

Title	女性性器癌細胞における $\beta$ 1,4-ガラクトース転移酵素の発現とその細胞生物学的特性におよぼす影響
Sub Title	
Author	山下, 博(Tamashita, Hiroshi) 野澤, 志朗
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.2 (2006. 6) ,p.T13- T21
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060601-0013">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060601-0013</a>

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.

学位論文

女性性器癌細胞における  $\beta$ 1, 4-ガラクトース転移酵素の発現と  
その細胞生物学的特性におよぼす影響

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

(指導：野澤志朗教授)

やま した ひろし  
山 下 博

(平成17年2月17日受付)

Key Words :  $\beta$ -1, 4-galactosyltransferase, ovarian cancer, endometrial cancer, metastasis, cell adhesion

$\beta$ 1, 4-ガラクトース転移酵素 (以下  $\beta$ 1, 4-GT) は、N-アセチルグルコサミンにガラクトースを  $\beta$ 1  $\rightarrow$  4 結合させる糖転移酵素であり、ラクト系列 II 型糖鎖と呼ばれる糖鎖群の合成に関与している。一方、 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素 (以下  $\beta$ 1, 3-GT) は、N-アセチルグルコサミンにガラクトースが  $\beta$ 1  $\rightarrow$  3 結合する反応を触媒しており、ラクト系列 I 型糖鎖と呼ばれる糖鎖群の合成に関与している。I 型、II 型糖鎖には、血液型糖鎖抗原やシアリル Lewis 系の各種の腫瘍マーカー抗原がある。一般に I 型糖鎖を多く発現している癌は、II 型糖鎖を多く発現している癌に比べ予後が良いことが知られており、女性性器癌においても一般的に予後良好である子宮体癌においては  $\beta$ 1, 3-GT 活性は高いが、 $\beta$ 1, 4-GT の活性は低く、予後不良である卵巣癌においては逆に  $\beta$ 1, 4-GT の活性は高く、 $\beta$ 1, 3-GT 活性は低いことを我々は明らかにしてきた<sup>1), 2)</sup>。

血清中の  $\beta$ 1, 4-GT 活性は種々の癌患者において非癌患者よりも高いことが報告されており<sup>3), 4)</sup>、我々が卵巣癌患者の腹水より分離同定した  $\beta$ 1, 4-GT の isoform である GAT (galactosyltransferase associated with tumor) は卵巣癌に対する腫瘍マーカーとして現在広く臨床応用されている<sup>5-8)</sup>。また、SCC 抗原 (Squamous cell carcinoma related antigen) がセリンプロテアーゼ阻害活性を有すること<sup>9)</sup>や CA19-9 (Carbohydrate antigen 19-9) や SLX (Sialyl lewis X) が e-セレクトインのリガンドとしての機能を有し大腸癌の血行性転移

と密接な関係があることが報告され<sup>10), 11)</sup>、腫瘍マーカー分子そのものが癌の細胞生物学的特性に深く関与していることが明らかになっている。SLX は GlcNAc  $\beta$ 1  $\rightarrow$  6Man  $\alpha$ 1  $\rightarrow$  6Man  $\beta$ 1 - 分岐側鎖にガラクトースと GlcNAc が交互に結合したポリ-N-アセチラクトサミン (Gal  $\beta$ 1  $\rightarrow$  4GlcNAc  $\beta$ 1  $\rightarrow$ )。や、糖脂質 nLc.セラミド (Gal  $\beta$ 1  $\rightarrow$  4GlcNAc  $\beta$ 1  $\rightarrow$  3Gal  $\beta$ 1  $\rightarrow$  4Glc-Cer) といった構造の上に発現しており、合成に  $\beta$ 1, 4-GT が関与していることより、 $\beta$ 1, 4-GT は癌の浸潤や転移といった細胞生物学的特性に関与していると予想される。この蛋白は、他の糖転移酵素と同様にゴルジ体に膜結合型蛋白として存在するが、細胞膜表面にも存在し、細胞間あるいは細胞・細胞外基質間の接着因子としての機能も有するという報告も過去にはみられたが<sup>12), 13)</sup>、最近では精子表面の  $\beta$ 1, 4-GT と卵子の透明帯蛋白である ZP3 との接着に関する報告のみがみられており、体細胞あるいは腫瘍細胞に関する報告はみられない。精子表面に発現する  $\beta$ 1, 4-GT の働きについても接着に関与するというよりも尖体反応を惹起する分子として報告されており、接着分子としては否定的な見解を示している報告もある<sup>14), 15)</sup>。

本研究においては、以上の背景を踏まえ、 $\beta$ 1, 4-GT が女性性器癌細胞においてどのような細胞生物学的特性に関与しているのかを明らかにするために、(1)  $\beta$ 1, 4-GT の発現が少ない子宮体癌細胞株に当該遺伝子を導入し、過剰発現させることにより  $\beta$ 1, 4-GT 高発現株を

本論文は、Yamashita H, Kubushiro K, Ma J, Fujii T, Tsukazaki K, Iwamori M, Nozawa S : Alteration in the metastatic potential of ovarian cancer cells by transfection of the antisense gene of  $\beta$ -1, 4-galactosyltransferase. *Oncol Rep.* 10(6) : 1857-62, 2003 の一部を含む。

作成し、過剰発現による細胞特性の変化の有無を検討した。

(2)  $\beta$ 1, 4-GT の発現量の多い卵巣癌細胞において本酵素がどのような細胞生物学的な特性に関与しているのかを検討するために、アンチセンス遺伝子を導入し  $\beta$ 1, 4-GT 低発現株を作成し、当該遺伝子の発現抑制が卵巣癌細胞に与える影響につき *in vitro* および *in vivo* において検討した。

## 方 法

### 1. 遺伝子導入

pCAGGS 発現ベクターに挿入された full length のヒト  $\beta$ 1, 4-GT cDNA (米国 Burnham 研究所 Michiko N. Fukuda 博士より御供与)<sup>16)</sup> (第1図) を子宮体癌細胞株である SNG-M<sup>17)</sup> に、また後述する方法で作製された  $\beta$ 1, 4-GT のアンチセンス cDNA を卵巣明細胞腺癌株である RMG-II<sup>18)</sup> にリポフェクション法を用いて導入した。親株を 35 mm ディッシュに  $1.5 \times 10^5$  個撒き 18 時間前培養した。無血清 DMEM で洗浄後、 $10 \mu\text{g}$   $\beta$ 1, 4-GT cDNA-pCAGGS ベクタープラスミドと pSVneo、あるいはコントロール細胞作成用にインサートのない pCAGGS ベクターのみを  $30 \mu\text{g}$  のリポフェクション、Opti-MEM 培養液とともに添加し 20 時間培養した。続いて血清含有 DMEM 培養液で 48 時間培養した後、G418 を添加し 2 週間培養を行い、耐性のコロニーを得

た。更に *in situ*  $\beta$ ガラクトシダーゼ染色を行い pSVneo のみがトランスフェクションされたコロニーを除外した。

### 2. $\beta$ 1, 4-GT アンチセンスプラスミドの作製

pCAGGS 発現ベクターに挿入された  $\beta$ 1, 4-GT cDNA を制限酵素 EcoRI によってプラスミドより切り出し、電気泳動の後 5.0 kb のベクターと 1.46 kb のインサートに分離精製した。分離したベクターは、self ligation を起こさないように 5' 側をアルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化した。その後  $\beta$ 1, 4-GTcDNA と pCAGGS ベクターの ligation を行い、生成物を大腸菌に導入し、プレーティングした。miniprep 法にて抽出したプラスミドを電気泳動し、6.46 kb のプラスミド DNA 10 クロウンを選別した。その後、これらのクロウンより、制限酵素 AccI を用いた restriction endonuclease digestion analysis によりアンチセンスプラスミドを選別した。

### 3. ノザンプロット法による遺伝子導入細胞の解析

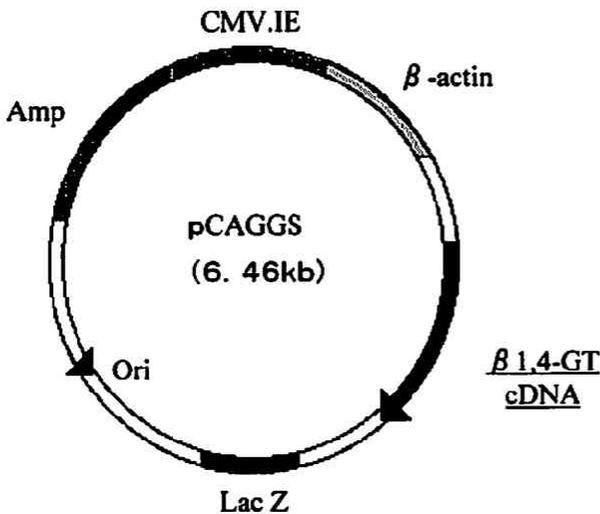
各クロウンより RNeasy キット (キアゲン社) を用いて総 RNA を抽出した。SNG-M のトランスフェクタントについては、得られた総 RNA  $10 \mu\text{g}$  を 1% アガロース/ホルムアルデヒドゲル上で電気泳動しナイロンメンブレンにトランスファーした。RMG-II のトランスフェクタントについては、ドットプロット法によりナイロンメンブレンに吸着させた。メンブレンはサケ精子 DNA  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  とプレハイブリダイゼーションした後に BcaBEST ラベリングキット (宝酒造) を用い [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP で標識した  $\beta$ 1, 4-GTcDNA プローブとハイブリダイゼーションを行った。メンブレンは SNG-M のトランスフェクタントにおいては  $-70^\circ\text{C}$  で X 線フィルムに感光し、RMG-II のトランスフェクタントにおいては BAS2000 (FUJIFILM) を用いて放射活性を測定した。

### 4. サザンプロット法による導入遺伝子の確認

ゲノム DNA を SNG-M のトランスフェクタントは制限酵素 BamHI 処理し、RMG-II のトランスフェクタントは制限酵素 EcoRI 処理し、サザンプロット解析をおこなった。メンブレンはサケ精子 DNA  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  とプレハイブリダイゼーションした後に BcaBEST ラベリングキット (宝酒造) を用い [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP で標識した  $\beta$ 1, 4-GTcDNA プローブとハイブリダイゼーションを行った。

### 5. 細胞増殖能の検討

トランスフェクタント各々  $1.0 \times 10^5$  個を 16 枚の 35 mm ディッシュに撒き、24 時間毎に 120 時間目まで 4 枚ずつ細胞数を計測し、それらの細胞数より対数増殖期における細胞倍加時間を算出した。



第1図 pCAGGS 発現ベクターに挿入されたヒト  $\beta$ 1, 4-GT cDNA

## 6. 細胞外基質に対する接着性の検討

SNG-M トランスフェクタントでは、細胞外基質コート 24 ウェルプレートに  $1 \times 10^5$  個の細胞を撒き 1 時間  $37^\circ\text{C}$  で静置した。培養液を捨て、PBS で 2 回洗浄した後に 25% グルタルアルデヒドで固定し、0.05% クリスタルバイオレット/20% メタノール溶液で 10 分間染色し蒸留水にて洗浄後に 405 nm での吸光度を測定した。

RMG-II トランスフェクタントでは、細胞外基質コート 96 ウェルマイクロプレートに細胞懸濁液を  $2.0 \times 10^5$  個撒き、 $37^\circ\text{C}$  1 時間培養した後、PBS (Ca/Mg 含有) で洗浄し、0.2% クリスタルバイオレット 100  $\mu\text{l}$  を各ウェルに添加し、5 分間室温にて放置染色した。その後再度 PBS にて洗浄後、1% SDS 含有 PBS 100  $\mu\text{l}$  を各ウェルに加え、振蕩することによって細胞を融解し、色素を溶出させた後に、マイクロプレートリーダーを用いて 540 nm の吸光度を測定した。

## 7. Boyden chamber を用いた浸潤能の検討 (In vitro invasion assay)

10  $\mu\text{g}$  のマトリゲル (Becton Dickinson 社) でおおわれた 8  $\mu\text{m}$  の細孔の開いた直径 13 mm のディスクを上側のチャンパーにのせ、下側のチャンパーを chemoattractant として NIH3T3 細胞由来の conditional medium (DMEM 5% FCS) で満たした。SNG-M および SNG-M トランスフェクタント細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/ml) を上側のチャンパーに入れ、24 時間インキュベーションした後フィルターをエタノールにて固定、ヘマトキシリンにて染色した。フィルターを浸潤した細胞数は顕微鏡下 (200 倍) で 10 視野を計測した。

## 8. ノードマウスへの腹腔内注射による造腫瘍能の検討

各細胞株より細胞懸濁液を調製し、 $6.0 \times 10^6$  個を 1 細胞株当り 5 匹、計 15 匹の Balb/c ノードマウスに腹腔内注射し、3 週間後エーテル麻酔殺後、解剖し、腹腔内に形成された腫瘍を摘出し、その湿重量を計測すると共に、横隔膜に形成された肉眼的転移巣の数を計測した。また、摘出された腫瘍についてはホルマリン固定後にヘマトキシリンエオジン染色を施行し、形態学的な検討をおこなった。

## 9. 統計学的手法

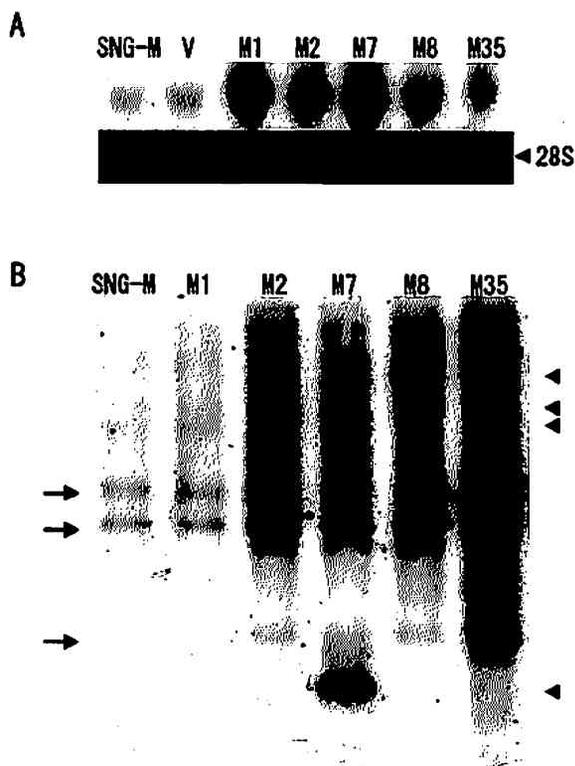
細胞倍加時間、細胞外マトリックスへの接着、ノードマウスに対する造腫瘍能の各実験結果の統計学的解析として、2 群間の比較には  $t$  検定を用い、3 群間の比較には分散分析を行った後に post-hoc テストを用いた多重比較を行った。

## 結 果

子宮体癌細胞株における  $\beta 1, 4\text{-GT}$  の過剰発現

## 1. サザンプロット法およびノザンプロット法による導入遺伝子の検証

pCAGGS ベクターおよび  $\beta 1, 4\text{-GT}$ -pCAGGS ベクターを子宮体癌細胞株 SNG-M にリポフェクチン法によりトランスフェクトした。G418 存在下に 2 週間のセレクトションを行い 5 種類の耐性クローン (M1, M2, M7, M8, および M35) および空ベクターを導入したコントロールクローン (V) を得た。ノザンプロット解析の結果、5 種類の SNG-M トランスフェクタント細胞の  $\beta 1, 4\text{-GT}$  mRNA 量は、コントロール細胞 (V) の量の 6 倍以上であった (第 2 図 A)。また、トランスフェクタント細胞 DNA に挿入された外来遺伝子をサザンプロット解析にて調べたところ、 $\beta 1, 4\text{-GT}$  mRNA レベルの高い細胞株にのみ transgene が認められた (第 2 図 B)。



第2図 SNG-M トランスフェクタント細胞のノザンプロット解析 (A) とサザンプロット解析 (B)。5 種類の SNG-M トランスフェクタント細胞の  $\beta 1, 4\text{-GT}$  mRNA 量は、コントロール細胞 (V) の量の 6 倍以上であった。  $\beta 1, 4\text{-GT}$  mRNA レベルの高い細胞株にのみ transgene が認められた。(矢印は内因性の  $\beta 1, 4\text{-GT}$  遺伝子、矢頭は transgene を示す)

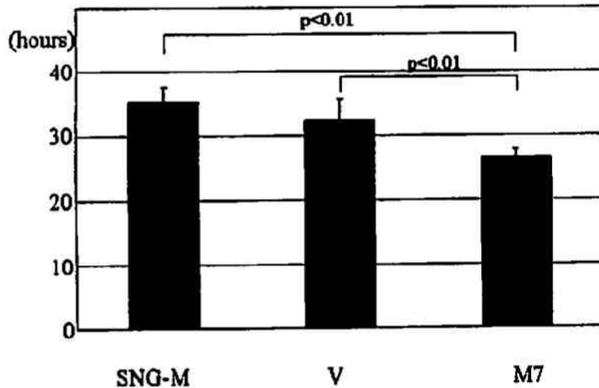
以後の実験においては最も  $\beta 1, 4\text{-GT}$  の発現量が多いクローン細胞 M7 を使用した。

2. 細胞増殖能の比較

親株である SNG-M, V, および M7 の対数増殖期における細胞倍加時間を比較した結果, それぞれ  $35.5 \pm 2.21$  時間,  $32.6 \pm 3.15$  時間, および  $26.7 \pm 1.01$  時間であり, M7 は V および SNG-M に比べて有意に細胞倍加時間が短縮していた (第3図)。

3.  $\beta 1, 4\text{-GT}$  高発現株 M7 の細胞外基質に対する接着性

細胞外基質であるラミニンと4型コラーゲンに対する接着性を M7 と V で比較した (第1表), ラミニンに対する接着性は M7 と V でそれぞれ  $0.222 \pm 0.017$ ,  $0.024 \pm 0.009$  であり, M7 は V に対して有意に接着性が亢進していた, 同様に4型コラーゲンに対しても M7 と V でそれぞれ  $0.137 \pm 0.009$ ,  $0.025 \pm 0.007$  と M7 は V に対して有意に接着性が亢進していた。



第3図 SNG-M トランスフェクタント細胞の細胞増殖能  
SNG-M, V, および M7 の対数増殖期における細胞倍加時間を比較した結果, M7 は V および SNG-M に比べて有意に細胞倍加時間が短縮していた。

第1表 細胞外基質分子に対する子宮体癌細胞株の接着性に与える  $\beta 1, 4\text{-GT}$  遺伝子の影響

cells	laminin	collagen type 4
V	$0.024 \pm 0.009$	$0.025 \pm 0.007$
M7	$0.222 \pm 0.017$	$0.137 \pm 0.009$

V : コントロール細胞株, M7 : 高発現株, \* $p < 0.01$

第2表 子宮体癌細胞株のマトリゲルへの浸潤性に与える  $\beta 1, 4\text{-GT}$  遺伝子の影響

Cells	No. of invading cells (mean $\pm$ S.D.)
V	$29.1 \pm 23.3$
M7	$69.7 \pm 25.4$

V : コントロール細胞株, M7 : 高発現株, \* $p < 0.01$

4. Boyden chamber を用いた浸潤能 (In vitro invasion assay) の比較

マトリゲルをコートした膜の裏面まで浸潤した細胞数を V と M7 の間で比較した。浸潤細胞数はそれぞれ  $29.1 \pm 23.3$  および  $69.7 \pm 25.4$  であり, V に対し M7 は浸潤能が有意に亢進していた (第2表)。

卵巣癌細胞株における  $\beta 1, 4\text{-GT}$  発現の抑制

$\beta 1, 4\text{-GT}$  の発現が少ない子宮体癌細胞株において,  $\beta 1, 4\text{-GT}$  を過剰発現させることにより細胞外基質との接着性が亢進したことから,  $\beta 1, 4\text{-GT}$  が癌細胞の特性, 特に浸潤・転移といった現象に関与している可能性があると考えられた。そこで, 本来  $\beta 1, 4\text{-GT}$  を多く発現している卵巣癌細胞において, その発現を抑制することにより卵巣癌細胞の特性を変化させられるのではないかと考え, 卵巣癌細胞株である RMG-II にアンチセンス遺伝子の導入を試みた。

1.  $\beta 1, 4\text{-GT}$  アンチセンス遺伝子導入卵巣癌細胞の検証

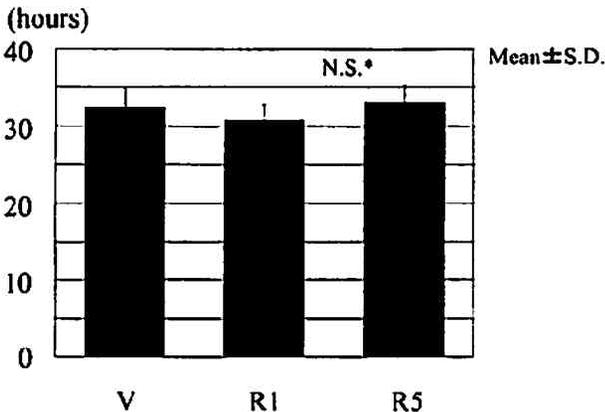
$\beta 1, 4\text{-GT}$  アンチセンス遺伝子をリポフェクション法にて導入した R1 から R6 までの各トランスフェクタントについてノザンドットプロット法により,  $\beta 1, 4\text{-GT}$  mRNA の多寡につき検討した結果, R1 および R5 においては mRNA レベルがコントロール細胞 V に比べ, それぞれ 41.3%, 52.0% に減少していることが確認された。また, mRNA の減少していた R1 および R5 と mRNA の減少していなかった R2 および V より抽出した DNA を用い,  $\beta 1, 4\text{-GT}$  cDNA をプローブとしたサザンプロット法による解析の結果, R1 および R5 には transgene が明らかに認められ, 遺伝子導入が成功していることが裏付けられた。一方, R2 には transgene は認められなかった (第4図)。そこで, 以降の実験においては上記の R1, R5 を用いた。

2.  $\beta 1, 4\text{-GT}$  アンチセンス遺伝子導入が細胞増殖能に与える影響

前項のようにして確認された  $\beta 1, 4\text{-GT}$  遺伝子抑制モデルである R1 および R5 細胞について,  $\beta 1, 4\text{-GT}$  遺



第4図 RMG-IIトランスフェクタント細胞のサザンブロット解析  
3種類の $\beta 1, 4$ -GTアンチセンス遺伝子導入クローン(R1, R2, およびR5)のサザンブロット解析をおこなったところR1およびR5にtransgeneが認められた(矢印)。(Yamashita H et al : Oncology Report 10(6) : 1857-1862, 2003のFigure 1を許可を得て転載)



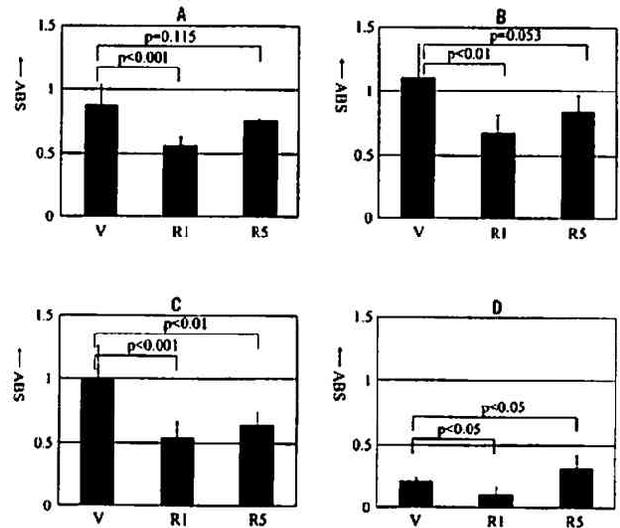
第5図 RMG-IIトランスフェクタント細胞の細胞増殖能  
アンチセンス遺伝子を導入したR1およびR5とコントロール細胞(V)の間には細胞倍加時間に有意差は認められない。(Yamashita H et al : Oncology Report 10(6) : 1857-1862, 2003のFigure 2を許可を得て転載)

伝子の抑制が卵巣明細胞腺癌細胞株の細胞生物学的特性にどのような影響を与えるのかを検討するために、まず、細胞増殖能に与える影響を検討した。

細胞増殖能の検討は、対数増殖期における細胞倍加時間をパラメーターとして比較した。コントロール細胞V株の $32.5 \pm 2.32$ 時間(mean  $\pm$  S.D.)に対して、R1株は $30.8 \pm 2.14$ 時間、R5株は $33.3 \pm 2.22$ 時間であり、3群間に統計学的な有意差は認められなかった(第5図)。したがって、 $\beta 1, 4$ -GTアンチセンス遺伝子は細胞増殖抑制あるいは促進効果を持っているとは言えない。さらに、これらのトランスフェクタントの細胞形態を検討した結果、各細胞株間に形態学的な相違は認められなかった。

### 3. $\beta 1, 4$ -GTアンチセンス遺伝子導入が細胞外基質との接着に与える影響

癌の浸潤・転移における間質との反応性に、 $\beta 1, 4$ -GTが影響を与えているか否かについて検討するために、細胞外基質に対する接着能について検討した(第6図)。コントロール細胞株および $\beta 1, 4$ -GTアンチセンスcDNA導入株の1型コラーゲンに対する接着能は吸光



第6図 細胞外基質分子に対する卵巣癌細胞の接着性におよぼす $\beta 1, 4$ -GTアンチセンス遺伝子の影響。  
細胞外基質分子がコートされたプレート上で1時間培養し、接着細胞数を吸光度で評価した。1型コラーゲン(A)、4型コラーゲン(B)、およびフィブロネクチン(C)においてアンチセンス遺伝子導入細胞は接着細胞数がコントロール細胞よりも少ない傾向が認められた。ラミニン(D)に対しては一定の傾向が認められなかった。(Yamashita H et al : Oncology Report 10(6) : 1857-1862, 2003のFigure3を許可を得て転載)

度で比較すると、V:  $0.868 \pm 0.165$ , R1:  $0.547 \pm 0.081$ , R5:  $0.754 \pm 0.010$  (mean  $\pm$  S.D.) とアンチセンス導入株においては、接着能が低下する傾向にあり、R1 においては有意に低下していた ( $p < 0.001$ ) (第6図A)。4型コラーゲン、フィブロネクチンに対する接着能に関しても同様の結果が得られた。すなわち4型コラーゲンに対しては、V:  $1.103 \pm 0.270$ , R1:  $0.665 \pm 0.157$ , R5:  $0.839 \pm 0.126$  であり、R1 に関しては統計学上有差をもって接着能が低下しており ( $p < 0.01$ )、R5 に関しても接着能の低下が認められた ( $p = 0.0531$ ) (第6図B)。フィブロネクチンに関しては、V:  $1.01 \pm 0.250$ , R1:  $0.519 \pm 0.064$ , R5:  $0.632 \pm 0.102$  であり、R1, R5 共に V に比べ、接着能は有意に低下していた ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ) (第6図C)。ラミニンについては、V:  $0.194 \pm 0.035$ , R1:  $0.094 \pm 0.056$ , R5:  $0.301 \pm 0.094$  となり、R1 の接着能は、V に比べて有意に低下していたが ( $p < 0.05$ )、R5 に関しては逆に接着能が有意に亢進しており ( $p < 0.05$ )、2種類の  $\beta 1, 4$ -GT アンチセンス導入株において相反する結果となった (第6図D)。

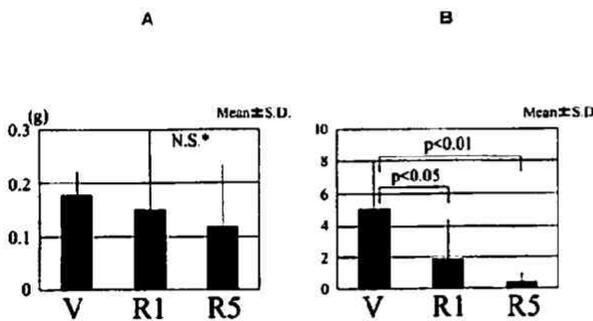
4. 腹腔播種モデルを用いた  $\beta 1, 4$ -GT アンチセンス遺伝子導入細胞株の造腫瘍能

卵巣癌の播種性転移モデルとして、コントロール細胞株 V、およびアンチセンス遺伝子導入株である R1, R5 を各々5匹ずつの Balb/c ノードマウスに腹腔内接種し、その造腫瘍能につき検討した。その結果、V を腹腔内接種した群においては、5匹全てに腫瘍を形成したのに

対し、R1, R5 群においては、それぞれ4/5, 3/5 にしか腫瘍の形成が認められなかった。形成された腹腔内腫瘍の総重量は、V:  $0.176 \pm 0.044$  g, R1:  $0.161 \pm 0.137$  g, R5:  $0.119 \pm 0.113$  g (mean  $\pm$  S.D.) と各群間に有意差は認められなかった (第7図A)。また、腫瘍の HE 染色標本においては、何れの群においても、明細胞はあまり認められず、大部分が hobnail pattern を呈す腺癌細胞で占められており、各群間に明らかな差異はなかった。一方、肉眼的所見として、コントロール V 細胞接種マウスに対し、 $\beta 1, 4$ -GT アンチセンス導入株である R1, R5 細胞接種マウスでは、播種巣の数が少なかったため、これを客観的に評価する目的で、横隔膜における転移巣の数を肉眼的に比較した (第7図B)。横隔膜転移の数は、V, R1, R5 各群においては、それぞれ  $5.0 \pm 2.6$ ,  $1.8 \pm 2.5$ ,  $0.4 \pm 0.6$  であり、コントロール群に対し  $\beta 1, 4$ -GT アンチセンス遺伝子導入群においては横隔膜転移が有意に抑制されていた。

考 案

本研究においては女性性器癌において  $\beta 1, 4$ -GT がどのように癌の細胞生物学的特性に関与しているのかを明らかにするため、 $\beta 1, 4$ -GT の発現の低い子宮体癌細胞株 SNG-M に  $\beta 1, 4$ -GT を過剰発現させる方法、また  $\beta 1, 4$ -GT 発現の高い卵巣癌細胞株 RMG-II にアンチセンス遺伝子を導入する方法を用いてそれら細胞株の細胞生物学的特性の変化を検討した。癌の細胞生物学的特性として細胞増殖能、浸潤・転移能が挙げられる。細胞増殖能については SNG-M においては  $\beta 1, 4$ -GT の過剰発現により細胞倍加時間が短縮されており、 $\beta 1, 4$ -GT が細胞増殖能を亢進させる結果となった。一方 RMG-II にアンチセンス遺伝子を導入した場合においては、細胞倍加時間の有意な変化は認められず、 $\beta 1, 4$ -GT 発現の変化は細胞増殖能に影響を与えなかった。 $\beta 1, 4$ -GT が細胞増殖において促進的に作用するのか抑制的に働くのかという議論には以前よりいくつかの報告がみられる。マウスの耳下腺の過形成を誘導すると腺房細胞の  $\beta 1, 4$ -GT 活性が上昇することや<sup>19)</sup>、 $\beta 1, 4$ -GT の阻害剤を添加することにより細胞増殖が抑制されることから<sup>20)</sup>、 $\beta 1, 4$ -GT には細胞増殖を促進する作用があるとする報告がみられる。また、反対に  $\beta 1, 4$ -GT の過剰発現により細胞増殖が抑制されるため、 $\beta 1, 4$ -GT は細胞増殖に対し抑制的に働くとする報告もある<sup>21)</sup>。細胞増殖のシグナル伝達経路は細胞膜表面の増殖因子受容体から核における Myc などの細胞増殖因子発現までのリン酸化により制



第7図 腹膜播種に対する  $\beta 1, 4$ -GT アンチセンス遺伝子の影響。各トランスフェクタント細胞を Balb/c ノードマウスに腹腔内注射することにより腹膜播種モデルを作成した。腹腔内に形成された腫瘍の総重量は3群間に有意差は認められなかった (A)。一方、横隔膜への播種病巣の数について  $\beta 1, 4$ -GT アンチセンス導入細胞 (R1, R5) はコントロール細胞と比較して有意に減少していた (B)。(Yamashita H et al: Oncology Report 10(6): 1857-1862, 2003 の Figure 4 を許可を得て転載)

御されていると考えられているが、近年糖転移酵素も細胞増殖シグナルの制御に関与していることが明らかになってきている。EGF レセプターファミリーは受容体そのものが  $\beta 1, 4$ -GT の関与する糖鎖修飾を受け、二量体の形成を促したり他のレセプターを介した EGFR のトランスアクティベーションに必須であることが報告されている<sup>22-24</sup>。SNG-M においてみられた  $\beta 1, 4$ -GT 過剰発現の細胞増殖促進効果はこの細胞株が細胞増殖を行う際に、 $\beta 1, 4$ -GT が関与する糖鎖修飾によりその機能を制御されている細胞表面の増殖因子受容体からのシグナル伝達の影響を受けている可能性を示唆している。一方 RMG-II においては細胞増殖は  $\beta 1, 4$ -GT の多寡に影響されないため、 $\beta 1, 4$ -GT による糖鎖修飾の影響を受けない増殖因子受容体からの細胞増殖シグナルが伝達されているか、あるいはリガンドの必要の無いようなシグナルの活性化が起こっている可能性が示唆される。

$\beta 1, 4$ -GT と浸潤・転移能の関係については、腫瘍細胞が原発巣より離脱する過程の一つである間質浸潤の指標として、子宮体癌株については細胞外基質との接着性とマトリゲルへの浸潤能について検討し、卵巣癌株では細胞外基質との接着性について検討した。さらに卵巣癌株においては原発巣より離脱した卵巣癌細胞の播種性転移モデルとして各トランスフェクタントのヌードマウスへの腹腔内投与を行った。細胞外基質との接着性は、子宮体癌細胞においては  $\beta 1, 4$ -GT の過剰発現により接着性が亢進し、さらにマトリゲルへの浸潤能も亢進した。一方卵巣癌においても  $\beta 1, 4$ -GT のアンチセンス導入による発現抑制により細胞外基質に対する接着性は低下したことより、どちらの細胞株においても  $\beta 1, 4$ -GT が細胞外基質との接着において重要な役割を担っているものと考えられる。細胞外基質と  $\beta 1, 4$ -GT との関連は諸家の報告と今回の結果とを考慮すると2つの仮説が考えられる。第一に、 $\beta 1, 4$ -GT が前述のように細胞膜表面に存在する接着因子としての役割を有する場合であり<sup>12-14</sup>、体癌においては過剰発現により細胞表面の  $\beta 1, 4$ -GT 蛋白が増加し接着分子としての  $\beta 1, 4$ -GT 蛋白と細胞外基質との接着の亢進がみられ、卵巣癌においては発現抑制により細胞膜表面の  $\beta 1, 4$ -GT 蛋白が減少することにより接着性が低下することになる。本研究においては  $\beta 1, 4$ -GT の細胞内局在については検討していない。  $\beta 1, 4$ -GT の総量に変化しても細胞膜表面の  $\beta 1, 4$ -GT 発現量は変化しないとする報告もみられるため<sup>19</sup>、本実験で得られた細胞株についても検討してみる必要があると考えられた。しかし、 $\beta 1, 4$ -GT が接着分子として機能する場合、本研究結果ではリガンドとしての様々な細胞外基

質に対する特異性が認められず通常の細胞膜表面受容体が高いリガンド特異性を有しているという事実を照らした場合非常に不自然である。第2の可能性は、細胞外基質に対する接着分子として広く認められているインテグリンに対する影響である。現在までにインテグリンの機能調節がインテグリンの糖鎖修飾、特に N-glycosylation によるとする報告が見られる。トランスフォームされた乳腺上皮由来の S115 細胞株は、 $\beta$ インテグリンが N-glycosylation をうけており、特にポリ-N-ラクトサミノグリカン鎖の構造が重要であるという報告がある<sup>25</sup>。また、Zheng らによると、Nグリコシド型糖鎖の除去により、 $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンの分離が起こり、フィブリノーゲンに対する接着能が失われるという報告もある<sup>26</sup>。したがって、N-アセチルラクトサミン合成に重要な  $\beta 1, 4$ -GT が過剰発現された子宮体癌株においてはインテグリンの糖鎖修飾が積極的に行われ、インテグリンの機能が亢進することにより、細胞外基質との接着性も亢進している可能性がある。また、同様に卵巣癌細胞株においてもインテグリンの糖鎖修飾が低下することによりインテグリンの機能低下を招き、結果的に細胞外基質に対する接着能を低下させている可能性がある。今後、今回得られたトランスフェクタントにおけるインテグリンの発現とその糖鎖修飾について検討する必要があると考えられる。

ヌードマウスによる腹膜播種モデルにおける播種性転移能の検討においては、アンチセンス遺伝子を導入した R1 および R5 は転移巣の認められないマウスが存在したり、横隔膜への転移数がコントロールに比べて少ないことより  $\beta 1, 4$ -GT の抑制は転移能に対しても抑制的に作用することが示唆された。 $\beta 1, 4$ -GT の抑制によって腹膜播種転移巣の数が減少したことに対する分子機構を明らかにすることは今後の課題であるが、卵巣癌細胞表面の糖鎖であり、 $\beta 1, 4$ -GT が合成に関与している Lewis<sup>x</sup> 抗原が腹膜への転移に重要であるとする報告や<sup>27</sup>、中皮より分泌される細胞外基質であり、インテグリンのリガンドであるフィブロネクチンが卵巣癌細胞の運動を亢進するという報告もあり<sup>28</sup>、 $\beta 1, 4$ -GT により合成される糖鎖が卵巣癌細胞の転移能に関与している可能性が考えられる。

## 総括

女性性器癌において  $\beta 1, 4$ -ガラクトース転移酵素が細胞生物学的特性にどのように関与しているのかを明らかにする目的で、子宮体癌細胞に対しては  $\beta 1, 4$ -GT のセ

ンス遺伝子を導入し、また卵巣癌細胞に対してはアンチセンス遺伝子を導入し以下の事実を明らかにした。

1. 子宮体癌細胞においては  $\beta 1, 4$ -GT は細胞増殖能を亢進するが卵巣癌細胞では  $\beta 1, 4$ -GT は細胞増殖に関与していない。
2. 子宮体癌細胞、卵巣癌細胞のいずれにおいても  $\beta 1, 4$ -GT 発現の多寡は細胞外基質との接着性に正の相関を示した。
3. 卵巣癌細胞においては  $\beta 1, 4$ -GT を抑制することによりヌードマウスによる腹膜播種モデルにおける播種の広がりが抑制された。

以上の結果より、 $\beta 1, 4$ -GT は女性性器癌細胞の浸潤・転移という細胞特性に関与していることが明らかとなった。

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、また御指導御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室野澤志朗教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、多大なる御指導、御鞭撻をいただきました近畿大学理工学部岩森正男教授、慶應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謝いたします。

なお、本研究の一部は第52回日本産科婦人科学会総会(2000年、徳島)、第42回日本臨床細胞学会秋期大会(2003年、横浜)において発表した。

## 文 献

- 1) Yoshiki J, Kubushiro K, Tsukazaki K, Udagawa Y, Nozawa S, Iwamori M : High expression of uridine diphosphate-galactose : Lc3Cer beta 1-3 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 : 669-77, 1997
- 2) Ma J : Expression of human  $\beta 1, 4$ -galactosyltransferase in gynecologic cancer cell lines. *Int J Oncology* 11 : 117-122, 1997
- 3) Uemura M, Winant RC, Sikic BI, Brandt AE : Characterization and immunoassay of human tumor-associated galactosyltransferase isoenzyme II. *Cancer Res* 48 : 5325-34, 1988
- 4) Uemura M, Winant RC, Brandt AE : Immunoassay of serum galactosyltransferase isoenzyme II in cancer patients and control subjects. *Cancer Res* 48 : 5335-41, 1988
- 5) Podolsky DK, Weiser MM : Galactosyltransferase activities in human sera : detection of a cancer-associated isoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 65 : 545-51, 1975
- 6) Uemura M, Sakaguchi T, Uejima T, Nozawa S, Narimatsu H : Mouse monoclonal antibodies which recognize a human (beta 1-4)galactosyl-transferase associated with tumor in body fluids. *Cancer Res* 52 : 6153-7, 1992
- 7) Nozawa S, Yajima M, Sakuma T, Udagawa Y, Kiguchi K, Sakayori M, Narisawa S, Iizuka R, Uemura M : Cancer-associated galactosyltransferase as a new tumor marker for ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Res* 50 : 754-9, 1990
- 8) Udagawa Y, Aoki D, Ito K, Uejima T, Uemura M, Nozawa S : Clinical characteristics of a newly developed ovarian tumour marker, galactosyltransferase associated with tumour (GAT). *Eur J Cancer* 34 : 489-95, 1998
- 9) Suminami Y, Kishi F, Sekiguchi K, Kato H : Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 181 : 51-8, 1991
- 10) Tyrrell D, James P, Rao N, Foxall C, Abbas S, Dasgupta F, Nashed M, Hasegawa A, Kiso M, Asa D, et al. : Structural requirements for the carbohydrate ligand of E-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 : 10372-6, 1991
- 11) Iwai K, Ishikura H, Kaji M, Sugiura H, Ishizu A, Takahashi C, Kato H, Tanabe T, Yoshiki T : Importance of E-selectin (ELAM-1) and sialyl Lewis(a) in the adhesion of pancreatic carcinoma cells to activated endothelium. *Int J Cancer* 54 : 972-7, 1993
- 12) Evans SC, Lopez LC, Shur BD : Dominant negative mutation in cell surface beta 1, 4-galactosyltransferase inhibits cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol* 120 : 1045-57, 1993
- 13) Lopez LC, Youakim A, Evans SC, Shur BD : Evidence for a molecular distinction between Golgi and cell surface forms of beta 1, 4-galactosyltransferase. *J Biol Chem* 266 : 15984-91, 1991
- 14) Shi X, Amindari S, Paruchuru K, Skalla D, Burkin H, Shur BD, Miller DJ : Cell surface beta-1, 4-galactosyltransferase-I activates G protein-dependent exocytotic signaling. *Development* 128 : 645-54, 2001
- 15) Rebeiz M, Miller DJ : Porcine sperm surface beta1, 4galactosyltransferase binds to the zona pellucida but is not necessary or sufficient to mediate sperm-zona pellucida binding. *Mol Reprod Dev* 54 : 379-87, 1999
- 16) Masri KA, Appert HE, Fukuda MN : Identification of the full-length coding sequence for human galactosyltransferase (beta-N-acetylglucosaminide : beta 1, 4-galactosyltransferase). *Biochem Biophys Res Commun* 157 : 657-63, 1988
- 17) Ishiwata I, Nozawa S, Inoue T, Okumura H : Development and characterization of established cell lines from primary and metastatic regions of human endometrial adenocarcinoma. *Cancer Res* 37 : 1777-

85, 1977

- 18) Yajima M : Establishment of an ovarian mesonephroid carcinoma cell line (RMG-II) and production of anti-RMG-II monoclonal antibody. *J Keio Med Soc* 66 : 817-826, 1989
- 19) Humphreys-Beher MG, Schneyer CA, Zelles T : Alpha-lactalbumin acts as a bimodal regulator of rat parotid acinar cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 147 : 174-81, 1987
- 20) Humphreys-Beher MG, Schneyer CA, Kidd VJ, Marchase RB : Isoproterenol-mediated parotid gland hypertrophy is inhibited by effectors of 4 beta-galactosyltransferase. *J Biol Chem* 262 : 11706-13, 1987
- 21) Hinton DA, Evans SC, Shur BD : Altering the expression of cell surface beta 1, 4-galactosyltransferase modulates cell growth. *Exp Cell Res* 219 : 640-9, 1995
- 22) Tsuda T, Ikeda Y, Taniguchi N : The Asn-420-linked sugar chain in human epidermal growth factor receptor suppresses ligand-independent spontaneous oligomerization. Possible role of a specific sugar chain in controllable receptor activation. *J Biol Chem* 275 : 21988-94, 2000
- 23) Fernandes H, Cohen S, Bishayee S : Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association : a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/DeltaEGFR) expressed in cancer cells. *J Biol Chem* 276 : 5375-83, 2001
- 24) Konishi A, Berk BC : Epidermal growth factor receptor transactivation is regulated by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 278 : 35049-56, 2003
- 25) Leppa S, Heino J, Jalkanen M : Increased glycosylation of beta 1 integrins affects the interaction of transformed S115 mammary epithelial cells with laminin-1. *Cell Growth Differ* 6 : 853-61, 1995
- 26) Zheng M, Fang H, Hakomori S : Functional role of N-glycosylation in alpha 5 beta 1 integrin receptor. De-N-glycosylation induces dissociation or altered association of alpha 5 and beta 1 subunits and concomitant loss of fibronectin binding activity. *J Biol Chem* 269 : 12325-31, 1994
- 27) Kiguchi K, Iwamori M, Mochizuki Y, Kishikawa T, Tsukazaki K, Saga M, Amemiya A, Nozawa S : Selection of human ovarian carcinoma cells with high dissemination potential by repeated passage of the cells *in vivo* into nude mice, and involvement of Le(x)-determinant in the dissemination potential. *Jpn J Cancer Res* 89 : 923-32, 1998
- 28) Rieppi M, Vergani V, Gatto C, Zanetta G, Allavena P, Taraboletti G, Giavazzi R : Mesothelial cells induce the motility of human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer* 80 : 303-7, 1999