

フコシル化関連遺伝子GMDSの 大腸がん組織における変異について

三善英知

要旨

糖鎖の構成単糖の一つであるフコースを付加するフコシル化は、特にがんや炎症と深く関係することが古くから知られている。フコシル化は、種々のフコース転移酵素、そのドナー基質であるGDPフコース、そしてGDPフコースをゴルジ装置内に運ぶトランスポータによって制御される。我々は以前に大腸がん細胞HCT116においてGDPフコース合成に関わる酵素GMDS(GDP-mannose 4,6-dehydratase)の遺伝子変異によりフコシル化が完全欠損し、逆にがんの増殖・転移が促進されることを明らかにした。本研究では、ヒト大腸がん組織の原発巣および転移巣において、GMDSの変異がどの程度存在するのか検索するとともに、フコシル化欠損の有無をレクチン免疫染色で検討した。その結果、大腸がん組織の原発巣ではGMDSの変異は8.6%、転移巣では12.8%に見られ、正常の大腸組織では0%だった。また、リンパ節転移組織の1例において、フコシル化完全欠損を認めた。以上のことから、大腸がん細胞株で見られたGMDS変異による悪性形質転換は、実際の大腸がん組織でも存在することが示唆された。

1. はじめに

糖鎖とは、単糖が鎖状に繋がった分子であり、細胞表面上のタンパク質や脂質に結合し、その機能を調節している。多くの疾患で異常糖鎖が確認されており、糖鎖と疾患の関係が古くから報告されているが、中でも、フコースと呼ばれる単糖を付加する反応であるフコシル化

は特に癌と深く関係することが知られており、近年注目を集めている⁽¹⁾。フコシル化は、ゴルジ体内腔でフコース転移酵素によって行われるが、その際、材料となるGDP-フコースというドナー基質が必要不可欠となる(図1)。GDP-フコースは細胞質内で主に *de novo* 経路により合成され、その後、GDP-フコース特異的の輸送体によりゴルジ体内腔へ輸送される。我々は今までの研究により、細胞のフコシル化レベルは主にGDP-フコースの合成・輸送により制御されていることを明らかとしてきた^(2, 3)。

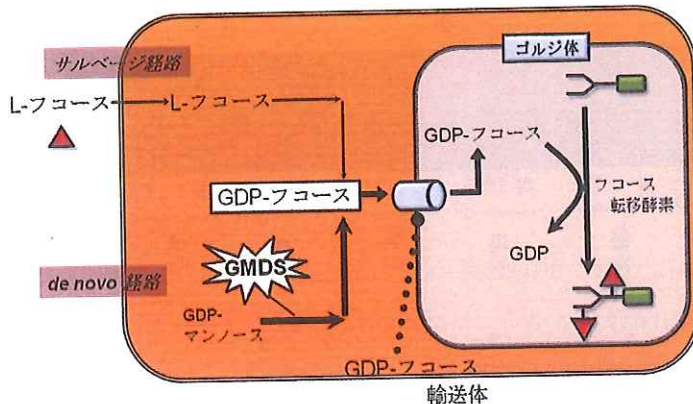


図1:フコシル化の反応経路

フコシル化糖鎖構造は癌化に伴い増加し、癌の進展を促進させることが知られている⁽⁴⁾。しかしながら、我々は大腸癌細胞株HCT116を用いた先行研究においてフコシル化が欠損することにより癌の進展が促進するという現象を見出し、今までに報告のない新たな癌進展経路を提唱している⁽⁵⁾。詳細な遺伝子解析により、HCT116細胞でのフコシル化欠損の原因はGDP-フコース合成酵素GDP-mannose 4,6-dehydratase (GMDS)の変異であることが明らかとなり、この細胞に野生型GMDSを導入しフコシル化を回復させると、癌の進展・転移が著しく抑制された。そこで本研究では、大腸がん組織117例(臨床病期Stage 0 4例、Stage I 16例、Stage II 41例、Stage IIIa 12例、Stage IIIb 6例、Stage IV 38例)を用いて、GMDSの変異を検索した⁽⁶⁾。また、組織アレイを用いたレクチン染色により、フコシル欠損の頻度に関しても検討し、大腸がんの病態との関連について検討した。

2. 大腸がん組織におけるGMDSの変異

参考文献5に示すGMDSのプライマーを用いて大腸がん周囲の正常組織24例、原発巣81例、転移巣39例におけるGMDSの変異をRT-PCRで検討した(図2)。GMDSの変異には、いくつかのエクソン欠損パターンが認められた。データには示さないが、これらの変異GMDSは全て酵素活性を持たないことを確認している。

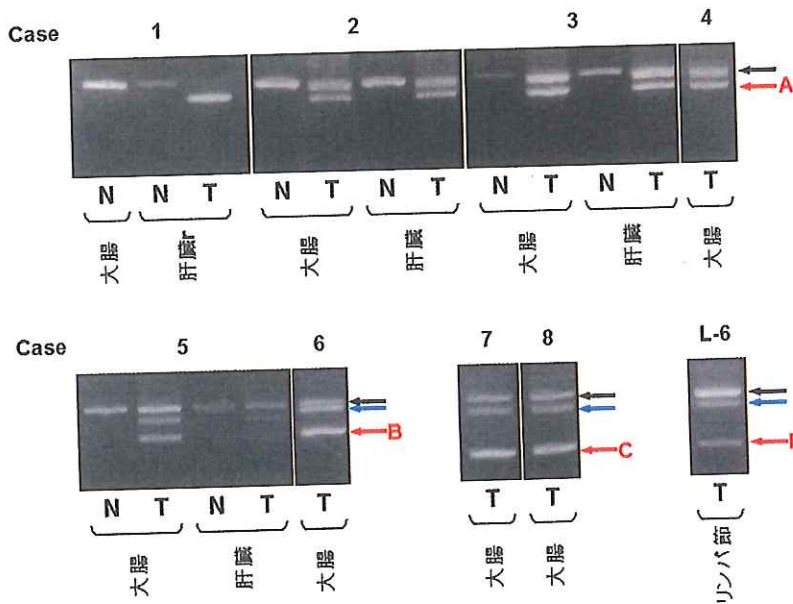


図2 RT-PCR法を用いたGMDSの変異検索

GMDSの変異にはA~D示す4つのパターンが認められた。黒線は野生型GMDSを、青線は非特異的なバンドを示す。Aはエクソン2-4の欠損、Bはエクソン5-7の欠損、Cはエクソン2-7の欠損、Dはエクソン3-7の欠損を示す。

全症例の解析結果のまとめを、Table I に示す。正常組織ではGMDSの変異は0/24例で0%、原発巣では7/81例で8.6%、転移巣では5/39例で12.8%だった。症例数の関係で、統計学的有意差は認められなかったが、やや転移巣でGMDS変異の頻度は高かった。また興味深いことに、肝転移巣でGMDSのHCT116細胞と同じパターンを示すホモの変異が見つかった。

Table 1 大腸がんにおけるGMDS変異の頻度

組織		症例	頻度 (%)
大腸の正常組織		0/24	0.0
原発巣		7/81	8.6
転移巣		5/39	12.8
	リンパ節	1/6	16.7
転移先臓器	肝臓	4/31	12.9
	その他	0/2	0.0

3 大腸がん組織を用いたレクチン染色による解析

GMDSが働かなければ、フコシル化反応のドナー基質GDP-フコースが産生できなくなり、全てのフコシル化が欠損することになる。そこで、フコシル化を全般的に認識するレクチンであるAALと抗GMDS抗体を用いて免疫染色を行った(図3)。その結果、GMDSが野生型であるCase 3では、GMDSとAALは共に強い陽性像を示した。一方、GMDSにヘテロの変異があったCase 1と2では、がん細胞が全般的にGMDS抗体で染色陽性となった。このことは、野生型とホモ欠損型が混在してRT-PCRでヘテロ変異に見えたのではなく、がん細胞全体がGMDSヘテロ変異をもつ可能性を示唆している。しかし、フコシル化を示すAAL染色に関しては、どちらも中程度の陽性像を示した。

次に、GMDSの変異があったCase 4と変異がなかったCase 5の原発巣と転移リンパ節でAALとGMDSの免疫染色を行った(図4)。その結果、大腸がんの原発巣ではGMDSの変異の有無にかかわらず、GMDSの高発現を認めたが、リンパ節転移巣ではGMDSは染色されず、AAL染色もムチンの非特異的な染色以外は完全に陰性となった。このことは、RT-PCRではがん細胞以外の細胞由来のバンドを検出するため、見かけ上はGMDSヘテロの変異に見えるが、実際には転移巣のがん細胞でGMDSにホモの変異が起こっていることを示唆する。しかも原発巣ではGMDSが高発現していることから、GMDSにホモの変異が入った細胞が偶然発生し、リンパ節転移に関与した可能性がある。

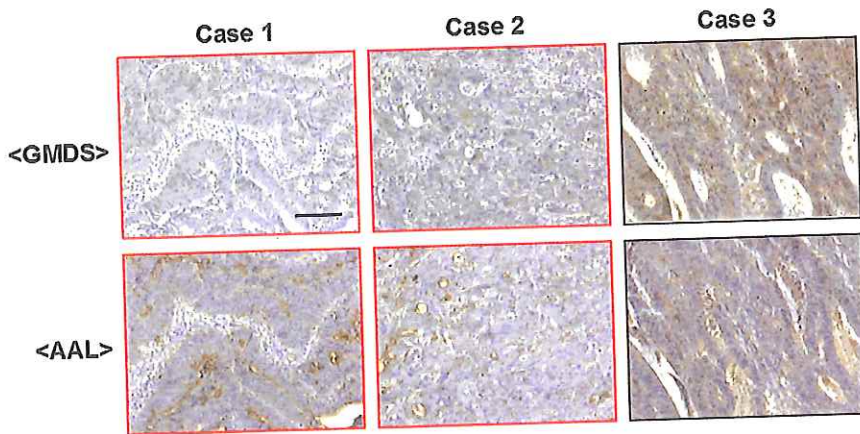


図3 AALとGMDS抗体を用いた大腸がん原発巣の免疫染色

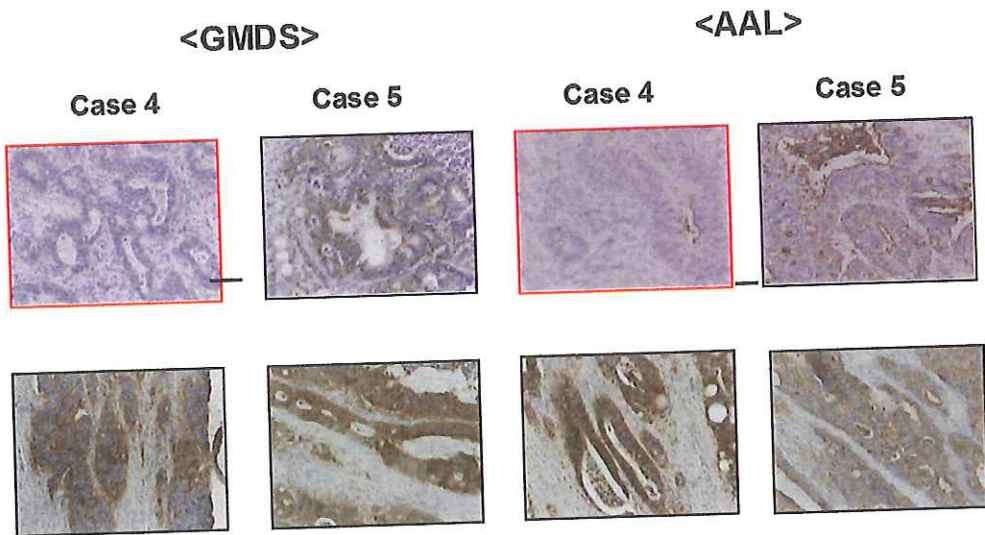


図4 GMDSの変異の有無による、大腸がん原発巣(下段)とリンパ節転移巣(上段)におけるGMDS抗体とAALによる免疫染色

Case 4 には、GMDSのヘテロの変異があり、Case 5には変異を認めなかった

4 組織アレイを用いたレクチン染色

AALは、上述のようにフコシル化全般を認識する。最近、J-オイルミルズ研究所の小林タ香らは、コアスコースを特異的に認識するPhoSL (Pholiota Squarrosa Lectin)というレクチンを同定した⁽⁷⁾。この2種類のレクチンを使って、大腸がん組織アレイのサンプルを免疫染色したところ、大腸がんの原発巣ではほとんどの症例で染色陽性を示したが、転移巣ではAALで約10%、PhoSLで約25%の陰性例を認めた(図5)。このことは、GMDSの変異だけでなく、コアフコースを生合成するフコース転移酵素(Fut8)の変異の可能性を示唆する。

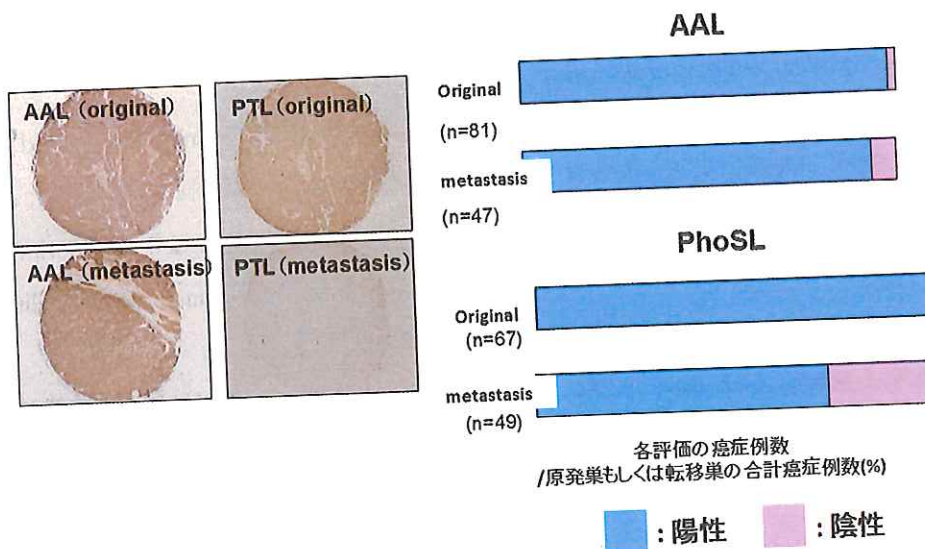


図5 大腸がん組織アレイを使ったAALとPhoSLの免疫染色
典型的な転移巣でPhoSL陰性となった症例を左に示す

5 おわりに

本研究により、大腸がん細胞HCT116に見られたGMDSの変異が、ヒトの大腸がん組織においても一定の頻度で検出されることがわかった。HCT116細胞では、フコシル化欠損によりTRAILやFasなどのNK細胞ががん細胞を殺す時に重要なシグナル伝達が障害され、腫瘍免疫監視機構から逃れることによって、大腸がんの転移・進展に関与する。同じメカニズムが、

実際のがんの転移機構に存在するのかもしれない。何故、フコシル化欠損が、これらのdeath signalを回避するかに関して、少しずつわかりつつある⁽⁸⁾。ただ、このメカニズムは非常に複雑で、糖鎖研究の奥の深さを感じさせる。最後になりましたが、本研究の推進にあたり研究室の森脇健太くん(現在、マサチューセッツ大学に留学中)と中山小太郎純友くん(阪大病院、臨床検査部)に深謝するとともに、本研究に対して研究助成いただいた(一財)杉山産業化学研究所の関係者の方々に、心から御礼申し上げます。

参考文献

1. Miyoshi E, Moriwaki K, and Nakagawa T. Biological function of fucosylation in cancer biology. *J. Biochem.* 2008; 143(6), 725-729.
2. Noda K, Miyoshi E, Gu J, Gao CX, Nakahara S, Kitada T, Honke K, Suzuki K, Yoshihara H, Yoshikawa K, Kawano K, Tonetti M, Kasahara A, Hori M, Hayashi N, and Taniguchi N. Relationship between elevated FX expression and increased production of GDP-L-fucose, a common donor substrate for fucosylation in human hepatocellular carcinoma and hepatoma cell lines. *Cancer Res.* 2003; 63, 6282-6289.
3. Moriwaki K, Noda K, Nakagawa T, Asahi M, Yoshihara H, Taniguchi N, Hayashi N, and Miyoshi E. A high expression of GDP-fucose transporter in hepatocellular carcinoma is as key factor for increases in fucosylation. *Glycobiology* 2007; 17(12), 1311-1320.
4. Kannagi R, Sakuma K, Miyazaki K, Lim KT, Yusa A, Yin J, and Izawa M. Altered expression of glycan genes in cancers induced by epigenetic silencing and tumor hypoxia: clues in the ongoing search for new tumor markers. *Cancer Sci.* 2010; 101(3):586-93.
5. Moriwaki K, Noda K, Furukawa Y, Ohshima K, Uchiyama A, Nakagawa T, Taniguchi N, Daigo Y, Nakamura Y, Hayashi N, and Miyoshi E. Deficiency of GMDS leads to escape from NK cell-mediated tumor surveillance through modulation of TRAIL signaling. *Gastroenterology* 2009; 137(1), 188-198.
6. Nakayama K, Moriwaki K, Imai K, Shinzaki S, Kamada Y, Murata K, Miyoshi E. (2013) Mutation of GDP-mannose-4,6-dehydratase in colorectal cancer. *PLOS ONE* 8(7),

e70298.

7. Kobayashi Y, Tateno H, Dohra H, Moriwaki K, Miyoshi E, Hirabayashi J, Kawagishi H. (2012) A novel core fucose-specific lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa*. *J Biol Chem.* 287(41), 33973-82.
8. Moriwaki K, Shinzaki S, Miyoshi E. (2011) GMDS deficiency renders colon cancer cells resistant to TRAIL receptor- and CD95-mediated apoptosis by inhibiting complex II formation. *J. Biol. Chem.* 286(50), 43123-43133.