

プロテオミクス的手法を応用した 消化器癌関連糖タンパク質の解析

中田 宗宏*

Proteomic Analysis of Digestive Cancer-Related Glycoproteins

by

Munehiro NAKATA

Abstract

Cell surface glycosylation changes dramatically during oncogenesis. Among the many types of carbohydrates, sialic acid is extremely important in the development of cancer, because enhanced sialylation is thought to play an important role in tumor progression and metastasis. To investigate the clinicopathological significance of sialoglycoconjugates in various gastrointestinal cancers, we performed histochemical analysis using sialic acid-binding lectins. Primary and metastatic cancer tissues were subjected to histochemical staining using *Maackia amurensis* leucoagglutinin (MAL). In gastric cancers, a high level of MAL staining was significantly related to unfavorable pathological features. Next, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis followed by blotting MAL-positive glycoproteins onto a PVDF membrane was performed to characterize the cancer-related sialoglycoproteins in gastric cancer. MAL-positive glycoproteins were found in samples from the cancerous region but not in those from non-cancerous region. These glycoproteins have molecular weights of approximately 200 kDa or higher, and have diverse pI values probably due to the degree of sialylation. Thus, the aberrant expression of sialoglycoconjugates might play an important role in tumor progression and may be useful as one of the clinicopathological factors in various gastrointestinal cancers.

Keywords: Glycoprotein, Sialic acid, Lectin, Cancer, Metastasis

1. 緒言

癌の予後因子として重要な転移に、細胞表面複合糖質の糖鎖末端にあるシアル酸残基が関与しているという知見が蓄積されつつある。しかし、その複合糖質の本質やシアル酸残基の役割に関しては未解明である。我々はこれまで、組織化学的および生化学的手法を駆使して胃癌などの各種消化器癌組織に発現するシアル酸含有複合糖質を調べてきた¹⁻³⁾。その結果、ある種のシアル酸認識レクチンで検出される複合糖質の発現が癌の転移や患者の予後と有意に相関することを見出し、さらに胃癌では、それがシアル酸含有糖タンパク質であることも見出した。そこで本研究では、タンパク質の同定に用いられるプロテオミクス的手法を、この癌関連糖タンパク質の解析に応用し、その生化学的本質の解明や各種消化器癌における癌関連糖タンパク質の系統的理解を目指した。

2. 実験方法

2.1. 組織染色

各種組織試料から連続切片を作製し、各種シアル酸認識レクチンを用いて免疫組織化学的にシアル酸含有複合糖質の組織内分布や細胞内分布、その発現レベルを解析した。組織化学的に得られた結果と臨床病理学的データとを、 χ^2 検定や単因子分析、多因子分析などの統計学的手法により比較検討した。

2.2. ウェスタン・ブロッティング法

胃癌臨床症例における癌部および非癌部組織を可溶化し、二次元電気泳動法を用いて抽出液中に含まれるタンパク質を分離した。これをウェスタン・ブロッティング法によりPVDF膜に転写した後、シアル酸認識レクチンを用いてシアル酸含有糖タンパク質を検出した。癌部および非癌部試料で検出スポットを比較検討し、癌特異的に発現する糖タンパク質を特定した。

3. 結果と考察

まず、胃がん患者および乳頭部がん患者より術中採取された新鮮切除標本を用い、そのがん部および非がん部組織に発現する糖鎖を、種々のレクチンやモノクローナル抗体を用いた組織化学的手法を用いて詳細に解析し比較検討した。その結果、シアル酸結合レクチンの一種であるイヌエンジュマメレクチン (*Maackia amurensis* leucoagglutinin, MAL) で認識される糖鎖が胃および乳頭部のがん部組織に発現しており (Fig. 1)、さらに臨床病理学的な諸因子と統計学的に比較検討した結果、その糖鎖の発現が患者の予後と深く関係していることが明らかとなった (Table 1)。また、ムチンのシアル酸含有糖鎖を抗原の一部とするモノクローナル抗体を用いた乳頭部組織の解析においても、がん部組織におけるその抗原の強発現ががんの浸潤や転移と相関し、予後に強く影響を与えることを明らかにした⁴⁾。

* 工学部生命化学科 助教授・医博

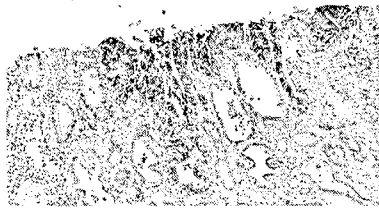


Figure 1. MAL-staining of gastric cancer

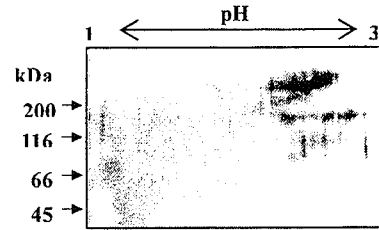


Figure 2. 2D-PAGE analysis of MAL-positive glycoproteins in gastric cancer

Table 1. Multivariate Cox regression of survival

Variables	P	Hazard ratio
MAL-staining		
High vs Low	0.0096	4.72
Depth of invasion		
T3 vs T1+T2	0.0003	7.46
Venous invasion		
Positive vs Negative	0.0370	4.02

次に、胃組織に関して、二次元電気泳動とレクチン-ウエスタンブロットを組み合わせた生化学的解析を行った。その結果、胃の癌部組織では、非癌部組織には認められない分子量約 200 kDa の酸性糖タンパク質が発現していることが明らかとなった (Figure 2)。本研究の成果は、癌病態におけるシアル酸含有糖タンパク質の役割解明だけでなく、各種消化器癌症例の転移予測や予後予測を可能とする新規腫瘍マーカーの開発にもつながると期待される。

謝辞

本研究は、2005 年度工学部研究教育補助金の助成を受けて行われた。

参考文献

- 1) Inagaki Y, Tang W, Guo Q, Kokudo N, Sugawara Y, Karako H, Konishi T, Nakata M, Nagawa H, Makuuchi M: Sialoglycoconjugate expression in primary colorectal cancer and metastatic lymph node tissues. *Hepato-Gastroenterology*, in press.
- 2) Tang W, Guo Q, Usuda M, Kokudo N, Seyama Y, Minagawa M, Sugawara Y, Nakata M, Kojima N, Makuuchi M: Histochemical expression of sialoglycoconjugates in carcinoma of the papilla of Vater. *Hepato-Gastroenterology* 52, 67-71, 2005.
- 3) Tang W, Mafune K, Nakata M, Konishi T, Kojima N, Mizuochi T, Makuuchi M: Association of histochemical expression of *Maackia amurensis* leucoagglutinin-positive glycoconjugates with behaviour of human gastric cancer. *Histopathology* 42, 239-245, 2003.
- 4) Zhang K, Tang W, Qu X, Guo Q, Inagaki Y, Seyama Y, Abe H, Gai R, Kokudo N, Sugawara Y, Nakata M, Makuuchi M: KL-6 mucin in metastatic liver cancer tissues from primary colorectal carcinoma. *Hepato-Gastroenterology*, in press.
- 5) Guo Q, Tang W, Inagaki Y, Midorikawa Y, Kokudo N, Sugawara

Y, Nakata M, Konishi T, Nagawa H, Makuuchi M: Clinical significance of subcellular localization of KL-6 mucin in primary colorectal adenocarcinoma and metastatic tissues. *World J Gastroenterol* 12, 54-59, 2006.

- 6) Tang W, Inagaki Y, Kokudo N, Guo Q, Seyama Y, Nakata M, Imamura H, Sano K, Sugawara Y, and Makuuchi M: Aberrant expression of KL-6 in carcinoma of the ampulla of Vater: Association with cancer progression. *World J Gastroenterol* 11, 5450-5454, 2005.