

主論文の要旨

***N*-acetylglucosaminyltransferase IVa promotes
invasion of choriocarcinoma**

〔*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 IVa は絨毛癌の浸潤を促進する〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

西野 公博

【緒言】

絨毛性疾患とは、胎盤を構成する栄養膜細胞が異型を示し増殖する疾患群であり、胞状奇胎、侵入胞状奇胎、絨毛癌、placental site trophoblastic tumour (PSTT)、epithelioid trophoblastic tumour (ETT) に分類される。胞状奇胎は受精障害による異常妊娠であるが、その他の絨毛性疾患は絨毛性腫瘍 (gestational trophoblastic neoplasia, GTN) と呼ばれ、局所浸潤や遠隔転移する。GTNのうち頻度が高いのは侵入胞状奇胎と絨毛癌であり、これらは化学療法が非常に奏功するが、絨毛癌の約10%は化学療法に抵抗性を示す難治性症例であり、予後不良である。

糖蛋白の糖鎖修飾には N 型糖鎖修飾と O 型糖鎖修飾の二つがある。絨毛性疾患から共通して分泌されるヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin, hCG) は糖蛋白ホルモンであり、糖鎖修飾を受けることにより機能が変化することや、さらに生理的、病理的な状況により糖鎖修飾のパターンが異なることが分かってきた。すなわち、正常妊娠や胞状奇胎では単分岐、または二分岐型の N 型糖鎖修飾をうけた hCG が検出されるのみであるが、侵入胞状奇胎や絨毛癌では、それに加えて三分岐、または異常二分岐型の N 型糖鎖修飾をうけた hCG も検出される。侵入胞状奇胎や絨毛癌にのみ検出される三分岐、または異常二分岐型の高分岐型 N 型糖鎖は、単分岐、または二分岐型の N 型糖鎖を基質として、N-アセチルグルコサミン転移酵素 IV (N-acetylglucosaminyltransferase IV, GnT-IV) という、N-アセチルグルコサミン分岐を β 1,4 結合で付加する糖転移酵素によって生合成される。GnT-IV は、これまで膵癌、腎癌、肝癌、大腸癌などで、悪性化への関与が報告されてきた。絨毛癌に関しては、高松らが、GnT-IV のアイソフォームの一つである GnT-IVa の mRNA 発現レベルが正常胎盤と比較して絨毛癌において高いことを報告し、新美らは、侵入胞状奇胎や絨毛癌組織において GnT-IVa 蛋白が強発現していること、また、絨毛癌細胞株を用いた GnT-IVa 発現抑制モデル実験により、GnT-IVa が絨毛癌の浸潤に関与する可能性を示した。

今回、絨毛癌における GnT-IVa の役割をさらに理解するため、絨毛癌細胞株 Jar を用いて GnT-IVa 過剰発現モデル実験を行った。さらに、絨毛癌悪性化に寄与する、hCG 以外の GnT-IVa 糖鎖修飾標的蛋白を探索した。

【方法】

(1) 侵入胞状奇胎 (n = 4) と絨毛癌 (n = 7) の組織標本を用いて GnT-IVa 免疫染色、及び、GnT-IVa によって修飾される β 1,4 結合型 N-アセチルグルコサミン分岐を認識する *Griffonia simplicifolia* lectin-II (GSL-II) レクチン染色を行った。(2) 絨毛癌細胞株 Jar における GnT-IVa 遺伝子導入株 (Jar-GnT4a) とコントロール遺伝子導入株 (mock) とを用いた機能解析として、(a) 細胞増殖能、接着能、遊走能、浸潤能アッセイ (*in vitro*)、(b) ノードマウス (5 週齢、n = 8) への Jar 皮下注射による腫瘍形成アッセイ (*in vivo*) を行った。(3) GnT-IVa 糖鎖修飾標的蛋白の探索のため、(a) Jar の細胞溶解液、及び培養上清に対する GSL-II、及び *Datura stramonium* lectin (DSA) レクチンブロッキング、(b) Jar の細胞溶解液に対する抗インテグリン β 1 (Int β 1) 抗体を用いた免疫沈降、及び

DSA レクチンブロッティング、(c) Jar の細胞溶解液、及び培養上清に対する DSA レクチン沈降、及び DSA レクチンブロッティングと Nano-LC/MS/MS を用いたゲルバンド解析、(d) Jar の細胞溶解液、及び培養上清に対する抗 lysosome-associated membrane glycoprotein 2 (LAMP-2) 抗体を用いた免疫沈降、及び DSA レクチンブロッティング、(e) Jar に対する抗 LAMP-2 抗体を用いたフローサイトメトリー分析を行った。

【結果】

(1) GSL-II 染色と GnT-IVa 染色パターンは侵入胞状奇胎標本 (図 1A、C)、及び絨毛癌組織標本 (図 1B、D) でそれぞれ一致し、いずれも強い反応性を示した。(2) (a) Jar において GnT-IVa 過剰発現 (図 2A) により細胞増殖能は変化しなかった (図 2B) が、細胞遊走能と浸潤能が統計学的有意に増加し (2.5 倍および 1.4 倍、図 2C)、細胞外基質 (フィブロネクチン、コラーゲン I、コラーゲン IV) への接着能も統計学的有意に増加した (2.88 倍、2.86 倍および 1.48 倍、図 2D)。(b) mock と比べて Jar-GnT4a は、皮下注射後の腫瘍形成能が有意に高く ($P=0.0407$)、生存率が低い (62.5% vs 12.5%) 傾向を認めた (図 2E、F)。(3) (a) GSL-II、及び DSA レクチンブロッティングの結果、Jar の細胞溶解液、及び培養上清において、レクチンに反応する複数の GnT-IVa 糖鎖修飾標的蛋白が明らかとなった (図 3A、B 矢印)。(b) mock 由来よりも Jar-GnT4a 由来の Int β 1 において DSA への反応性が強かった (図 3C)。(c) 細胞溶解液、及び培養上清において、mock と Jar-GnT4a 由来の DSA レクチン沈降産物で、DSA への反応性に差がある複数のバンドが認められ (図 4A、B 矢頭)、さらに Nano-LC/MS/MS を用いてゲルバンド解析した。複数の蛋白の中から、細胞溶解液と培養上清の両方から検出された LAMP-2 に着目した。(d) mock 由来よりも Jar-GnT4a 由来の LAMP-2 において DSA への反応性が強かった (図 4C、D)。(e) Jar の細胞膜に LAMP-2 が存在することを確認した (図 4E)。

【考察】

(1) の結果から、侵入胞状奇胎と絨毛癌組織において、GnT-IVa により生合成され GSL-II に反応する高分岐型 N 型糖鎖が存在することが示唆された。(2) の結果から、GnT-IVa 過剰発現により、絨毛癌細胞の細胞外基質への接着能、遊走能、浸潤能が促進され、GnT-IVa が絨毛癌の悪性化促進に寄与していることが示唆された。その要因として、(3) の結果から、GnT-IVa が細胞膜上の Int β 1 や LAMP-2 の糖鎖を高分岐型に修飾していることが示唆された。培養上清中において、GnT-IVa 糖鎖修飾標的蛋白として LAMP-2 が検出されたことより、エクソソームなどの細胞外分泌小胞中に LAMP-2 が存在し絨毛癌転移に関与する可能性が考えられたが、今後の研究による解明が必要である。

【結論】

侵入胞状奇胎と絨毛癌において、GnT-IVa により生合成される高分岐型 N 型糖鎖が

存在し、Int β 1 や LAMP-2 などの GnT-IVa の糖鎖修飾標的蛋白を介し、GnT-IVa は絨毛癌の悪性化に関与している可能性が示唆された。