発現を抑制するだけでヘパラーゼが増加することを見つけているので、FBJ-S1 細胞で *Ext1* 発現を siRNA により抑制した実験では、ヘパラン硫酸の合成量が低下したことが主因なのか、ヘパラーゼも増えてヘパラン硫酸の発現量が低下したためなのか、どちらか一つ

に原因を帰することはできない。また、*Ext1* siRNA とヘパラーゼの siRNA を FBJ-S1 細胞に同時に投与した実験では、*Ext1* siRNA による細胞遊走能の亢進がヘパラーゼの発現抑制により相殺された。ヘパラーゼが *Ext1* またはヘパラン硫酸の発現抑制による FBJ 細胞に遊走能の向上に関与していることが本研究によって明確に示唆されている。

FBJ 細胞において、ガングリオシド GD1a が細胞の遊走[19]や vitronectin への接着[20]や HGF および MMP9 の発現を抑制すること[22, 24]が既に実証され、FBJ 細胞の転移を制御していると考えられている。主に細胞表面に存在する糖鎖はどのように細胞外のシグナルを受け取り、細胞内に伝達し、細胞の機能を制御するか、その機構の解明が大変興味深い。ここ数年の研究も GD1a によるシグナルの伝達経路を中心として展開されている[19, 23, 24, 44, 53, 54]。本研究の結果より、ヘパラン硫酸も FBJ 細胞の転移に関与することは見出され、GD1a の他に糖鎖が FBJ 細胞の転移に関与する証拠として挙げられた。転移のプロセスは複雑であり、さまざまな分子がその機構に関与しており、転移促進因子と転移抑制因子が複雑に相互作用することにより制御されると考えられる[4, 6]。GD1a とヘパラン硫酸が独立に細胞の転移を制御することは考えにくい。本研究の結果とこれまでの知見と併せて考え、ヘパラン硫酸と GD1a によるシグナル伝達経路との接点を探ることは FBJ 細胞の転移機構の解明に役立つ可能性があると考えられる。例えば、骨髄腫においてヘパラン硫酸の分解酵素であるヘパラーゼが HGF および MMP9 の発現を誘導すると報告されている[78, 79]。FBJ 細胞において、ヘパラーゼには HGF および MMP9 と類似な関連性があるとは限らないが、転移機構の全貌を解明するには新たな手がかりとなると考えられる。

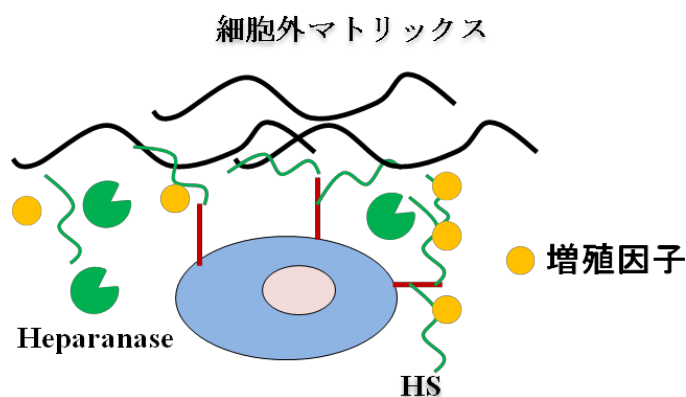


Fig. 4-22 ヘパラン硫酸とヘパラーゼ

ヘパラン硫酸（HS）が細胞接着と細胞外マトリックスの形成に関与している。ヘパラン硫酸が様々な増殖因子と結合して、増殖因子の活性を制御している。ヘパラーゼがヘパラン硫酸を分解することで、増殖因子が遊離され、細胞の増殖や転移を促進する。

4.5 結言

本章では、第2章で検討した FBJ 細胞における Xyl-Ser-C12 由来の生成物の比較解析の結果に基づき、GAG 合成酵素および分解酵素の発現と細胞遊走能の関連性について検討した。ヘパラン硫酸の合成酵素 Ext1 が FBJ-S1 細胞において高発現していることを見出し、siRNA で Ext1 をノックダウンすることにより、Ext1 とヘパラン硫酸の発現は FBJ-S1 細胞の遊走に関与することを証明した。さらに、ヘパラン硫酸の分解酵素であるヘパラーゼが FBJ 細胞の遊走に関与しており、ヘパラーゼの mRNA の発現が Ext1 の発現抑制により促進することが見出された。これにより、本研究において Ext1 とヘパラーゼが FBJ 細胞の遊走能を制御していることを初めて見出した。本研究でヘパラン硫酸が FBJ 細胞の転移に関与する可能性が明らかとなったので、マウス骨肉腫細胞の転移の機構に関する研究対象を広げ、実験と考察をさらに深めることが期待される。

第5章 結論

マウス FBJ 骨肉腫細胞の転移性の制御因子として糖鎖が注目されているが、転移に関わる糖鎖の解析および糖鎖が関与する転移のメカニズムは十分には解明されていない。そこで、糖鎖プライマー法を用いて、転移性の異なる FBJ 細胞における発現糖鎖の比較解析を実施した。得られた結果を基にして、ガングリオシド GD1a やグリコサミノグリカン鎖が細胞の遊走性に与える影響を解析することで、骨肉腫細胞が転移性を獲得する分子機構の解明を目指した。

第1章では、糖鎖の構造および機能、特にがん転移との関係について概説した。また糖鎖プライマー法の原理と応用について述べ、本研究の目的と方針をまとめた。

第2章では、糖鎖プライマー法を用いて、低転移性の FBJ-S1 細胞と高転移性の FBJ-LL 細胞に発現する糖鎖を比較解析し、転移に関与する糖鎖の同定を行った。糖鎖プライマーとして Lac-C12, Xyl-Ser-C12 などを用いて、FBJ-S1 細胞と FBJ-LL 細胞における生成物の比較解析を行った。Lac-C12 の投与により、低転移性の FBJ-S1 細胞において、GD1a などのガングリオ系列の発現が顕著に高いことが見出された。また Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖伸長生成物の解析により、高転移性の FBJ-LL 細胞においてグリコサミノグリカン (GAG) のひとつであるヘパラン硫酸型の糖鎖の発現量が低下している事が明らかとなった。

第1章では、ガングリオシド GD1a が FBJ 細胞の遊走能を制御する作用機序の解析を行なった。Caveolin1 および肝細胞増殖因子 HGF などの転移に関与する分子の発現と FBJ 細胞の転移および GD1a の発現との関連性について検討した。これにより、FBJ 細胞において、GD1a が Caveolin1 を介して HGF の発現を制御していることが明らかとなった。また Caveolin1 の発現抑制により、FBJ-S1 細胞の遊走能の向上が見出された。

第4章では、FBJ 細胞における Xyl-Ser-C12 由来の糖鎖生成物の比較解析の結果に基づき、GAG の合成酵素と分解酵素の発現と細胞遊走能との関連について検討した。ヘパラン硫酸の合成遺伝子 *Ext1* が分解酵素であるヘパラー

ゼの遺伝子の発現を制御しており、さらに細胞遊走能を制御していることを見出した。さらに、ヘパラーゼが FBJ 細胞の遊走能に関与することを明らかにした。

第5章では、結論として本論文を総括した。

本研究では腫瘍の転移性に関与する糖鎖生合成経路のモニタリングにおける糖鎖プライマー法の有用性を示した。グライコミクスにおける糖鎖プライマー法の更なる展開が期待される。また、ヘパラン硫酸がマウス骨肉腫細胞の転移性に関与していることが示され、ヘパラン硫酸の合成酵素 Ext1 とヘパラーゼを介して細胞の遊走能に関与することを明らかにした。ヘパラン硫酸が細胞の遊走能および転移に関わっていることは他にも報告されていた。しかしながら、ヘパラン硫酸合成酵素遺伝子 *Ext1* が細胞の遊走能と直接に関連していることを明らかにしたのは本研究が初めてである。また、ヘパラーゼの発現はがんの転移能を促進することは他の研究により実証されているが[64, 75, 76]、本研究では骨肉腫細胞の遊走能にヘパラーゼが関与していることを初めて証明した。また Ext1 がヘパラーゼの発現を制御し、さらに細胞遊走を制御していることも初めて見出した。よって、本研究で得られた結果は骨肉腫転移の抑制に新たなターゲットを見つけ、がん細胞の転移機構の解明と診断や創薬に大いに寄与すると期待される。

参考文献

1. 永井克孝 (1994) *糖鎖と生命*, 東京化学同人.
2. Hacker, U., Nybakken, K., and Perrimon, N. (2005) Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 530-541.
3. Shimokawa, K., Kimura-Yoshida, C., Nagai, N., Mukai, K., Matsubara, K., Watanabe, H., Matsuda, Y., Mochida, K., and Matsuo, I. (2011) Cell Surface Heparan Sulfate Chains Regulate Local Reception of FGF Signaling in the Mouse Embryo, *Developmental Cell* 21, 257-272.
4. Valastyan, S., and Weinberg, R. A. (2011) Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms, *Cell* 147, 275-292.
5. 山形達也. (2001) ガングリオシドで制御される腫瘍の転移 (糖鎖分子の設計と生理機能) -- (糖鎖による細胞機能制御), *季刊化学総説*, 165-173.
6. Eccles, S. A., and Welch, D. R. (2007) Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies, *Lancet* 369, 1742-1757.
7. Li, M., Song, L., and Qin, X. (2010) Glycan changes: cancer metastasis and anti-cancer vaccines, *J Biosci* 35, 665-673.
8. Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K., and Kimura, N. (2004) Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis, *Cancer Science* 95, 377-384.
9. Kawamura, Y. J., and Muto, T. (1998) CARBOHYDRATE CHAINS AND HEMATOGENOUS METASTASIS : A REVIEW, *Journal of Japan Surgical Society* 99, 419-424
10. Ugorski, M., and Laskowska, A. (2002) Sialyl Lewis(a): a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells, *Acta Biochimica Polonica* 49, 303-311.
11. Hamamura, K., Furukawa, K., Hayashi, T., Hattori, T., Nakano, J., Nakashima, H., Okuda, T., Mizutani, H., Hattori, H., Ueda, M., Urano, T., Lloyd, K. O., and Furukawa, K. (2005) Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11041-11046.
12. Inokuchi, J., Jimbo, M., Momosaki, K., Shimeno, H., Nagamatsu, A., and Radin, N. S. (1990) Inhibition of experimental metastasis of murine Lewis lung carcinoma by an inhibitor of glucosylceramide synthase and its possible mechanism of action, *Cancer Research* 50, 6731-6737.
13. Sato, T., Hatanaka, K., Hashimoto, H., and Yamagata, T. (2007) Syntheses of oligosaccharides using cell function, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 19, 1-17.
14. Miura, Y., Arai, T., and Yamagata, T. (1996) Synthesis of amphiphilic lactosides that possess a lactosylceramide-mimicking N-acyl structure:

- alternative universal substrates for endo-type glycosylceramidases, *Carbohydrate Research* 289, 193-199.
15. Miura, Y., and Yamagata, T. (1997) Glycosylation of lactosylceramide analogs in animal cells: amphipathic disaccharide primers for glycosphingolipid synthesis, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 241, 698-703.
 16. Nakajima, H., Miura, Y., and Yamagata, T. (1998) Glycosylation of amphipathic lactoside primers with consequent inhibition of endogenous glycosphingolipid synthesis, *J Biochem* 124, 148-156.
 17. Sato, T., Takashiba, M., Hayashi, R., Zhu, X., and Yamagata, T. (2008) Glycosylation of dodecyl 2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside and dodecyl beta-D-galactopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside as saccharide primers in cells, *Carbohydrate Research* 343, 831-838.
 18. Yamagata, S., Miwa, M., Tanaka, K., and Yamagata, T. (1982) FBJ virus-induced osteosarcoma has type V collagen consisting of A, B and C-like chains in addition to type I collagen, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 105, 1208-1214.
 19. Hyuga, S., Yamagata, S., Tai, T., and Yamagata, T. (1997) Inhibition of highly metastatic FBJ-LL cell migration by ganglioside GD1a highly expressed in poorly metastatic FBJ-S1 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 231, 340-343.
 20. Hyuga, S., Yamagata, S., Takatsu, Y., Hyuga, M., Nakanishi, H., Furukawa, K., and Yamagata, T. (1999) Suppression by ganglioside GD1A of migration capability, adhesion to vitronectin and metastatic potential of highly metastatic FBJ-LL cells, *International Journal of Cancer* 83, 685-691.
 21. Hyuga, S., Kawasaki, N., Hyuga, M., Ohta, M., Shibayama, R., Kawanishi, T., Yamagata, S., Yamagata, T., and Hayakawa, T. (2001) Ganglioside GD1a inhibits HGF-induced motility and scattering of cancer cells through suppression of tyrosine phosphorylation of c-Met, *International Journal of Cancer* 94, 328-334.
 22. Hu, D., Tan, X., Sato, T., Yamagata, S., and Yamagata, T. (2006) Apparent suppression of MMP-9 activity by GD1a as determined by gelatin zymography, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349, 426-431.
 23. Wang, L., Takaku, S., Wang, P., Hu, D., Hyuga, S., Sato, T., Yamagata, S., and Yamagata, T. (2006) Ganglioside GD1a regulation of caveolin-1 and Stim1 expression in mouse FBJ cells: augmented expression of caveolin-1 and Stim1 in cells with increased GD1a content, *Glycoconjugate Journal* 23, 303-315.
 24. Hu, D., Man, Z., Wang, P., Tan, X., Wang, X., Takaku, S., Hyuga, S., Sato, T., Yao, X., Yamagata, S., and Yamagata, T. (2007) Ganglioside GD1a negatively regulates matrix metalloproteinase-9 expression in mouse FBJ cell lines at the transcriptional level, *Connect Tissue Res* 48, 198-205.
 25. Benson, M. A., Fu, Z., Kim, J. J., and Baldwin, M. R. (2011) Unique ganglioside recognition strategies for clostridial neurotoxins, *Journal of*

- Biological Chemistry* 286, 34015-34022.
26. Takagaki, K., Nakamura, T., Kon, A., Tamura, S., and Endo, M. (1991) Characterization of beta-D-xyloside-induced glycosaminoglycans and oligosaccharides in cultured human skin fibroblasts, *J Biochem* 109, 514-519.
 27. Salimath, P. V., Spiro, R. C., and Freeze, H. H. (1995) Identification of a novel glycosaminoglycan core-like molecule. II. Alpha-GalNAc-capped xylosides can be made by many cell types, *Journal of Biological Chemistry* 270, 9164-9168.
 28. Miura, Y., and Freeze, H. H. (1998) alpha-N-acetylgalactosamine-capping of chondroitin sulfate core region oligosaccharides primed on xylosides, *Glycobiology* 8, 813-819.
 29. Etchison, J. R., Srikrishna, G., and Freeze, H. H. (1995) A novel method to co-localize glycosaminoglycan-core oligosaccharide glycosyltransferases in rat liver Golgi. Co-localization of galactosyltransferase I with a sialyltransferase, *Journal of Biological Chemistry* 270, 756-764.
 30. Prydz, K., and Dalen, K. T. (2000) Synthesis and sorting of proteoglycans, *Journal of Cell Science* 113 Pt 2, 193-205.
 31. Kitagawa, H., Shimakawa, H., and Sugahara, K. (1999) The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of heparan sulfate, *Journal of Biological Chemistry* 274, 13933-13937.
 32. Kitagawa, H., Kano, Y., Shimakawa, H., Goto, F., Ogawa, T., Okabe, H., and Sugahara, K. (1999) Identification and characterization of a novel UDP-GalNAc:GlcAbeta-R alpha1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase from a human sarcoma cell line, *Glycobiology* 9, 697-703.
 33. Schwartz, N. B., Galligani, L., Ho, P. L., and Dorfman, A. (1974) Stimulation of synthesis of free chondroitin sulfate chains by beta-D-xylosides in cultured cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 4047-4051.
 34. Izumi, J., Takagaki, K., Nakamura, T., Shibata, S., Kojima, K., Kato, I., and Endo, M. (1994) A novel oligosaccharide, xylosyl beta 1-4xylosyl beta 1-(4-methylumbelliferone), synthesized by cultured human skin fibroblasts in the presence of 4-methylumbelliferyl-beta-D-xyloside, *J Biochem* 116, 524-529.
 35. Lugenwa, F. N., and Esko, J. D. (1991) Estradiol beta-D-xyloside, an efficient primer for heparan sulfate biosynthesis, *Journal of Biological Chemistry* 266, 6674-6677.
 36. Mani, K., Belting, M., Ellervik, U., Falk, N., Svensson, G., Sandgren, S., Cheng, F., and Fransson, L. A. (2004) Tumor attenuation by 2(6-hydroxynaphthyl)-beta-D-xylopyranoside requires priming of heparan sulfate and nuclear targeting of the products, *Glycobiology* 14, 387-397.
 37. Mani, K., Havsmark, B., Persson, S., Kaneda, Y., Yamamoto, H., Sakurai, K.,

- Ashikari, S., Habuchi, H., Suzuki, S., Kimata, K., Malmstrom, A., Westergren-Thorsson, G., and Fransson, L. A. (1998) Heparan/chondroitin/dermatan sulfate primer 2-(6-hydroxynaphthyl)-O-beta-D-xylopyranoside preferentially inhibits growth of transformed cells, *Cancer Research* 58, 1099-1104.
38. Siegbahn, A., Aili, U., Ochocinska, A., Olofsson, M., Ronnols, J., Mani, K., Widmalm, G., and Ellervik, U. (2011) Synthesis, conformation and biology of naphthoxylosides, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19, 4114-4126.
39. Freeze, H. H., Sampath, D., and Varki, A. (1993) Alpha- and beta-xylosides alter glycolipid synthesis in human melanoma and Chinese hamster ovary cells, *Journal of Biological Chemistry* 268, 1618-1627.
40. Takagaki, K., and Endo, M. (2000) beta-D-xyloside-initiated oligosaccharides in cultured cells, *Seikagaku* 72, 1263-1266.
41. Wang, Y., Kumazawa, T., Shiba, K., Osumi, K., Mizuno, M., and Sato, T. (2012) Glycosylation of N(alpha)-lauryl-O-(beta-d-xylopyranosyl)-l-serinamid as a saccharide primer in cells, *Carbohydrate Research* 361C, 33-40.
42. Fritz, T. A., Lugenwa, F. N., Sarkar, A. K., and Esko, J. D. (1994) Biosynthesis of heparan sulfate on beta-D-xylosides depends on aglycone structure, *Journal of Biological Chemistry* 269, 300-307.
43. Tatsuya, Y., Sumiko, H., and Sadako, Y. (1998) Metastatic capacity of FBJ-osteosarcoma cells dependent on ganglioside GD1a, *Bioscience & industry* 56, 34-35.
44. Wang, L., Wang, Y., Sato, T., Yamagata, S., and Yamagata, T. (2008) Ganglioside GD1a suppresses TNFalpha expression via Pkn1 at the transcriptional level in mouse osteosarcoma-derived FBJ cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371, 230-235.
45. Deryugina, E. I., and Quigley, J. P. (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis, *Cancer and Metastasis Reviews* 25, 9-34.
46. Sotgia, F., Martinez-Outschoorn, U. E., Howell, A., Pestell, R. G., Pavlides, S., and Lisanti, M. P. (2012) Caveolin-1 and cancer metabolism in the tumor microenvironment: markers, models, and mechanisms, *Annu Rev Pathol* 7, 423-467.
47. Goetz, J. G., Lajoie, P., Wiseman, S. M., and Nabi, I. R. (2008) Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly, *Cancer and Metastasis Reviews* 27, 715-735.
48. Gumulec, J., Sochor, J., Hlavna, M., Sztalmachova, M., Krizkova, S., Babula, P., Hrabec, R., Rovny, A., Adam, V., Eckschlager, T., Kizek, R., and Masarik, M. (2012) Caveolin-1 as a potential high-risk prostate cancer biomarker, *Oncology Reports* 27, 831-841.
49. Williams, T. M., and Lisanti, M. P. (2005) Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 288, C494-C506.
50. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of

- the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
51. Jeffers, M., Rong, S., and Woude, G. F. (1996) Hepatocyte growth factor/scatter factor-Met signaling in tumorigenicity and invasion/metastasis, *Journal of Molecular Medicine (Berlin)* 74, 505-513.
 52. Jiang, W. G., Hallett, M. B., and Puntis, M. C. (1993) Hepatocyte growth factor/scatter factor, liver regeneration and cancer metastasis, *Br J Surg* 80, 1368-1373.
 53. Cao, T., Zhang, T., Wang, L., Zhang, L., Adachi, T., Sato, T., Yamagata, S., and Yamagata, T. (2010) Ganglioside GD1a suppression of NOS2 expression via ERK1 pathway in mouse osteosarcoma FBJ cells, *Journal of Cellular Biochemistry* 110, 1165-1174.
 54. Zhang, L., Wang, Y., Wang, L., Cao, T., Hyuga, S., Sato, T., Wu, Y., Yamagata, S., and Yamagata, T. (2011) Ganglioside GD1a negatively regulates hepatocyte growth factor expression through caveolin-1 at the transcriptional level in murine osteosarcoma cells, *Biochimica et Biophysica Acta* 1810, 759-768.
 55. Sanderson, R. D. (2001) Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 12, 89-98.
 56. Liu, D., Shriver, Z., Venkataraman, G., El Shabrawi, Y., and Sasisekharan, R. (2002) Tumor cell surface heparan sulfate as cryptic promoters or inhibitors of tumor growth and metastasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 568-573.
 57. Sasisekharan, R., Shriver, Z., Venkataraman, G., and Narayanasami, U. (2002) Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer, *Nature Reviews Cancer* 2, 521-528.
 58. Handel, T. M., Johnson, Z., Crown, S. E., Lau, E. K., and Proudfoot, A. E. (2005) Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines, *Annual Review of Biochemistry* 74, 385-410.
 59. Sugahara, K., and Kitagawa, H. (2000) Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans, *Current Opinion in Structural Biology* 10, 518-527.
 60. Barash, U., Cohen-Kaplan, V., Dowek, I., Sanderson, R. D., Ilan, N., and Vlodaysky, I. (2010) Proteoglycans in health and disease: new concepts for heparanase function in tumor progression and metastasis, *FEBS Journal* 277, 3890-3903.
 61. Okada, M., Nadanaka, S., Shoji, N., Tamura, J., and Kitagawa, H. (2010) Biosynthesis of heparan sulfate in EXT1-deficient cells, *Biochemical Journal* 428, 463-471.
 62. Busse, M., Feta, A., Presto, J., Wilen, M., Gronning, M., Kjellen, L., and Kusche-Gullberg, M. (2007) Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to heparan sulfate chain elongation, *Journal of Biological Chemistry* 282, 32802-32810.
 63. Bame, K. J. (2001) Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans, *Glycobiology* 11, 91r-98r.

64. Vlodaysky, I., Ilan, N., Nadir, Y., Brenner, B., Katz, B. Z., Naggi, A., Torri, G., Casu, B., and Sasisekharan, R. (2007) Heparanase, heparin and the coagulation system in cancer progression, *Thrombosis Research 120 Suppl 2*, S112-120.
65. Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., and Linsley, P. S. (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi, *Nature Biotechnology 21*, 635-637.
66. Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., and Zako, M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans, *Annual Review of Biochemistry 68*, 729-777.
67. Nadanaka, S., and Kitagawa, H. (2008) Heparan sulphate biosynthesis and disease, *J Biochem 144*, 7-14.
68. Kure, S., Yoshie, O., and Aso, H. (1987) Metastatic potential of murine B16 melanoma correlates with reduced surface heparan sulfate glycosaminoglycan, *Japanese Journal of Cancer Research 78*, 1238-1245.
69. Redini, F., Moczar, E., and Poupon, M. F. (1986) Cell surface glycosaminoglycans of rat rhabdomyosarcoma lines with different metastatic potentials and of non-malignant rat myoblasts, *Biochimica et Biophysica Acta 883*, 98-105.
70. Raman, K., and Kuberan, B. (2010) Chemical Tumor Biology of Heparan Sulfate Proteoglycans, *Curr Chem Biol 4*, 20-31.
71. Bishop, J. R., Schuksz, M., and Esko, J. D. (2007) Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology, *Nature 446*, 1030-1037.
72. McCormick, C., Duncan, G., Goutsos, K. T., and Tufaro, F. (2000) The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97*, 668-673.
73. Gohji, K., Katsuoka, Y., Okamoto, M., Kamidono, S., Kitazawa, S., Toyoshima, M., Dong, J., and Nakajima, M. (2000) Human heparanase: roles in invasion and metastasis of cancer, *Hinyokika Kyo 46*, 757-762.
74. Vlodaysky, I., Elkin, M., Pappo, O., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R., Aviv, A., Pecker, I., and Friedmann, Y. (2000) Mammalian heparanase as mediator of tumor metastasis and angiogenesis, *The Israel Medical Association journal 2 Suppl*, 37-45.
75. Roy, M., and Marchetti, D. (2009) Cell surface heparan sulfate released by heparanase promotes melanoma cell migration and angiogenesis, *Journal of Cellular Biochemistry 106*, 200-209.
76. Ilan, N., Elkin, M., and Vlodaysky, I. (2006) Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology 38*, 2018-2039.
77. Wang, Y., Yang, X., Yamagata, S., Yamagata, T., and Sato, T. (2012) Involvement of Ext1 and heparanase in migration of mouse FBJ osteosarcoma cells, *Molecular and Cellular Biochemistry 373*, 63-72.

78. Ramani, V. C., Yang, Y., Ren, Y., Nan, L., and Sanderson, R. D. (2011) Heparanase plays a dual role in driving hepatocyte growth factor (HGF) signaling by enhancing HGF expression and activity, *Journal of Biological Chemistry* 286, 6490-6499.
79. Purushothaman, A., Chen, L., Yang, Y., and Sanderson, R. D. (2008) Heparanase stimulation of protease expression implicates it as a master regulator of the aggressive tumor phenotype in myeloma, *Journal of Biological Chemistry* 283, 32628-32636.

略称一覧

Chpf; Chondroitin polymerizing factor
Chsy; Chondroitinsulfate synthase
CS; Chondroitin sulfate
DS; Dermatan sulfate
EIC; Exact Ion Chromatography
Ext; Exostosin
FBS; Fetal Bovine Serum
GAG; Glycosaminoglycan
GAG; Glycosaminoglycan
Gal; Galactose
GalNAc; N-Acetyl galactosamine
Glc; Glucose
GlcNAc; N-Acetyl glucosamine
GlcUA; Glucuronic acid
Hex; Hexose
HexNAc; N-Acetyl hexosamine
Hpse; Heparanase
HPTLC; High-performance Thin Layer Chromatography
HS; Heparan sulfate
IdoUA; Iduronic acid
KS; Keratan sulfate
Lac; Lactose
LC, HPLC; High-performance Liquid Chromatography
MS; Mass spectrometry
PCR; Polymerase Chain Reaction
PVDF; Polyvinylidene fluoride
R.T.; Retention time
RT; Reverse Transcription
Ser; Serine
siRNA; small interfering RNA
TEA; Triethylamine
Thr; Threonine
Xyl; Xylose

本研究に関する業績

原著論文

Wang, Y., Yang, X., Yamagata, S., Yamagata, T., and Sato, T. (2012) Involvement of Ext1 and heparanase in migration of mouse FBJ osteosarcoma cells, *Molecular and Cellular Biochemistry* 373, 63-72.

Wang, Y., Kumazawa, T., Shiba, K., Osumi, K., Mizuno, M., and Sato, T. (2012) Glycosylation of *N*(alpha)-lauryl-*O*-(beta-D-xylopyranosyl)-L-serinamide as a saccharide primer in cells, *Carbohydrate Research* 361C, 33-40.

Zhang, L., Wang, Y., Wang, L., Cao, T., Hyuga, S., Sato, T., Wu, Y., Yamagata, S., and Yamagata, T. (2011) Ganglioside GD1a negatively regulates hepatocyte growth factor expression through caveolin-1 at the transcriptional level in murine osteosarcoma cells, *Biochimica et Biophysica Acta* 1810, 759-768.

学会発表

糖鎖プライマー法を用いた細胞内糖鎖伸長生成物の構造解析手法と糖鎖パネルの作成

第29回日本糖質学会年会 高山 2009年9月

佐藤智典、熊澤知祥、朱性宇、王毅楠、古市悠、金子智典、水野真盛、山形達也、大喜多肇、片桐洋子、清河信敬、藤本純一郎

転移性の異なる骨肉腫細胞における発現糖鎖の比較および GD1a による HGF の発現調節 (ポスター)

第29回日本糖質学会年会 高山 2009年9月

王毅楠、佐藤智典、王麗、山形貞子、山形達也

糖鎖プライマー法を利用したマウス FBJ 細胞に発現する糖鎖の解析および GD1a による HGF の発現の下方制御 (ポスター)

GlycoTOKYO 2009 シンポジウム 東京 2009年11月

王毅楠、佐藤智典、王麗、山形貞子、山形達也

Studies on metastasis-related molecules regulated by GD1a in murine FBJ Osteosarcoma Cells and Analysis of Glycan Structures in FBJ Cells Revealed by the Saccharide Primer Method

The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

ホノルル アメリカ 2010年12月

Yinan Wang, Toshinori Sato, Li Wang, Sadako Yamagata and Tatsuya Yamagata

糖鎖プライマー法を用いた転移性がん細胞での発現糖鎖およびその機能の解析

第30回日本糖質学会年会長岡 2011年7月

佐藤智典、王毅楠、古市悠、今野友輔、熊澤知祥、水野真盛、山形達也

糖鎖プライマー法を用いたマウス骨肉腫細胞に関わる糖鎖および糖転移酵素の解析

日本化学会 第92春季年会 横浜 2012年3月

王毅楠、佐藤智典等

GAG型糖鎖プライマーを用いた転移性がん細胞で発現する糖鎖構造の解析

第31回日本糖質学会年会 鹿児島 2012年9月

佐藤智典、王毅楠

謝辞

本研究は、著者が慶應義塾大学大学院理工学研究科後期博士課程在学中に、同大学理工学部佐藤智典教授の指導のもとに行ったものである。本研究のテーマに取り組む機会を与えて下さり、またその遂行にあたり懇切なるご指導を賜るとともに、審査に際しましては主査の労をお執りいただきました佐藤智典教授に心より感謝申し上げます。

本論文の審査に際しましては、ご多忙にもかかわらず副査の労をお執りいただいた慶應義塾大学理工学部生命情報学科井本正哉教授、松本緑准教授、宮本憲二准教授に心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、さまざまなご助言と激励を賜りました慶應義塾大学理工学部生命情報学科松原輝彦専任講師に深く感謝いたします。

大学学部学生時代より永年にわたり多大なるご指導をいただいてまいりました瀋陽薬科大学山形達也教授、山形貞子准教授に深く感謝いたします。

日頃より研究と日常生活における多大なご協力とご支援をいただきました佐藤研究室の皆様にご深く感謝致します。

最後に、私の研究生活を支えてくれた友人と家族に感謝いたします。