

論文審査の要旨

報告番号	総研第 676 号	学位申請者	近藤 清貴
審査委員	主査	井戸 章雄	学位 博士 (医学) 歯学・学術)
	副査	橋口 照人	副査 石塚 賢治
	副査	大塚 隆生	副査 谷本 昭英

Identification of distinct N-glycosylation patterns on extracellular vesicles from small-cell and non-small-cell lung cancer cells

(小細胞肺癌および非小細胞肺癌細胞由来の細胞外小胞における N 結合型糖鎖構造の違いの同定)

細胞外小胞 (small extracellular vesicles: sEV) は細胞が放出する 50~200 nm サイズの脂質二重膜の小胞で、mRNA、micro-RNA、DNA、蛋白質を内包している。sEV はそれらの分子を細胞間で伝達しているとされるが、癌細胞においては増殖、転移に関与することが明らかとなっている。既報では sEV の膜蛋白質の種類によって、腫瘍細胞の転移部位が決定されるという報告がある。また、sEV は健常者と癌患者、腫瘍と非腫瘍組織、細胞株間で内包される分子が異なることも報告されており、腫瘍マーカーや薬剤輸送といった臨床応用に関する研究も進められている。sEV の膜蛋白質は、その多くが N 結合型糖鎖で修飾されているが、その N 結合型糖鎖の構造は同じ蛋白質であっても由来する臓器の違いによって、また同じ臓器の細胞であっても悪性良性の違いによって異なる構造を有することが解明されている。しかし、癌細胞由来の sEV の N 結合型糖鎖の構造が、由来する細胞の種類や病態と関連しているかどうかについては未だ不明な点が多い。そこで我々は、組織学的に異なる肺癌細胞株から放出される sEV の N 結合型糖鎖の比較解析を行い、sEV の N 結合型糖鎖が組織型を反映しているかについて検証した。

段階的遠心分離で細胞培養液から回収した sEV を Western blot と透過型電子顕微鏡で確認した。回収した sEV をレクチンで pull down しプロテオーム解析で sEV に含まれる蛋白質を確認した。さらに sEV から酵素を用いて N 結合型糖鎖を遊離させ High Performance Liquid Chromatography で分離回収、TOF-MS で質量分析し、得られた情報をデータベースで照合し各細胞株由来の sEV に含まれる主要な糖鎖構造を決定した。プロテオーム解析で判明した蛋白質に糖鎖解析で確認した主要な N 結合型糖鎖が修飾されているかを確認するため、sEV を対象となる蛋白質の抗体で免疫沈降した後、酵素で N 結合型糖鎖を遊離させ糖鎖構造を解析した。

結果以下の知見が確認された

1. 非小細胞肺癌由来の sEV の N 結合型糖鎖は、二分岐、三分岐および core fucose を伴う糖鎖構造が主な構造であった。
2. 小細胞肺癌由来の sEV の N 結合型糖鎖は antennal fucose、LacdiNAc、bisecting GlcNAc を有しており、それらの構造は非小細胞肺癌由来の sEV では、ほとんど確認されなかった。
3. 小細胞肺癌由来の sEV の N 結合型糖鎖の構造は脳で確認される構造と類似していた。
4. 小細胞肺癌と非小細胞肺癌由来の sEV の蛋白質に関して比較解析した結果、非小細胞肺癌由来の sEV において Integrin $\alpha 6 \beta 4$ が特異的であった。
5. 非小細胞肺癌由来の sEV の Integrin $\alpha 6$ に修飾される N 結合型糖鎖は二分岐、三分岐および core fucose を伴う構造が主な構造であった。

以上より、本研究では、小細胞肺癌と非小細胞肺癌由来の sEV を比較した結果、Integrin およびそこに修飾される N 結合型糖鎖が異なることを明らかにした。これは sEV が組織の違いを反映しており、新たな腫瘍マーカーとなり得る可能性を示唆する重要な研究である。

よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。