

## 審査の結果の要旨

氏名 田園

ムチンは上皮が産生する糖含量が高く、O-結合型糖鎖に富む糖蛋白質である。その分子機能は細胞や上皮組織の表面の保護であるとされるが、具体的な保護のメカニズムは不明であった。「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」と題する本論文では、以下に詳しく述べるように膜結合型ムチンの一つであるヒトムチン21 (MUC21) が発現することによって細胞がアポトーシスに耐性を獲得すること、この性質がヒトMUC21の糖鎖の構造に依存していることを明らかにした結果が述べられている。アポトーシス耐性の獲得については、別の膜貫通型ムチンであるヒトMUC1に関して知られていたが、MUC21に関しては初めての知見である。また、このようなムチンの分子機能がそのグリコフォームに依存することが示されたのは、あらゆるムチンを含めて初めてである。ヒトMUC21は、がん細胞にこれが発現すると悪性度が増強すると推測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同定された膜貫通型ムチンである。また、ヒト甲状腺及び乳腺上皮においてヒトMUC21の発現ががん化した細胞に出現することが示されたことにより、がん細胞の悪性挙動と関係する可能性が強いことから、重要な発見と考えられる。

本論文の第一章は序論であり、がん細胞の悪性挙動に関わるムチンの研究の歴史を中心に本研究の背景が述べられている。またMUC21は乳がん細胞の造腫瘍性や転移性に関わる分子として、古くから知られていたが、コアポリペプチドに関しては最近初めて研究室においてマウス及びヒトの遺伝子が同定されたことが述べられている。

第二章では、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ことが抗がん剤であるEtoposideを用いることによって示されたことが述べられている。HEK293 (胎児由来腎臓細胞) MUC21強制発現細胞及びそのモック細胞の複数のクローンをEtoposide含有培地で培養し、フローサイトメリー解析によりPI陽性/annexin陽性細胞をアポトーシス細胞として評価した結果からMUC21強制発現細胞のアポトーシス耐性が観察された。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の発現上昇、アポトーシス促進分子であるBaxの転写抑制がそれぞれウェスタンブロット解析またはリアルタイムPCRにより観察され、MUC21強制発現細胞における細胞内のアポトーシス誘導シグナル経路が修飾を受けたことが確かめられた。

さらに本章では、MUC21のどの部位がアポトーシス抑制に関与するか検討した。タンデムリピートを欠損させたMUC21 ( $\Delta$ TR-MUC21)及び細胞内ドメインを欠損させたMUC21 (ACT-MUC21)をHEK293細胞に強制発現させ、これらのドメインの欠損がMUC21によるアポトーシス抑制にどのように影響するかを

検討した。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 $\Delta$ TR-MUC21及びACT-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、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、タンデムリピードドメイン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。

第三章では、学位申請者はMUC21が重量にして50%以上の糖を含むことが予想されることから、そ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ことを目指し、糖鎖生合成系路に変異を持つCHO細胞を用いた。即ち、CHO-K1細胞及びその糖鎖合成不全細胞株であるCHO-ldID細胞、CHO-Lec2細胞にMUC21を強制発現させ、クローンを得てEtoposideの影響を検討した。これらの細胞に発現するMUC21の糖鎖構造をレクチンプロット法により推定することにより、期待されている糖鎖を持つMUC21を発現する細胞が得られていることが確認された。CHO-K1-MUC21強制発現細胞及びそのモック細胞をEtoposideで処理した結果、MUC21発現細胞がモック細胞に比べて、Annexin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>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、また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。CHO-K1細胞とLec2細胞において、MUC21強制発現細胞がモック細胞と比べてアポトーシス抵抗性を持つことが示され、シアル酸が付加したThomsen-Friedenreich (T) 抗原または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、O結合型糖鎖を合成できないldID細胞とこの細胞の培地にN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を添加して培養した細胞上のムチンにGalNAcのみ(Tn抗原)を付加出来る細胞ではMUC21強制発現細胞とモック細胞との間にアポトーシスに差は見られなかった。ガラクトース(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には、MUC21強制発現細胞がモック細胞に比べてアポトーシスに抵抗性を持つようになり、T抗原及びシアル 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。

第四章では、学位申請者が開発したモノクローナル抗体を用いて、甲状腺がん及び乳がん組織におけるMUC21の発現及びそのグリコフォームについて検討した結果が述べられている。甲状腺乳頭がん及びその隣接正常甲状腺上皮組織を比較した結果、甲状腺上皮にはグリコフォームにかかわらずMUC21の発現は見られないが、腫瘍組織では強い結合が見られた。また、モノクローナル抗体heM21Aが腫瘍部位に強く結合した。これらの結果から、甲状腺正常上皮細胞にはMUC21は発現せず、甲状腺乳頭がん細胞には糖鎖が付加し、伸長したMUC21が発現していることが示された。乳管上皮及び乳がん細胞を比較した結果からも、正常上皮細胞にはMUC21は発現せず、浸潤性乳管がん細胞には糖鎖が付加し、伸長したMUC21が発現していることが示された。すなわち、甲状腺乳頭がん細胞と浸潤性乳管がん細胞にはT-MUC21またはシアル 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。糖鎖が付加し、伸長したMUC21

の発現レベルと、アポトーシスを誘導する抗がん物質に対する抵抗性に相関があるかどうかを今後解明する必要があることが指摘された。

本研究において学位申請者は、MUC21 を発現する細胞が Etoposide によって誘導されるアポトーシスに抵抗性を持つこと、さらに、これが MUC21 の糖鎖構造に依存することを示した。また甲状腺がん組織、乳がん組織において、糖鎖が付加、伸長した MUC21 が発現することを明らかにした。本研究はムチンによるアポトーシス抵抗性獲得が糖鎖構造に依存することを示した初めての報告である。ムチンは従来がんの診断マーカーとしての重要性から臨床の現場で使用され、研究が発展して来た。その糖鎖に関しても、構造解析や生合成の制御に関する研究の発展と裏腹に、がん細胞の悪性挙動との関連を生物学的に証明した研究は少なかった。従って、本論文に記載された研究は、糖鎖生物学及び腫瘍生物学に資するところが大きい。よって、本研究を行った田園は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。