慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	子宮体癌の糖鎖発現異常におけるフコース転移酵素の関与とその転移能への影響
Sub Title	
Author	佐久間, 雄一(Sakuma, Yuichi) 野澤, 志朗
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.3 (2005. 9) ,p.T285- T295
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050901-0285

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・82(3)：T285～T295，2005

学位論文

子宮体癌の糖鎖発現異常における フコース転移酵素の関与とその転移能への影響

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室
（指導：野澤志朗教授）
佐久間 雄一

（平成17年2月21日受付）

Key Word： fucosyltransferase, uterine endometrial cancer, adhesion, H type 1 carbohydrate antigen, Lewis^b carbohydrate antigen

近年，婦人科悪性腫瘍のなかでも子宮体癌（以下体癌と略す）は増加傾向にあるが，その細胞生物学的特性については未だ不明な点が多く解明が急がれている．

一方，細胞膜上に存在する複合糖質（糖蛋白と糖脂質の総称）が，細胞の癌化にともない発現異常をきたし有用な腫瘍マーカーとなり得る事，又その発現が患者の予後，さらに癌細胞の浸潤，転移能に関与する事などが報告されている[1-15]．

複合糖質の中でも，血液型関連糖鎖はその構造や合成経路が詳細に判明しており，非還元末端ガラクトースとN-アセチルグルコサミンがβ1-3で結合するI型糖鎖とβ1-4で結合するII型糖鎖に分類される．それらの中には，末端に一つまたは二つのフコースがα1-2，α1-3，α1-4で結合したフコシル化糖鎖が存在し，I型フコシル化糖鎖にはLewis^{a}型，Lewis^{b}型，H1型糖鎖等が属し，II型フコシル化糖鎖にはLewis^{x}型，Lewis^{y}型，H2型糖鎖等が属する．そしてその合成にはα1-2，α1-3，α1-4Fucosyltransferase（以下FTと略す）が関与している．

これら血液型関連フコシル化糖鎖については，特にシアル酸を有する糖鎖を中心に，従来より基礎的ならびに臨床的研究が種々の臓器の癌について進められ，いくつかの知見が得られている．すでに，癌化にともなう血液型関連糖鎖の発現異常には臓器特異性がある事が知られており[11-15]，また患者の予後との関連については，大腸癌や乳癌において腫瘍マーカーであるCA19-9（糖鎖構造はシアリルLewis^a）[1]，SLX（シアリルLewis^x）[6]を強く発現する患者の予後が不良であるという臨床的成績が報告されている．また，これら癌細胞に発現されるシアリルLewis^{a}やシアリルLewis^{x}等の糖鎖が血管内皮に発現する接着分子であるE-セレクチンのリガンド糖鎖となり，癌の転移過程で重要な役割を担っている事が明らかとなっている[16]．

当研究室ではすでに，体癌において，I型糖鎖の異常な発現が見られる事，なかでもLewis^{b}型糖鎖は体癌で特異的に高率に発現する事を明らかにしている[17]．又，高分化型体癌由来培養細胞株SNG-II[18]を免疫原として，体癌と特異的に反応するマウス型モノクローナル抗体

本論文は，Sakuma Y, Kubushiro K, Tsukazaki K, Nozawa S.：Involvement of H Type 1 Carbohydrate Antigen in Cell Adhesion to Vascular Endothelial Cells of Human Endometrial Cancer. Anticancer Res 23(2B)：1277-1282,2003の1部，Kubushiro K, Tsukazaki K, Sakuma Y, Akiba Y, Sakayori M, Aoki R, Yazawa S, Nozawa S：Expression mechanism of human uterine endometrial cancer-specific fucosylated carbohydrate chains：Aberrant α1-4 fucosyltransferases in uterine endometrial cancer-derived cell lines with type 1 carbohydrate chain. Int J Oncol 6：93-97,1995の1部，Kubushiro K, Tsukazaki K, Sakuma Y, Sakayori M, Yazawa S, Nozawa S：Enzymatic basis for the accumulation of Lewis^b antigen in uterine endometrial cancer. Jpn J Cancer Res 86：361-367, 1995の1部，及びKubushiro K, Sakuma Y, Yamashita H, Fukuchi T, Banno K, Tsukazaki K, Nozawa S：Biological Characteristics of Human Uterine Endometrial Cancer Variant Cells Selected for Blood Group H Type 1 Antigen：Adhesion to Vascular Endothelial Cells. Acta Histochem.Cytochem 33(3)：209-213, 2000の1部を含む．

MSN-I[18]を作製し，その認識抗原が主として Lewis^b 型糖鎖である事を確認している[19]．さらに，患者体癌組織中に，MSN-I 認識抗原を発現していない症例の5年生存率が，発現している症例に比べ有意に低いという臨床統計上の成績を得ており[20]，体癌におけるフコシル化糖鎖の発現異常が，癌の細胞生物学的特性に強く関与する事が推定されている．

そこで，本研究ではまず体癌におけるフコシル化糖鎖の発現異常の機序を明らかにする目的で，その合成に関与すると考えられる FT の活性を測定するとともに，SNG-II を MSN-I 認識抗原強発現株（SNG-S）と弱発現株（SNG-W）とに分別し，各々におけるフコシル化糖鎖の発現とその細胞生物学的特性への関与を特に血行性転移能を中心に検討した．

材料と方法

1．α-FT 活性の測定

子宮内膜組織及び培養細胞のα-FT 活性の測定は，矢澤らの方法[21-23]によった．すなわち，1 g の細胞又は組織に 2%Triton X-100（Sigma, St. Louis, MO）を含む PBS を加え，4℃でソニケート後，10,000 rpm で 30 分遠心し酵素液とした．α1-2，α1-3，α1-4 FT の基質にはそれぞれ phenyl β-galactoside（Sigma, St. Louis, MO），2'OMeGalβ1-4GlcNAcβBn，2'OMeGalβ1-3GlcNAcβBn（Edmonton, Canada）を使用した．糖供与体としてはトリチウムでラベルした GDP-fucose（Sigma, St. Louis, MO）70 pmol を用い，酵素液 10 μl とともに基質 10 nmol と 37℃で 4 時間インキュベートし，エタノールで反応停止後，Sep-Pak plus C_{18} 逆相カラム（Waters, Milford, CT）を用いて基質に取り込まれた放射活性を測定することにより，α1-2，α1-3，α1-4 FT 活性を測定した．なお，正常子宮内膜及び体癌組織は慶応義塾大学病院にて手術を受けた患者の同意を得た上で，その摘出標本より採取した．

2．MSN-1 認識抗原発現量の差による SNG-II 細胞の分別

高分化型体癌由来培養細胞株 SNG-II[18]をトリプシン-ethylene diamine tetraacetate（EDTA）にて剥離し，FCS 添加 phosphate-buffered saline（PBS）に懸濁，これに MSN-1[18] 20 μg/ml を添加し室温で 30 分反応させた．PBS で洗浄後，この細胞懸濁液をヤギ抗マウス抗体付着マイクロセレクター（AIS, CA）[24]に添加し，室温で 1 時間静置した．これによりマウス型モノクローナル抗体である MSN-I と反応した SNG-II 細胞のみがマイクロセレクター容器に付着する．その結果得られた上清を非付着細胞の懸濁液として回収した．又，マイクロセクターを PBS で数回洗浄後，トリプシン－EDTA にて付着細胞を剥離，回収した．この選別を付着細胞，非付着細胞それぞれについて 3 回ずつ繰り返した．これらの処理で得られた付着細胞すなわち MSN-I 認識抗原強発現細胞を SNG-S，非付着細胞すなわち MSN-I 認識抗原弱発現細胞を SNG-W と名付けた．両者の分別状態はフローサイトメトリー及び免疫細胞化学染色で確認した．フローサイトメトリーは Epics profile flowcytometer（Counter Corporation, FL）を使用した．

3．モノクローナル抗体

MSN-1[18]は当研究室にて作成したマウス型モノクローナル抗体で，イムノグロブリンクラスは IgM，認識抗原は主として末端に 2 個のフコースを有する Lewis^b 型糖鎖であることを確認している[19]．抗 H1 型モノクローナル抗体は Signet Laboratories, InC（Massachusetts, U.S.A）より，抗 H2 型モノクローナル抗体は DAKO Corporation（Glostrup, Denmark），抗 Lewis^a 型，抗 Lewis^b 型モノクローナル抗体はミドリ十字株式会社（大阪）より購入した．抗 Lewis^x 型および抗 Lewis^y 型モノクローナル抗体[25]は，国立がんセンター研究所広橋説雄所長より供与を受けた．抗 Lactotetraosyl ceramide（Lc4）型モノクローナル抗体 HMST-I[26]は当研究室で作成したもので，Lc4 と特異的に反応する事を確認している．抗 neolactotetraosyl ceramide（nLc4）型モノクローナル抗体[27]は国立成育医療センター研究所秦順一研究所長より供与を受けた．

4．免疫組織（細胞）化学染色

免疫組織（細胞）化学染色は avidine-biotin complex 法により行った[17]．各種モノクローナル抗体との反応は室温で 1 時間とした．また，染色性の判定基準は，すでに塚崎らにより報告されている方法によった[17]．すなわち，全細胞の中で陽性細胞の占める染色頻度を 10%未満，10-50%，51%以上の 3 段階に，又染色強度を主観的に弱，中，強の 3 段階に分類し，両者の組み合わせで染色反応性を（-），（+），（++），（+++）の 4 段階で判定した．

5．Cell Analysis System（CAS）による DNA ploidy 及び細胞増殖能の検討

SNG-S と SNG-W の DNA ploidy を，CAS200

Image Cytometer（Cell Analysis System, Inc., IL）で分析した．DNA は Foylugen 反応を用いて染色した．細胞増殖能は，Ki67 との免疫細胞化学的反応性により検討した．

6．ヌードマウス肺転移モデルの作製

ヌードマウス（BALB/C, nu/nu, 6weeks old, female）を用い，SNG-S，SNG-W の尾静注及び子宮正所性移植による肺転移モデルを作製した．腫瘍細胞を 1.0×10^6個/0.1 ml PBS とし，尾静注又は開腹下に子宮へ局注した．注入 8 週間後にヌードマウスを解剖し，肺転移の有無を顕微鏡下に検討した．

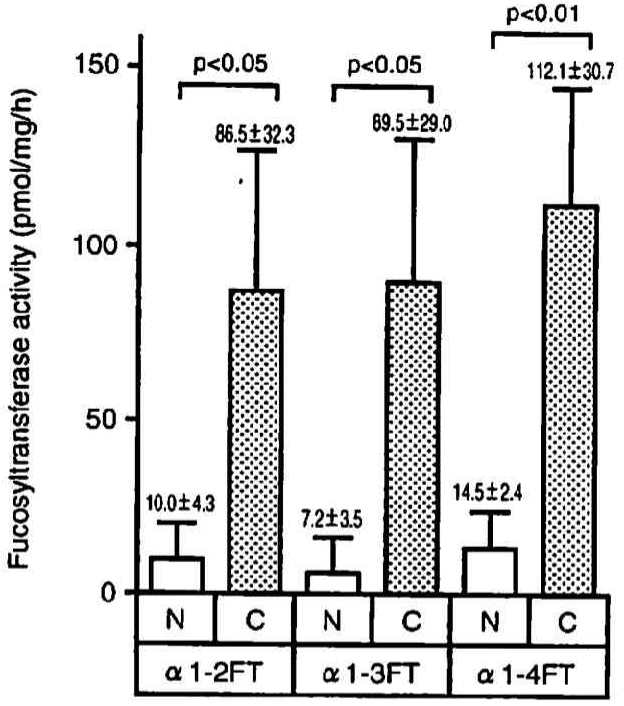
7．SNG-S と SNG-W の血管内皮細胞に対する接着試験

血管内皮細胞はヒト臍帯静脈よりコラゲナーゼ処理で得たものを，96-well multiwell plate で semi-confluent となるまで静置培養して使用した．サイトカイン処理は human Interleukin-1β（rIL-1β）2.5 U/ml で 4 時間行った．SNG-S，SNG-W 細胞は 0.02%EDTA と 0.05%トリプシンで剥離後，10%FCS＋Ham'S F12 培地で洗浄し，さらに PBS で洗浄し，1×10^5個/1 ml PBS の細胞懸濁液とし，血管内皮細胞上に 50 μl/well ずつマウントした．37℃で 30 分培養後，接着していない細胞を 150 g 5 分間の遠心にて除去し，位相差顕微鏡下に 200 倍 1 視野あたりの血管内皮細胞への接着細胞数をカウントした．

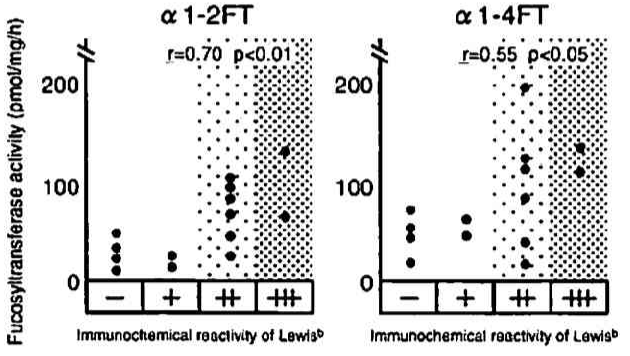
SNG-W の血管内皮細胞への接着阻害試験は各種血液型関連糖鎖に対するモノクローナル抗体を用いて行なった．SNG-W の PBS 懸濁液に 100 μl/ml のモノクローナル抗体を添加し，室温で 30 分間反応後，PBS で洗浄して使用した．なお，コントロール抗体として，マウス IgG 1 Kappa（Sigma, St. Louis, MO）を用いた．

8．フローサイトメトリーによる，単一糖鎖付着蛍光ビーズと血管内皮細胞との接着性の検討

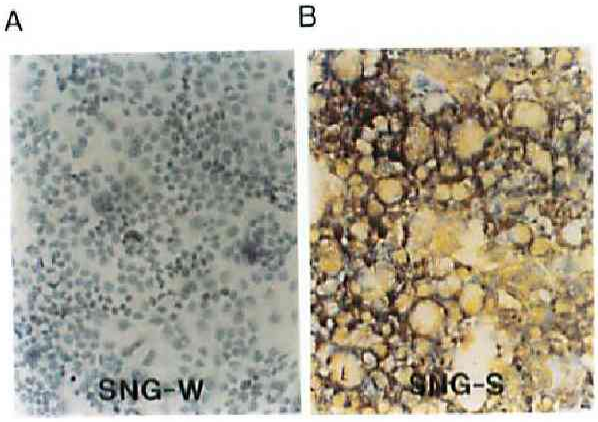
蛍光ラテックスビーズ（Becton Dickinson Immunocytometry Systems, California, U.S.A.）に phosphatidyl ethanol amine を介して Lewis^a 型，Lewis^b 型，H1 型，H2 型糖鎖を結合させた単一糖鎖付着蛍光ビーズは，日本抗体研究所 矢澤伸副所長より供与されたものを使用した[21-23]．サイトカイン処理した血管内皮細胞 10^5個/1 ml PBS に単一糖鎖付着蛍光ビーズ 10^7 個を添加し，37℃30 分間反応後，150 g で 2 分間遠沈し，非付着ビーズを含む上清を除去，さらに PBS



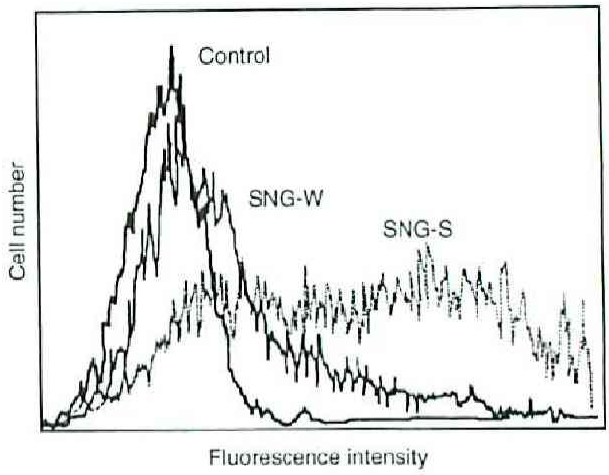
第 1 図　正常子宮内膜及び体癌組織における α1-2，α1-3，α1-4 Fucosyltransferase 活性．本文中に記載された方法で，正常子宮内膜組織（N）8 例，体癌組織（C）14 例における Fucosyltransferase（FT）活性を測定した．平均値±標準偏差を示す．
（Kubushiro K,Sakuma Y et al ：Jpn J Cancer Res 86 ：361-367, 1995 の第 1 図を，許可を得て転載）



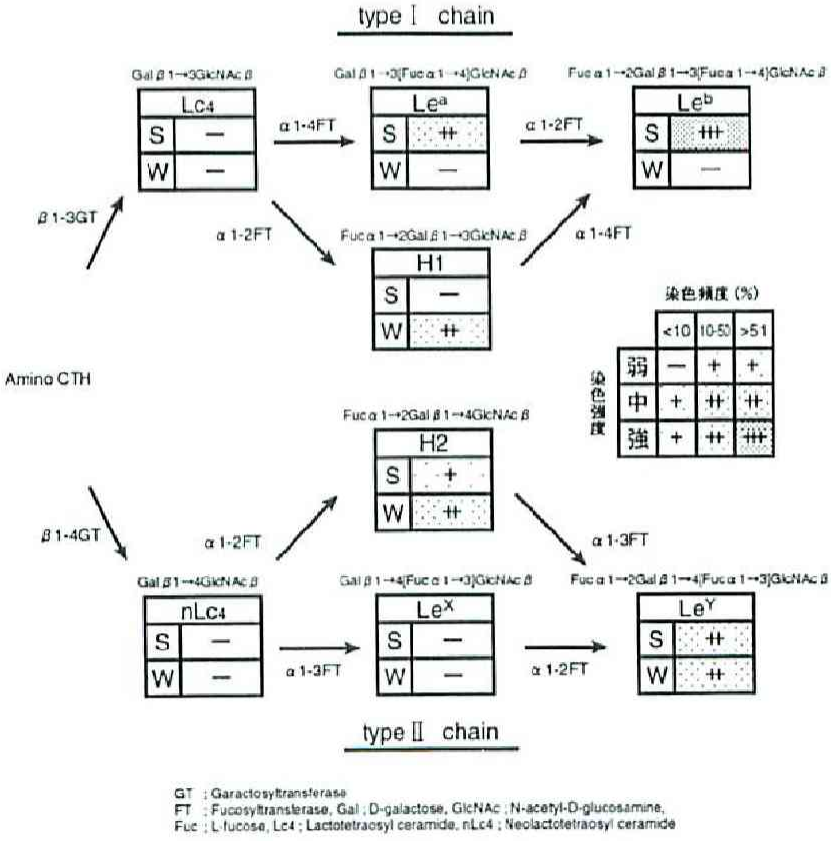
第 2 図　体癌組織における Lewis^b 型糖鎖の免疫組織化学的反応性と α1-2，α1-4 Fucosyltransferase 活性との関連．両者の間に正の相関関係を認める．r ：Spearman の順位相関係数．
（Kubushiro K, Sakuma Y et al ：Jpn J Cancer Res 86 ：361-367, 1995 の第 2 図を，許可を得て転載）



第3図　SNG-W と SNG-S の MSN-1 免疫細胞化学染色．SNG-W（A）は MSN-1 でほとんど染色されないのに対し，SNG-S（B）では強い染色性を認める．×100．
（Kubushiro K, Sakuma Y et al ：Int J Oncol 6 ：93-97, 1995 の第1図を，許可を得て転載）



第4図　SNG-W と SNG-S の MSN-1 に対する反応性のフローサイトメトリーによるヒストグラム．SNG-W に比べ SNG-S で高い蛍光強度を示す．
（Kubushiro K,Sakuma Y et al ：Int J Oncol 6 ：93-97, 1995 の第2図を許可を得て転載）



第5図　SNG-S と SNG-W における各種血液型関連糖鎖の発現と合成経路．免疫細胞化学染色の反応性は，本文中に記載した判定基準により，(-)，(+)，(++)，(+++) の4段階で示した．S，SNG-S，MSN-1 認識抗原強発現株；W，SNG-W，MSN-1 認識抗原弱発現株．
（Kubushiro K,Sakuma Y et al ：Int J Oncol 6 ：93-97, 1995 の第5図を許可を得て改変，転載）

で洗浄後 50 μm ナイロンメッシュでろ過し，フローサイトメトリーで解析した．コントロールには糖鎖非付着蛍光ビーズを使用した．

結　果

1．正常子宮内膜及び体癌組織における α-FT 活性

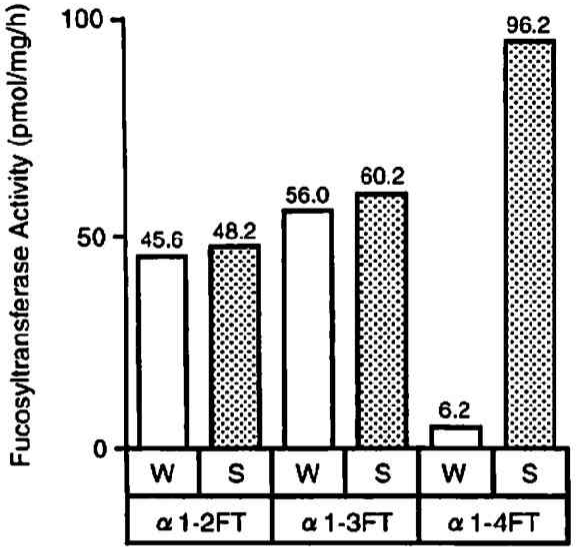
正常子宮内膜 8 例におけるα1-2FT，α1-3FT，α1-4 FT の酵素活性は，それぞれ 10.0±4.3，7.2±3.5，14.5 ±2.4 pmol/mg/hr であった．それに対し，体癌組織 14 例ではそれぞれ 86.5±32.3（$p<0.05$），89.5±29.0（$p<0.05$），112.1±30.7（$p<0.01$）pmol/mg/hr と，すべての α-FT 活性が有意に増加している事が判明した（第 1 図）．また，体癌において特異的に発現する Lewis^b 型糖鎖の免疫組織化学的反応性と，その合成に関与すると考えられるα1-2FT，α1-4FT 活性には，正の相関関係が存在する事が明らかとなった（第 2 図）．尚，α1-3FT については相関は認められなかった．

2．SNG-II 細胞の SNG-S と SNG-W 細胞への分別

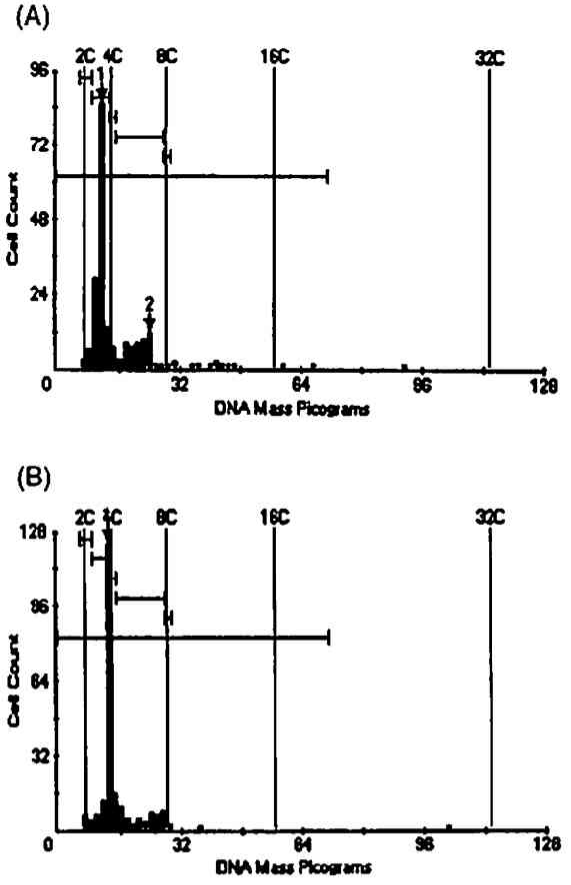
SNG-S と SNG-W の分別状態は，MSN-1 認識抗原発現量の差を免疫細胞化学染色及びフローサイトメトリーで比較する事により確認した．その結果，免疫細胞化学染色で SNG-S が MSN-1 染色で強陽性を示したのに対し，SNG-W ではほとんど染色されなかった（第 3 図）．また，フローサイトメトリーによるヒストグラムの解析でも，SNG-S では SNG-W に比べ強い蛍光強度を示す細胞が多数認められた（第 4 図）．これらにより，SNG-S と SNG-W の間には MSN-1 認識抗原発現量に大きな差のある事が明らかになった．

3．SNG-S と SNG-W における血液型関連糖鎖の発現

SNG-S と SNG-W の血液型関連糖鎖の発現を免疫細胞化学染色ににより検討した．その結果，SNG-S では SNG-W に比べ Lewis^a 型，Lewis^b 型糖鎖の強い発現が見られたのに対し，SNG-W では H 型糖鎖，中でも Lewis^b 型糖鎖の前駆糖鎖である H1 型糖鎖が強く発現している事が判明した．一方，Lc4，nLc4，Lewis^x 型，Lewis^y 型糖鎖の発現には差のない事が明らかとなった（第 5 図）．



第 6 図　SNG-W と SNG-S における α1-2，α1-3，α1-4 Fucosyl-transferase 活性．W，SNG-W ；S，SNG-S．1 g の細胞あたりの活性を測定した．
(Kubushiro K,Sakuma Y et al ：Int J Oncol 6 ：93-97, 1995 の第 4 図を許可を得て転載)



第 7 図　SNG-S と SNG-W における DNA ploidy の CAS による分析．(A), SNG-S, DNA index 1.66 ；(B), SNG-W, DNA indexl. 89．両者に明らかな差を認めない．
(Kubushiro K,Sakuma Y et al ：Int J Oncol 6 ：93-97, 1995 の第 3 図を許可を得て転載)

4．SNG-S と SNG-W のα-FT 活性

SNG-S と SNG-W の α1-2FT 活性ならびに α1-3FT 活性にはほとんど差が認められないのに対し，α1-4FT 活性はそれぞれ 96.2 pmol/mg/hr, 6.2 pmol/mg/hr であり，SNG-S におけるα1-4FT 活性は SNG-W に比べ著明に高い事が判明した（第6図）.

第1　SNG-W と SNG-S のヌードマウス尾静注，子宮正所性移植モデルを用いた肺転移能の比較

Cells	Incidence (number of mice)	
	Injection into tail vein	Intrauterine transplantation
SNG-W	26.7% (8/30)	63.6% (14/22)
SNG-S	0.0% (0/27)	23.8% (5/21)

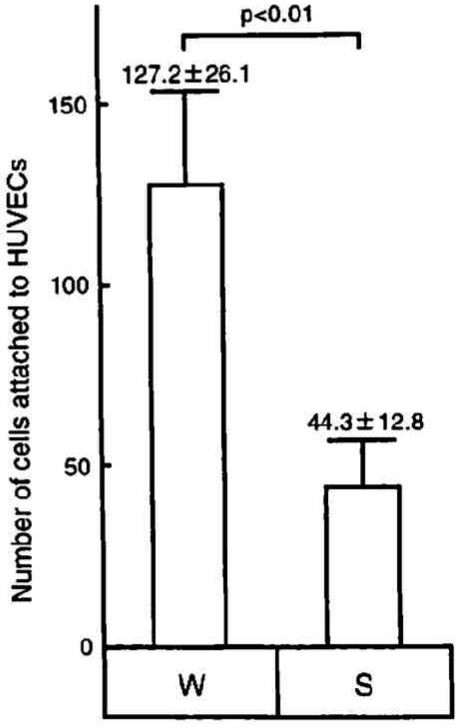
細胞を尾静注または開腹下に子宮へ局注し，8週間後の肺転移の有無を顕微鏡下に検討した．両モデルとも SNG-W では SNG-S 比べ有意に高い肺転移率を認めた．（*p<0.01，**p<0.01）（Sakuma Y et al：Anticancer Res 23(2B)：1277-1282, 2003 の第1表を許可を得て転載）

5．SNG-S と SNG-W の DNA ploidy および細胞増殖能

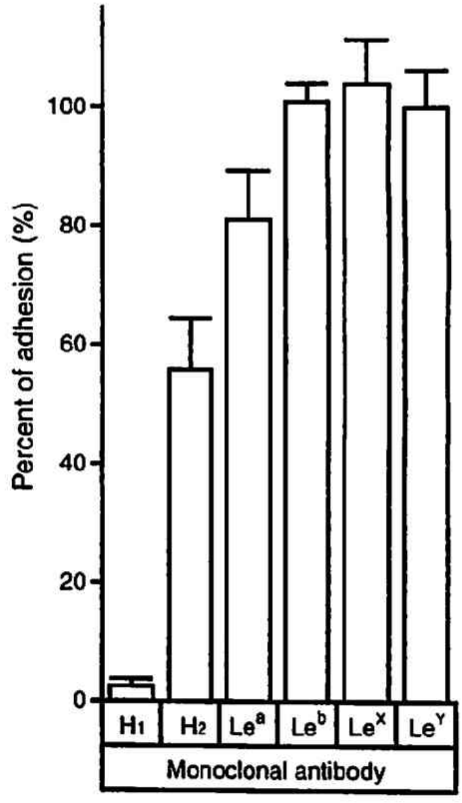
CAS による解析の結果，SNG-S と SNG-W の DNA index はそれぞれ 1.66，1.89 で，両者の DNA ploidy には差のないことが明らかとなった（第7図）．又，細胞増殖能を反映する Ki67 の免疫細胞化学的反応性は，SNG-S と SNG-W でそれぞれ 36.9%（93/252），30.2%（77/255）で，細胞増殖能にも有意な差のない事が判明した（P>0.1）.

6．SNG-S と SNG-W の *in vivo* における遠隔転移能

ヌードマウスへの SNG-S と SNG-W の尾静脈モデル



第8図　SNG-W と SNG-S のヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞に対する接着性．rIL-1βで刺激した血管内皮細胞に対する顕微鏡200倍1視野あたりの接着細胞数をカウントした．W. SNG-W ；S. SNG-S．平均値±標準偏差を示す．
（Kubushiro K,Sakuma Y et al ：Acta Histochem. Cytochem 33(3)：209-213,2000 の第2図を許可を得て改変，転載）

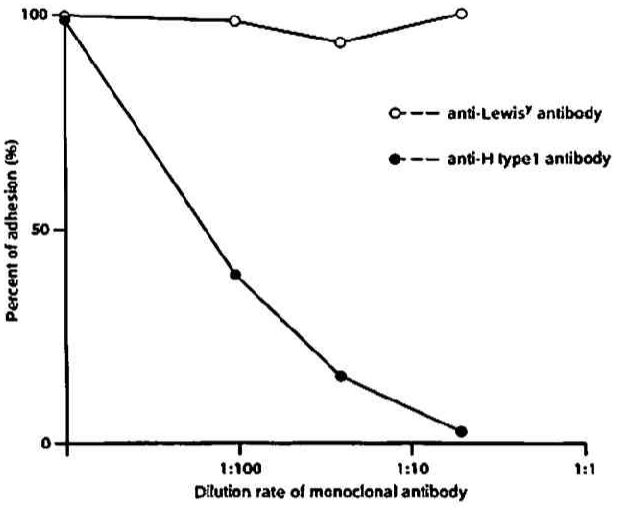


第9図　各種血液型関連糖鎖に対するモノクローナル抗体を用いた，SNG-W のサイトカイン処理ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞への接着阻害試験．コントロール抗体（マウス IgG）の接着率を100とする%表示の平均値±標準偏差を示す．抗 H1 型モノクローナル抗体による明らかな接着阻害を認めた．
（Kubushiro K,Sakuma Y et al：Acta Histochem. Cytochem 33(3)：209-213,2000 の第4図を許可を得て改変，転載）

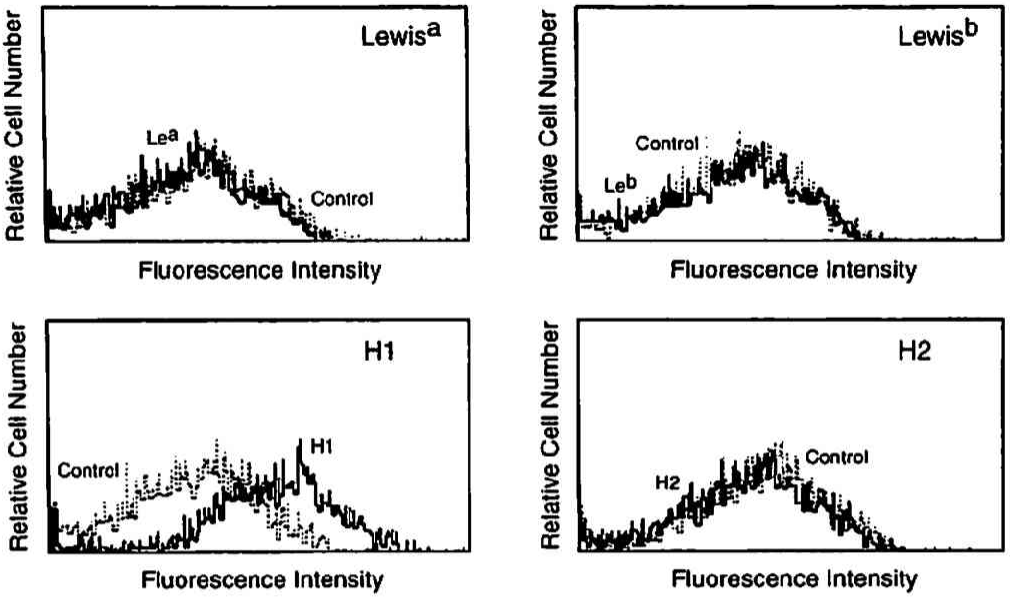
における肺転移率はそれぞれ 0.0%（0/27），26.7%（8/30）であり，SNG-W で有意に高かった（$p<0.01$）．又，子宮正所性移植モデルにおける肺転移率も，それぞれ 23.8%（5/21），63.6%（14/22）と，SNG-W で有意に高く（$p<0.01$），SNG-W は SNG-S に比べ高い遠隔転移能を有する事が判明した（第 1 表）．

7．SNG-S と SNG-W の血管内皮細胞に対する接着能

SNG-W のサイトカイン処理した血管内皮細胞に対する接着細胞数は 127.2±26.1 個/1 視野と，SNG-S の 44.3±12.8 個/1 視野に比べ有意（$p<0.01$）に多かった（第 8 図）．また，各種血液型関連糖鎖に対するモノクローナル抗体を用いた接着阻害試験の結果，抗 H1 型モノクローナル抗体処理した SNG-W の，サイトカイン処理した血管内皮細胞に対する接着率は，コントロールに比べ 2.4±0.5%と明らかに阻害されている事が判明した．一方，抗 H2 型，抗 Lewis^a 型モノクローナル抗体処理では，それぞれ 56.1±8.2%，81.2±8.2%と若干の阻害が認められたが，他の Lewis^b，Lewis^x，Lewis^y 型糖鎖に対するモノクローナル抗体では全く阻害されない事が明らかとなった（第 9 図）．また，抗 H1 型モノクローナル抗体による接着阻害には，濃度依存性が認められた．（第 10 図）



第 10 図　SNG-W のサイトカイン処理ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞に対するモノクローナル抗体による濃度依存性接着阻害試験．SNG-W の接着は抗 H1 型モノクローナル抗体により濃度依存性に阻害された．一方，抗 Lewis^y 型モノクローナル抗体による阻害は認めなかった．（Sakuma Y et al ：Anticancer Res 23(2B)：1277-1282, 2003 の第 1 図を許可を得て転載）



第 11 図　単一糖鎖付着蛍光ビーズのサイトカイン処理ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞に対する接着性のフローサイトメトリーによる検討．コントロールとして糖鎖非付着蛍光ビーズを用いた．H1 型糖鎖付着ビーズのみで血管内皮細胞への接着性を認めた．
（Sakuma Y et al ：Anticancer Res 23(2B)：1277-1282, 2003 の第 2 図を許可を得て転載）

8．単一糖鎖付着蛍光ビーズの血管内皮細胞への接着性

単一糖鎖付着蛍光ビーズのサイトカイン処理した血管内皮細胞への接着性を，フローサイトメトリーを用いて検討した．その結果，H1型糖鎖付着ビーズを用いた検討では，コントロールに比べ高い蛍光強度を示す血管内皮細胞が多数認められ，H1型糖鎖が血管内皮細胞へ多数接着したことが判明した．一方，Lewis^{a}型，Lewis^{b}型，H2型糖鎖付着ビーズについては，血管内皮細胞への接着性は認められない事が明らかとなった（第11図）．

考　察

細胞の癌化に伴なう複合糖質，中でも血液型関連糖鎖の発現異常については種々の臓器についての報告がなされているが，膵や遠位大腸の様に，I型糖鎖の発現異常を生ずるものと[14, 15]膀胱や肺などII型糖鎖の発現異常を生ずるもの[11, 12]が有る．I型糖鎖，II型糖鎖の発現には，その合成経路から，Galactosyltransferase（GT）およびFT，なかでもI型フコシル化糖鎖の合成にはβ1-3GT，α1-2FT，α1-4FT，II型フコシル化糖鎖の合成にはβ1-4GT，α1-2FT，α1-3FTが関与すると考えられる（第5図）．実際，FTについては，遠位大腸癌組織におけるI型糖鎖の異常発現とα1-4FT活性の亢進についての報告がみられる[15]．

また，これら血液型関連糖鎖の癌細胞の生物学的特性に対する関与についても，特にシアル酸を有する糖鎖であるシアリルLewis^a，シアリルLewis^{x}を中心に検討されている．臨床的には，これらのシアル酸を有する糖鎖の強い発現の見られる大腸癌や乳癌患者の予後が不良である事[1, 6]が報告されている．また癌の血行性転移における重要なステップ[28]，すなわち，①癌細胞の原発巣からの離脱，②血管内への侵入，③血管内移動と腫瘍血栓の形成，④遠隔臓器の血管内皮細胞への接着，⑤血管外への脱出，⑥転移巣における増殖のうち，シアル酸を有する糖鎖が癌細胞の血管内皮細胞への接着に関与する事が明らかにされている．例えば，肺癌由来培養細胞株QG56の血管内皮細胞への接着がシアリルLewis^{x}依存性である事，又大腸癌由来培養細胞株Colo201の血管内皮細胞への接着がシアリルLewis^{a}依存性である事，しかもサイトカインで刺激した血管内皮細胞上に出現する種々の接着分子のうち，E-セレクチンがリガンドである事が示されている[16]．しかしながら，これらのシアル酸を有する糖鎖以外の糖鎖については，異常発現の報告があるだけで，その機能に関してはほとんど解明されていない．

当研究室ではすでに体癌においてI型糖鎖の発現異常が見られ，なかでもLewis^{b}型糖鎖は体癌に特異的に強い発現が見られる事[17]，また体癌と特異的に反応するモノクローナル抗体MSN-1[18]を作成し，その認識抗原が主としてLewis^{b}型糖鎖である事[19]を明らかにしている．また，臨床統計上，体癌組織でMSN-1と反応しない症例の予後が，反応する症例に比べ有意に不良である事を報告し[20]，これまでその機能がほとんど明らかにされていないLewis^{b}型をはじめとするシアル酸を持たないフコシル化糖鎖が，体癌細胞の生物学的特性に何らかの関与を有する可能性を示唆してきた．

そこでまず，体癌におけるフコシル化糖鎖の発現異常の機序を解明する目的で，FT活性の測定を行ったところ，体癌組織ではすべてのα-FT活性が正常内膜に比べ高くなっており，また体癌で特異的に発現するLewis^{b}型糖鎖の発現と，その合成に関与するα1-2，α1-4FT活性の間には正の相関関係が存在していた．さらに，MSN-1認識抗原（主としてLewis^{b}型糖鎖）強発現株であるSNG-Sにおけるα1-4FT活性が弱発現株であるSNG-Wに比べ明らかに高いという結果が得られた．SNG-WにおけるH1型糖鎖の強い発現は，α1-4FT活性が低いためH1型糖鎖からのLewis^{b}型糖鎖の合成が阻害され，H1型糖鎖の蓄積を生じているものと説明できる．以上の事実より，体癌における血液型関連糖鎖の発現異常の機序として，α1-2FT，α1-4FT活性が強く関与する事が示唆された[29, 30]．当研究室ではすでに，体癌におけるβ1-3GT活性の亢進を報告しているが[31]，子宮体内膜の癌化にともなう血液型関連糖鎖の発現異常が，その合成に関与する糖転移酵素活性の支配を受けていることが，本研究においても明らかとなった．

今回，SNG-SとSNG-Wという亜株樹立に用いたマイクロセレクター[24]による細胞分別法は，single cell cloning法と異なり，特定の糖鎖抗原の有無によってのみ細胞の分別を行えるため，純粋に糖鎖の発現機序や機能を検討するのに適した方法と言える．実際，SNG-SとSNG-WにおけるDNA ploidyや増殖能には差が無く，SNG-IIをMSN-1認識抗原の有無という特性によってのみ分別することができたと考えられる．

次にこのSNG-SとSNG-Wについて，その細胞生物学的特性の差異を検討したところ，*in vivo*のヌードマウス肺転移モデルにおいて，SNG-WはSNG-Sに比べ高い血行性転移能を有していた[32]．さらに*in vitro*での血管内皮細胞との接着性を検討した所，SNG-WではSNG-Sに比べ血管内皮細胞に対して高い接着性を認め[33]，これが*in vivo*におけるSNG-Wの高い遠隔転移

能の一因であると考えられた．従来，癌細胞膜上のシアル酸を含む糖鎖が血管内皮細胞との接着に関与する事が報告されている．そこで，SNG-W 上に発現している糖鎖が，血管内皮細胞に対する接着因子として機能しているか否かを明らかにするため，各種血液型関連糖鎖に対するモノクローナル抗体を用いた接着阻害試験を行った所，SNG-W でのみ強く発現し，SNG-S では発現の見られない H1 型糖鎖が，血管内皮細胞との接着に強く関与する事が判明した[32), 33)]．この事は，H1 型糖鎖付着蛍光ビーズを用いたフローサイトメトリーによる検討でも確認された[32)]．この単一糖鎖付着ビーズを用いた実験法では純粋にその糖鎖抗原と血管内皮上のリガンドとの相互反応を見る事が出来るという利点を有している．H1 型糖鎖付着ビーズが血管内皮細胞に接着性を有するという結果は，SNG-W においてだけでなく，H1 型糖鎖を発現する他の培養細胞株においても，H1 型糖鎖が血管内皮細胞に対する接着因子のひとつとして機能する可能性を示唆している．一方，SNG-W の血管内皮細胞に対する接着は，H1 型糖鎖以外にも H2 型，Lewis^a 型糖鎖に対するモノクローナル抗体でも若干の阻害を受けた．しかし，H2 型と Lewis^a 型糖鎖については，単一糖鎖付着ビーズを用いた検討では血管内皮細胞に対する接着性を有していなかった．この解釈として，実際の癌細胞の血管内皮細胞への接着が，単一糖鎖と血管内皮細胞上のリガンドとの直接の相互反応のみによるとは限らない可能性も考えられる．例えば，癌細胞上の糖鎖にさらに他の物質が結合し，その物質が血管内皮細胞に対する接着因子として機能するという間接的関与も考えられる．また，ある糖鎖単独の血管内皮細胞への接着力が極めて弱い場合，その糖鎖を発現する癌細胞同士がまず結合し，極めて多数の糖鎖抗原となってはじめて接着性を生ずる可能性等も考えられ，これらについても更なる検討を要する．

本研究における以上の結果は，これまで不明とされていた体癌におけるフコシル化糖鎖発現異常の機序，及びその機能を明らかにするとともに，患者体癌組織が MSN-1 と反応しない症例の予後が，反応する症例に比べ有意に不良であるという臨床統計上の成績を裏付けるものである．すなわち，MSN-1 認識抗原を発現していない体癌では，α1-4FT 活性の低下等により，前駆糖鎖である H1 型糖鎖の蓄積が生じており，その血管内皮細胞に対する接着因子としての機能から，血行性転移能が高まり，予後不良の一因となる可能性が示唆される．

今後は，SNG-W 細胞に α1-4FT の cDNA をトランスフェクションする事による転移能の変化等，分子生物学的手法を用いた検討を要するとともに，H1 型糖鎖のリガンドの解明，さらには，*in vivo* における転移抑制への応用の可能性についての検討が急務であると考えられる．

総　括

本研究では，子宮体癌におけるフコシル化糖鎖，中でも血液型関連糖鎖の発現異常における糖転移酵素の関与を明らかにする目的で α-FT 活性の測定を行なうとともに，その細胞生物学的特性への関与について血管内皮細胞への接着性を中心に検討し，以下の知見を得た．

1．体癌組織では正常内膜に比べ α1-2，α1-3，α1-4FT のすべての活性が亢進していた．また，体癌に特異的に発現する Lewis^b 型糖鎖の免疫組織化学的反応性と α1-2，α1-4FT 活性には正の相関関係を認めた．ついで，体癌に特異的に発現し，臨床統計上患者の予後と関連を有するフコシル化糖鎖である MSN-1 認識抗原（主として Lewis^b 型糖鎖）の発現量の差により，体癌由来培養細胞株 SNG-II を，マイクロセレクターを用いて SNG-S（強発現株）と SNG-W（弱発現株）に分別し，各々の α-FT 活性を測定した．その結果，SNG-S では SNG-W に比べ α1-4FT 活性が著明に亢進していた．また，両者における血液型関連糖鎖の発現の差を検討した所，SNG-S では Lewis^a 型，Lewis^b 型糖鎖の強い発現が見られたのに対し，SNG-W では，Lewis^b 型糖鎖の前駆糖鎖である H1 型糖鎖の強い発現が見られた．この糖鎖の発現の差は，α1-4FT 活性の差により生じていると考えられた．以上より，体癌における血液型関連糖鎖の発現異常の機序として，α1-2FT，α1-4FT 活性が強く関与する事が判明した．

2．SNG-S と SNG-W の細胞生物学的特性の差を検討したところ，DNA ploidy や増殖能には差が見られなかったが，ヌードマウス肺転移モデルを用いた *in vivo* での検討では SNG-W が有意に高い血行性転移能を有していた．また，*in vitro* における血管内皮細胞との接着性を検討したところ，SNG-W は SNG-S に比べ有意に高い血管内皮細胞への接着能を認めた．さらに，各種血液型関連糖鎖に対するモノクローナル抗体を用いた接着阻害試験や，単一糖鎖付着蛍光ビーズを用いたフローサイトメトリーによる検討の結果，SNG-W の血管内皮細胞に対する高い接着能には，H1 型糖鎖が強く関与する事が判明した．以上より，癌細胞膜上の H1 型糖鎖が血管

内皮細胞に対する接着因子のひとつとして機能している事が明らかとなった．そして，MSN-1認識抗原を発現しない体癌症例の予後不良の一因として，α1-4FT活性の低下等によるH1型糖鎖の蓄積と，それにともなう血行性転移能の亢進という細胞特性が関与している事が示唆された．

本稿を追えるにあたり，御指導御校閲を賜りました慶応義塾大学医学部産婦人科学教室野澤志朗教授に深謝いたします．また，直接御指導いただいた慶応義塾大学医学部産婦人科学教室塚崎克己助教授，久布白兼行講師に深く感謝の意を表します．また，実験に関するご協力，御援助をいただいた日本抗体研究所矢澤伸副所長，婦人科病理研究室諸兄に感謝いたします．尚第1-9図は久布白兼行講師の論文から引用したがこのデータは佐久間雄一が主たる貢献者であり，共著者の同意を得て転載した．

本研究の一部は第52回日本癌学会総会（1993，仙台），第46回日本産科婦人科学会総会（1994，東京），第35回日本臨床細胞学会総会（1994，島根），International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine 22nd Meeting（1994，Netherland）で発表した．

文　献

1) Wang WS, Lin JK, Chiou TJ, Liu JH, Fan FS, Yen CC, Lin TC, Jiang JK, Yang SH, Wang HS, Chen PM：CA19-9 as the most significant prognostic indicator of metastatic colorectal cancer. Hepatogastroenterology 49：160-164, 2002
2) Steplewska-Mazur K, Gabriel A, Zajecki W, Wylezol M, Gluck M：Breast cancer progression and expression of blood group-related tumor-associated antigens. Hybridoma 19：129-133, 2000
3) Nakagoe T, Sawai T, Tsuji T, Jibiki MA, Nanashima A, Yamaguchi H, Yasutake T, Ayabe H, Arisawa K, Ishikawa H：Predictive factors for preoperative serum levels of sialyl Lewis X, sialyl Lewis A and sialyl Tn antigens in gastric cancer patients. Anticancer Res 22：451-458, 2002
4) Sanders DS, Kerr MA：Lewis blood group and CEA related antigens；coexpressed cell-cell adhesion molecules with roles in the biological progression and dissemination of tumors.Mol Pathol 52：174-178, 1999
5) Takada A, Ohmori K, Takahashi N, Tsuyuoka K, Yago A, Zenita K, Hasegawa A, Kannagi R：Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a cabohydrate antigen,sialyl Lewis A. Biochem Biophys Res Commun 179：713-719, 1991
6) Nakagoe T, Fukushima K, Itoyanagi N, Ikuta Y, Oka T, Nagayasu T, Ayabe H, Hara S, Ishikawa H, Minami H：Expression of ABH/Lewis-related antigens as prognostic factors in patients with breast cancers. J Cancer Res Clin Oncol 128：257-264, 2002
7) Matsusako T, Muramatsu H, Shirahama T, Muramatsu T, Ohi Y：Expression of a carbohydrate signal, sialyl dimeric Le (x) antigen, is associated with metastatic potential of transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. Biochem Biophys Res Commun 181：1218-1222, 1991
8) Polley MJ, Phillips ML, Wayner E, Nudelman E, Singhal AK, Hakomori S, Paulson JC：CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule I (E LAM-1) recognize the same carbohydrate ligand,sialyl-Lewis x, Proc Natl Acad Sci USA 88：6224-6228, 1991
9) Handa K, Nudelman ED, Stroud MR, Shiozawa T, Hakomori S：Selectin GMP-140 (CD 62；PADGEM) binds to sialosyl-Le (a) and sialosyl-Le (x), and sulfated glycans modulate this binding. Biochem Biophys Res Commun 181：1223-1230, 1991
10) Nakagoe T, Fukushima K, Nanashima A, Sawai T, Tsuji T, Jibiki M, Yamaguchi H, Yasutake T, Ayabe H, Matsuo T, Tagawa Y, Arisawa K：Expression of Lewis (a), sialyl Lewis (a), Lewis (x) and sialyl Lewis (x) antigens as prognostic factors in patients with colorectal cancer. Can J Gastroenterol 14(9)：753-760, 2000
11) Sheinfeld J, Reuter VE, Fair WR, Cordon-Cardo C：Expression of blood group antigens in bladder cancer：current concepts. Semin Surg Oncol 8(5)：308-315, 1992
12) Shimizu T, Yonezawa S, Tanaka S, Sato E：Expression of Lewis X-related antigens in adenocarcinomas of lung. Histopathology 22(6)：549-555, 1993
13) Zhang S, Zhang HS, Cordon-Cardo C, Reuter VE, Singhal AK, Lloyd KO, Livingston PO：Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry：II. Blood group-related antigens. Int J Cancer 73(1)：50-56,1997
14) Hanisch FG, Auerbach B, Bosslet K, Kolbe K, Karsten U, Nakahara Y, Ogawa T, Uhlenbruck G：Monoclonal antibody BW494 defines a blood group Lewis a/type1 chain-related antigen on carcinoma-associated mucins. Biol Chem Hoppe Seyler 374(12)：1083-1091, 1993
15) Ørntoft TF, Holmes EH, Johnson P, Hakomori S, Clausen H：Differential tissue expression of the Lewis blood group antigens：Enzymatic immunohistologic and immunochemical evidence for Lewis a and b antigen. Blood 77：1389-1396, 1991
16) Takada A, Omori K, Yoneda T, Tsuyuoka K, Hasegawa A, Kiso M, Kannagi R：Contribution of

carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. Cancer Res 53：354-361, 1993

17) Tsukazaki K, Sakayori M, Arai H, Yamaoka K, Kurihara S, Nozawa S：Abnormal expression of blood group related antigens in uterine endometrial cancers. Jpn J Cancer Res 82：934-941, 1991

18) Nozawa S, Sakayori M, Ohta K, Iizuka R, Mochizuki H, Soma M, Fujimoto J, Hata J, Iwamori M, Nagai Y：A monoclonal antibody (MSN-1) against a newly established uterine endometrial cancer cell line (SNG-II) and its application to immunohistochemistry and flow cytometry. Am J Obstet Gynecol 161：1079-1086, 1989

19) Iwamori M, Sakayori M, Nozawa S, Yamamoto T, Yago M, Noguchi M, Nagai Y：Monoclonal antibody-defined antigen of human uterine endometrial carcinoma is Le^b. J Biochem 105：718-722, 1989

20) 塚崎克己：子宮体癌の発生に伴う複合糖質発現異常に関する基礎的研究とその臨床へのフィードバック，日産婦誌 45：789-801, 1993

21) Yazawa S, Nakamura J, Asao T, Nagamachi Y, Sagi M, Matta K. L, Tachikawa T, Akamatsu M：Aberrant α1→2 fucosyltransferases found in human colorectal carcinoma involved in the accumulation of Leb and Y antigens in colorectal tumors. Jpn J Cancer Res 84：989-995, 1993

22) Yazawa S,Madiyalakan R, Jain R K, Shimoda N, Matta K. L：Use of benzyl 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(2-O- methyl-β-D-galactosyl)-β-D glucopyranoside〔2'-O-methyllacto-N-biose 1βBn〕as a specific accepter for GDP-fucose：N-acetylglucosaminide α(1-4)-L-fucosyl-transferase. Anal Biochem 187：374-378,1990

23) Yazawa S, Takeya A, Hosomi A, Nakajima T, Shimada N, Ohi H, Tachikawa T, Piscorz C.F, Jain R.K, Matta K.L：Use of synthetic H disaccharides as acceptors for detecting activities of UDP-GalNAc：Fucα1→2Galβ-Rα1→3-N acetylgalactosaminyltransferase in plasma sample from blood group A subgroups.Clin Chem 38：2392-2395,1992

24) Negler A, Peacock M, Tantoco M, Lamons D, Okarma TB, Okrongly DA：Separation of hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. J Hematotherapy 2：243-245, 1993

25) Watanabe M, Hirohashi S, Shimosato Y, Ino Y, Yamada T, Teshima S, Sekine T, Abe O：Carbohydrate antigen defined by a monoclonal antibody raised against a gastric cancer xenograFT. Jpn J Cancer Res 76：43-52, 1985

26) Nozawa S, Narisawa S, Kojima K, Sakayori M, Iizuka R, Mochizuki H, Yamauchi T, Iwamori M, Nagai Y：Human monoclonal antibody (HMST-1) against lacto-series type 1 chain and expression oFThe chain in uterine endometrial cancers.Cancer Res 49：6401-6406, 1989

27) Fujimoto J, Hata J, Ishii E, Tanaka R, Kannagi R, Ueyama Y, Tamaoki N：Differentiation antigens defined by mouse monoclonal antibodies against human germ cell tumors.Lab Invest 57：350-358, 1987

28) Liotta, L.A.：Cancer cell invasion and metastasis. Sci. Am 266：54-63, 1992

29) Kubushiro K, Tsukazaki K, Sakuma Y, Akiba Y, Sakayori M, Aoki R, Yazawa S, Nozawa S：Expression mechanism of human uterine endometrial cancer-specific fucosylated carbohydrate chains：Aberrant α1-4 fucosyltransferases in uterine endometrial cancer-derived cell lines with type 1 carbohydrate chain.Int J Oncol6：93-97, 1995

30) Kubushiro K, Tsukazaki K, Sakuma Y, Sakayori M, Yazawa S, Nozawa S：Enzymatic basis for the accumulation of $Lewis^b$ antigen in uterine endometrial cancer.Jpn J Cancer Res 86：361-367, 1995

31) Yoshiki J, Kubushiro K, Tsukazaki K ,Udagawa Y, Nozawa S,Iwamori M：High expression of uridine diphosphate-galactose：Lc_3Cer β1-3 galactosyltransferase in human uterine endometrial cancer-derived cells as measured by enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography-immunostaining.Jpn J Cancer Res 88：669-677, 1997

32) Sakuma Y, Kubushiro K, Tsukazaki K, Nozawa S, ：Involvement of H Type 1 Carbohydrate Antigen in Cell Adhesion to Vascular Endothelial Cells of Human Endometrial Cancer. Anticancer Res 23(2B)：1277-1282,2003

33) Kubushiro K, Sakuma Y, Yamashita H, Fukuchi T, Banno K, Tsukazaki K, Nozawa S：Biological Characteristics of Human Uterine Endometrial Cancer Variant Cells Selected for Blood Group H Type 1 Antigen：Adhesion to Vascular Endothelial Cells. Acta Histochem.Cytochem 33(3)：209-213, 2000