

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	機能再建・再生科学領域 泌尿器移植再生医学教育研究分野 氏名 三上 穰太郎
<p>I-branching <i>N</i>-acetylglucosaminyltransferase regulates prostate cancer invasiveness by enhancing <math>\alpha 5\beta 1</math> integrin signaling (I-branching glycan はインテグリンシグナルを活性化し前立腺癌の浸潤を亢進する)</p>	
<p><b>【目的】</b> 細胞表面に発現している複合糖鎖は細胞の悪性化に伴って大きく変化し、さらに浸潤、転移の過程で重要な役割を果たすことが知られている。I-branching <i>N</i>-acetylglucosaminyl-transferase (GCNT2) は GlcNAc1-6Gal の分岐型糖鎖修飾を行う酵素であり、ポリラクタサミン構造 (i 抗原) から I-抗原を形成する。GCNT2 の発現は乳癌の悪性度と関連するとの報告があるものの、前立腺癌を含め GCNT2 の癌細胞における機能についてはほとんど検討されていない。本研究では、GCNT2 の発現と前立腺癌の悪性度との関係を明らかにし、GCNT2 が前立腺癌細胞の浸潤過程において果たす役割について検討した。</p> <p><b>【方法】</b> 2005 年から 2011 年の間に前立腺全摘除術を受けた症例の中から 156 例を無作為に抽出し、パラフィン包埋切片に対して抗 GCNT2 モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色を行った。GCNT2 の染色性と病理組織学的因子および前立腺全摘除術後の PSA 再発との関連性を検討した。 次に、前立腺癌の浸潤過程における GCNT2 の役割を調べるため、ヒト前立腺上皮細胞株である RWPE-1、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3、LNCaP、DU-145、PC-3 の GCNT2 発現抑制細胞 PC-3siGCNT2、DU-145 の GCNT2 ノックダウン細胞株 DU145GCNT2KD を使用して以下の実験を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>① 前立腺癌細胞の <i>in vitro</i> proliferation assay、migration assay、invasion assay および wound healing assay</li> <li>② fibronectin 上での adhesion assay と spreading assay</li> <li>③ GCNT2 により形成される I-抗原が <i>O</i>-glycan、<i>N</i>-glycan、糖脂質のどの担体上に発現しているのかを調べるため、糖鎖合成阻害薬を用いた抑制実験を行った。<i>O</i>-glycan、<i>N</i>-glycan、糖脂質合成阻害剤は各々 bebzyl-<math>\alpha</math>-GalNAc (BAG)、tunicamycin (TM)、DL-threo-1-Phenyl-2-palminoilamino-3-morpholino-1-propanol hydrochloride (PPMP) を使用した。</li> <li>④ GCNT2 および I-抗原の発現が <math>\alpha 5\beta 1</math> integrin-fibronectin を介したシグナル伝達に及ぼす影響について検討した。</li> </ol> <p><b>【結果】</b> 前立腺全摘標本における GCNT2 陽性率は pT2 で 67.4%であったが、被膜外浸潤を認める pT3 以上の症例においては 82.8%と有意に高率であった。また、リンパ節転移を有する 2 症例はいずれも GCNT2 陽性であった。GCNT2 陽性群は陰性群に比べ術後 PSA 再発率が有意に高かった。多変量解析の結果、GCNT2 の染色性は margin status、initial PSA と共に独立した PSA 再発の危険因子であった。以上より、GCNT2 の発現は前立腺癌の浸潤性や悪性度に関与することが示唆された。 GCNT2 高発現前立腺癌細胞株は低発現株に比べ遊走能と浸潤能が有意に亢進してい</p>	

たが、両者の間で epithelial-mesenchymal transition (EMT) marker の発現に差は認めなかった。また、糖鎖合成阻害剤添加による検討によって、I-抗原は主に *O*-glycan と糖脂質上に存在することを確認した。

GCNT2 高発現株と低発現株との間で fibronectin をコートしたプレート上での接着能に差を認めなかったが、GCNT2 高発現株で細胞伸展が活発であった。そこで、代表的 Extracellular matrix (ECM) protein である fibronectin とそのレセプターである  $\alpha 5 \beta 1$  integrin に注目した。GCNT2 の発現により  $\alpha 5 \beta 1$  integrin の構造や発現量に変化は認めなかったため、 $\alpha 5 \beta 1$  integrin と fibronectin の接着により細胞内シグナルの活性化に変化が起きている可能性が示唆された。細胞接着により活性化される細胞内シグナルとして、FAK と AKT が知られているので、GCNT2 高発現株および低発現株において、fibronectin による FAK, AKT の活性化を Western blot 法により確認したところ、FAK のリン酸化に差は認めなかったが、AKT のリン酸化は GCNT2 低発現株で優位に抑制されていることが判明した。このことから、I-抗原の発現が AKT のリン酸化を介して癌細胞の浸潤能を増強していることが明らかとなった。

さらに、GCNT2 高発現株に対して *O*-glycan と糖脂質の合成阻害剤処理を行った後に再度浸潤能と AKT のリン酸化を検証したところ、*O*-glycan 上の I-抗原は細胞遊走能に関与し、糖脂質上の I-抗原は  $\alpha 5 \beta 1$  integrin-fibronectin を介した PI3K/AKT 活性化と細胞遊走能に関与することが示唆された。

#### 【結論】

GCNT2 は *O*-glycan と糖脂質上の I-抗原合成に関与し、その発現は前立腺癌の病理学および臨床的悪性度と密接に関連していた。また、前立腺癌細胞上に発現した I-抗原は  $\alpha 5 \beta 1$  integrin-fibronectin を介する AKT のリン酸化を促進し、前立腺癌細胞の浸潤性を増強した。