

# 多段階脳腫瘍モデルの包括的糖鎖解析



北大先端生命科学研究院

## 篠原康郎特任教授



北大腫瘍病理学分野

## 田中伸哉教授

### ●背景

悪性腫瘍の克服は現在、医療において最も重要な課題の1つである。特に脳腫瘍の一種である悪性グリオーマは平均生存期間が約1年と最も予後の悪い腫瘍であり、早期診断に有効なバイオマーカーは今のところないことから、バイオマーカーの同定と有効な治療法の確立が急がれている。グリオーマにおける糖鎖の発現変動はいくつか報告されているものの、これらの糖鎖の発現変動がどの段階で起こるのかは不明であり、その因果関係についてもほとんど分かっていなかった。がんマーカーの探索は患者由来の臨床検体を用いる方法が一般的だが、個体差や発生機序の多様性から再現性に問題を抱えることが多い。

### ●研究手法

がん化に関与する主要な遺伝子の変異と糖鎖の発現変動を系統的に解明すれば、がん化に伴う多様な糖鎖変動を原因となる遺伝子の変異に因数分解できると考えられる。本研究では、細胞がさまざまながん抑制遺伝子やがん原遺伝子の変異を経て、段階的に不死化、足場非依存性増殖能、造腫瘍能やアポトーシス抵抗性などのがん形質を獲得するとするがん多段階発生説に基づき、腫瘍病理学分野の田中伸哉教授らが樹立した正常ヒトアストロサイト(NHA)に、hTERT(T)、SV40ER(S)、H-RasV12(R)、及びmylAKT(A)遺伝子をそれぞれ段階的に導入したグリオーマモデル細胞(NHA/T、TS、

TSR、TSRA)を用いて、細胞表面の抗原として最も重要な3種類の複合糖質糖鎖(N-及びO-結合型糖鎖、スフィンゴ脂質糖鎖)について、先端生命科学研究院の篠原康郎特任教授らが確立した独自の、網羅的な糖鎖発現解析法により詳細に解析した。

NHA/TS細胞はWHO grade IIIに相当する良性グリオーマを模倣しており、NHA/TSRはgrade III相当の悪性グリオーマを、NHA/TSRAはgrade IV相当のグリオブラストーマ(膠芽腫)を模倣することが明らかにされている。このため、個々のモデル細胞に特徴的な糖鎖発現を見出すことができれば、悪性度を反映する糖鎖関連バイオマーカー候補を網羅的に取得できることが期待される。

### ●研究成果

5種類のモデル細胞のN-及びO-結合型糖鎖、スフィンゴ脂質糖鎖の発現プロファイルを図に示すプロトコルにより解析した。すなわち、培養細胞からタンパク質画分、脂質画分を調製し、N-結合型糖鎖とスフィンゴ脂質糖鎖をそれぞれPNGase FおよびEGCaseによりタンパク質あるいは脂質より切断し、グライコブロットング法により糖鎖を特異的に精製するとともに高感度試薬(aoWR)によって標識した。O-結合型糖鎖に関しては最近古川潤一特任助教(篠原研究室)が確立したマイクロ波支援ピラゾロン共存下のβ-脱離反応(Analytical Chemistry(米国化学会)に7月1日付で公表)によって定量的にタンパク質からO-結合型糖鎖を遊離するとともにピラゾロン誘導体で標識した。MALDI-TOF質量分析法により総計160種類を超える糖鎖の発現情報(絶対量)を取得した。得られた糖鎖発現プロファイルが多変量解析した結果、5種類の細胞は明確に区別されることが明らかになり、糖鎖の発現プロファイルによってモデル細胞の

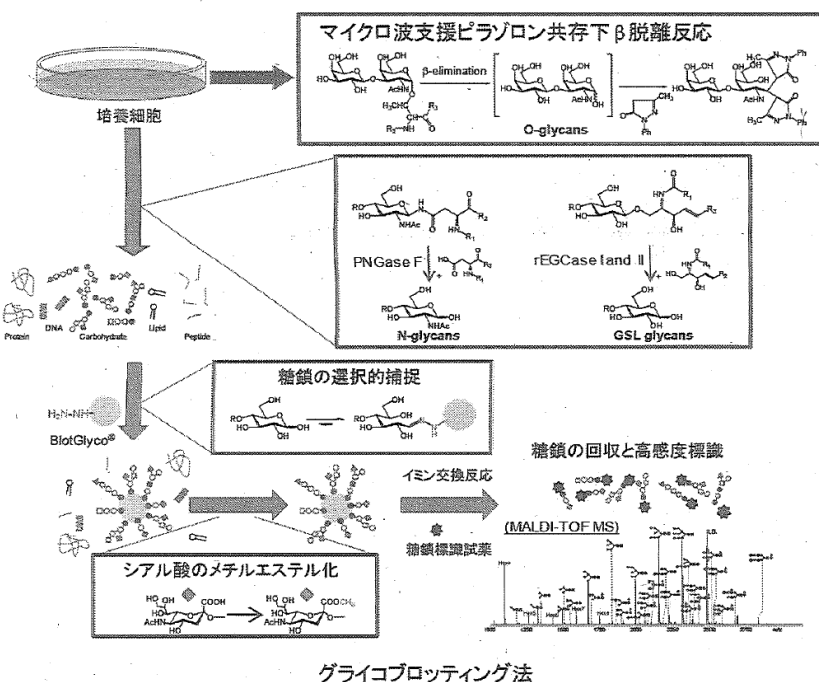
# がん化で細胞の「顔つき」変化 悪性度反映する特異的マーカーに有用

ん化の諸過程を追跡できることが分かった。代表的な糖鎖の発現変動として、grade Iでは、脊椎動物では生合成路が明らかにされていないパウチマンノース型のN-結合型糖鎖やスフィンゴ脂質の一種であるGD3などの一過性の発現増大、grade IIでは、スフィンゴ脂質の組成がガングリオ系列からグロボ系列へシフトするとともに、非ヒト型シアル酸であるN-グリコシルノイラミン酸(Neu5Gc)の取り込みが増大し、grade IIIでは、バイセクトGlcNAc型糖鎖、α2,3シアルル化、SSEA-4などが一過性に増大するとともにコア2型のO-結合型糖鎖の発現が低下、Grade IVでは、(ネオ)ラクト系列のスフィンゴ脂質の大幅な発現の増大やN-結合型糖鎖のフコース修飾の増大など表1に示す数多くの変動が認められた。

本研究は、多段階がん発生説に基づき作製された細胞を用いて、主要な複合糖質糖鎖の発現を包括的に解析した初めての例であり、糖鎖発現とがん関連遺伝子との因果関係、すなわちグリオーマの糖鎖関連バイオマーカー候補の大規模抽出に成功した。興味深いことに各遺伝子の導入に伴う糖鎖の発現変動は、悪性化に伴って徐々に顕在化するというよりも一過性で多様な変動が多く、このことは、悪性グリオーマの早期診断、グレードや予後の判定、治療効果の判定が特定の糖鎖のモニタリングによってできる可能性を示唆している。

### ●今後への期待

本研究で変異を加えた遺伝子はいずれも悪性グリオーマの形成で重要な役割を担うことが明らかにされていることに加え、今回認められた糖鎖の発現変動には実際に悪性グリオーマで発現が増大することが報告されているものも多数含まれるため、本モデルから得られた知見の有用性は高いと考えられる。これらの知見を踏まえ、今後、臨床検体を用いて悪性グリオーマのバイオマーカーの検証と探索を進めていく予定だ。(文部科学省・先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム補助金により実施。米国オープンアクセスジャーナル「PLOS ONE」に2日付で公表)



グライコブロットング法

がんの発生・進行に関しては、さまざまながん抑制遺伝子やがん原遺伝子の段階的な変異による不死化、無限増殖能、造腫瘍能、アポトーシス抵抗性などの形質を獲得するとする多段階発生説が広く受け入れられている。本研究では、がん化に関与する主要な遺伝子の変異が糖鎖の発現変動に与える因果関係を包括的に解明し、悪性度を反映するマーカー候補の網羅的な同定に成功した

研究