



Glycosylation controls cooperative PECAM-VEGFR2- β 3 integrin functions at the endothelial surface for tumor angiogenesis

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-06-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 今牧, 理恵 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000272

学 位 論 文

Glycosylation controls cooperative PECAM-VEGFR2- β 3 integrin functions at the endothelial surface for tumor angiogenesis

腫瘍の血管新生は糖鎖依存的な PECAM-VEGFR2- β 3 インテグリン

複合体機能で調節される

福島県立医科大学大学院研究生

分子調節学専攻

今牧 理恵

論文内容要旨 (和文)

学位論文 題名	Glycosylation controls cooperative PECAM-VEGFR2-β3 integrin functions at the endothelial surface for tumor angiogenesis 腫瘍の血管新生は糖鎖依存的な PECAM-VEGFR2- β 3 インテグリン複合体機能で調節される
<p>がんの血管新生阻害を目的として、VEGF(血管内皮細胞増殖因子)/VEGFR(血管内皮細胞増殖因子受容体)経路をターゲットにした阻害剤の開発が試みられている。効果的な薬剤開発のためには腫瘍血管新生に関する知見を蓄積することが重要である。</p> <p>本研究では、以下に述べるように、糖鎖依存的な腫瘍血管新生の調節機構を明らかにした。シアル酸転移酵素の一つである ST6Gal I はシアル酸 α2,6 ガラクトース糖鎖末端を生合成する。ST6Gal I を欠損した <i>St6gal1</i>^{-/-} マウスにルイス肺癌細胞を接種すると、腫瘍内血管の内皮細胞がアポトーシスを起こし、血管新生が減少することを示した。我々は、ST6Gal I を欠損させると血管内皮細胞の接着分子である PECAM(血小板内皮細胞接着分子)の膜表面上における安定性が減少することを示した。本研究では、ST6Gal I 欠損の条件下では PECAM-VEGFR2-β3 インテグリンの複合体の機能低下が見られることを示した。具体的には、<i>St6gall1</i>^{-/-} マウスから単離した血管内皮細胞の膜表面において PECAM-VEGFR2 複合体が消失することが示された。さらに、VEGF の細胞内への取り込み及び VEGFR2 依存性のシグナルの上昇がみられた。また、<i>St6gall1</i>^{-/-} 血管内皮細胞において細胞-細胞外マトリックス間の接着低下に伴うアポトーシス、すなわちアノイキスの上昇が観察された。このことから、α2,6-シアル酸残基の欠損により、細胞-細胞外マトリックス間の接着に関わるインテグリンのシグナルの調節不全が示唆された。また、本来 PECAM を発現していない細胞に PECAM を発現させると細胞膜表面のβ3 インテグリン量が増加した。このことは、血管内皮細胞の膜表面の PECAM 量とβ3 インテグリンの細胞表面量の関連を示唆している。これらの結果から、α2,6 シアル酸残基の欠損により、PECAM-VEGFR2-β3 インテグリン複合体の血管内皮細胞膜表面での安定性が減少し、その結果、異常なシグナルが細胞内に伝達され、腫瘍の増大が停滞することが明らかとなった。</p>	

(oncogene、2018年5月2日、37巻、4287-4299)

目次

論文内容要旨	2
略語	4
序論	5
方法	8
結果	15
考察	21
引用文献	24
図および表	29
謝辞	40

略語

EGFR	: Epidermal growth factor receptor
FAK	: Focal adhesion kinase
FBS	: Fetal bovine serum
GV	: Glomeruloid vessel
HUVECs	: Human umbilical vein endothelial cells
ITIM	: Immunoreceptor tyrosine inhibitory
LLC	: Lewis Lung carcinoma
LSEC	: Liver sinusoidal endothelial cells
MCAM	: Melanoma cell adhesion molecule
PBS	: Phosphate-buffered saline
PECAM	: Platelet endothelial cell adhesion molecule
PFA	: Paraformaldehyde
PLA	: Polyligation assay
PolyHEMA	: Poly 2-hydroxyethyl methacrylate
SHP2	: Src homology-2 domain phosphatase
STSP	: Staurosporine
TJA-1	: <i>Trichosanthes japonica</i> agglutinin 1
T-PER buffer	: T-PER Tissue Protein Extraction Reagent
VCAM	: Vascular cell adhesion molecule
VE-カドヘリン	: Vascular endothelial cell cadherin
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
VEGFR	: VEGF receptor
VWF	: Von Willebrand factor

序論

血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)は受容体チロシンキナーゼの一種であり、血管内皮細胞に主に発現している糖タンパク質である。血管内皮細胞の増殖・遊走の促進などに関与している。腫瘍組織においては、リガンドである血管内皮増殖因子(VEGF)の発現が上昇し、病的血管新生を促進している。また、転移や、悪性化の過程にも関与している。主にVEGF/VEGFR経路を標的とする腫瘍血管新生阻害剤は多くの癌患者の無増悪生存期間を延長させてきたが、生存期間全体の有効性という面では効果は限定的と言える[1, 2]。この原因の一つとして考えられるのが、低酸素微小環境下においては癌細胞の代謝が再プログラミングされて抗血管新生治療に抵抗性を示すことである[3]。中でも特に、細胞接着分子の発現変化などを含む一連の血管内皮応答は抵抗性に関する原因の一つとされている[4]。プロテオグリカンや糖タンパク質に結合している糖鎖はグライコカリックスと呼ばれる炭水化物に富んだ層を形成して、血管内皮細胞を厚く覆っていることが知られている[5]。また炎症反応や免疫反応を担う血小板や白血球と血管内皮細胞との接着は血管内皮細胞上の糖鎖と血小板や白血球のセレクチンが関与しているとされている[6]。しかしながら、増殖因子受容体や細胞接着分子が持つ糖鎖が生理的血管新生や病的血管新生にどのように関与しているかはほとんど明らかにされていない[7]。最近、腫瘍由来のガレクチン-1が血管内皮細胞上のVEGFR2が持つ糖鎖に結合し、VEGFのようにシグナル伝達を活性化して血管新生を促進するという大変興味深い報告がなされた[8]。さらに、もう一つの興味深い報告では、機能的なVEGFR2複合体にグリコサミノグリカンの一種であるヘパラン硫酸が同定され、VEGFに依存した細胞の増殖がヘパラン硫酸の発現量に依存するというを示している[9,10]。これらの知見から、糖鎖依存的なVEGFR2の機能が血管新生をコントロールしていることが示された。 α 2,6-シアル酸とはN型糖鎖のガラクトースに酸性糖であるシアル酸がシアル酸転移酵素ST6Gal I によって α 2,6-結合で付加された糖鎖の一種である (Fig. 1) が、サイトカイン処理することで血管内皮細胞が持つこの α 2,6-シアル酸が増加することをいくつかの論文が報告している[11,12]。

PECAMは免疫グロブリンスーパーファミリーに属する糖タンパク質で、主に血管内皮細胞や血小板に発現している接着分子である。細胞質領域にITIMモチ

ーフを持ち、ITIM内のチロシンのリン酸化によってSHP2がリクルートされ、抑制性シグナルを細胞内に伝達する。また、PECAMは相互的に結合することでシグナルを細胞内に伝達することも知られている。PECAMが持つ $\alpha 2,6$ -シアル酸をシアリダーゼNeu 1で除去すると、*in vitro*での血管内皮細胞のチューブ形成に異常が生じる[13]、さらに、 $\alpha 2,6$ -シアリル化が欠損するとVCAM-1依存性の接着が促進することが報告されている[14]。これらの結果、血管内皮細胞の接着特性は $\alpha 2,6$ -シアリル化によって積極的にコントロールされていることを示していると考えられる。

インテグリンは細胞表面に存在するタンパク質で、細胞と細胞外マトリックスをつなぐ接着因子である。また、細胞接着や細胞移動にも関与する。 α 鎖と β 鎖が結合した二量体から成り、細胞外マトリックスや特異的なタンパク質と結合すると、FAKタンパク質がリン酸化され、細胞内にシグナルを伝達する。VEGFR2は病的血管新生の重要な調節因子として $\beta 3$ インテグリンと機能的複合体を形成することが知られている[15]。またPECAMやVE-カドヘリンとはシアーストレスセンサーとして複合体を形成し、血管の恒常性を維持する役割を果たしている。血流に起因するシアーストレスはこのセンサーを介して、細胞骨格の分布や量を変化させて、血管内皮細胞の形態や配列や運動に影響を及ぼすことが知られている[16]。さらにPECAMはアポトーシスを阻害するシグナルを細胞内へと伝達する機能を担っているが、この機能を果たすためにはPECAMが相互作用することが必要であることが知られている [17-20]。PECAMはいくつかの $\alpha 2,6$ -シアリル化されたN型糖鎖を持っており、近年、PECAMは $\alpha 2,6$ -シアリル化糖鎖を認識するレクチン活性を示すことが明らかとなった[21, 22]。PECAM内のN型糖鎖付加部位は生物種により異なるが[23]、N末端側のIgドメイン1と2にあるホモフィリック結合境界面に存在する[24]。このことは、ホモフィリックなPECAMの結合を $\alpha 2,6$ -シアリル化糖鎖が調節していることを示唆している。さらに、 $\alpha 2,6$ -シアリル化の欠損はPECAMの細胞膜表面での安定性を減少させ、ミトコンドリア依存性アポトーシス刺激への感受性を増加させていることが報告されている[4, 22]。これらの知見から、 $\alpha 2,6$ -シアリル化はPECAM-VEGFR2- $\beta 3$ インテグリン複合体の細胞表面における協働的な機能を調節している可能性を示唆している。

本研究では、 $\alpha 2,6$ -シアリル化欠損マウスにおいて、腫瘍内血管内皮細胞のアポトーシスが亢進することで腫瘍血管新生が減退することを示している。この

ことから、 α 2,6-シアリル化依存的な血管新生複合体は腫瘍の血管新生を阻害するための新しい治療標的になることが期待できる。

方法

ヒトサンプル

ヒトの脳のアストロサイトーマ（星状細胞腫）グレード IV のパラフィン切片は US Biomax Inc. から購入した。

マウス

St6gal 1⁺ マウス[32]は Dr. Jamey D. Marth（カリフォルニア大学サンタバーバラ校）より提供された。

全ての動物実験は理化学研究所動物実験ガイドラインに準拠して実施した。

細胞培養と発現プラスミド

マウスの肝臓からの血管内皮細胞（LSEC）の単離は、抗 CD146（MCAM または MUC18、血管内皮細胞特異的分子）抗体を架橋したヒツジ anti-rat IgG ダイナビーズ（Thermo Fisher）を用いて実施した[21, 25]。マウスから取り出した肝臓をコラゲナーゼ処理により細胞を分散させた後、30 % Histodenz/PBS に懸濁し密度勾配法によって肝細胞を取り除いた。その後、肝細胞を取り除いた細胞溶液を抗 CD146 抗体ビーズと反応させ、血管内皮細胞のみを拾い上げた。単離した血管内皮細胞は、10 % FBS と 50 µg/ml endothelial mitogen（Alfa Aesar）を添加した DMEM/F12（Thermo Fisher）培地中で培養した。LLC 細胞（LLC1, CRL-1642, ATCC）は 10 % FBS を含む DMEM（Wako）培地中で培養した。ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVECs、Lonza）は 2 % FBS と EGMTM-2 SingleQuotsTM supplements（Lonza）を添加した EBMTM-2 培地（Lonza）中で培養し、4 継代の間に使用した。CHO-K1 細胞は 10 cm 培養ディッシュ上で 10 % FBS を含む α-MEM 培地中で培養した後、ヒト PECAM-pcDNA[22]、ヒト ST6Gal I-pcDNA[21] またはコントロール pcDNA プラスミド（5 µg）をポリエチレンイミン MAX（Polysciences）を用いて遺伝子導入した[26]。チューブに DNA：ポリエチレンイミン MAX=1：4 の比率で混和し、室温で 20 分反応させ、その後、混和溶液を 50-80 % コンフルになった細胞プレートに滴下した。24 時間後、遺伝子導入した細胞を実験に用いた。

腫瘍モデル

St6gal 1^{+/+} マウス同士の交配によって得た週齢の一致した *ST6Gal 1*^{+/+} (野生型 : WT) もしくは *St6gal 1*^{-/-} (knockout : KO) マウス (どちらも C57BL/6N を背景としており、それぞれ $n=8$ で解析した) の背部皮下にルイス肺癌細胞 (LLC、 2×10^6 個) を接種した。3 日もしくは 5 日ごとにノギスで腫瘍サイズ幅を計測し、そこから標準式 (幅² × 長さ × 0.52) [27] を用いて腫瘍体積を算出した。動物実験規定通りに、マウスは腫瘍が 5 cm³ に達する前に安楽死処置した。また、腫瘍接種後 24 日目には全てのマウスの腫瘍を取り出した後、安楽死処置した。取り出した腫瘍の重量を計測し、4 % PFA/PBS で固定し、その後 30 % スクロースで置換したのち、Tissue-Tek OCT compound (Thermo Fisher) で包埋し、-80 °C で保管した。また、同様の方法で得た腫瘍を用いて、パラフィン切片も作製した。パラフィン切片は 4 μm、凍結切片は 50 μm の厚さで薄切した。

リアルタイム PCR

血管内皮細胞の総 RNA は TRIzol reagent (Thermo Fisher) を用いて抽出し、その内の 1 μg の RNA を用い、ランダムヘキサマーを使用して SuperScript III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher) で逆転写した[28]。PECAM に対するプローブ (Thermo Fisher, Mm01242584_m1) と VEGFR2 に対するプローブ (Thermo Fisher, Mm01222421_m1) は、5'-末端を蛍光レポーター色素 FAM で、3'-末端をクエンチャー色素 MGB で標識されたものを使用した。rRNA に対するプローブ (Thermo Fisher, 4308329) は 5'-末端をレポーター色素 VIC で、3'-末端をクエンチャー色素 TAMRA で標識されたものを使用した。標的遺伝子の発現量は 2 度測定し、rRNA 発現量と比較して相対定量法で算出した。

蛍光免疫染色と免疫組織染色

パラフィン中に包埋したマウスの腫瘍切片は 10 分間キシレンに浸すことで脱パラフィンし、次に、一連の濃度 (100 %、95 %、70 %) のエタノールにて再水和した後、ヘマトキシリン・エオジン染色し、組織学的解析に用いた。蛍光免疫染色には凍結切片を用いた。凍結切片は、5 % ヤギ血清/PBS で 30 分間ブロッキングした後、1 次抗体溶液中で室温で 1 時間もしくは 4 °C で一晚反応させ、その後、PBS で 5 分間振とうさせた後に溶液交換する作業を 3 回行って洗浄した。続いて、2 次抗体溶液中で室温で 1 時間反応させた後 PBS で 3 回洗浄し、

染色した。各実験で使用した 1 次抗体、2 次抗体とレクチンについての詳細は表 1 に記載した。抗 VWF 抗体で染色した腫瘍切片は NanoZoomer Digital Pathology (浜松ホトニクス) で画像を取得した。また、ヘマトキシリン・エオジン染色した腫瘍組織は KEYENCE BZ-X700 で観察した。その他の染色切片は Olympus FV-1000 共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した。画像の定量解析には MetaMorph ソフトウェア (Olympus) もしくは FV-10ASW ver. 1.7 ソフトウェア (Olympus) を用いた。ヒト脳のアストロサイトーマのパラフィン切片は抗原賦活化処理のために 120 °C でオートクレーブ処理を行った。TJA-1 レクチン染色では、チラミドシグナル増幅 (TSA) 法によりシグナル増幅を行なった。まず、腫瘍切片を 3 % 過酸化水素/PBS 溶液中に浸し、内在性ペルオキシダーゼをブロックした後、tyramide signal amplification kit (TSA Biotin System ; Thermo Fisher) に付属のブロッキング溶液で処理した。その後、抗 PECAM 抗体/ブロッキング溶液中で 4 °C で一晩反応させた。次いで、PBS で 3 回洗浄した後、ビオチン化された TJA-1 レクチン/Alexa546-donkey anti-mouse IgG/DAPI (1:1000) 溶液中で 1 時間反応させた。PBS による洗浄を 3 回行い、ストレプトアビジン-ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase; HRP) で 1 時間反応させた後に 3 回 PBS で洗浄操作し、その後 Alexa488 標識チラミド溶液 (1:100) で 10 分間反応することで、チラミドにより増感した TJA-1 シグナルを可視化した。

免疫蛍光抗体法

St6gal 1^{+/+} もしくは *St6gal 1^{-/-}* マウスから単離し、コラーゲンコートした 8 ウェルチャンバースライドで培養した血管内皮細胞は PBS で洗い、4 % PFA/PBS で 30 分間もしくは氷冷したメタノールで 10 分間反応することで固定した。固定した後、必要に応じて、1 % Triton X-100/PBS で 30 分間振とうし透過処理を行なった。つぎに、5 % ヤギ血清/PBS でブロッキングを行い、その後 1 次抗体溶液中で振とうし、PBS による洗いを 3 回行った。次いで、蛍光標識した二次抗体溶液で振とうし、染色を行なった。各実験で使用した 1 次抗体、2 次抗体とレクチンについての詳細は表 1 に記載した。

近接ライゲーション解析 (PLA)

コラーゲンコートした 8 ウェルチャンバースライド上で培養した HUVEC に α 2,6-シアリル化二分岐 N-型糖鎖 (0.5 もしくは 2 mM、伏見製薬所) を添加もし

くは添加せずに、18時間培養した後、PBSで細胞を洗い、4% PFA/PBSで固定した。透過処理は必要に応じて、0.3% Triton X-100/PBS中で30分間行なった。抗PECAM抗体と抗VEGFR2抗体溶液中で振とうし、次いで、Duolink in situ PLA probe anti-mouse PLUS 溶液/-rabbit MINUS (Sigma Aldrich) 溶液中で振とうした。その後の手順は製造元のプロトコールに従い実施した。

フローサイトメトリー

ヒトPECAMとヒトST6Gal Iを過剰発現させたCHO細胞を回収し、FACS溶液(1% BSA, 0.1% NaN₃/PBS)で懸濁した。1次抗体溶液中で4℃で30分間振とうし、PBSによる洗浄を3回行った。次いで蛍光標識2次抗体溶液中で4℃で30分間振とうし、染色を行い、その後、FACS Calibur (BD Biosciences)でフローサイトメトリー解析を行なった。

In vitro チューブ形成アッセイ

St6gal 1^{+/+} もしくは *St6gal 1^{-/-}* マウスから単離した血管内皮細胞を用いたチューブ形成アッセイを行なった[29]。未重合のマトリゲル (BD Biosciences) を DMEM/F12 (1:1) 培地で希釈し、24 ウェルプレートに 300 μ l/well ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間重合反応を行なった。50 ng/ml マウス VEGF-A (R&D Systems) を含む 1 ml の培地で細胞 (2×10^5 個) を懸濁し、懸濁した細胞を重合したマトリゲル上に蒔き、3 時間もしくは 6 時間インキュベートした。2 μ l の calcein-AM (1 mg/ml) を加え細胞を染色した後、チューブ形成を観察した。チューブの長さは血管新生イメージアナライザーソフト (KURABO) で測定した。

創傷治癒アッセイ (Wound healing assay)

St6gal 1^{+/+} もしくは *St6gal 1^{-/-}* マウスから単離した血管内皮細胞 (3 継代目) を 50 ng/ml mouse VEGF-A を添加した DMEM/F12 (1:1) 培地中に 4×10^5 個/ml の濃度で懸濁し、細胞懸濁液を culture insert (Ibidi) のインサート部分に 70 μ l ずつ蒔いた。細胞が接着した後にインサートをはずし、1 時間ごとに写真を撮影した。それぞれの写真で計測場所を 5 ヶ所選択し、移動距離を計測し解析を行なった。

VEGFR2 の内在化

マウス VEGF-A を Alexa Fluor 555 protein labeling kit (Thermo Fisher) で標識した。 *St6gal 1^{+/+}* もしくは *St6gal 1^{-/-}* マウスから単離した[21] LSEC を、無血清培地で 16 時間培養した。そこに、Alexa 標識した VEGF-A (終濃度 4 µg/ml) を添加し、30 分培養した。その後、温めた無血清培地で細胞を洗い、4 % PFA/PBS で固定した細胞を共焦点顕微鏡で観察した。

In vitro でのアポトーシスの誘導と定量

コラーゲンコート 8 ウェルチャンバースライド上で培養した *ST6Gal 1^{+/+}* もしくは *ST6Gal 1^{-/-}* マウス由来の LSEC (1.75×10^5 細胞/well) を 1 µM STSP で 3 時間処理もしくは 10 µg/ml 抗 Fas 抗体 (#610198, BD Transduction Laboratories) で 6 時間処理もしくは LLC 細胞を培養した培地中で 0.5 時間培養することでアポトーシスを誘導した[18]。アポトーシスを誘導した細胞は抗 cleaved caspase-3 抗体溶液中で振とうし、PBS による洗浄を 3 回行った。次いで Alexa546 標識 2 次抗体溶液中で振とうし、染色を行った。染色された細胞は Olympus FV-1000 を用いて顕微鏡解析にて cleaved caspase-3 の画像を取得し、cleaved caspase-3 の蛍光シグナル強度を FV10-ASW ver. 1.7 ソフトで定量した。

アノキス アッセイ

St6gal 1^{+/+} もしくは *St6gal 1^{-/-}* マウス血管内皮細胞を polyHEMA (Sigma Aldrich) コートした 96 well カルチャープレートに $1-5 \times 10^5$ 細胞/well で蒔き、それぞれ 0、2、6、24 時間インキュベーションした。その後、生細胞を染色するために 1 µg の calcein-AM (Thermo Fisher) を添加し、死細胞を染色するために EthD-1 (Thermo Fisher) を添加した後、30 分振とうすることで細胞を染色した。生細胞と死細胞は蛍光顕微鏡で観察した。

シアリダーゼ処理

コラーゲンコートした 8well チャンバースライドもしくは 10 cm 培養プレート上で培養した HUVEC を Opti-MEM で 3 回洗い、Opti-MEM で希釈した *V. cholera* シアリダーゼ中 (免疫蛍光解析では 10 milliunits/ml で 30 分、ウェスタンブロット解析では 25 milliunits/ml で 1 時間) でインキュベートした。Opti-MEM と PBS で細胞を洗った後に 4 % PFA/PBS で 30 分間細胞を固定し、蛍光免疫染

色を行った。

ウェスタンブロットティング

組織溶解液と細胞溶解液、さらに免疫沈降物は 5-20% ポリアクリルアミドゲルで泳動分画し、ニトロセルロース膜に転写した。その後、5% スキムミルク/0.1% Tween 20/TBS でブロッキングを行い、1次抗体溶液中で室温で1時間もしくは4°Cで一晩反応した後、0.1% Tween 20/TBS で3回洗浄作業を行った。次いでHRP標識2次抗体溶液中で室温で1時間反応させることで目的タンパク質を検出した。各実験で使用した1次抗体、2次抗体とレクチンについての詳細は表1に記載した。検出したシグナル強度はルミノ・イメージアナライザー LAS-4000 (GE Healthcare) を用いて定量した。

リン酸化アレイ

St6gal 1^{+/+} もしくは *St6gal 1*^{-/-} マウス血管内皮細胞を polyHEMA コートした培養プレート上で30分間インキュベートした後回収し、キットの製造元のプロトコールに従い細胞溶解液を作成した。細胞溶解液は Proteome Profiler Mouse Phospho-RTK Array Kit (R&D Systems) のプロトコールに従い解析を行った。検出したシグナル強度はルミノ・イメージアナライザー LAS-4000 (GE Healthcare) を用いて定量した。

免疫沈降と SSA レクチン沈降

マウス肺と血管内皮細胞はプロテアーゼ阻害剤 (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) を含む T-PER buffer (Thermo) に懸濁した後、超音波破碎機を用いて溶解した。また、マウスの肺組織は Complete Protease Inhibitor Cocktail を含む TBS でホモジナイズし、105,000 ×g で35分間超遠心した。沈降物をプロテアーゼ阻害剤を含む T-PER buffer に懸濁した後、超音波破碎機を用いて溶解しマイクロソーム画分とした。マイクロソーム画分 (1 mg タンパク) に 5 μg の抗 VEGFR2 抗体もしくは抗 FITC 抗体もしくは 30 μl の *Sambucus sieboldiana agglutinin* (SSA) -アガロース (Cosmo Bio) を添加し、2時間振とうした。抗原-抗体複合体もしくはレクチンと結合した糖タンパク質を沈降させるために、30 μl の protein G-Dynabeads (Thermo Fisher) を加えた。その後、洗浄を行い、沈降物はウェスタンブロット解析を行なった。

Enzyme-mediated activation of radical sources (EMARS) 解析

これまでアリルアジド基は紫外線によって活性化されることが知られていたが、HRP が作用するとアリルアジド基は分解されて (EMARS 反応)、近傍のタンパク質のアミノ酸と共有結合するような中間体 (ナイトレンラジカル) を生じる。EMARS 解析[30]は、この反応を利用した解析である。まず、生きた細胞の標的タンパク質に HRP 標識抗体を結合させておき、その後 FITC-アリルアジドを添加すると HRP 標識された標的タンパク質によって、FITC-ナイトレンラジカルを生じる。生じた FITC-ナイトレンラジカルは標的タンパク質の近傍のタンパク質のアミノ酸に結合するため、FITC 標識された標的タンパク質近傍の分子は抗 FITC 抗体によって、容易に検出することができる。

詳しくは、10 cm 培養プレート上で培養した *St6gal 1*^{+/+} もしくは *St6gal 1*^{-/-} マウス血管内皮細胞を 25 μ g の抗 PECAM 抗体 (MEC13.3) /PBS 溶液中で 25 $^{\circ}$ C 20 分間振とうした。その後 PBS で洗い、15 μ g の HRP-conjugated anti-rat antibody/PBS と 0.1 mM FITC-アリルアジド /PBS 中で 25 $^{\circ}$ C 20 分間振とうした。さらに PBS で洗った後、プロテアーゼ阻害剤を含む T-PER buffer で溶解した、細胞溶解液を抗 PECAM 抗体もしくは抗 FITC 抗体で反応させ免疫沈降を行なった。免疫沈降物は 5-20% ポリアクリルアミドゲルで泳動分画し、蛍光イメージャーで FITC を検出、もしくはウェスタンブロット解析を行なった。

統計

Student's *t*-tests は Microsoft Excel で行なった。多群間解析は GraphPad Prism を用いて行なった。

結果

ST6Gal I^{-/-} マウスでは腫瘍血管新生が減退している

ST6Gal I 欠損が in vivo における腫瘍の増大にどのような影響を及ぼすかを調べるため、LLC 細胞を *St6gal 1^{+/+}* と *St6gal 1^{-/-}* マウスの背部皮下に接種した。接種後 10 日まで、2 種類のマウス間で腫瘍の増大に差はみられなかった (Fig. 2a)。しかしながら、2 週間後 (接種後 14 日) くらいから、*St6gal 1^{-/-}* マウスに接種した腫瘍の増大に明らかな遅滞が観察された (Fig. 2a, b)。腫瘍をヘマトキシリン・エオジン染色すると、*St6gal 1^{-/-}* マウスのから取り出した腫瘍では、*St6gal 1^{+/+}* と比較して、ネクロシス部の割合が有意に大きいことが明らかになった (Fig. 2c, d)。増殖している腫瘍の中で血管新生がうまくいっていないと、腫瘍細胞がネクロシスを起こすことがわかっており [31]、このことから、*St6gal 1^{-/-}* マウスで腫瘍血管新生が減退しているのではないかと予想した。血管内皮細胞を観察するため抗 VWF 抗体で腫瘍切片を蛍光免疫染色すると、*St6gal 1^{-/-}* マウスの腫瘍では腫瘍内の血管形成がほとんど観察されなかった (Fig. 2e, f)。*St6gal 1^{-/-}* マウスは正常に成長し、各組織にも B 細胞の異常以外は報告されていないため [32]、*St6gal 1^{-/-}* マウスでは、生理学的な血管新生ではなく腫瘍の血管新生に異常が見られるということがわかった。

***St6gal 1^{-/-}* マウスの腫瘍では血管内皮細胞のアポトーシスが上昇している**

がん細胞において ST6Gal I 発現が上昇しており、がん組織中の ST6Gal I の発現上昇は予後不良と関連性があるとされている [33]。そのため、我々はまず、*St6gal 1^{+/+}* と *St6gal 1^{-/-}* マウス内の腫瘍細胞の ST6Gal I の発現量に差異がないことを確かめた (Fig. 3a)。血管内皮細胞では ST6Gal I は比較的発現が高いため [11, 21]、*St6gal 1^{-/-}* マウスにおいて腫瘍内の血管新生が減退しているのは血管内皮細胞のアポトーシスが上昇しているためではないかと考えた。そのため、これら 2 種類のマウスから取り出した腫瘍において、非常に感度の高いアポトーシスマーカーであるポリ (ADP-リボース) 合成酵素の切断型 (cleaved PARP) [34] と PECAM (血管内皮マーカー) のシグナルを見るために蛍光免疫染色を行った。その結果、*St6gal 1^{-/-}* マウスの腫瘍内血管の方が抗 cleaved PARP 抗体で染まっている割合が有意に高いことがわかった (Fig. 3b, c)。次に、様々なアポトーシス刺激に対する *St6gal 1^{-/-}* 血管内皮細胞の感受性を見てみることにした。腫瘍内環

境を模倣するため LLC 細胞を培養した培養液を *St6gal 1^{-/-}* 血管内皮細胞に加えると、*St6gal 1^{+/+}* に比較して非常に高い caspase-3 活性を示した (Fig. 3d)。さらに内因性ミトコンドリア依存性アポトーシス誘導剤である STSP や外因性アポトーシス誘導剤である Fas リガンドを加えても、*St6gal 1^{-/-}* 血管内皮細胞でより高い caspase-3 活性が見られた (Fig. 3d, e)。PECAM は外因性ではなく内因性のアポトーシス刺激に対して抵抗性を示すことが知られている[21]。そのため、PECAM レクチンのリガンドである α 2,6-シアル酸が欠損している場合は、機能的 PECAM 複合体に異常が生じることで、外因性および内因性のアポトーシス刺激に対して感受性が増加するのではないかと仮定した。そのため、次に、PECAM 以外に α 2,6-シアル酸を持つような、機能的な血管内皮因子に着目することにした。

***St6gal 1^{-/-}* 血管内皮細胞では VEGF/VEGFR2 依存的シグナルが上昇する**

VEGFR2 は PECAM と機能的複合体を形成することが知られており[16]、また VEGFR2 の N 型糖鎖は α 2,6-シアリル化されていることも報告されている[8]。実際に SSA レクチンを用いた沈降実験で、VEGFR2 に α 2,6-シアル酸が含まれていることを確認したので (Fig. 4a)、次に α 2,6-シアリル化がどのように VEGF/VEGFR2 シグナル伝達に影響を及ぼしているかを試験することにした。VEGF は in vitro でも in vivo でも血管新生を促進する主要因子である[35]。まず in vitro での VEGF/VEGFR2 依存的な血管新生測定系として、VEGF 存在下で *St6gal 1^{+/+}* と *St6gal 1^{-/-}* 血管内皮細胞の細胞遊走をみるために創傷治癒アッセイを行なった。その結果、*St6gal 1^{-/-}* 血管内皮細胞で *St6gal 1^{+/+}* 細胞より 3 倍も高い遊走能を示した (Fig. 4b, c)。次に、VEGF を添加したマトリゲル上に *St6gal 1^{+/+}* と *St6gal 1^{-/-}* 血管内皮細胞を植え付け、in vitro でのチューブ形成アッセイを行なった。どちらの細胞においても 6 時間後には毛細血管様の密な網目構造を形成したが、3 時間後では *St6gal 1^{-/-}* 血管内皮細胞のみが緩い網目構造を形成し、*St6gal 1^{+/+}* 細胞に網目構造は全く観察されなかった (Fig. 4d)。3 時間後の時のこれらの網目構造の長さを定量解析したところ、*St6gal 1^{-/-}* 血管内皮細胞の方がより長く網目構造を形成することがわかった (Fig. 4e)。これらの結果から、 α 2,6-シアリル化の欠損により VEGF 依存性シグナルが上昇することがわかった。近年の報告によると VEGFR2 が内在化されると VEGFR2 の下流のシグナルが伝達される[36]。そのため、*St6gal 1^{-/-}* 血管内皮細胞における VEGF 依存的シグナ

ルの上昇は、VEGFR2 の内在化の増加によって起こり得る可能性があると考えた。そこで、VEGF-A の細胞内への取り込みは、主に VEGFR2 によって行われていることを利用し[36]、蛍光標識した VEGF-A の取り込みを *St6gal 1^{+/+}* と *St6gal 1^{-/-}* 血管内皮細胞とで比較した。その結果、VEGF-A の取り込みを示す蛍光スポットが *St6gal 1^{-/-}* 血管内皮細胞の核周辺で *St6gal 1^{+/+}* よりも顕著に多く観察された (Fig. 5a, b)。VEGF/VEGFR2 のシグナル伝達機構には正のフィードバック機構が存在する。つまり、VEGFR2 は VEGF と結合し、核へと移行することで VEGFR2 の発現が上昇するとされている[37]。そこで、単離直後の *St6gal 1^{-/-}* 血管内皮細胞に比べ、継代を繰り返した *St6gal 1^{-/-}* 血管内皮細胞では VEGFR2 の発現が相対的に高くなっているのではないかと予想して実験を行った。その結果、単離直後の新鮮な *St6gal 1^{+/+}* と *St6gal 1^{-/-}* 血管内皮細胞で測定した VEGFR2 と PECAM の発現量はほとんど同じであった (Fig. 5c)。しかし、これら 2 種類の血管内皮細胞を VEGF 存在化で 2 週間培養すると、*St6gal 1^{+/+}* 細胞に対して、*St6gal 1^{-/-}* 血管内皮細胞でのみ VEGFR2 の発現量が 2 倍も増加しているということがわかった。これらの結果もまた $\alpha 2,6$ -シアル酸が欠損すると VEGF/VEGFR2 シグナル伝達が上昇するという結果を支持していると考えられる。

VEGFR2 と複合体を形成する分子の一つである[16]PECAM の膜表面上での安定性の低下は、*St6gal 1^{-/-}* 細胞で VEGFR2 の内在化とシグナル伝達亢進を引き起こす原因となっている可能性がある[21]。弱い結合で相互作用している様な PECAM 近傍の分子を同定するために、EMARS 解析を行なった。EMARS 解析とは細胞が活着している状態で細胞膜上の標的分子の近傍に存在する分子を同定するために、近年確立された技術である。*St6gal 1^{+/+}* と *St6gal 1^{-/-}* 細胞ともに抗 PECAM 抗体、HRP 標識 2 次抗体そして FITC-アリルアジド[30]を用いて解析を行なったところ、*St6gal 1^{+/+}* 細胞でのみ 250 kDa と 300 kDa の 2 つの FITC 陽性シグナルが観察された。(Fig. 5d 上)。250 kDa のシグナルに対応するタンパクは VEGFR2 であることが予想された。そこで、FITC 標識された分子の同定を試みた。まず、抗 FITC 抗体で免疫沈降されてきた FITC 標識タンパクのうちの一つが、*St6gal 1^{+/+}* 細胞でのみ抗 VEGFR2 抗体によって検出された。これはつまり、PECAM-VEGFR2 複合体が *St6gal 1^{-/-}* 細胞の膜表面では減少していることを示唆している。しかし、これら 2 種類のマウス肺マイクロソームで行なった共沈実験においては、PECAM-VEGFR2 共沈量は同程度であった (Fig. 5e)。これは、*St6gal*

$I^{-/-}$ 細胞の細胞膜表面上の PECAM が減少しているため、EMARS 解析では HRP 標識された PECAM はほとんど存在せず、EMARS 反応が膜表面で起こらなかったためと考えられる。一方、 $St6gal 1^{+/+}$ 細胞においては PECAM が細胞膜上に留まっていられるため、HRP 標識された PECAM の近傍の分子が FITC 標識されたということを示唆している (Fig. 5d)。次に、PECAM-VEGFR2 複合体を直接観察するために、近接ライゲーション解析を行なった。その結果、透過処理を行わない HUVEC の膜表面に PECAM-VEGFR2 複合体を観察することができた (Fig. 5f)。また、透過処理を行うと PECAM-VEGFR2 複合体シグナルが増加した。これは定常状態でも複合体が内在化することを示唆している。さらに PECAM はシアル酸、特に $\alpha 2,6$ -シアル酸を特異的に認識するようなレクチンであり、PECAM-PECAM 相互作用もシアル酸が重要であることが報告されている。そのため、PECAM の相互作用を競合的に阻害するために $\alpha 2,6$ -シアリル化糖鎖を細胞に添加し、PECAM-VEGFR2 量の変化を観察した。その結果、添加量依存的に内在化 PECAM-VEGFR2 量が著しく増加した (Fig. 5g)。これらの結果から、PECAM-VEGFR2 複合体は $\alpha 2,6$ -シアル酸欠損下でも安定ではあるが、より内在化しやすいということが考えられた。

細胞内へ生存シグナルを伝達するために $\alpha 2,6$ -シアリル化はインテグリンを細胞膜表面に保持する役目を果たしている

$St6gal 1^{-/-}$ マウスにおける腫瘍血管新生の減退は VEGF/VEGFR2 シグナル増加では説明し難いため、我々はインテグリンと呼ばれる $\alpha 2,6$ -シアリル化した分子に着目することにした (Fig. 4a)。インテグリン-VEGFR2 シグナル伝達経路は病的血管新生に関与するとされているので、 $St6gal 1^{-/-}$ 細胞における PECAM-VEGFR2 複合体の内在化が増加することでインテグリン依存性のシグナル伝達に影響を及ぼす、もしくは細胞外マトリックスとインテグリンと結合が不適切になる、またはアノキスとして知られている細胞死[38]を引き起こしたりするかもしれないと考えた。接着斑キナーゼ (FAK) が焦点接着部位にリクルートされることと、それに続いて起こる Tyr 397 の自己リン酸化 (pFAK-Y397) はインテグリン依存的シグナル伝達のマーカーである[39]ことから、まず $St6gal 1^{+/+}$ と $St6gal 1^{-/-}$ 血管内皮細胞を抗 pFAK-Y397 抗体で免疫染色してみることにした。すると、 $St6gal 1^{-/-}$ 細胞で焦点接着の増加が見られた (Fig. 6a, b)。次に、アノキスによって誘導される細胞死を評価するため、 $St6gal 1^{+/+}$ と $St6gal 1^{-/-}$ 血管内

皮細胞を polyHEMA コートした培養プレート上に蒔いた。両種の細胞を同じ密度で単一の細胞になるようにして、プレート上に蒔いたところ、6 時間後には楕円体状の凝集体を形成し始めた。さらに 24 時間後では、*St6gal I*^{-/-} 細胞の方が明らかに凝集体が小さく、calcein-AM 陽性の生細胞に対して EthD-1 陽性の死細胞の割合が非常に高いことがわかった (Fig. 6c, d)。この結果は、 $\alpha 2,6$ -シアル酸の欠損が血管内皮細胞のアノキスを促進するような異常なインテグリンシグナルを引き起こしていることを示唆している。アポトーシス上昇の分子メカニズムを更に解析するため、同時に 39 種のマウス受容体チロシンキナーゼのリン酸化を検出することができる、リン酸化アレイを行なった。その結果、*St6gal I*^{-/-} 細胞で上皮成長因子受容体 (EGFR) のリン酸化が上昇していた (Fig. 6e)。以前に血管内皮細胞から酵素的にシアル酸を除去すると、PECAM の相互的な結合が失われ、アポトーシスシグナルが上昇することが報告されていた[22]。実際に、血管内皮細胞をシアリダーゼ処理することによりカスパーゼ活性が上昇することを確認した (Fig. 6f) ので、血管内皮細胞をシアリダーゼ処理し、シアル酸を除去することで同様に EGFR のリン酸化が上昇するかを確認したところ、EGFR Y1173 のリン酸化が上昇していることを見出した (Fig. 6g)。インテグリンは EGFR シグナル伝達により調節されていることがすでに知られている[40]。また、所属研究室は以前に血管内皮細胞に ST6Gal I を過剰発現させると PECAM の細胞膜表面での発現量が増加することを見出している[21]ことから、本来 PECAM を発現していない細胞に PECAM を異所性に発現させると、細胞膜表面で $\beta 3$ インテグリンが保持されるのではないかと予想して実験を行った。内在性 $\alpha 2,6$ -シアリル化酵素と PECAM を欠損している CHO 細胞にヒト PECAM を過剰発現させると、ST6Gal I の発現の有無にかかわらず、 $\beta 3$ インテグリンの細胞膜上での発現量が増加した (Fig. 6h)。また ST6Gal I の有無にかかわらず、過剰発現した PECAM は CHO 細胞の膜表面で保持されることもわかった。これらのことは細胞膜表面上の PECAM は $\beta 3$ インテグリンを細胞膜表面上に保持させることができることを示唆している。

グリオーマ（神経膠腫）で特徴的な肥厚した血管内皮では $\alpha 2,6$ -シアリル化が増加している

もし、 $\alpha 2,6$ -シアル酸が腫瘍内血管新生にとって決定的な生存因子の一つであるならば、血管内皮細胞における $\alpha 2,6$ -シアル酸の増加は腫瘍の中でも観察され

るであろうと考えた。神経系の ST6Gal I 発現は無視することができるほど少ないため[21,41]、脳腫瘍組織切片を用いた。脳における血管内皮の α 2,6-シアリル化は TJA-1 レクチンで容易に検出することができるので、PECAM と TJA-1 レクチンのシグナルを解析した。脳の正常な血管 (Fig. 6i 下パネル) と比較すると、星状細胞腫では腎糸球体様血管 (GV) が TJA-1 で強く染色される (Fig. 6i 上パネル)。その結果、 α 2,6-シアリル化糖鎖がヒトの脳腫瘍内血管で上昇していることが確認された。

考察

この研究において、 $\alpha 2,6$ -シアリル化が欠損すると、VEGF/VEGFR2 とインテグリン依存性シグナルの異常なシグナル伝達を引き起こし、さらに腫瘍血管内皮細胞のアポトーシスを引き起こし、そのことが腫瘍血管新生と腫瘍増大の減退につながることを発見した。*St6gal 1*^{-/-} 細胞は内因性（例、STSP 依存的）、外因性（例、Fas 依存的）アポトーシス刺激のどちら対しても高い感受性を示した。つまり、PECAM のリガンドである $\alpha 2,6$ -シアリル化の欠損は、抗アポトーシス分子である PECAM の機能を減退させる。一方で、PECAM の欠損は外因性の Fas 依存性アポトーシス経路に影響を及ぼさないことがわかっている[18]。これらのことから、 $\alpha 2,6$ -シアリル化の欠損は PECAM 以外のいくつかの膜糖タンパク質に影響を及ぼしていることが示唆される。Fas 受容体は $\alpha 2,6$ -シアリル化されているため、癌細胞における $\alpha 2,6$ -シアリル化の欠損が Fas 依存性アポトーシスに対する感受性を増加させているとの報告[42]から、同様のことが血管内皮細胞でもおきているのではないかと考えた。エンドソームへの Fas の細胞内輸送はアポトーシスシグナル伝達を伝播するとされている [43]。 $\alpha 2,6$ -シアリル化の欠損により Fas の細胞膜表面での安定性が減退していることが推測されたが、血管内皮細胞における Fas の発現量は低く[44]、血管内皮細胞に発現している Fas の生化学的解析は困難であり詳細な解析は行わなかった

St6gal 1^{-/-} 血管内皮細胞において、 $\alpha 2,6$ -シアル酸依存的な PECAM 同士の相互作用は欠失している。このことは PECAM-VEGFR2 複合体の膜表面における安定性の低下につながり、次いで異常なシグナル伝達を引き起こす (Fig. 7)。VEGFR2 もまた $\alpha 2,6$ -シアリル化しているにもかかわらず、 $\alpha 2,6$ -シアリル化糖鎖の欠損細胞、もしくは $\alpha 2,6$ -シアル酸依存的結合を競合阻害するために $\alpha 2,6$ -シアリル化糖鎖を細胞に添加しても PECAM-VEGFR2 複合体は保持されていた。これは、この複合体の結合は糖鎖非依存的な結合が主体であることを示唆している。また、VEGFR2 シグナルを促進すると、*St6gal 1*^{-/-} 血管内皮細胞において *in vitro* 実験では血管新生が亢進していたが、一方で、腫瘍の血管新生は *St6gal 1*^{-/-} マウスで減退していた。これは、インテグリンが中心的役割を担う[38]アノキスアッセイで、*St6gal 1*^{-/-} 血管内皮細胞で細胞死の亢進が観察されたことから、インテグリンが細胞外マトリックスと結合できなくなることによって生じるアポトーシスが強く誘導され[45]、腫瘍血管新生の減退が引き起こされたと考えら

れる。所属研究室では、 $\alpha 2,6$ -シアリル化が欠損していると、PECAM のリン酸化が増加し、タンパク質チロシンフォスファターゼ 2 含有 Src ホモロジー 2 ドメイン (SHP2) が PECAM にリクルートされることを見出している[21]。本研究では、アノキスがどのように受容体チロシンキナーゼのリン酸化量の変化につながるかを調べた結果、EGFR がリン酸化することを同定した。EGFR はこれまでにがんの血管新生と転移をブロックする様な治療の標的とされている[46, 47])。興味深いことに、Morello 等は $\beta 1$ インテグリンが細胞膜上での EGFR の効率的な代謝に必要であると報告している[40]。

血管内皮細胞における膜糖タンパク質の不安定性を説明するためのいくつかのメカニズムの 1 つとして、 $\alpha 2,6$ -シアル酸特異的レクチンである PECAM の細胞膜上からの欠失が、PECAM と一緒にいるようなパートナー分子たちの内在化の促進につながることを示した (Fig. 7)。共沈実験では、PECAM-VEGFR2 複合体は $\alpha 2,6$ -シアル酸非依存的に結合していることを示し、CHO 細胞での異所性の PECAM 発現によって $\alpha 2,6$ -シアル酸非依存的に $\beta 3$ インテグリンの膜表面量が増加することも示した。これらの事実は、PECAM-VEGFR2- $\beta 3$ インテグリンの複合体形成には $\alpha 2,6$ -シアル酸は必要ではないことを示している。つまり、 $\alpha 2,6$ -シアリル化が血管内皮細胞膜表面における PECAM のホモフィリック結合に関与しているとするならば、VEGFR2 や $\beta 3$ インテグリンのようなパートナー分子の細胞表面への局在化を $\alpha 2,6$ -シアリル化した PECAM が決めており、それによって、それ等の分子のシグナル伝達や血管内皮細胞の生存も調節しているという興味深い構図が見えてくる。加えて、異所性の PECAM 発現は $\beta 3$ インテグリンの細胞膜上における安定性を向上させていること、ST6Gal I 発現のない CHO 細胞の表面に過剰発現した PECAM が保持されることから、PECAM が安定的に細胞膜表面で発現するために $\alpha 2,6$ -シアル酸が必要であるというのは血管内皮細胞の特徴であることが考えられる。

ガレクチンはシアル酸を持たないガラクトース末端糖鎖に結合する[49]。VEGFR2[8]とインテグリンが $\alpha 2,6$ -シアリル化しているとガレクチン-1, 3 が結合できなくなり[48, 49]、競合的に PECAM とこれらの糖タンパクの複合体形成が細胞膜表面で増加し、抗アポトーシス作用を伝達する。逆に、 $\alpha 2,6$ -シアリル化が欠損していると、ガレクチン-1, 3 の結合は促進し、ガレクチンと VEGFR2 は複合体を細胞外に形成し、血管新生を促進する [50]。これらのことから、PECAM とガレクチン-1, 3 のレクチン作用はどちらも細胞の生存に重要である

と言える。

腫瘍で血管内皮アポトーシスを引き起こすような VEGF/VEGFR2 とインテグリンの異常なシグナル伝達は α 2,6-シアリル化の欠損によって生じる。近年、ほとんどの血管新生阻害剤は VEGF/VEGFR2 シグナル経路を標的にしていることを考えると、 α 2,6-シアリル化は抗血管新生治療戦略としての新規の標的になり得る。また、癌組織における ST6Gal I 発現の上昇は、一般的に臨床状態が不良であることと関係が深い[33]。以上のことから、本研究で示した結果は、 α 2,6-シアリル化を標的にすることは新規でかつ効率的な抗がん剤開発につながる可能性を示唆している。しかしながら、*St6gal 1*^{-/-} マウスは B 細胞に異常があるため[32]、ST6Gal I 阻害剤は免疫学的な副作用を示すかもしれない。所属研究室では、現在、PECAM の糖鎖標的を模倣した化合物を用いてスクリーニングを行っており、これらの化合物が PECAM アンタゴニストとして作用し、血管新生阻害剤となることが期待される。

引用文献

- 1 Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 592-603.
- 2 Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008; 358: 2039-2049.
- 3 McIntyre A, Harris AL. Metabolic and hypoxic adaptation to anti-angiogenic therapy: a target for induced essentiality. *EMBO Mol Med* 2015; 7: 368-379.
- 4 Kitazume S, Imamaki R, Ogawa K, Taniguchi N. Sweet role of platelet endothelial cell adhesion molecule in understanding angiogenesis. *Glycobiology* 2014; 24: 1260-1264.
- 5 Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* 2007; 454: 345-359.
- 6 McEver RP. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Current opinion in cell biology* 2002; 14: 581-586.
- 7 Croci DO, Cerliani JP, Pinto NA, Morosi LG, Rabinovich GA. Regulatory role of glycans in the control of hypoxia-driven angiogenesis and sensitivity to anti-angiogenic treatment. *Glycobiology* 2014; 24: 1283-1290.
- 8 Croci DO, Cerliani JP, Dalotto-Moreno T, Mendez-Huergo SP, Mascanfroni ID, Dergan-Dylon S *et al.* Glycosylation-Dependent Lectin-Receptor Interactions Preserve Angiogenesis in Anti-VEGF Refractory Tumors. *Cell* 2014; 156: 744-758.
- 9 Xu D, Fuster MM, Lawrence R, Esko JD. Heparan sulfate regulates VEGF165- and VEGF121-mediated vascular hyperpermeability. *J Biol Chem* 2011; 286: 737-745.
- 10 Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 526-542.
- 11 Hanasaki K, Varki A, Stamenkovic I, Bevilacqua MP. Cytokine-induced beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in human endothelial cells mediates alpha 2,6-sialylation of adhesion molecules and CD22 ligands. *J Biol Chem* 1994; 269: 10637-10643.

- 12 Kitazume S, Yoshihisa A, Yamaki T, Oikawa M, Tachida Y, Ogawa K *et al.* Soluble amyloid precursor protein 770 is released from inflamed endothelial cells and activated platelets: a novel biomarker for acute coronary syndrome. *J Biol Chem* 2012; 287: 40817-40825.
- 13 Lee C, Liu A, Miranda-Ribera A, Hyun SW, Lillehoj EP, Cross AS *et al.* NEU1 Sialidase Regulates the Sialylation State of CD31 and Disrupts CD31-driven Capillary-like Tube Formation in Human Lung Microvascular Endothelia. *J Biol Chem* 2014; 289: 9121-9135.
- 14 Abe Y, Smith CW, Katkin JP, Thurmon LM, Xu X, Mendoza LH *et al.* Endothelial alpha 2,6-linked sialic acid inhibits VCAM-1-dependent adhesion under flow conditions. *J Immunol* 1999; 163: 2867-2876.
- 15 Mahabeleshwar GH, Feng W, Phillips DR, Byzova TV. Integrin signaling is critical for pathological angiogenesis. *J Exp Med* 2006; 203: 2495-2507.
- 16 Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B *et al.* A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 2005; 437: 426-431.
- 17 Bird IN, Taylor V, Newton JP, Spragg JH, Simmons DL, Salmon M *et al.* Homophilic PECAM-1(CD31) interactions prevent endothelial cell apoptosis but do not support cell spreading or migration. *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 12): 1989-1997.
- 18 Gao C, Sun W, Christofidou-Solomidou M, Sawada M, Newman DK, Bergom C *et al.* PECAM-1 functions as a specific and potent inhibitor of mitochondrial-dependent apoptosis. *Blood* 2003; 102: 169-179.
- 19 Newman PJ, Newman DK. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 953-964.
- 20 Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2514-2523.
- 21 Kitazume S, Imamaki R, Ogawa K, Komi Y, Futakawa S, Kojima S *et al.* Alpha2,6-sialic acid on platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) regulates its homophilic interactions and downstream antiapoptotic signaling. *J*

- Biol Chem 2010; 285: 6515-6521.
- 22 Kitazume S, Imamaki R, Kurimoto A, Ogawa K, Kato M, Yamaguchi Y *et al.* Interaction of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) with alpha2,6-sialylated glycan regulates its cell surface residency and anti-apoptotic role. J Biol Chem 2014; 289: 27604-27613.
 - 23 Lertkiatmongkol P, Paddock C, Newman DK, Zhu J, Thomas MJ, Newman PJ. The Role of Sialylated Glycans in Human Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1)-mediated Trans Homophilic Interactions and Endothelial Cell Barrier Function. J Biol Chem 2016; 291: 26216-26225.
 - 24 Paddock C, Zhou D, Lertkiatmongkol P, Newman PJ, Zhu J. Structural basis for PECAM-1 homophilic binding. Blood 2016; 127: 1052-1061.
 - 25 Kitazume S, Tachida Y, Kato M, Yamaguchi Y, Honda T, Hashimoto Y *et al.* Brain endothelial cells produce amyloid {beta} from amyloid precursor protein 770 and preferentially secrete the O-glycosylated form. J Biol Chem 2010; 285: 40097-40103.
 - 26 Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 7297-7301.
 - 27 Frentzas S, Simoneau E, Bridgeman VL, Vermeulen PB, Foo S, Kostaras E *et al.* Vessel co-option mediates resistance to anti-angiogenic therapy in liver metastases. Nat Med 2016; 22: 1294-1302.
 - 28 Sugimoto I, Futakawa S, Oka R, Ogawa K, Marth JD, Miyoshi E *et al.* ST6Gal I cleavage by BACE1 enhances the sialylation of soluble glycoproteins : A novel regulatory mechanism for alpha 2,6-sialylation. J Biol Chem 2007; 282: 34896-34903.
 - 29 Komi Y, Ohno O, Suzuki Y, Shimamura M, Shimokado K, Umezawa K *et al.* Inhibition of tumor angiogenesis by targeting endothelial surface ATP synthase with sangivamycin. Jpn J Clin Oncol 2007; 37: 867-873.
 - 30 Kotani N, Gu J, Isaji T, Udaka K, Taniguchi N, Honke K. Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105: 7405-7409.

- 31 Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.
- 32 Hennet T, Chui D, Paulson JC, Marth JD. Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 4504-4509.
- 33 Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 2015; 15: 540-555.
- 34 Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994; 371: 346-347.
- 35 Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
- 36 Nakayama M, Nakayama A, van Lessen M, Yamamoto H, Hoffmann S, Drexler HC *et al.* Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. *Nat Cell Biol* 2013; 15: 249-260.
- 37 Domingues I, Rino J, Demmers JA, de Lanerolle P, Santos SC. VEGFR2 translocates to the nucleus to regulate its own transcription. *PLoS One* 2011; 6: e25668.
- 38 Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 555-562.
- 39 Ungewiss C, Rizvi ZH, Roybal JD, Peng DH, Gold KA, Shin DH *et al.* The microRNA-200/Zeb1 axis regulates ECM-dependent beta1-integrin/FAK signaling, cancer cell invasion and metastasis through CRKL. *Scientific reports* 2016; 6: 18652.
- 40 Morello V, Cabodi S, Sigismund S, Camacho-Leal MP, Repetto D, Volante M *et al.* beta1 integrin controls EGFR signaling and tumorigenic properties of lung cancer cells. *Oncogene* 2011; 30: 4087-4096.
- 41 Kleene R, Schachner M. Glycans and neural cell interactions. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 195-208.
- 42 Swindall AF, Bellis SL. Sialylation of the Fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 2011; 286: 22982-22990.

- 43 Schutze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 655-662.
- 44 Sata M, Suhara T, Walsh K. Vascular endothelial cells and smooth muscle cells differ in expression of Fas and Fas ligand and in sensitivity to Fas ligand-induced cell death: implications for vascular disease and therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 309-316.
- 45 Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresch DA. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol* 2001; 155: 459-470.
- 46 Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 273-286.
- 47 Lurje G, Lenz HJ. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* 2009; 77: 400-410.
- 48 Markowska AI, Liu FT, Panjwani N. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J Exp Med* 2010; 207: 1981-1993.
- 49 Zhuo Y, Chammas R, Bellis SL. Sialylation of beta1 integrins blocks cell adhesion to galectin-3 and protects cells against galectin-3-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2008; 283: 22177-22185.
- 50 Dennis JW, Nabi IR, Demetriou M. Metabolism, cell surface organization, and disease. *Cell* 2009; 139: 1229-1241.

図および表

表 1. 本研究で用いた抗体とレクチン

1抗体/レクチン	2次抗体/プローブ	使用した実験
Endothelial markers		
Rabbit Anti-VWF (Dako, #A0082, 1:100)	Alexa 488-donkey anti-rabbit (Thermo Fisher, A11008, 1:100)	免疫組織染色 Figure 1e
Rat anti-mPECAM(MEC13.3) (Biolegend, #102502, 1:100)	Alexa488-donkey anti-rat (Thermo Fisher, A11006, 1:100)	蛍光免疫染色 Figure 2b, Figure 4a , Figure 5a
Rabbit anti-VEGFR2 (Cell Signaling, #2479, 1:1000)	HRP-conjugated anti-rabbit (GE Healthcare, NA934, 1:1000)	ウェスタンブロット解析 Figure 3a, Figure 4d, 4e
Goat anti-mPECAM (Santa Cruz, #sc1506, 1:1000)	HRP-conjugated anti-goat (Jackson Immuno Research laboratories, #705-035-147, 1:1000)	ウェスタンブロット解析 Figure 4d and 4e
Rabbit anti-VEGFR2 conjugated sepharose (Cell Signaling, #5168)		免疫沈降 Figure 4e
Rabbit anti-VEGFR2 (Cell Signaling, #2479, 1:100)	Duolink PLA probe anti-rabbit MINUS (Sigma-Aldrich, 1:5)	PLA Figure 4f and 4g
Mouse anti-PECAM(JC/70A) (abcam, #ab9498, 1:10)	Duolink PLA probe anti-mouse PLUS (Sigma-Aldrich, 1:5)	PLA Figure 4f and 4g
Mouse anti-hPECAM (Dako, #M0823, 1:50)	Alexa 546-donkey anti-mouse (Thermo Fisher, A11030, 1:50)	免疫組織染色 Figure 5i
Rabbit anti-integrin-β3 (Cell Signaling, #4702, 1:1000)	HRP-conjugated anti-rabbit (GE Healthcare, NA934, 1:1000)	ウェスタンブロット解析 Figure 3a
Apoptosis markers		
Rabbit anti-cleaved PARP (Cell Signaling, #9544, 1:100)	Alexa 546-donkey anti-rabbit (Thermo, A11040, 1:100)	蛍光免疫染色 Figure 2b
Rabbit anti-cleaved caspase-3 (Cell Signaling, #9661, 1:100)	Alexa 546-donkey anti-rabbit (Thermo Fisher, A11040, 1:100)	蛍光免疫染色 Figure 2e and Figure 5f
Others		
Rabbit anti-ST6Gal I * (IBL, M1, 1:20)	Alexa 488-donkey anti-rabbit (Thermo Fisher, A11008, 1:100)	免疫組織染色 Figure 2a
<i>Sambucus sieboldiana</i> agglutinin (SSA)-agarose (Cosmo Bio)		レクチン沈降 Figure 3a
Rabbit anti-Fluorosein ROCKLAND, #600-101-096, 1:400)		免疫沈降 Figure 4d
Rabbit anti- FAK(phospho Y397) (abcam, #ab39967, 1:100)	Alexa 546-donkey anti-rabbit (Thermo Fisher, A11040, 1:100)	蛍光免疫染色 Figure 5a
Rabbit anti-EGFR (abcam, #ab52894, 1:1000)	HRP-conjugated anti-rabbit (GE Healthcare, NA934, 1:1000)	ウェスタンブロット解析 Figure 5g
Rabbit anti-EGFR(phospho Y1173) (Cell Signaling, #4407, 1:500)	HRP-conjugated anti-rabbit (GE Healthcare, NA934, 1:1000)	ウェスタンブロット解析 Figure 5g
Mouse anti-GAPDH (Millipore, #MAB374, 1:1000)	HRP-conjugated anti-mouse (GE Healthcare, NA931, 1:1000)	ウェスタンブロット解析 Figure 5g
Biotin-conjugated <i>Trichosanthes japonica</i> agglutinin I (TJA-I) lectin (Seikagaku Co., 1:100)	HRP-conjugated Streptavidin and Alexa Fluor 488 tyramide (Thermo Fisher, T20932, 1:100)	免疫組織染色 Figure 5i

* Rabbit anti-ST6Gal I antibodyは合成ペプチドSSAGSLKSSQLGREI (ヒトST6Gal I のアミノ酸配列の一部) に対して IBL社で作成した。

Figure 1

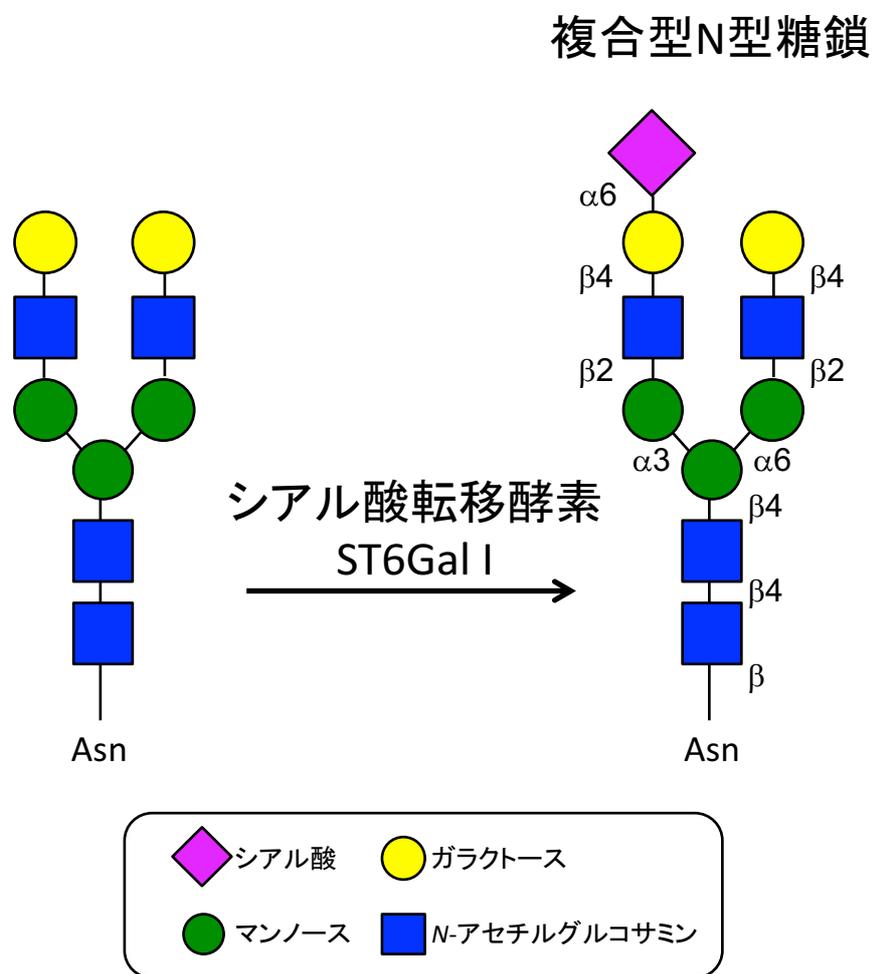


Figure 1. ST6Gal I の作用機序

ST6Gal I はタンパク質に結合する糖鎖の末端に α 2,6-結合様式でシアル酸を付加する。

Figure 2

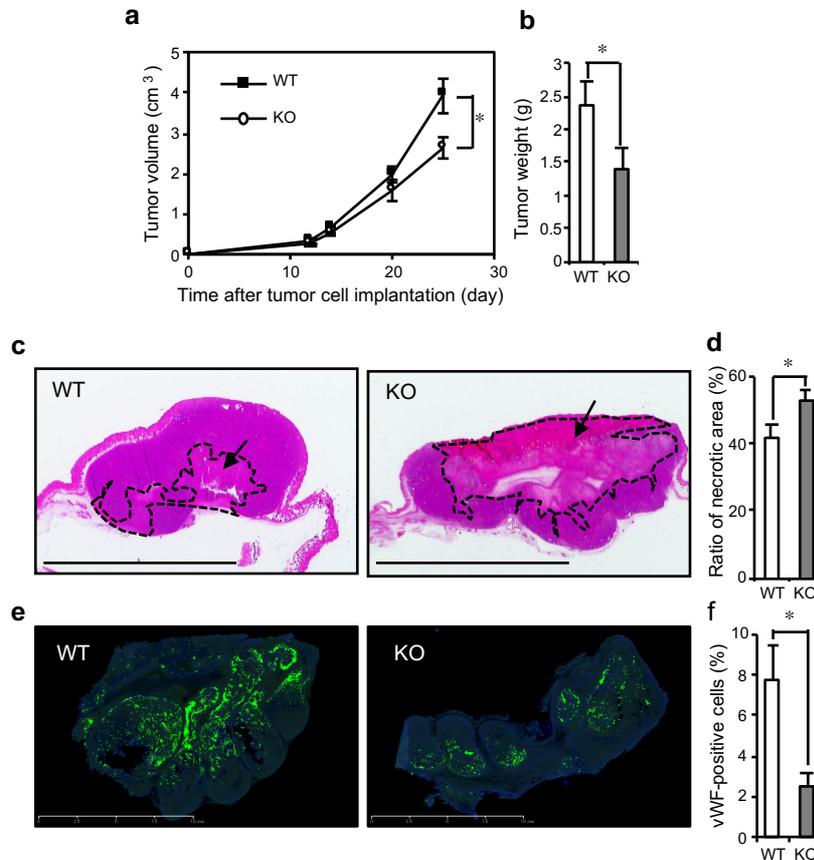


Fig. 2: *St6gal 1*^{-/-} マウスでは腫瘍の血管新生が減退している

a. 週齢の一致した *St6gal 1*^{+/+} (WT) と *St6gal 1*^{-/-} (KO) マウスの背部皮下に LLC 細胞を接種した。腫瘍サイズは 3-5 日ごとに測定した。**p* < 0.05 (Student's *t*-tests)。 b. LLC 細胞接種 24 日後に、腫瘍を解剖的に取り出し、重量を測定した。測定値は平均±標準誤差として示す (WT, *n* = 8; KO, *n* = 7)。**p* < 0.05 (Student's *t*-tests)。 c. WT と KO マウスから取り出した腫瘍切片をヘマトキシリン・エオジン染色した。ネクロシス部は破線で囲み矢印で示した。スケールバー: 1cm。 d. 腫瘍のネクロシス部の面積を測定し、ネクロシス領域の割合をグラフにした。測定値は平均±標準誤差として示す (WT, *n* = 8)。**p* < 0.05 (Student's *t*-tests)。 e. WT と KO マウスから取り出した腫瘍切片を抗 VWF 抗体 (緑) で染色した。スケールバー: 1cm。 f. 腫瘍内の VWF 陽性血管領域を測定した。測定値は平均±標準誤差として示す (*n* = 3)。**p* < 0.05 (Student's *t*-tests)。

Figure 3

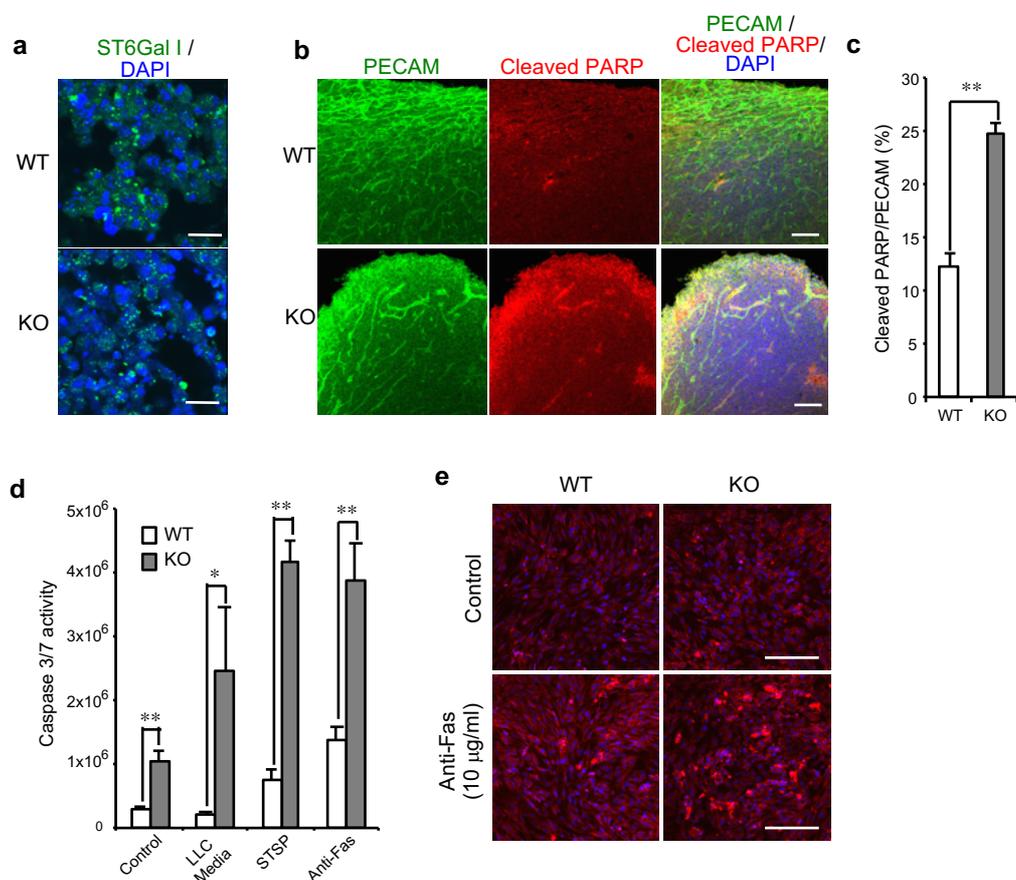


Fig. 3: ST6Gal I の欠失によって血管内皮アポトーシスは促進する

a. *St6gal 1*^{+/+} (WT) と *St6gal 1*^{-/-} (KO) マウスから取り出した腫瘍切片中の ST6Gal I を染色した。ST6Gal I (緑)、DAPI (青)。スケールバー: 20 µm。 b. WT と KO マウスから取り出した腫瘍切片の血管内皮 PECAM (緑) と cleaved PARP (赤) と DAPI (青) を染色した。スケールバー: 100 µm。 c. PECAM 陽性領域に対する PARP 陽性領域の割合を示す。測定値は平均±標準誤差として示す。それぞれのマウス ($n=3$) からの 5 枚の切片を解析に用いた。** $p < 0.01$ (Student's *t*-tests)。 d. WT と KO マウスから単離した血管内皮細胞を LLC 培養液、STSP (1 µM)、抗 Fas 抗体 (10 µg/ml) で刺激したのち、カスパーゼ 3 活性を顕微鏡 Olympus FV-1000 にて写真撮影し、写真を FV10-ASW ソフトウェアにて解析した。測定値は平均±標準誤差として示す。Prism 7 ソフトウェアにて分散分析を行なった。 e. WT と KO 血管内皮細胞を 10 mg/ml の抗 Fas 抗体で 6 時間刺激したのち、cleaved caspase-3 (赤) と DAPI (青) を染色した。スケールバー: 200 µm。

Figure 4

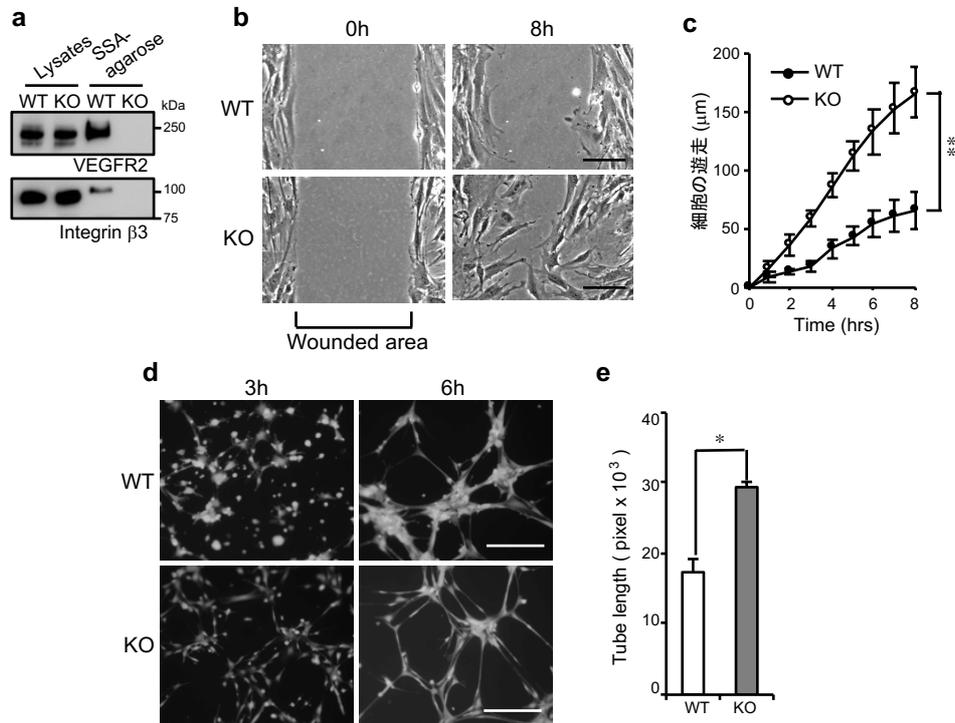


Fig. 4: ST6Gal I の欠失していると細胞遊走が亢進する

a. *St6gal 1*^{+/+} (WT) と *St6gal 1*^{-/-} (KO) マウスから単離した血管内皮細胞溶解液を SSA-agarose と反応させた。その後、沈降物をウェスタンブロットにて VEGFR2 と β 3 インテグリンの染色を行なった。 b. 創傷治癒アッセイ。WT と KO 血管内皮細胞を culture insert に蒔き、細胞が接着した後 insert をはずし 1 時間ごとに写真を撮影した。図は 0 または 8 時間の写真を示す。スケールバー: 100 μ m。 c. 創傷治癒アッセイのそれぞれの経過時間の写真につき 5 カ所の移動距離を測定した。測定値は平均 \pm 標準誤差として示す。** $p < 0.01$ (Student's t -tests)。 d. In vitro チューブ形成アッセイ。WT と KO 血管内皮細胞をそれぞれ VEGF を添加した重合マトリゲルに懸濁し、3 または 6 時間インキュベートした。その後、calcein-AM で染色し、チューブ形成を観察した。スケールバー: 200 μ m。 e. In vitro チューブ形成アッセイの 3 時間における、管の長さを angiogenesis assay software (KURABO) を用いて決定した。* $p < 0.05$ (Student's t -tests)。

Figure 5

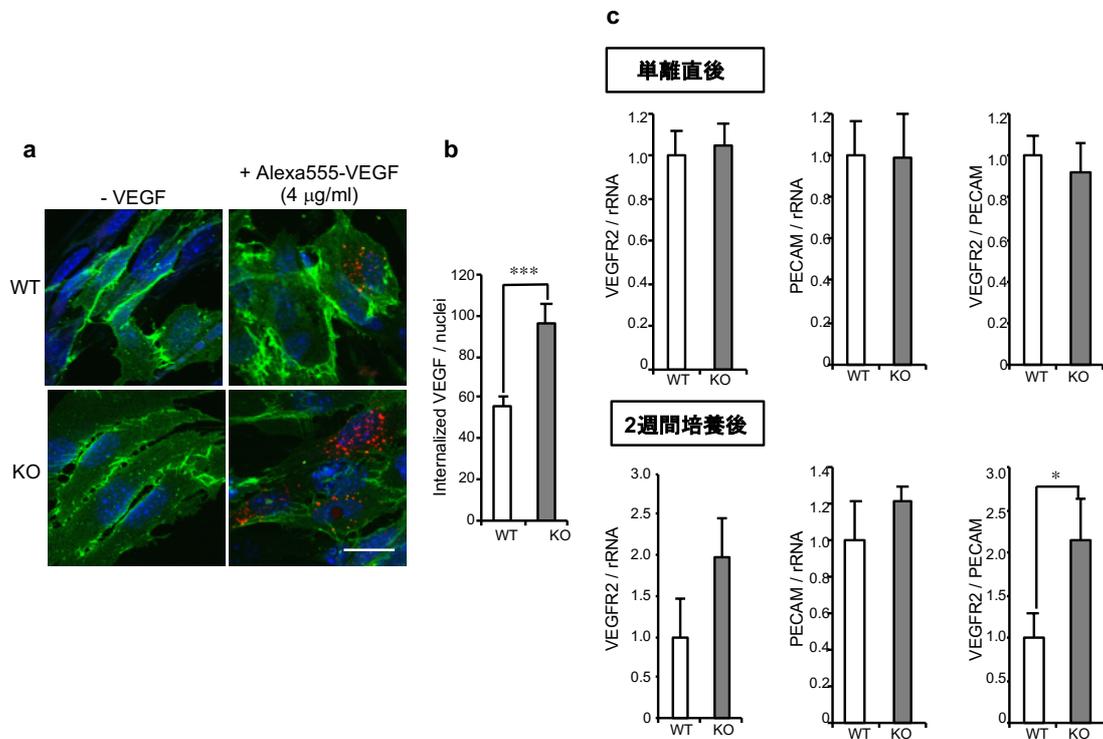


Fig. 5: ST6Gal I 欠失により VEGFR 依存性シグナルが亢進する。

a. *St6gal 1*^{+/+} (WT) と *St6gal 1*^{-/-} (KO) マウスから単離した血管内皮細胞に Alexa 555 標識 VEGF-A を添加し、30 分間反応した。その後、PECAM (緑) と DAPI (青) の染色を行なった。スケールバー: 20 μm。 b. ブラインド分析によって細胞内に取り込まれた Alexa 555 標識 VEGF-A を計数した。測定値は平均±標準誤差として示す (n = 10)。***p < 0.001 (Student's t-tests)。 c. WT または KO マウスから単離直後の血管内皮細胞もしくは単離後、~2 週間培養した血管内皮細胞における VEGFR2 と PECAM の mRNA 量をリアルタイム PCR により分析した。VEGFR2 と PECAM の発現量は rRNA 発現量と比較して相対定量法で算出した。測定値は平均±標準誤差として示す (n = 3)。

Figure 5

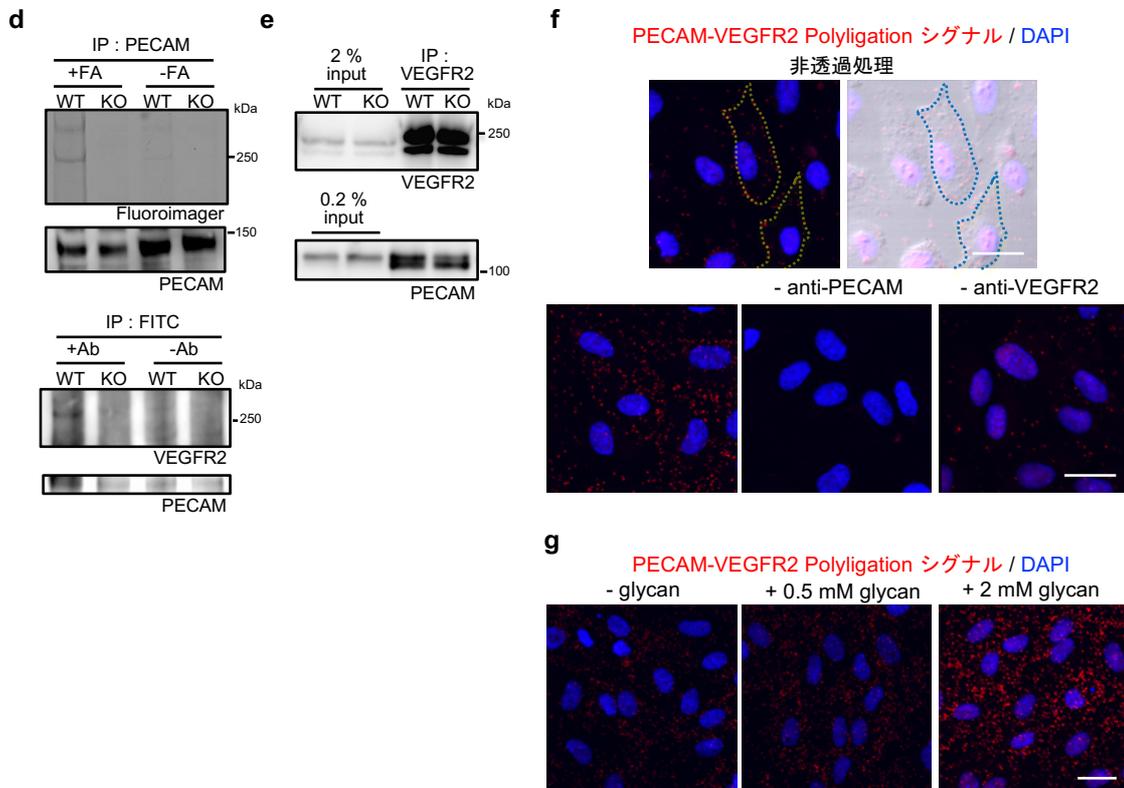


Fig. 5: ST6Gal I 欠失により VEGFR 依存性シグナルが亢進する

d. WT と KO マウス血管内皮細胞を用いて、PECAM 近傍に存在する分子を FITC-arylazide (FA) で標識し、同定するために、EMARS 解析を行なった。FITC で標識された分子は蛍光スキャナーで検出した (上)。また、FITC で標識された分子を抗 FITC 抗体で免疫沈降し、VEGFR2 抗体を用いて同定した (下)。 e. WT または KO 血管内皮細胞のマイクロソーム画分に抗 VEGFR2 抗体結合セファロースビーズを入れ反応した。共免疫沈降物の VEGFR2 と PECAM を免疫染色した。 f. HUVEC を用いて PECAM-VEGFR2 複合体を検出するために PLA アッセイを行なった。非透過処理 (上) と透過処理 (左下) した際の PLA アッセイの結果を示す。PECAM-VEGFR2 複合体シグナルの特異性を確認するために、抗 PECAM 抗体を加えないコントロール (中央下) と抗 VEGFR2 抗体を加えないコントロール (右下) を共に行なった。黄色と青の点線は細胞の境界線を示す。スケールバー: 20 μm 。 g. HUVEC に α 2,6-シアリル化糖鎖を添加 18 時間後、PECAM-VEGFR2 複合体を観察するために PLA アッセイを行なった。スケールバー: 20 μm 。

Figure 6

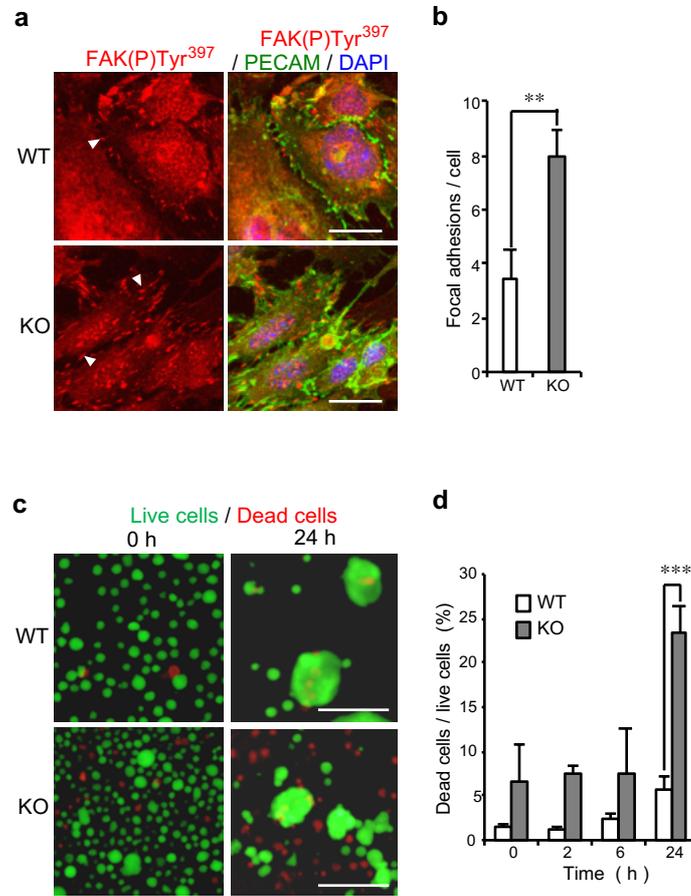


Fig. 6: ST6Gal I 欠損による調節不全 integrin 依存性シグナルは血管内皮細胞にアポトーシスを引き起こす

a. *St6gal 1*^{+/+} (WT) と *St6gal 1*^{-/-} (KO) マウスから単離した血管内皮細胞を固定し、pFAK-Y397 (赤)、PECAM (緑)、DAPI (青) の染色を行なった。スケールバー: 20 μ m。 b. pFAK-Y397 陽性の接着斑を 50 細胞分計測し、ブラインド分析した。WT と KO 細胞の、1 細胞に対する染色陽性の接着斑の数をグラフに示した。** $p < 0.01$ (Student's *t*-tests)。 c. WT と KO マウス血管内皮細胞を用いてアノイクシアッセイを行なった。生細胞は calcein-AM (緑) で、死細胞は EthD-1 (赤) で染色した。polyHEMA コートプレートへ細胞播種後、0, 24 時間の典型的な写真を示した。スケールバー: 100 μ m。 d. アノイクシアッセイの各時間帯における生細胞に対する死細胞の割合をグラフに示した。測定値は平均±標準誤差として示す ($n = 3$)。* $p < 0.001$ (Student's *t*-tests)。

Figure 6

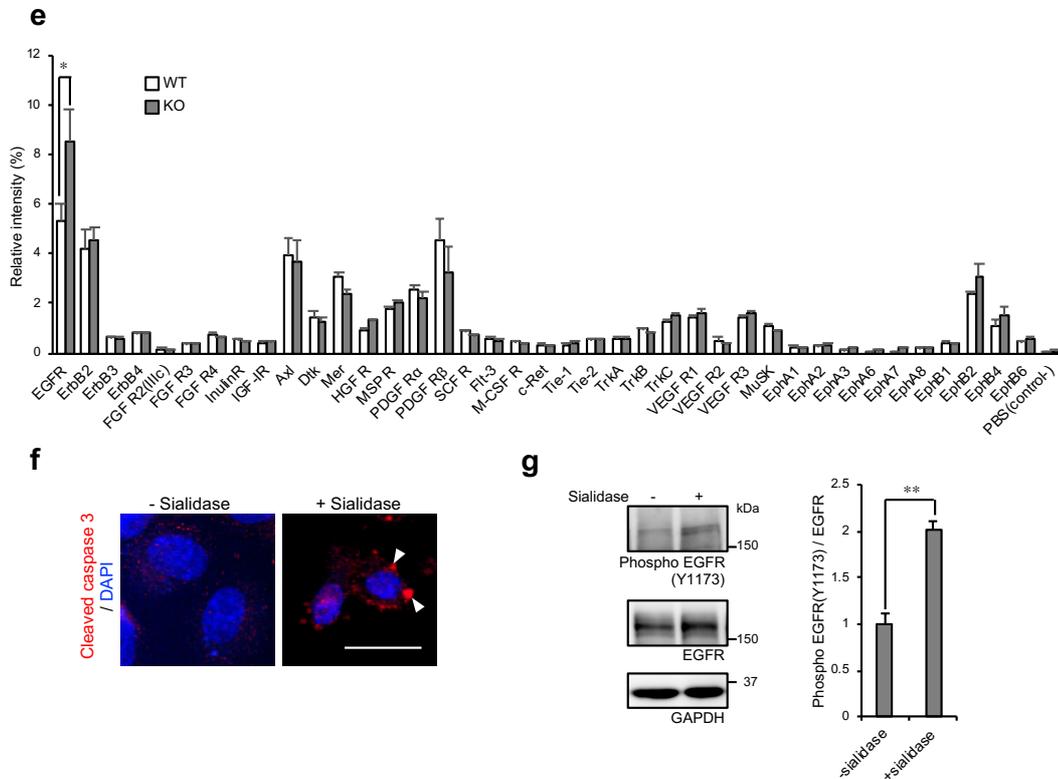
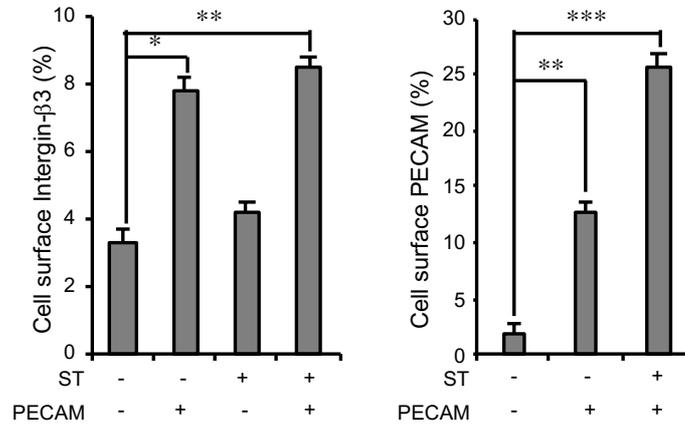


Fig. 6: ST6Gal I 欠損による調節不全 integrin 依存性シグナルは血管内皮細胞にアポトーシスを引き起こす

e. WT と KO マウス血管内皮細胞を polyHEMA コートプレートへ細胞播種 30 分後、細胞を回収・溶解し、Proteome Profiler Mouse Phospho-RTK Array を行なった。各スポットの相対的なシグナル強度をコントロール強度 (100%) に対する比として定量化した。測定値は平均±標準誤差として示す ($n=4$)。* $p < 0.05$ (Student's t -tests)。 f. HUVEC をシアリダーゼ処理し、固定し、抗 cleaved caspase-3 抗体 (赤) と DAPI (青) で染色した。三角矢印は典型的で顕著な cleaved caspase-3 シグナルを示す。 g. HUVEC を±シアリダーゼ処理し、細胞溶解液を用いて EGFR、pEGFR-Y1173、GAPDH のウェスタンブロットを行なった (左)。右のグラフは EGFR に対する pEGFR-Y1173 の割合を示す。値は平均±標準誤差として示す ($n=3$)。** $p < 0.01$ (Student's t -tests)。

Figure 6

h



i

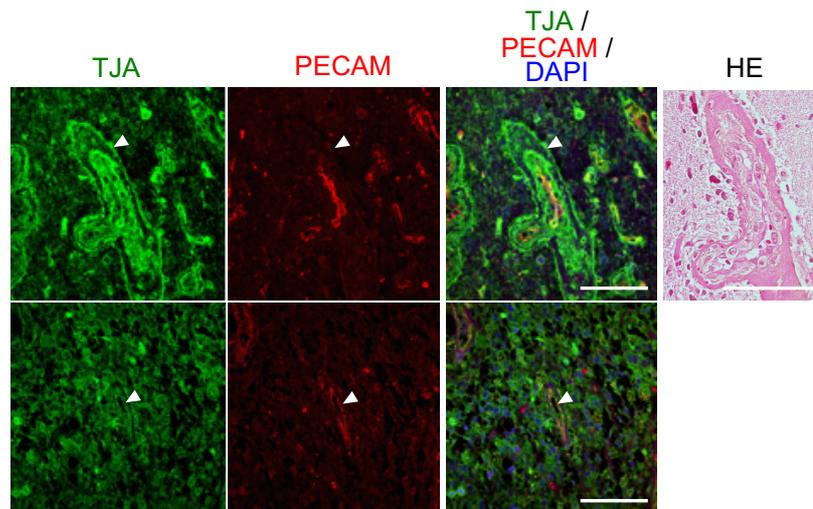


Fig. 6: ST6Gal I 欠損による調節不全 integrin 依存性シグナルは血管内皮細胞にアポトーシスを引き起こす

h. PECAM および/または ST6Gal I を過剰発現させた CHO 細胞の細胞表面の integrin-β3 と PECAM の増加量をフローサイトメトリーで測定した。 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ (ダネット検定)。 i. ヒトの脳のアストロサイトーマの切片を組織学的解析のためにヘマトキシリン・エオジン染色(右)、もしくは PECAM と $\alpha 2,6$ -シアル酸 (TJA のエピトープ) で染色した。下部パネルは正常脳血管部を示す。スケールバー: 100 μm 。

Figure 7

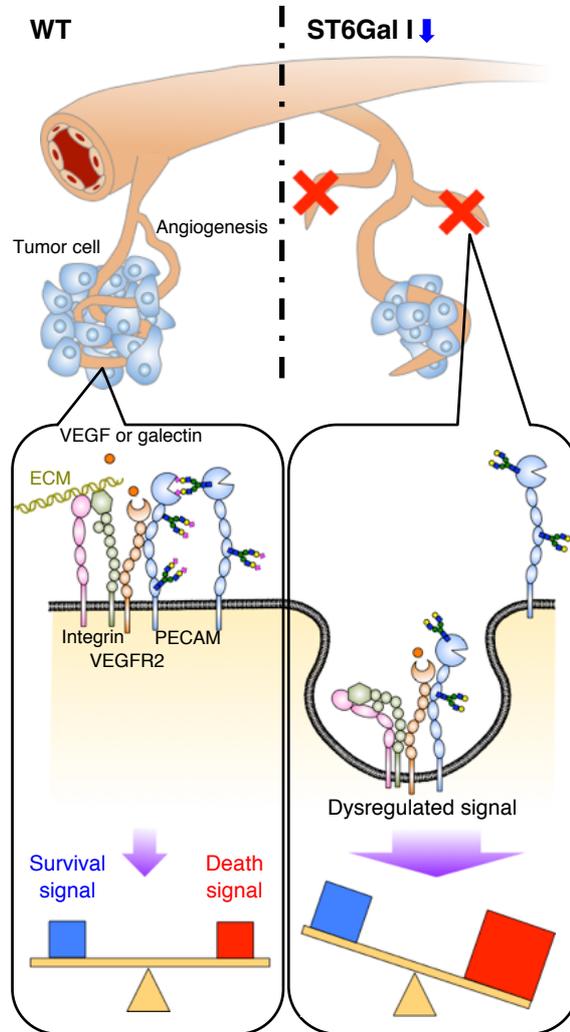


Fig. 7: α 2,6-シアル酸依存的に腫瘍ない血管新生が減少する仕組みの模式図

野生型マウスに腫瘍細胞を移植した場合（左）。ST6Gal I 欠損マウスに腫瘍細胞を移植した場合、腫瘍の血管内皮細胞では細胞膜上での PECAM 同士の相互作用が不安定になり、PECAM の内在化（細胞内への取り込み）が起こる。PECAM と機能的複合体を形成している β 3 インテグリンや VEGFR2 もその内在化に巻き込まれて PECAM と一緒に細胞内へ取り込まれる。その結果、異常な調節不全シグナルが生じ、細胞の状態が増殖よりも細胞死に傾くことで、腫瘍内の血管内皮細胞の現象が起こり、腫瘍の増大が減退する（右）。

謝辞

本論文は筆者が理化学研究所 システム糖鎖生物学研究グループ 疾患糖鎖研究チームに在籍中の研究成果をまとめたものである。同チームのチームリーダーである谷口直之先生には本研究の実施の機会を与えてくださったことに深謝する。副チームリーダーである北爪しのぶ先生には研究の遂行にあたって終始、ご指導をいただくとともに、本論文の細部に渡りご助言いただいた。ここに深謝の意を表す。同チーム小川加寿子氏には本研究を遂行するにあたり、動物実験などでご助力いただいた。感謝の意を表す。福島県立医科大学 医学部 生化学講座の橋本康弘教授には博士号取得の機会を与えていただき、ここに感謝の意を表す。同生化学講座の山田和子様には博士号取得に関する様々な事務的な手続きを代行していただき、ここに感謝の意を表す。福島県立医科大学 看護学部 生命科学部門の本多たかし教授には本論文中の腫瘍内血管の評価などに関して臨床的なご指導とご協力を賜り、感謝の意を表す。理化学研究所 生命医科学研究センター 肝がん予防研究ユニットリーダーの小嶋聡一先生並びに理化学研究所 脳神経科学研究センター タンパク質構造疾患研究チームの小見悠介博士にはこの研究で用いた LLC 細胞をご提供いただき、また腫瘍移植実験のご指導をいただいた。ここに感謝の意を表す。埼玉医科大学 医学部 生化学講座の小谷典弘准教授には本論文中の EMARS 法に関してご指導いただき、感謝する。東京大学 医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス病態制御分野の川口寧教授には本論文執筆にあたり、温かく見守ってくださり、感謝の意を表す。