

論文の内容の要旨

論文題目 糖鎖構造に依存したヒトムチン 21 のアポトーシス抑制機能

氏名 田 園

【研究背景及び目的】

腫瘍細胞や炎症を起こした上皮組織において、複数のムチンの発現や糖鎖付加状態が変化することが古くから知られていた。上皮由来のがん細胞とそれが由来する正常細胞の違いを見分けることを指標に開発されたモノクローナル抗体が、シアリル Tn 抗原、CA19-9 や CA125 などのムチンの糖鎖構造特異的であることが判明し、診断薬としてがんの血清診断や治療経過のモニタリングに利用されてきた。さらに、ムチンの発現や糖鎖修飾の変化はがんの進行やそれに伴って起こる浸潤性や転移性と並行して起こることが知られていた。しかし、がん細胞におけるムチンの異常な糖鎖修飾ががん細胞の悪性度の獲得にどのように関与しているかはまだはっきり解明されていない。

ヒトムチン 21(MUC21)は、悪性化に強い影響を持つと推定されていたマウスエピグリカニン/Muc21 のヒト相同遺伝子として当研究室において同定された膜貫通型ムチンである (Itoh et al, *Glycobiology*, 18: 74-83, 2008)。私は修士課程において、MUC21 に特異的なモノクローナル抗体を複数樹立し、ヒト食道扁平上皮における MUC21 糖鎖構造の発現分布を解析し、細胞分化に伴って MUC21 の糖鎖が伸長することを示した (Tian et al, *Glycobiology*, 22: 1218-26, 2012)。しかし、MUC21 の発現及びその糖鎖構造とがん細胞の挙動との関係は不明であった。

本研究において、私はがん細胞の特性の一つとして知られているアポトーシスに対する抵抗性に注目し機能解析を行い、さらに、MUC21 の糖鎖構造の多様性に着目し、糖鎖構造が MUC21 の機能に与える影響の解明を行った。また、ヒト腫瘍組織における MUC21 の役割を明らかにするため、先んじて乳がん組織及び甲状腺がん組織における MUC21 発現解析を行った。

【研究方法及び結果】

1 MUC21 強制発現により細胞はアポトーシス抵抗性を獲得する

MUC21 の発現が細胞のアポトーシス感受性に与える影響を、抗がん剤である Etoposide を用いて検討した。HEK293 (胎児由来腎臓細胞) MUC21 強制発現細胞及びその mock 細胞を Etoposide 含有培地で培養し、フローサイトメトリー解析により PI+/annexin+細胞をアポトーシス細胞として評価した。16 時間、24 時間及び 48 時間培養した結果、MUC21 強制発現細胞が mock 細胞に比べて、PI+/annexin+細胞の割合が小さく、アポトーシスが抑えられていることが示された。さらに、異なるクローンの HEK293-MUC21 強制発現細胞及び mock 細胞 に対して Etoposide 処理した場合においても、同様に MUC21 強制発現細胞のアポトーシス耐性が観察された。これらの結果から、MUC21 を強制発現させることで、細胞はアポトーシス抵抗性を獲得することが示された。さらに、MUC21 強制発現細胞において、アポトーシスを抑制する分子である Bcl-2 及び Bcl-xL の発現が上昇していることがウェスタンブロット解析により観察され、また、アポトーシスを促進する Bax の転写が抑制されることがリアルタイム PCR により明らかになった。

2 MUC21 タンデムリピート及び細胞内ドメインは MUC21 によるアポトーシス抑制に必須である

MUC21 のどの部位がアポトーシス抑制に関与するかの検討を行った。タンデムリピートを欠損させた MUC21(Δ -TR-MUC21)及び細胞内ドメインを欠損させた MUC21(Δ -CT-MUC21)を HEK293 細胞に強制発現させ、タンデムリピート及び細胞内ドメインの MUC21 によるアポトーシス抑制における役割を検討した。ベクターに組み込んだ Δ -TR-MUC21 及び Δ -CT-MUC21 の配列は ABI PRISM3100 Genetic Analyzer を用いて確認し、細胞表面におけるこれらの分子の発現はフローサイトメトリーにより確認した。これらの強制発現細胞に対して Etoposide 処理によりアポトーシスを誘導したところ、全長 MUC21 強制発現細胞に見られていたアポトーシス抵抗性は Δ -TR-MUC21 及び Δ -CT-MUC21 を発現させた細胞では観察されなかった。さらに、これらの細胞における Bax の転写量を検討した結果、タンデムリピート及び細胞内ドメインを欠損させることで、MUC21 発現による Bax の転写抑制が観察されなくなった。これらの結果から、タンデムリピート及び細胞内ドメインの双方が MUC21 のアポトーシス抑制能に必須であることが示された。

3 MUC21 糖鎖構造がアポトーシス抑制能に関与する

次にタンデムリピートに付加する糖鎖に注目した。MUC21 の糖鎖構造の違いがアポトーシス抑制に与える影響を検討するため、CHO-K1 細胞及びその糖鎖合成不全細胞株である CHO-IdID 細胞、CHO-Lec2 細胞の MUC21 強制発現細胞を Etoposide で処理した。CHO-K1 細胞に発現する MUC21 にはシアリル T 抗原が付加されるのに対して、Lec2 細胞では CMP-シアル酸輸送体の欠損によりシアル酸を付加できないことが知られている(Deutscher et al, *Cell*, 39: 295-9, 1984)。IdID 細胞は通常培養条件下では O 型糖鎖を合成できないためムチンは糖鎖修飾を受けないが(Kingsley et al, *Cell*, 14:44(5):749-59, 1986)、培地中に *N*-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を添加すると Tn 抗原が付加できるようになり、また、ガラクトース(Gal)及び GalNAc を同時に添加すると細胞は伸長した O 型糖鎖を合成できる(Altschuler et al, *Mol Biol Cell*, 11(3):819-831, 2000)。これらの細胞を用いて、MUC21 の糖鎖構造がアポトーシスに与える影響を検討した。

CHO-K1 細胞、IdID 細胞及び Lec2 細胞に発現する MUC21 の糖鎖構造はレクチンプロット解析により確認した。CHO-K1-MUC21 強制発現細胞及びその mock 細胞を Etoposide で処理した結果、MUC21 発現細胞が mock 細胞に比べて、Annexin⁺/PI⁺細胞の割合が小さく、異なるクローンにおいても同様の現象が観察されたことから、CHO-K1 細胞において MUC21 が有意にアポトーシスを抑制することが示され、さらにシアリル-T 抗原が付加した MUC21 がアポトーシス抑制機能を持つことが示された。また、CHO-K1 細胞における MUC21 のタンデムリピート及び細胞内ドメインの役割の検討を行った。細胞を Etoposide と共に培養した結果、HEK293 と同様に Δ -TR-MUC21 及び Δ -CT-MUC21 を発現させた細胞はアポトーシスに対して抵抗性を示さなかった。この結果から、CHO-K1 細胞においても、タンデムリピート及び細胞内ドメインがアポトーシス抑制に必須であることが示された。

また、Lec2 細胞においても、MUC21 強制発現細胞が mock 細胞と比べてアポトーシス抵抗性を持つことが示され、T 抗原が付加した MUC21 もアポトーシスを抑制することが示された。

一方で、O 型糖鎖を合成できない IdID 細胞では MUC21 強制発現細胞と mock 細胞とではアポトーシスに差は見られなかった。これらの結果から、MUC21 の糖鎖がアポトーシス抑制に重要であることが推測された。次に IdID 細胞の糖鎖構造に改変を加えて、MUC21 糖鎖構造とアポトーシスとの関与を検討した。なお、Gal 及び GalNAc 処理した後の MUC21 の糖鎖構造はレクチンプロットにより確認した。GalNAc のみの添加培地で前培養した細胞に Etoposide を加えてアポトーシスを誘導した場合は、MUC21 強制発現細胞と mock 細胞とでは差は見られなかったが、Gal 及び GalNAc 添加培地で前培養した後にアポトーシスを誘導した場合は、MUC21 強制発現細胞が mock 細胞に比べてアポトーシスに抵抗性を持つようになった。

これらの結果から、T 抗原及びシアリル T 抗原を持つ MUC21 はアポトーシスを抑制するのに対して、糖鎖が付加されていない MUC21 及び Tn 抗原を持つ MUC21 ではアポトーシスを抑制しないことが示唆された。

4 甲状腺乳頭がん及び浸潤性乳管がん組織では MUC21 が発現している

MUC21 強制発現細胞を用いた検討により、MUC21 がその糖鎖構造依存的にアポトーシスを抑制することが示されたため、次に生体内において MUC21 がどのように発現しているのかの検討を行った。これまで当研究室において、甲状腺の腫瘍部位と隣接正常部位において MUC21 の遺伝子発現に差があることが明らかとなった(Okada K. unpublished data)。また、マウス Muc21 は乳がん細胞株に発現していたことから、ヒト MUC21 も乳がん組織に発現している可能性が高い。そこで本研究では甲状腺がん及び乳がんにおける MUC21 の発現及びその糖鎖構造について検討した。

組織における MUC21 の発現を調べるため、pAb anti-MUC21-CT、mAb heM21A 及び mAb heM21D を用いて組織染色を行った。pAb anti-MUC21-CT は MUC21 の細胞内ドメインに結合するため、MUC21 の糖鎖構造に関わらずすべて MUC21 を認識する。それに対して、mAb heM21A は Tn-MUC21、T-MUC21 及びシアリル T-MUC21 に結合し、mAb heM21D は糖鎖が付加していない MUC21 及び Tn-MUC21 に結合することを過去に明らかにした(Tian Y. et al.)。

甲状腺乳頭がん及びその隣接正常組織を pAb anti-MUC21-CT で染色した結果では、正常組織では

pAb anti-MUC21-CT による結合は見られず、腫瘍組織では強い結合が見られた。また、mAb heM21A が腫瘍部位に強く結合した。これらの結果から、甲状腺正常組織では MUC21 は発現せず、乳頭がん組織では糖鎖が付加した MUC21 が発現していることが示された。

浸潤性乳管がん組織を用いた染色でも、腫瘍組織において、pAb anti-MUC21-CT 及び mAb heM21A による結合が確認されたが、mAb heM21D による結合は見られなかった。これらの結果から、浸潤性乳管がんには T-MUC21 またはシアリル T-MUC21 が発現し、糖鎖が付加していない MUC21 及び Tn-MUC21 は発現していないことが示された。

【考察と展望】

本研究において、私は MUC21 が Etoposide によって誘導されるアポトーシスを抑制することを示し、さらに、これが MUC21 の糖鎖構造に依存することを示した。また実際に腫瘍組織において、糖鎖が付加した状態で MUC21 が発現することを明らかにした。これまでも、MUC1 や MUC4 がアポトーシスを抑制するとの報告がなされてきたが、糖鎖構造がアポトーシス抑制にどのように影響するかはまだ明らかでなかった。よって、本研究はムチンによるアポトーシス抑制が糖鎖構造に依存することを示した初めての報告となる。MUC21 によるアポトーシス抑制のメカニズムはまだ不明であるが、タンデムリピートに付加する T 抗原やシアリル T 抗原及び細胞内ドメインが必須であることから、MUC21 のタンデムリピートが何らかのリガンドと糖鎖構造依存的に結合し、MUC21 細胞内ドメインからシグナルが伝達することが考えられ、これが Bcl-2、Bcl-xL 及び Bax を制御することでアポトーシスを抑制するという可能性が考えられる。

ムチンは生体内において多くの組織や臓器に発現するため、がん治療においてムチンタンパクそのものはがん治療のターゲットになりにくいと考えられる。今後は腫瘍組織における MUC21 糖鎖構造の役割も含め、MUC21 の糖鎖依存的なアポトーシス抑制機構を更に解明していくことで、糖鎖修飾の変化をがん化の結果生じた現象だけとして捉えるのではなく、がんの悪性化に寄与する因子として解明することができる。この研究を発展させることによって、MUC21 を組織診断マーカーとしてだけでなく、特定の糖鎖構造を持つ MUC21 をがん治療の新しいターゲットとして利用することも可能であり、がん治療に大きく貢献することができると期待される。

参考文献：

Tian Y, et al., Mucin 21 in esophageal squamous epithelia and carcinomas: analysis with glycoform-specific monoclonal antibodies. *Glycobiology*, 22: 1218-26, 2012