



がん化に伴って細胞の顔つきが変わる様子を モデル細胞の包括的な糖鎖解析によって解明

研究成果のポイント

- ・脳腫瘍の一種である悪性グリオーマの WHO grade I-IV^{注1} を模倣するモデル細胞で包括的な糖鎖^{注2} の発現解析を行った。
- ・がん原遺伝子やがん抑制遺伝子の異常と糖鎖発現の因果関係の網羅的な抽出に成功した。
- ・グリオーマの進展に伴う段階的な糖鎖の発現変動は、悪性度を反映する特異的な糖鎖関連バイオマーカー候補として期待できる。

研究成果の概要

本研究では、多段階がん発生説^{注3}に基づき作製した悪性グリオーマの WHO grade I-IV を模倣する独自のモデル細胞で、糖タンパク質やスフィンゴ糖脂質の包括的な発現解析を行い、グリオーマの進展に伴う糖鎖の発現変動の網羅的な解明を試みました。このアプローチによって、がん原遺伝子やがん抑制遺伝子の段階的な変異に伴うがんの進展の過程で、多数のダイナミックな糖鎖の発現変動を検出しました。興味深いことに多くの変動は一過性であり、悪性化に伴う段階的な糖鎖の発現変動が早期診断や予後、治療効果の判定に有用である可能性が示唆されました。

なお、本研究は文部科学省 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されました。

論文発表の概要

研究論文名: Comprehensive glycomics of a multistep human brain tumor model reveals specific glycosylation patterns related to malignancy (多段階脳腫瘍モデルの包括的な糖鎖解析によって悪性度に関連する特異的な糖鎖付加パターンが明らかとなった)

著者: 篠原康郎, 古川潤一, 岡田和恵, 朴 錦花 (北海道大学大学院先端生命科学研究院),

田中伸哉, 津田真寿美, 木村太一 (北海道大学大学院医学研究科)

公表雑誌: PLOS ONE (Public Library of Science によるオープンアクセスジャーナル)

公表日：日本時間（現地時間）2015年7月2日（木）午前3時（米国東部時間 2015年7月1日（水）午後2時）

研究成果の概要

（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一つです。特に脳腫瘍の中の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ます。グリオーマにおける糖鎖の発現変動は幾つか報告されているものの、グリオーマにおいて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、これらの糖鎖発現変動の因果関係についてもほとんどわかっていませんでした。

（研究手法）

本研究では、細胞が様々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^{注4}、造腫瘍能^{注5}やアポトーシス抵抗性^{注6}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、医学研究科の田中伸哉教授らが樹立した正常ヒトアストロサイト^{注7}（NHA）にhTERT（T）^{注8}、SV40ER（S）^{注9}、H-RasV12（R）^{注10}、及びmyI AKT（A）^{注11}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^{注12}、スフィンゴ糖脂質^{注13}糖鎖）について、先端生命科学研究科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ました。NHA/TS細胞はWHO grade II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^{注14}を模倣することが明らかにされているため、個々のモデル細胞に特徴的な糖鎖発現を見いだすことができれば、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ます。

（研究成果）

5種類のモデル細胞のN-及びO-結合型糖鎖、スフィンゴ糖脂質糖鎖の発現プロファイルを解析し、総計160種類を超える糖鎖の発現情報（絶対量）を取得しました。得られた糖鎖発現プロファイルを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の諸過程を追跡できることがわかりました。代表的な糖鎖の発現変動として、grade Iでは、パウチマンノース型^{注15}やスフィンゴ糖脂質の1種であるGD3などの一過性の発現増大、grade IIでは、スフィンゴ糖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-グリコリルノイラミン酸（Neu5Gc）の取り込みが増大し、grade IIIでは、バイセクトGlcNAc型糖鎖^{注16}、 α 2,3シアリル化^{注17}、SSEA-4^{注18}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し、Grade IVでは、（ネオ）ラクト系列のスフィンゴ糖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が認められました。

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ました。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ます。

(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から、本モデルから得られた知見の有用性は高いと考えられます。これらの知見を踏まえて、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です。

お問い合わせ先

北海道大学 未来創薬・医療イノベーション推進室 [広報担当：和田]

TEL：011-706-7798 FAX：011-706-7799 E-mail：innovation@cris.hokudai.ac.jp

ホームページ：<http://www.cris.hokudai.ac.jp/cris/innovahome/index.html>

【用語解説】

注1) 悪性グリオーマの WHO grade I-IV：脳内にある神経膠細胞から発生する腫瘍のこと。脳腫瘍は、他の臓器のがんのように進行度を表すステージではなく、悪性度をみるグレードで表記する。WHO（世界保健機構）が脳腫瘍の悪性度を、悪性度が低い Grade I から、最も高い Grade IV までに分類している。

注2) 糖鎖：いろいろな糖が鎖のようにつながりあっている物質で、タンパク質や脂質に結合し、細胞表面に発現しているものも多い。

注3) 多段階がん発生説：遺伝子の変異を含めて複数の段階を経てがんが発生する、という考え方。

注4) 足場非依存性増殖能：細胞が足場（細胞と細胞の間を埋めるもの）から離れていても自ら生存・増殖できるようになることで、細胞ががん化するマーカーの一つ。

注5) 造腫瘍能：がん細胞のうち幹細胞の性質をもった細胞であるがん幹細胞がもっているヒトや動物にがんを生じさせたり、進行させる能力。

注6) アポトーシス抵抗性：アポトーシスとは細胞の死に方の一種で、個体を良好な状態に保つために積極的に引き起こされるプログラムされた細胞死のこと。発生や再生過程において不要な細胞を排除したり、癌細胞やウイルス感染細胞を排除する際にも重要な役割を果たす。細胞の癌化の過程で様々な癌遺伝子や癌抑制遺伝子に変異が入ることで、アポトーシスが抑制されることをアポトーシス抵抗性という。

注7) アストロサイト：中枢神経系に存在するグリア細胞の一つ。星状膠細胞ともいう。

注8) TERT：テロメラーゼ逆転写酵素。染色体の両端にあるテロメア DNA (GGTTAG) の反復配列と相補的に結合し、逆転写によりテロメア DNA を伸長する結果、細胞は死なずに分裂を繰り返して不死化する。

注9) SV40ER：DNA 型腫瘍ウイルスであるシミアンウイルス 40 において、ウイルス感染初期に発現する Large T や Small T 抗原をコードする領域。Large T 抗原は細胞を不死化する能力を持つ。

注10) H-RasV12：活性化型 H-Ras。

注11) myI AKT：ミリストイル化 Akt。ミリストイル化によりタンパク質の疎水性が上昇し、細胞膜への親和性が向上する。細胞内情報伝達経路の活性化に重要な役割を果たす。

注12) N- 及び O-結合型糖鎖：アスパラギンに結合する N-結合型糖鎖とセリンまたはスレオニンに結合する O-結合型糖鎖の2種類が代表的な糖鎖によるタンパク質の修飾である。

注 13) スフィンゴ糖脂質：セラミドの頭部に糖鎖修飾を受けた糖脂質であり，糖鎖構造により，ガングリオ系列，グロボ系列，（ネオ）ラクト系列に分類される。

注 14) グリオブラストーマ：日本語では膠芽腫こうがしゅといい，悪性度の高い脳腫瘍。脳の神経細胞を支える神経膠細胞が腫瘍化したもの。

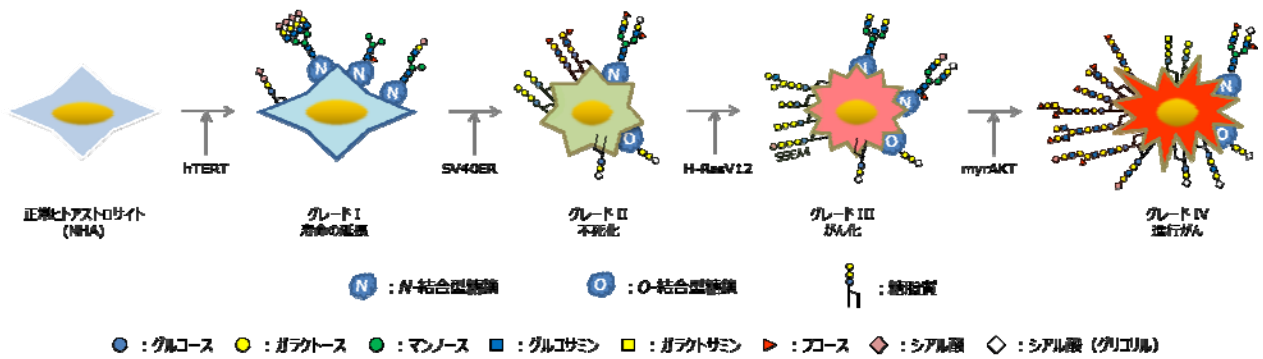
注 15) パウチマンノース型：N-結合型糖鎖の一種で，2 個の N-アセチルグルコサミンと 2~4 個のマンノースによって構成される。

注 16) バイセクト GlcNAc 型：N-結合型糖鎖の一種。分岐の間に 1 つの N-アセチルグルコサミンが結合する糖鎖の総称。

注 17) $\alpha 2,3$ シアリル化：シアル酸の代表的な結合様式は $\alpha 2-3$ 結合と $\alpha 2-6$ 結合の 2 種類あり， $\alpha 2-3$ 結合した糖鎖のこと。

注 18) SSEA-4: スフィンゴ糖脂質のグロボ系列に属する糖鎖。SSEA は時期特異的胎児性抗原の意で，SSEA-4 はヒト胚性幹細胞（ES 細胞）や iPS 細胞のマーカーとしても注目されている。

【概念図】



がんの発生・進行に関しては，様々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。