

博士論文

2024 年度

低容量糖代謝ストレスを介したがん幹細胞性制御機構の解明

京都産業大学大学院

生命科学研究科 生命科学専攻

博士後期課程 3 年

学生証番号 187040

氏 名 岩本 駿吾

目次

1. 要旨	3
2. 序論	4
3. 略語表	8
4. 実験材料及び方法	
4-1. ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞の樹立	10
4-2. 細胞培養	11
4-3. 阻害剤処理と単糖の添加処理	11
4-4. マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析法 (MALDI-TOF MS) による <i>N</i> -結合型糖鎖の定量分析	11
4-5. イオンペア逆相 HPLC による糖ヌクレオチドの定量	12
4-6. LLO 分析	12
4-7. フローサイトメトリー解析	14
4-8. マンモスフィア形成アッセイ	14
4-9. アポトーシスアッセイ	14
4-10. RT-qPCR 法	14
4-11. RNA-seq 解析	15
4-12. 転写データの解析	15
4-13. 遺伝子セットエンリッチメント解析 (GSEA)	15
4-14. 動物実験	15
4-15. 統計解析	16
5. 結果	
5-1. ヒアルロン酸の過剰産生に伴う <i>N</i> -結合型糖鎖の特徴的な変化	17
5-2. ヒアルロン酸過剰産生がん細胞における糖ヌクレオチドの細胞内プールの減少	20
5-3. ヒアルロン酸過剰産生がん細胞における <i>N</i> -結合型糖鎖前駆体の減少	21
5-4. 低用量 TM の長期処理によるがん幹細胞様の形質獲得	22
5-5. 低用量 2-DG の長期処理によるがん幹細胞様の形質獲得	24
5-6. 低用量 TM および 2-DG の長期処理による化学療法抵抗性の増強効果	29
5-7. 糖代謝ストレス下における Notch および WNT/ β -カテニンシグナル関連遺伝子の発現変化	31
5-8. Notch シグナルによるがん幹細胞性の制御	35
5-9. GlcN および Man 添加による <i>N</i> -結合型糖鎖合成の部分的回復	36
5-10. GlcN および Man 添加によるがん幹細胞性の抑制とシスプラチン治療効果の増強	38
6. 考察	41

7. 表-----	45
8. 参考文献-----	55
9. 論文目錄-----	63
10. 謝辭-----	64

1. 要旨

がん幹細胞 (CSCs) は、自己複製によりがん幹細胞を生み出すと同時にがん細胞に分化し、腫瘍形成に働くとされている。また、がん幹細胞は化学療法や放射線治療に耐性を持ち、がん再発の主要因であると考えられている。近年では、乳がんや大腸がん、膵臓がんなど様々ながん種でがん幹細胞の存在が明らかとなっており、がん幹細胞とがん細胞の相互変換を制御する細胞内代謝の重要性が注目されている。またこれまでの研究では、悪性乳がん細胞でヒアルロン酸が過剰に産生されていることや、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞において、高い造腫瘍能や自己複製能を示すがん幹細胞様の細胞の割合が増加することが明らかとなっている。ヒアルロン酸は、*N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) と D-グルクロン酸 (GlcUA) の二糖繰り返し構造からなる高分子多糖で、細胞内の糖ヌクレオチドであるウリジン二リン酸(UDP)-GlcNAc と UDP-GlcUA を合成基質として合成される。ヒアルロン酸は巨大な糖鎖分子であり、その生合成に糖供与体である UDP-GlcNAc や UDP-GlcUA を大量に必要とする。そこで本研究では、ヒアルロン酸産生による糖代謝の変化とがん幹細胞性との関連に着目して以下の研究を行った。

まず、細胞における糖鎖構造の網羅的解析を行い、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞における *N*-結合型糖鎖前駆体であるドリコール結合オリゴ糖 (LLO) の著しい減少と *N*-結合型糖鎖プロファイルの特徴的な変化を明らかにした。UDP-GlcNAc はヒアルロン酸生合成に必要な糖供与体であると同時に、LLO や *N*-結合型糖鎖の合成に必要な糖供与体でもある。従って、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞では、LLO 合成および *N*-結合型糖鎖修飾反応への UDP-GlcNAc の供給不足が、*N*-結合型糖鎖プロファイルの変化の要因であると考えられた。そこで次に、*N*-結合型糖鎖修飾阻害剤であるツニカマイシン (TM) や解糖系阻害剤 2-デオキシ-D-グルコース (2-DG) の低用量処理により、対照乳がん細胞の LLO 合成と *N*-結合型糖鎖修飾を部分的に阻害し、がん幹細胞性と抗がん剤のシスプラチンに対する耐性について解析した。その結果、低用量の TM あるいは 2-DG 処理により、がん幹細胞様細胞が増加し、がん幹細胞性の指標であるマンモスフィア形成とシスプラチン耐性が亢進した。RNA-seq と Gene Set Enrichment 解析は、低容量の糖代謝ストレスに曝された対照乳がん細胞で、Notch シグナル伝達経路が活性化していることを明らかにした。また、阻害剤による Notch シグナル伝達の遮断、あるいはグルコサミン (GlcN) とマンノース (Man) 添加による *N*-結合型糖鎖修飾の回復は、マンモスフィア形成とシスプラチン耐性を減弱した。

以上の結果は、低容量の糖代謝ストレスが、*N*-結合型糖鎖修飾の変化と Notch シグナルの活性化を通じて、がん細胞のがん幹細胞性と抗がん剤耐性を促進することを示唆している。

2. 序論

がん細胞は、その活発な代謝や増殖のため、大量のエネルギーや生体物質を必要とする。このためがん細胞は、低栄養、低血糖および低酸素などの種々のストレスに曝されている。こうしたストレス環境下において、がん細胞は、細胞内の代謝反応やシグナル伝達を変化させることによって、代謝ストレス軽減にはたらく適応機構を構築し、ストレス耐性などを獲得しているとされる。

がん幹細胞 (CSCs) は、自己複製によりがん幹細胞を生み出すと同時に腫瘍組織を構成する様々な系統のがん細胞を生み出し、腫瘍形成に働くとされている。また、がん幹細胞は化学療法や放射線治療に耐性を持ち、がん再発の主な要因であると考えられているため、がん幹細胞性を制御することは、がん根治のための新たな治療法の開発において非常に重要とされている[1, 2]。固形がんにおけるがん幹細胞の存在は、乳がんですべて確認され、細胞表面マーカーである CD24 や CD44 の発現を標的に CD44 陽性/CD24 陰性あるいは弱陽性の細胞集団をがん幹細胞と特定し、その高い造腫瘍能や自己複製能が明らかとなった[3]。この報告以降、多くのがん腫においてがん幹細胞の同定が進み、がん幹細胞の発生機序やがん幹細胞性を制御するメカニズムが解明されつつある。がん幹細胞とがん細胞の相互変換を制御する代謝ストレスの重要性は、多くの固形がんを対象とした研究で示されてきた[4-7]。しかしながら、代謝ストレスが、がん幹細胞の発生・維持・治療耐性にどのように寄与しているのかなど、詳細なメカニズムや意義についてはまだ明らかにされていない。

がんの特徴のひとつである異常な糖鎖修飾は、がん細胞の増殖や転移、免疫回避、多剤耐性などを制御するうえで重要な役割を果たしている[8-10]。がん細胞は、様々なグルコース代謝産物の増減を感知することによって、その糖鎖成分と構造を大きく変化させることが知られている[11-14]。近年では、がん幹細胞はがん細胞と異なる糖鎖プロファイルを持つことが示され、がん幹細胞性の制御と糖鎖修飾との関連性が明らかにされつつある。例えば、EGFR や Wnt 受容体における *N*-結合型糖鎖修飾の異常は、上皮間葉転換 (EMT) を介してがん幹細胞性の制御にはたらくことが報告されている[15-18]。また、最近の研究から、グルコース代謝の副経路であるヘキサミン合成経路 (HBP) の代謝流速 (フラックス) の加速が、UDP-GlcNAc の細胞内プールの増加とともにタンパク質の *N*-結合型糖鎖修飾の変化と、それに伴う異常な細胞内シグナル伝達を引き起こし、がん幹細胞性の獲得と化学療法抵抗性を促進するといった知見も得られている[19, 20]。

N-結合型糖鎖修飾は、翻訳された新生タンパク質のアスパラギン残基に糖鎖を付加・伸長する反応である。この反応は、多くの膜結合タンパク質や分泌タンパク質の適切なフォールディング、分泌、構造完全性、動態、そして機能の調節に重要な翻訳後修飾反応であり、細胞の成長、生存、アポトーシスなどに関わる様々な細胞内シグナルを制御している。真核生物の *N*-結合型糖鎖は、 $\text{Man } \alpha 1-6(\text{Man } \alpha 1-3)\text{Man } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-$

Asn-X-Ser/Thr からなる共通のコア構造を持ち、その糖鎖構造に基づいて、パウチマンノース型、高マンノース型、コンプレックス型、そしてハイブリッド型の4つのタイプに分類される。*N*-結合型糖鎖の合成は、ER 膜の細胞質側で UDP- GlcNAc から GlcNAc リン酸がドリコールリン酸(Dol-P)に転移され、ドリコールピロリン酸 GlcNAc (GlcNAc-PP-Dol)が形成される反応により開始する(図1) [21]。次に、GDP-Man を糖供与体として5つのマンノース残基が付加され、細胞質側から ER 内腔にフリップする。続いて、ドリコールリン酸 Man およびドリコールリン酸 Glc を糖供与体として4つのマンノース残基および3つのグルコース残基が付加されることによって成熟型 LLO である Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol が合成される。その後、成熟型 LLO はオリゴ糖転移酵素 (OST) 複合体によって新生ポリペプチド受容体内のアスパラギン残基に転移される。さらに、小胞体とゴルジ体においてプロセッシングと様々な単糖の付加を経て、複雑な構造を有する *N*-結合型糖鎖が形成される[22]。

ヒアルロン酸は細胞の増殖や移動に重要な細胞外マトリックスの主要な構成成分であり、乳がんや大腸がんなど様々ながん腫において、その高い産生とがん進展との密接な関連が報告されている[23-25]。近年では、ヒアルロン酸の蓄積が進行がん患者の予後不良と関連していることを示す報告が増えてきている[25-28]。所属研究室ではこれまでに、ヒアルロン酸を過剰産生する乳がんモデルマウスの解析から、乳がんにおけるヒアルロン酸の過剰産生が、がんの形成や進展に働くことを明らかにしてきた[23, 29-31]。また、乳がん幹細胞マーカーである CD44 および CD24 の細胞表面における発現やスフェロイド形成、そして免疫不全マウスにおける造腫瘍性から、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞において、がん幹細胞様細胞の割合が増加していることを明らかにした[32]。さらに、ヒアルロン酸合成欠損乳がん細胞では、がん幹細胞性が減弱し、抗がん剤に対する耐性も低下していることを明らかにしている[20]。このことは、がん細胞におけるヒアルロン酸の産生が、がん幹細胞性や抗がん剤耐性の促進に働くことを示唆している。最近のメタボローム解析により、ヒアルロン酸はその生合成と関連する細胞代謝のリプログラミングによって、がん幹細胞性を制御していることが明らかになってきた[29]。

ヒアルロン酸は GlcNAc と GlcUA の二糖繰り返し構造から成る直鎖状高分子多糖であり、哺乳動物では3種類のヒアルロン酸合成酵素 (HAS1-3) によって、UDP- GlcNAc と UDP-GlcUA から合成される(図2) [33]。このうち UDP- GlcNAc は、グルコース代謝の副経路である HBP により合成され、細胞内に取り込まれるグルコースの2-5%がこの経路で消費される(図3) [34, 35]。HBP は、UDP-GlcNAc 合成に必須の代謝経路であるだけでなく、主要な糖ヌクレオチドの生合成を制御する中心的な経路でもある。また、グルコースから UDP-Glc を経て UDP-GlcUA が生成されるグルクロン酸経路や、同じくグルコースから GDP-Man を生成するマンノース代謝経路もグルコース代謝経路の副経路として働いている。UDP-GlcNAc と UDP-Glc そして GDP-Man はいずれも、タンパク質の *N*-結合型糖鎖修飾に必須の糖供与体であり、多くの生物学的機能を制御している(図1)

[36]。従って、ヒアルロン酸過剰産生による HBP やグルクロン酸経路のフラックスの加速は、細胞内糖ヌクレオチド合成に影響し、結果として *N*-結合型糖鎖の伸長と分枝のパターンに変化を引き起こすと考えられる[37, 38]。

本研究では、ヒアルロン酸合成などによって引き起こされる低容量の糖代謝ストレスが、*N*-結合型糖鎖修飾の変化を通じて、がん細胞のがん幹細胞性と抗がん剤耐性を促進するというがん幹細胞性の新たな制御機構を明らかにした。

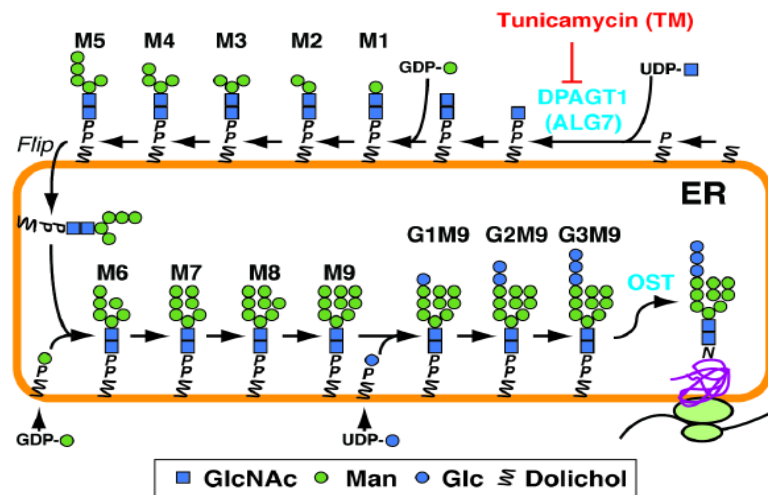


図 1. LLO 生合成の模式図

LLO 生合成の模式図。LLO の形成は、ER 膜の細胞質側で UDP-GlcNAc から GlcNAc とリン酸基がドリコールリン酸(Dol-P)に転移されることにより開始する。続いて、Man 残基と Glc 残基の付加や ER 内腔へのフリップを経て、成熟型 LLO である $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ が合成され、オリゴ糖転移酵素 (OST) 複合体によって新生ポリペプチド受容体内のアスパラギン残基に転移される。

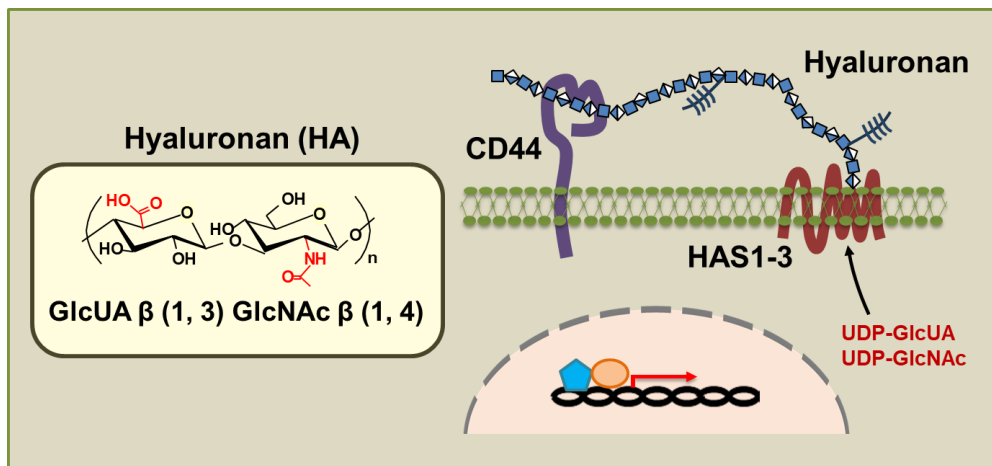


図 2. ヒアルロン酸の生合成

ヒアルロン酸は GlcNAc と GlcUA の二糖繰り返し構造から成る直鎖状高分子多糖であり、哺乳動物では 3 種類のヒアルロン酸合成酵素（HAS1-3）によって、細胞質に存在する UDP-GlcNAc と UDP-GlcUA から合成される。通常、ヒアルロン酸の合成は HAS によって厳密に制御されているが、多くのがん腫ではこの機構が破綻しており、ヒアルロン酸が過剰に産生されている。

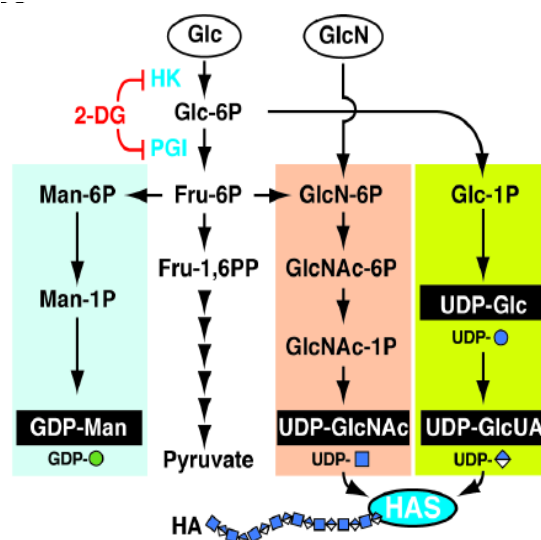


図 3. 糖ヌクレオチド生合成の模式図

UDP-GlcNAc と GDP-Man は、それぞれヘキソサミン生合成経路（オレンジ）と GDP-Man 生合成経路（青）において、共通の解糖系中間体であるフルクトース-6-リン酸（Fru-6P）から合成される。UDP-GlcUA は、グルコース-6-リン酸（Glc-6P）からグルコース-1-リン酸（Glc-1P）への変換、Glc-1P から UDP-Glc への変換、UDP-Glc の酸化という 3 段階の反応（黄緑色）によって生成される。UDP-GlcNAc と UDP-GlcUA はヒアルロン酸の生合成に利用される。

3. 略語表

AMPK: AMP-activated protein kinase
ATP: Adenosine triphosphate
CSC: Cancer stem cell
DEG: Differentially expressed genes
DHB: 2,5-dihydroxybenzoic acid
DMSO: Dimethyl sulfoxide
Dol: Dolichol
EDEM: ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein
EGFR: Epidermal growth factor receptor
ER: Endoplasmic reticulum
ERAD: ER-associated protein degradation
FBS: Fetal bovine serum
FDR: False discovery rate
Fru: Fructose
Gal: Galactose
GDP: Guanosine diphosphate
GlcN: Glucosamine
GlcNAc: N-acetyl-D-glucosamine
GlcUA: D-glucuronic acid
GSEA: Gene set enrichment analysis
HAS: Hyaluronan synthases
HBP: Hexosamine biosynthesis pathway
HK: Hexokinase
HM: High mannose
HPLC: High performance liquid chromatography
KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes
LLO: Dolichol lipid-linked oligosaccharide
Man: Mannose
MMTV: Mouse mammary tumor virus
MSigDB: Molecular signatures database
NES: Normalized enrichment score
OST: Oligosaccharyltransferase
PBS: Phosphate-buffered saline
PGI: Glucose-6-phosphate isomerase

PI: Propidium iodide
PM: Pauci mannose
PNGase F: Peptide-N-glycosidase F
RIN: RNA integrity number
ST: Sialyltransferase
TCEP: Tris (2-carboxyethyl) phosphine
Tg: Transgenic
TM: Tunicamycin
UDP: Uridine diphosphate
2-DG: 2-deoxy-D-glucose

4. 材料および方法

4-1. ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞の樹立

ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞は、以前報告した方法に従い樹立した（図 4）[39]。まずは、Has2 conditional Tg マウスと MMTV-Neu 乳がんモデルマウスを交配し、Has2^{+Neo} マウスを作製した。次に、Has2^{+Neo} マウスを MMTV-Cre/MMTV-Neu マウスと交配し、乳がん細胞で Has2 を過剰発現する Has2^{ΔNeo} マウスを作製した[40]。各マウスに発生した乳がんから初代乳がん細胞をそれぞれ樹立し、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞（Has2^{ΔNeo} 細胞）と対照乳がん細胞（Has2^{+Neo} 細胞）として以下の実験に供した。

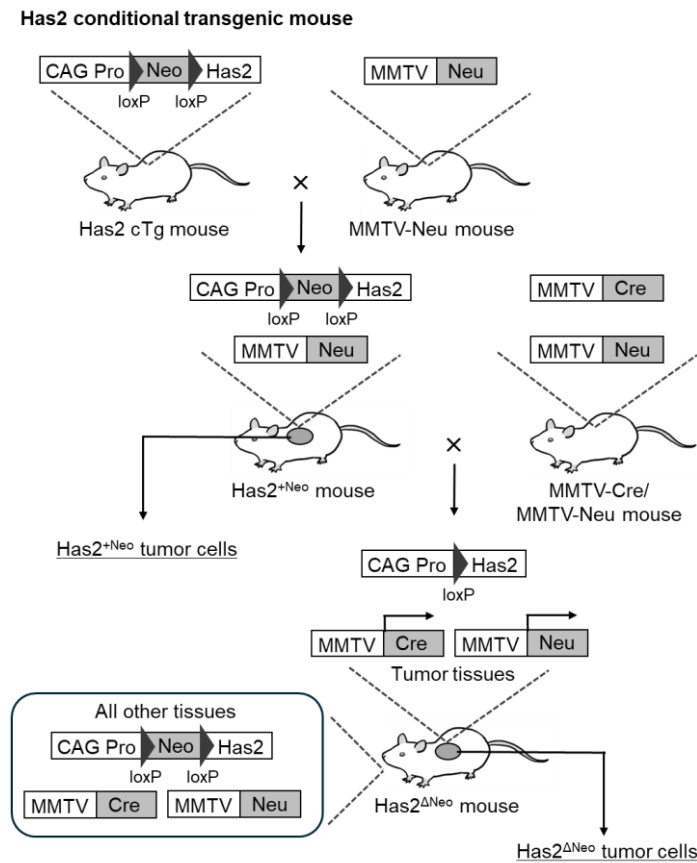


図 4. 乳がんモデルマウスの樹立

Has2 過剰発現乳がんモデルマウスを樹立するため、Has2 cTg マウスを MMTV-Neu 乳腺腫瘍モデルマウスと交配し、Has2^{+Neo} マウスを作製した。さらに、この Has2^{+Neo} マウスを MMTV-Neu/MMTV-Cre ダブルトランスジェニックマウスと交配し、Has2^{ΔNeo} マウスを作製した。MMTV プロモーターの制御下で Cre リコンビナーゼを発現する Has2^{ΔNeo} マウスでは、Cre を介した導入遺伝子の組換えにより Neo カセットが欠損し、Has2 およびヒアルロン酸が過剰発現する。対照的に、コントロールの Has2^{+Neo} マウスでは、Cre リコン

ビナーゼの発現がないため、Has2 およびヒアルロン酸の発現は不活性となる。ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞 (Has2^{ΔNeo} 細胞) と対照乳がん細胞 (Has2^{+Neo} 細胞) は、それぞれ Has2^{ΔNeo} と Has2^{+Neo} マウスの原発性乳がんから樹立された。

4-2. 細胞培養

初代乳がん細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS) および 1%ペニシリン・ストレプトマイシン (富士フィルム和光純薬) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; ナカライテスク) を用いて、37°C、5% CO₂ 培養条件下で増殖させた。

4-3. 阻害剤処理と単糖の添加処理

Has2^{+Neo} 細胞と Has2^{ΔNeo} 細胞を 60mm の細胞培養ディッシュに 3.3×10^5 細胞/培養ディッシュの細胞密度で播種し、10% FBS を含む DMEM を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。*N*-結合型糖鎖修飾を阻害するため、Has2^{+Neo} 細胞を 0-2.0 μg/ml TM (Sigma-Aldrich) または 0-5 mM 2-DG (富士フィルム和光純薬) で処理した後、8 日間培養した。また、Notch シグナル伝達を阻害するため、Has2^{ΔNeo} 細胞を 50 μM LY411575 (Selleck Chemicals LLC)、50 μM LY3039478 (Selleck Chemicals LLC)、20 μM DAPT (富士フィルム和光純薬)、1 μM LLNLe (Abcam) でそれぞれ処理した後、7 日間培養した。単糖の添加については、Has2^{ΔNeo} 細胞を 500 μM GlcN および 20mM Man、またはそのいずれかで処理した後、8 日間培養した。長期培養の際は、2-3 日おきに培地交換を行った。対照実験として、それぞれの処理濃度で DMSO を添加し、同様の日数で培養した。

4-4. マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析法 (MALDI-TOF MS) による *N*-結合型糖鎖の定量分析

糖タンパク質は、Fujitani らが報告した方法で抽出した[41]。まず初めに、細胞を cold PBS で 6 回洗浄し、cold PBS 中で細胞を剥離して回収した。細胞溶解液を 500 × g、4°C で 5 分間遠心した後、細胞ペレットを *N*-結合型糖鎖分析に用いた。100 μg の細胞タンパク質を、Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) と iodoacetamide を用いて還元アルキル化した後、4 倍量のエタノールを加え、-30°C で 3 時間インキュベートした。変性タンパク質を炭酸水素アンモニウム緩衝液に溶解し、既報のようにトリプシン消化および peptide-N-glycosidase F (PNGase F) 消化を行った[41, 42]。遊離した *N*-結合型糖鎖の分析は、aminolysis-SALSA を組み合わせたグライコプロッティング法を用いて行った[43, 44]。精製した糖鎖は、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB; Sigma-Aldrich) を基質として MALDI-TOF MS で分析した。各糖鎖の相対量は Cluster 3.0 ソフトウェアを用いて解析し、R の heatmap 関数 (ver. 4.2.2) を用いて階層的クラスタリングによるヒートマップを取得した。

4-5. イオンペア逆相 HPLC による糖ヌクレオチドの定量

Nakajima らや Chokchaitaweekul らの報告をもとに、イオンペア逆相 HPLC を用いて糖ヌクレオチドを定量した[20, 45]。

4-6. LLO 分析

LLO の抽出と解析は、Harada らや Massarweh らの報告を参考にして行った[46, 47]。まず初めに、細胞を PBS で 2 回洗浄し、cold PBS 中で剥離して回収した。細胞溶解液を $500\times g$ 、 4°C で 5 分間遠心した後、細胞ペレットは -80°C で保存した。凍結した細胞ペレットを、4 mM MgCl_2 を含む 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) 1ml に再懸濁した後、さらに 2ml methanol と 3ml CHCl_3 を加え、室温で 60 分間振盪した。 $2,000\times g$ 、15 分間、 4°C で遠心した後、三相（緩衝液/methanol 上相、 CHCl_3 下相、中間相）を分離した。LLO は、 CHCl_3 下相と、中間相の CHCl_3 /methanol/ H_2O (10:10:3) 処理により抽出された抽出物の両方から回収した。有機相中の LLO を凍結乾燥した後、オリゴ糖（LLO 糖鎖）を 50% isopropanol を含む 1ml HCl を用いて 100°C で 30 分間穏やかに酸加水分解し遊離させた。遊離した LLO 糖鎖を凍結乾燥し、1 ml H_2O に懸濁のうえ、水溶性オリゴ糖は Spelco ENVI-Carb カラム（Sigma-Aldrich）を用いて精製した[48]。精製した LLO 糖鎖を 2-aminopyridine (PA、富士フイルム和光純薬) で標識し、Monospin Amide カラム（GL サイエンス社）を用いてさらに精製した。PA 標識した糖鎖を Shodex NH2P-50 4E カラム ($4.6\times 250\text{ mm}$; Resonac Corp.) を用いたサイズ排除 HPLC により解析した。溶出には、溶媒 A (93% acetonitrile、7% 50mM ammonium acetate) と溶媒 B (20% acetonitrile、80% 50mM ammonium acetate) の 2 種類のグラジエントを用いた。グラジエントプログラムは、流速： 0.8 ml/min 、カラム温度：室温、標識した糖鎖の蛍光：励起波長 310 nm / 発光波長 380 nm に設定し検出した。PA 標識糖鎖は、増田化学工業から購入した PA 標識標準品 PA-M3B および PA-M5B の蛍光強度に基づいて定量した。

各 HPLC ピーク中の PA 標識 LLO 糖鎖は、Autoflex Speed 装置（Bruker Daltonics）を用いた MALDI-TOF MS で同定した（図 5）。サンプルは、 $1.0\text{ }\mu\text{l}$ の糖鎖溶液を $1.0\text{ }\mu\text{l}$ のマトリックス溶液（20 mg/ml DHB）と $1.0\text{ }\mu\text{l}$ の 20 mM 硫酸アンモニウムとともにターゲットプレートにスポットし、シグナルを $[\text{M}+\text{H}]^+$ にシフトさせることにより調製した。サンプル混合物は乾燥させた後、糖鎖を正反射モードで分析した。代表的な MS スペクトルデータは、GlycoWorkbench ソフトウェア（<https://code.google.com/archive/p/glycoworkbench/>）を用いて解析し、注釈を付けた[49]。

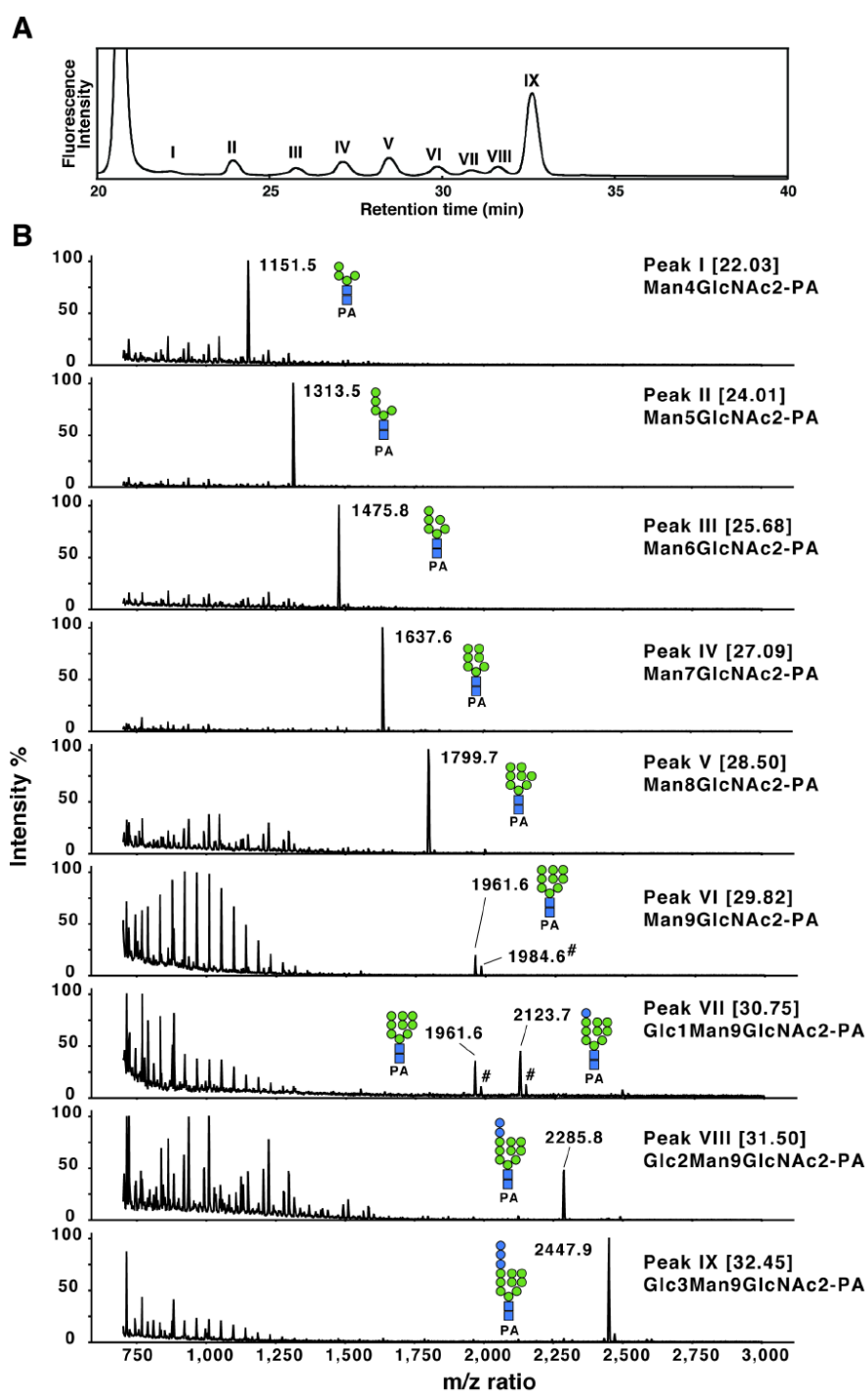


図 5. HPLC によって分離した LLO 糖鎖の MALDI-TOF MS 分析

(A) LLO 糖鎖の HPLC プロファイル。(B) 各ピークに対応する LLO 糖鎖の MALDI-TOF MS 分析結果。各ピークの構造は GlycoWorkbench ソフトウェアによって決定した。
#は主要ピークの水素イオン型を示す。

4-7. フローサイトメトリー解析

フローサイトメトリー解析は以前の報告に従って行った[20]。がん幹細胞様集団を同定するため、PE 標識抗 CD44 抗体 (eBioscience, 12-0441-82) と FITC 標識抗 CD24 抗体 (eBioscience, 11-0241-82) で細胞を染色した。細胞表面の Notch3 を検出するため、PE 標識抗 Notch3 抗体 (BioLegend, HMN3-133) で細胞を染色した。標識した細胞の分布は FACS Melody (BD Biosciences) で同定し、FlowJo ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて解析した。

4-8. マンモスフィア形成アッセイ

マンモスフィア形成アッセイは、以前の報告に従って行った[32]。阻害剤処理は、Has2^{+Neo}細胞を 0.05 または 0.1 μ g/ml の TM で 8 日間培養することにより行った。単糖の添加処理は、Has2 Δ Neo細胞を 500 μ M GlcN および 20mM Man、またはそのいずれかを含む培地、含まない培地で 8 日間培養することにより行った。TM または単糖で処理した後、5,000 個の Has2^{+Neo}細胞または 10,000 個の Has2 Δ Neo細胞は、無血清培地 Ham's F-12 に 20 ng/ml bFGF (富士フイルム和光ケミカルズ) および 20 ng/ml EGF (ミルテニ・バイオテック)、B27 (サーモ・フィッシャーサイエンティフィック) を添加したスフェロイド形成培地を含む 24 ウェルの超低接着プレート (Corning) に播種した。さらに、同じ濃度の TM または単糖を含む培地で 7 日間培養された。その後、位相差顕微鏡を用いて直径 25 μ m 以上の細胞塊の数を集計した。

4-9. アポトーシスアッセイ

アポトーシスアッセイは、MEBCTO アポトーシスキット (MBL) を用いて、取扱説明書のとおり Annexin V-FITC および PI の二重染色により行った。標識細胞の分布は、FACS Melody (BD Biosciences) を用いて同定し、FlowJo ソフトウェアを用いて初期および後期アポトーシス細胞数を測定した。

4-10. RT-qPCR 法

全 RNA は、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて、取扱説明書のとおり乳がん細胞から抽出した。逆転写は、PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio) を用いて、取扱説明書のとおりランダムプライミング法により行った。RT-qPCR は、QuantStudio3 Flex Real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific) を用いて、Notch3 (Mm00435270_m1, Applied Biosystems) の TaqMan 遺伝子発現アッセイと Probe qPCR Mix (Takara Bio) により行った。GAPDH mRNA の相対量は、TaqMan rodent GAPDH control reagents (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。相対 mRNA 発現は比較 Ct 法を用いて解析し、GAPDH 発現をもとに正規化した。

4-11. RNA-seq 解析

全 RNA は、RNeasy ミニキット (Qiagen) を用いて、Has2^{+Neo}細胞と TM または 2-DG 処理した Has2^{+Neo}細胞から取扱説明書のとおり抽出した。RNA サンプルの純度と濃度は、NanoDrop 2000c 装置 (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。RNA integrity number (RIN) は、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) により評価し、RIN スコアが 7 以上の RNA サンプルをライブラリー調製に用いた。cDNA ライブラリーは、NEBNext® Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs) と NEBNext® UltraTMII Directional RNA Library Prep Kit (New England Biolabs) を用いて調製した。RNA シーケンシングは、NovaSeq 6000 シーケンサー (Illumina) を用い、ペアエンド 150 bp モードで株式会社 Rhelixa により行われた。

4-12. 転写データの解析

RNA-seq データは、FastQC 0.11.7 を用いて品質をチェックし、Trimomatic 0.38 を用いて選別した[50, 51]。リードカウントデータは、Transcripts per million (TPM) で正規化し、遺伝子発現は RaNA-seq cloud platform (<https://ranaseq.eu/>) を用いて解析した[52]。発現変動遺伝子を評価する DEG 解析は、integrated differential expression and pathway (iDEP) online platform (ver. 0.94; <http://bioinformatics.sdstate.edu/idep/>) を用いて行った[53]。DESeq2 を用いて DEG を選別し、中でも $|\log_2FC| \geq 2$ かつ $FDR < 0.1$ (false discovery rate (FDR)) を満たす遺伝子を DEG と定義した。DEG のパスウェイ解析は、iDEP に基づく KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) データベースを用いて行った。

4-13. 遺伝子セットエンリッチメント解析 (GSEA)

GSEA は、MSigDB の hallmark 遺伝子セットと GSEA ソフトウェア (ver. 4.2.3; <http://software.broadinstitute.org/gsea/downloads.jsp>) を用いて行った[54, 55]。GSEA の結果は normalized enrichment score (NES) に基づいて評価した。

4-14. 動物実験

Has2^{ΔNeo}細胞 (5.0×10^5 細胞) を、500 μ M GlcN および 20mM Man を添加した DMEM または無添加の DMEM でそれぞれ 8 日間培養し、BALB/c ノードマウス (3-4 匹/グループ; 8 週齢雌; 日本クレア株式会社) の第 4 乳腺脂肪体に両側注射した。マウスには 0.5% (w/v) GlcN と 20% (w/v) Man を飲料水として与え、1 日おきに 100 μ L の同飲料水を経口投与した。腫瘍の大きさは、2 日ごとにデジタルノギスを用いて測定した。腫瘍体積は、「長さ \times 幅² \times 0.5」により算出した。シスプラチン (200 μ L 中 5mg/kg) は、図 26A のとおり指定のタイミングで腹腔内注射した。腫瘍は、がん細胞を接種して 24 日後に摘出した。動物の管理とすべての実験手順は、京都産業大学倫理委員会のガイドラインに従い、バイオセーフティレベル 2 の動物飼育施設で行った。

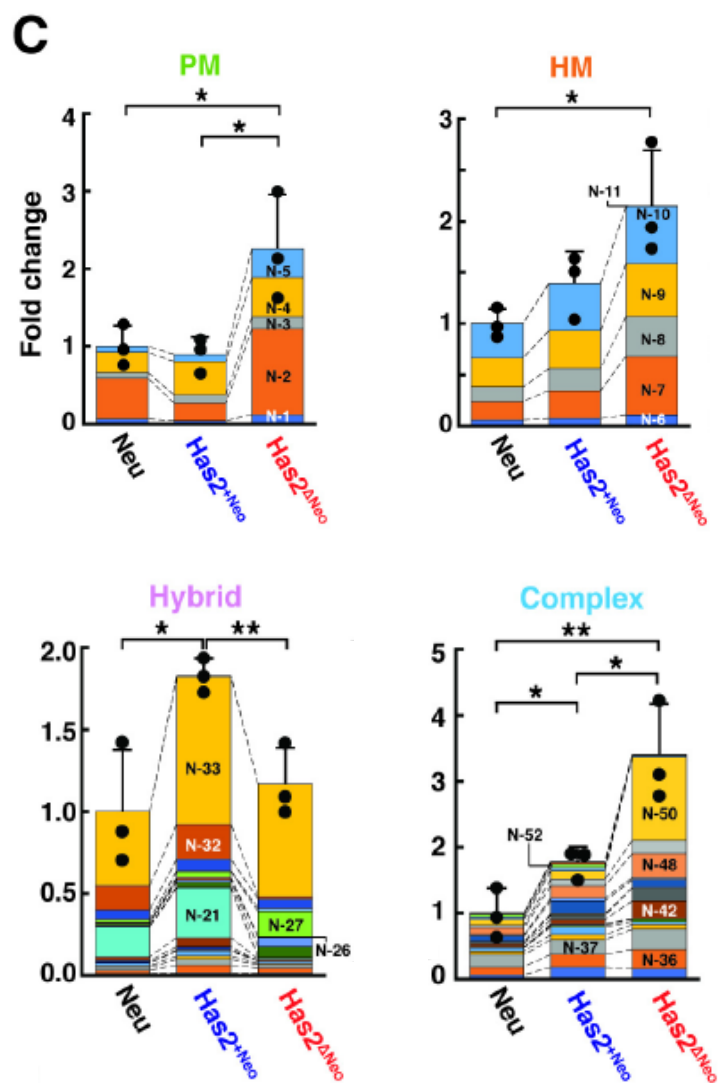
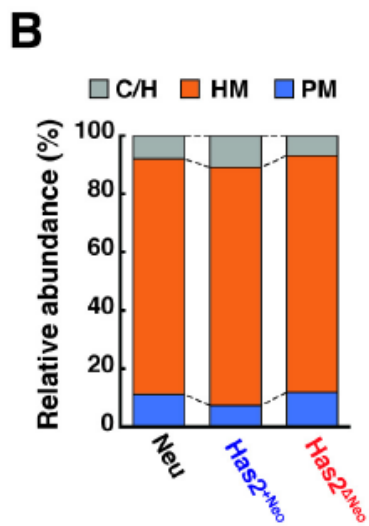
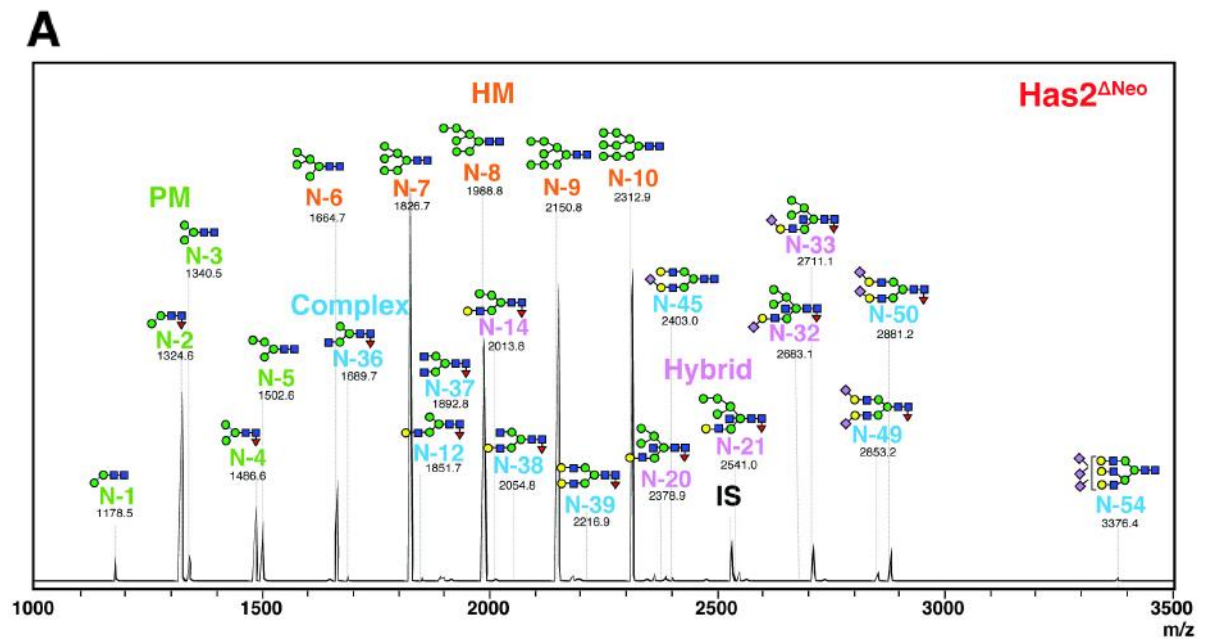
4-15. 統計解析

統計解析は、IBM SPSS Statistics 22 ソフトウェアを用いて行った。すべての実験は少なくとも 3 回行った。結果は平均値±標準偏差（SD）で報告した。p 値が<0.05 のときに有意差有りと判断した。

5. 結果

5-1. ヒアルロン酸の過剰産生に伴う *N*-結合型糖鎖の特徴的な変化

がん幹細胞性制御の根底にある分子メカニズムを解明するため、本研究ではまず、グライコミクス解析により、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞に特徴的な糖鎖構造を同定した。マウス乳腺腫瘍ウイルス (MMTV) プロモーター制御下に Neu がん原遺伝子を強発現するトランスジェニックマウス、サイレントな状態で Has2 遺伝子をマウスに導入したトランスジェニックマウス、そして、乳がん細胞特異的に Has2 遺伝子を強発現しヒアルロン酸を過剰産生するトランスジェニックマウスを用い、それら 3 種のトランスジェニックマウスに発生した乳がんより初代乳がん細胞である Neu 細胞、ヒアルロン酸低産生 Has2^{+Neo} 細胞、そしてヒアルロン酸過剰産生 Has2^{ΔNeo} 細胞をそれぞれ樹立した。これらヒアルロン酸産生能の異なる初代乳がん細胞の糖鎖構造を比較した結果、Neu 細胞とヒアルロン酸低産生 Has2^{+Neo} 細胞では同様のプロファイルを示したのに対し、ヒアルロン酸過剰産生 Has2^{ΔNeo} 細胞では *N*-結合型糖鎖プロファイルが大きく変化していた (図 6A-D)。*N*-結合型糖鎖は、高マンノース (High Mannose : HM) 型、パウチマンノース (Pauci Mannose : PM) 型、コンプレックス (Complex) 型、ハイブリッド (Hybrid) 型の 4 つのカテゴリーに分類される。PM 型 *N*-結合型糖鎖の相対量は、Neu 細胞では全 *N*-結合型糖鎖の約 11.1% を占め (図 6B)、Has2^{ΔNeo} 細胞ではその割合が有意に増加した (図 6C、D)。HM 型糖鎖は、Neu 細胞の全 *N*-結合型糖鎖の約 81.0% を占め (図 6B)、主に Man₅₋₉GlcNAc₂ 糖鎖から構成されていた (図 6C, D)。これに対し、Has2^{ΔNeo} 細胞では、短い Man₅₋₇GlcNAc₂ 糖鎖構造の増加が顕著であった (図 6C、D および表 1)。さらに、Has2^{ΔNeo} 細胞では、バイセクティング GlcNAc 構造を持つハイブリッド型 *N*-結合型糖鎖の相対量が減少した (図 6C、D および表 1)。コンプレックス型 *N*-結合型糖鎖の相対量は、ヒアルロン酸産生依存的に有意に増加した (図 6C)。コンプレックス型 *N*-結合型糖鎖のうち、末端に α2,6 結合したシアル酸を持つ糖鎖および *N*-結合型糖鎖にコアフコースが結合した糖鎖の相対量が Has2^{ΔNeo} 細胞で増加し、一方で α2,3 結合したシアル酸を持つ *N*-結合型糖鎖の相対量は Has2^{+Neo} 細胞で増加した (図 6C、D および表 1)。



D

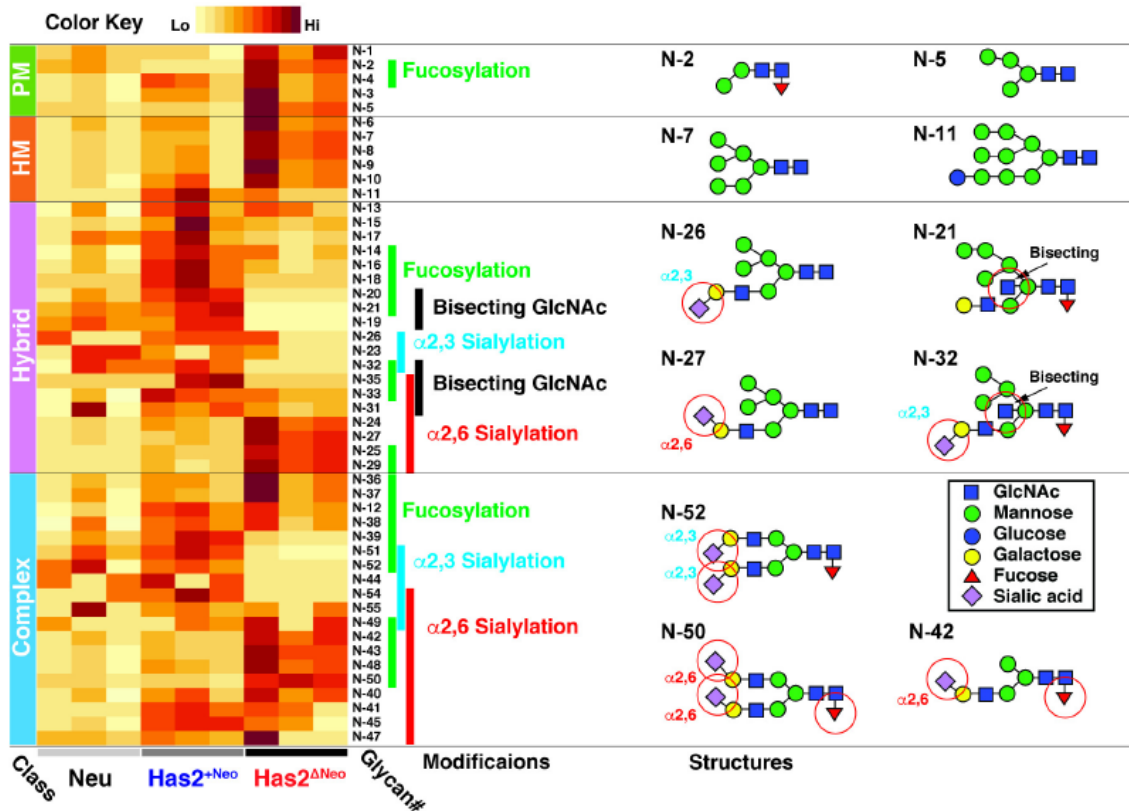


図 6. ヒアルロン酸産生能の異なる初代乳がん細胞における *N*-結合型糖鎖プロファイル

(A) ヒアルロン酸過剰産生 $\text{Has2}^{\Delta\text{Neo}}$ 細胞における *N*-結合型糖鎖の典型的な MALDI-TOF MS スペクトルと推定された *N*-結合型糖鎖構造。IS は内部標準を表す。(B) Neu 細胞、ヒアルロン酸低産生 $\text{Has2}^{+\text{Neo}}$ 細胞、ヒアルロン酸過剰産生 $\text{Has2}^{\Delta\text{Neo}}$ 細胞における *N*-結合型糖鎖の組成。*N*-結合型糖鎖組成は、全 *N*-結合型糖鎖に対する各糖鎖種の比率で表した。(C) パウチマンノース型、高マンノース型、コンプレックス型、ハイブリッド型 *N*-結合型糖鎖の相対量。各糖鎖構造を表す色や相対量の詳細は、表 1 に記載している。データは両側スチューデントの *t* 検定を用いて平均値 \pm 標準偏差 ($n=3$) を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。(D) *N*-結合型糖鎖の定量的糖鎖プロファイルに基づくヒートマップ解析。ヒートマップは、Neu 細胞、 $\text{Has2}^{+\text{Neo}}$ 細胞、 $\text{Has2}^{\Delta\text{Neo}}$ 細胞における *N*-結合型糖鎖の存在量を正規化したものである。各糖鎖構造や相対量の詳細は、表 1 に記載している。*N*-結合型糖鎖の重要な修飾は、ヒートマップ右側のバーと糖鎖構造の赤丸で示す。

5-2. ヒアルロン酸過剰産生がん細胞における糖ヌクレオチドの細胞内プールの減少

ヒアルロン酸の過剰産生は、糖ヌクレオチドの過剰消費によりタンパク質の *N*-結合型糖鎖修飾に影響を及ぼす可能性がある。なぜなら、ヒアルロン酸と *N*-結合型糖鎖の生合成経路は、共通のドナー基質である UDP-GlcNAc を共有しているからである。そこでイオンペア逆相 HPLC を用いて、Has2^{+Neo} 細胞と Has2^{ΔNeo} 細胞の糖ヌクレオチドの細胞内レベルを測定した (図 7A)。測定された糖ヌクレオチドのうち、UDP-GlcNAc と UDP-GlcUA の細胞内レベルは、Has2^{+Neo} 細胞より Has2^{ΔNeo} 細胞で有意に低かった (図 7B)。ヒアルロン酸過剰産生がん細胞における UDP-GlcNAc と UDP-GlcUA の細胞内濃度の低下は、ヒアルロン酸生合成によるそれらの過剰消費の結果と考えられた。興味深いことに、UDP-Glc と GDP-Man の細胞内レベルは、Has2^{+Neo} 細胞に比べ Has2^{ΔNeo} 細胞では約 3 倍低かった (図 7B)。

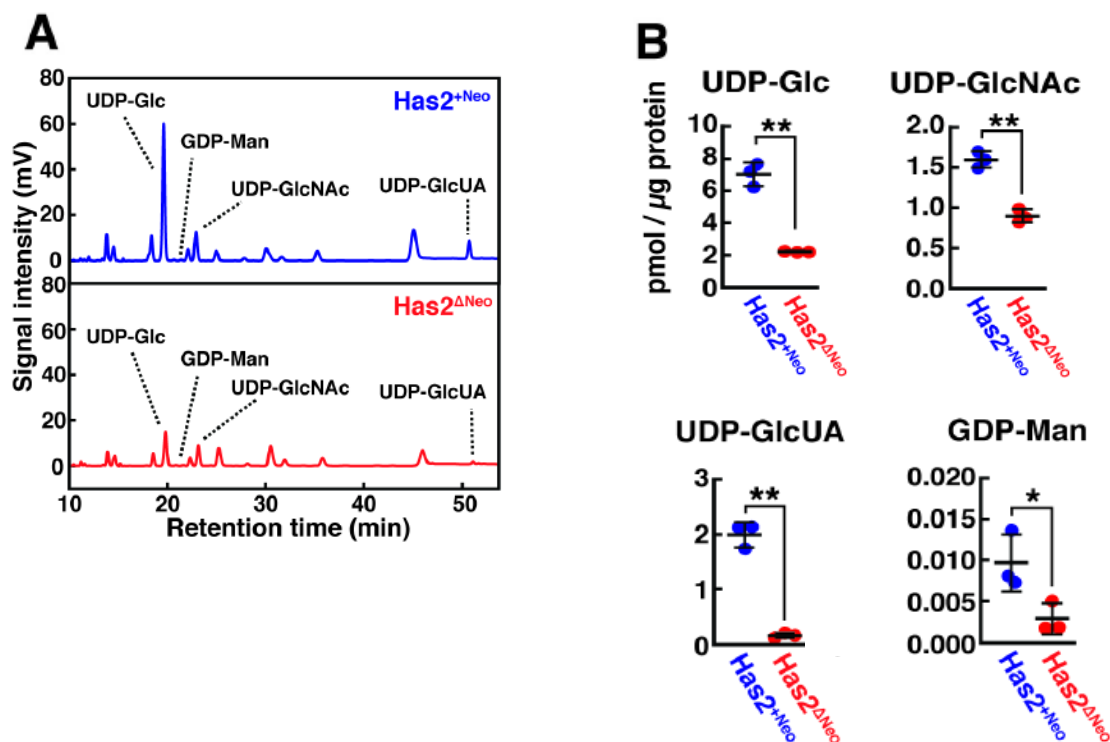


図 7. ヒアルロン酸産生能の異なる初代乳がん細胞における糖ヌクレオチドの細胞内レベル

(A, B) Has2^{+Neo} 細胞と Has2^{ΔNeo} 細胞における糖ヌクレオチドのイオンペア逆相 HPLC プロファイル (A) と細胞内レベル (B)。データは両側スチューデントの *t* 検定を用いて平均値±標準偏差 (n=3) を示す。**p* < 0.05, ***p* < 0.01。(※同研究室の寺西 由紀子氏により得られたデータ)

5-3. ヒアルロン酸過剰産生がん細胞における *N*-結合型糖鎖前駆体の減少

UDP-Glc、UDP-GlcNAc、そして GDP-Man は、*N*-結合型糖鎖前駆体である LLO の生合成において必須の基質である。ヒアルロン酸過剰産生 $\text{Has2}^{\Delta\text{Neo}}$ 細胞におけるこれら糖ヌクレオチドの減少は、成熟型 LLO の合成を阻害し、その結果として *N*-結合型糖鎖の生合成を変化させると考えられた (図 1)。そこで次に、HPLC 分析により、ヒアルロン酸の産生が LLO 生合成に影響を及ぼす可能性を検討した。予想したように、 $\text{Has2}^{\Delta\text{Neo}}$ 細胞は、成熟型 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ の量が、Neu や $\text{Has2}^{+\text{Neo}}$ 細胞と比較し著しく減少した (図 8A-C)。Neu 細胞と $\text{Has2}^{+\text{Neo}}$ 細胞では、未成熟型 LLO において異なるプロファイルを示した一方、成熟型 LLO レベルの有意な減少は認められなかった (図 8A-C)。以上の結果から、成熟型 LLO レベルの減少が、 $\text{Has2}^{\Delta\text{Neo}}$ 細胞における *N*-結合型糖鎖修飾の変化の要因であることが示唆された。

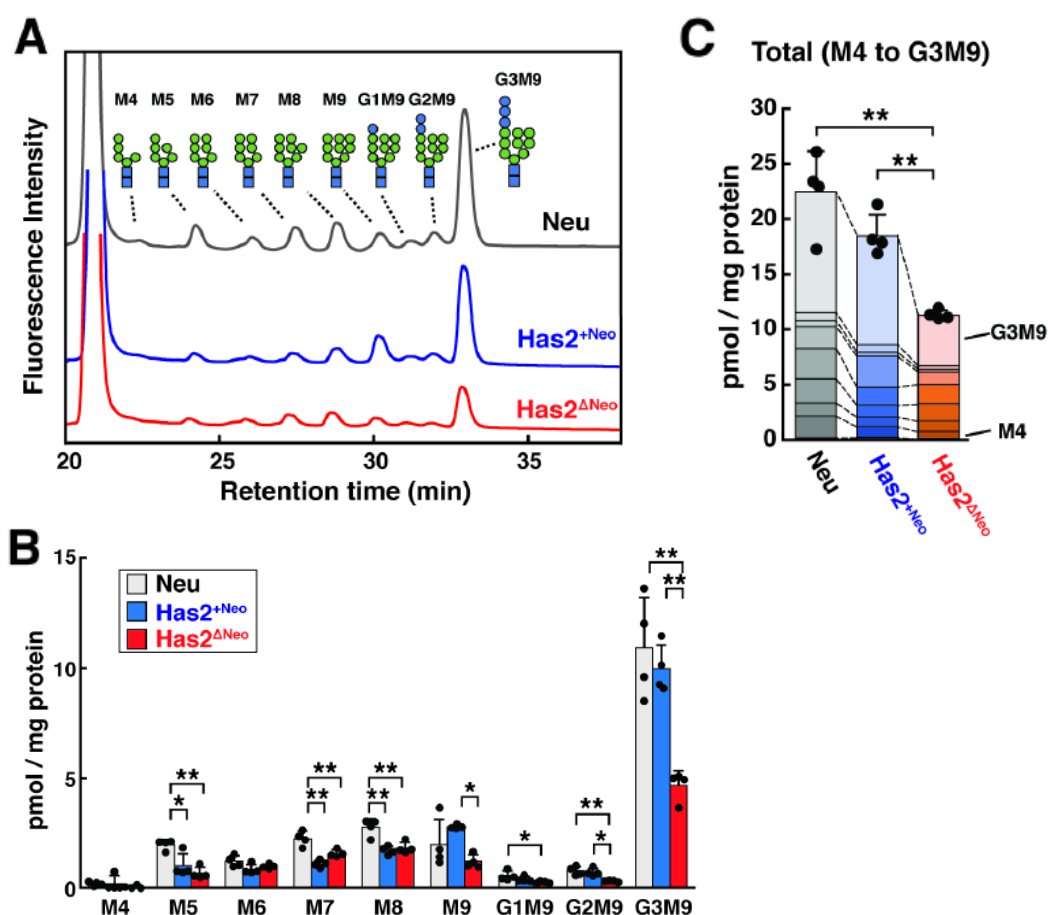


図 8. ヒアルロン酸産生能の異なる初代乳がん細胞における LLO の細胞内レベル

(A-C) Neu 細胞、 $\text{Has2}^{+\text{Neo}}$ 細胞、 $\text{Has2}^{\Delta\text{Neo}}$ 細胞から調製した LLO 糖鎖の HPLC プロファイル (A) と定量結果 (B, C)。データは Tukey の検定を用いて平均値 ± 標準偏差 ($n=4$) を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

5-4. 低用量 TM の長期処理によるがん幹細胞様の形質獲得

先行研究により、ヒアルロン酸の過剰産生が、がん幹細胞様細胞を増加させることが明らかとなっている[29]。そこで次に、過剰なヒアルロン酸産生が、LLO 合成を減少させることにより、非がん幹細胞からがん幹細胞への転換を促進するという仮説を立て、その検証を行った。低用量 TM の長期的な前処理による LLO 合成の部分的阻害が、がん幹細胞への転換に影響するかどうかを解析するため、Has2⁺Neo 細胞を様々な濃度の TM で 8 日間処理し、がん幹細胞性への影響を評価した。増殖阻害効果は高用量 (0.2-1.0 μ g/ml) の TM で顕著であり、1.0 μ g/ml TM では Has2⁺Neo 細胞の 80%以上がアポトーシスを起こした。そこで Has2⁺Neo 細胞を 0.2 μ g/ml 以下の TM で 8 日間処理した。低用量 (0.1 μ g/ml) の TM による長期的な前処理は、Has2⁺Neo 細胞における成熟型 LLO 合成を部分的に阻害し、Has2 Δ Neo 細胞と同レベルにまで低下させた (図 9A-C)。グライコミクスと階層的クラスタリング解析の結果、低用量 TM (0.1 μ g/ml) で前処理した Has2⁺Neo 細胞では、*N*-結合型糖鎖のプロファイルが、Has2 Δ Neo 細胞様に変化したことが明らかとなった (図 10A-C および表 2)。対照的に、比較的高用量 (0.2 μ g/ml) の TM による長期的な前処理は、成熟型 LLO の合成を著しく阻害し (図 9A-C)、*N*-結合型糖鎖全般を減少させた (図 10A-C および表 2)。

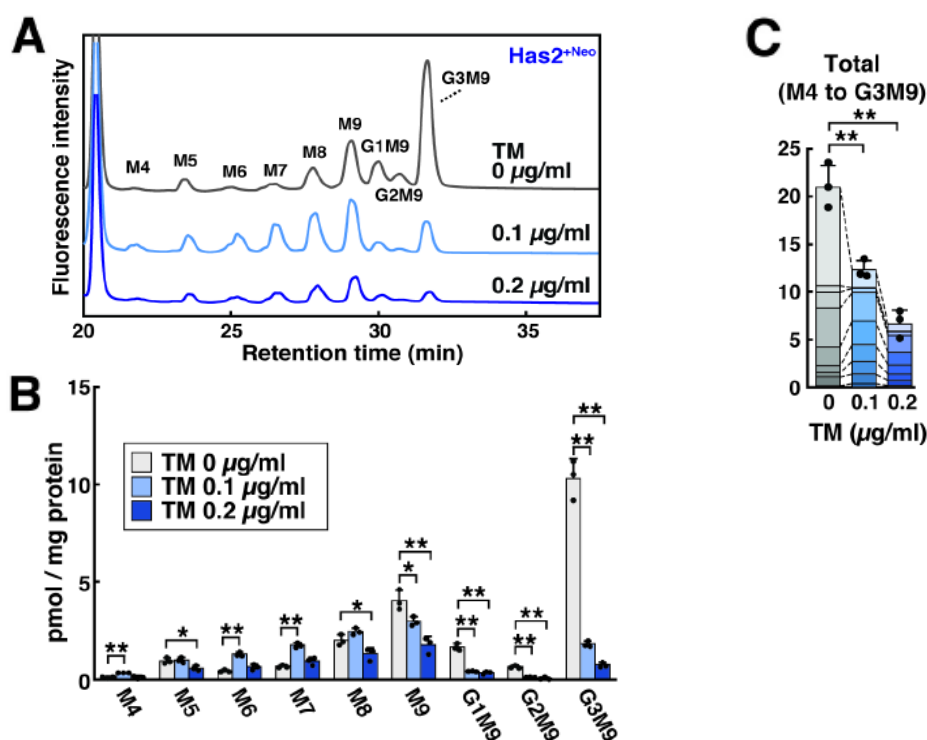


図 9. 低用量の TM 処理による LLO 生合成の部分的阻害

(A-C) LLO 糖鎖の HPLC プロファイル (A) と定量結果 (B, C)。Has2⁺Neo 細胞を 0.1 または 0.2 μ g/ml の TM で 8 日間処理し、細胞内の LLO レベルを分析した。データは Tukey の検定を用いて平均値 \pm 標準偏差 (n=3) を示す。* p < 0.05, ** p < 0.01。

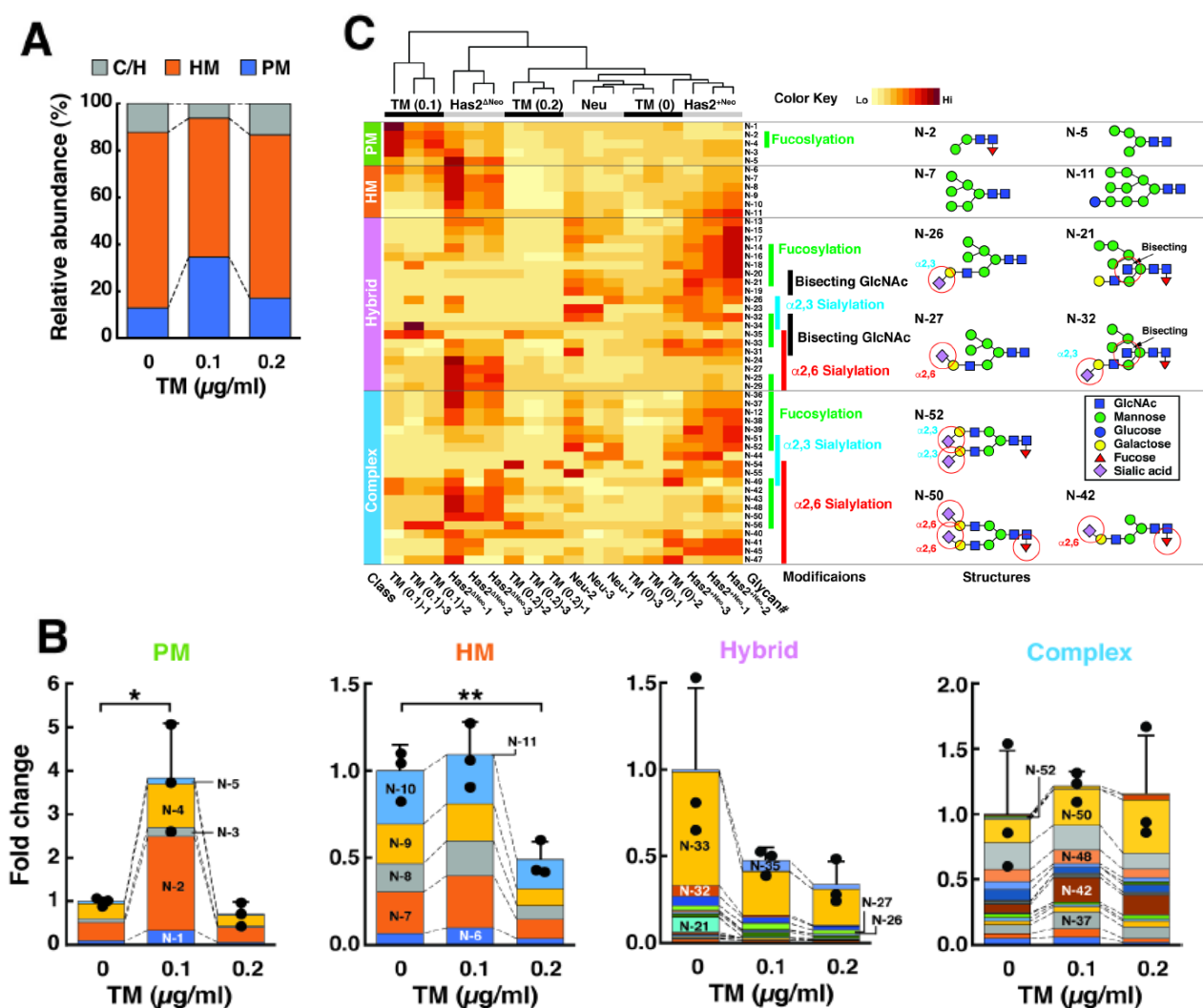


図 10. 低用量の TM 処理による *N*-結合型糖鎖プロファイルの変化

(A) TM 処理細胞と未処理細胞における *N*-結合型糖鎖の組成。Has2^{+Neo} 細胞を 0.1 または 0.2 $\mu\text{g/ml}$ の TM で 8 日間処理し、*N*-結合型糖鎖の組成を分析した。*N*-結合型糖鎖の組成は、全 *N*-結合型糖鎖に対する各糖鎖種の比率で表した。(B) パウチマンノース型、高マンノース型、コンプレックス型、ハイブリッド型 *N*-結合型糖鎖の相対量。各糖鎖構造を表す色や相対量の詳細は、表 2 に記載している。データは両側スチューデントの *t* 検定を用いて平均値 \pm 標準偏差 ($n=3$) を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。(C) *N*-結合型糖鎖の定量的糖鎖プロファイルに基づく階層的クラスタリング解析。ヒートマップは、TM 処理細胞と未処理細胞における *N*-結合型糖鎖の存在量を正規化したものである。Neu 細胞、Has2^{+Neo} 細胞、Has2 Δ Neo 細胞のデータセットは図 6D から再利用した。各糖鎖構造や相対量の詳細は、表 1 および表 2 に記載している。*N*-結合型糖鎖の重要な修飾は、ヒートマップ右側のバーと糖鎖構造の赤丸で示す。

5-5. 低用量 2-DG の長期処理によるがん幹細胞様の形質獲得

2-DG は解糖系の中間体である Glc-6P と Fru-6P の合成酵素であるヘキソキナーゼ (HK) とグルコース-6-リン酸イソメラーゼ (PGI) の機能を抑制することによって LLO 合成を阻害する (図 3)。また、2-DG はマンノースと構造が似ているため、マンノース代謝と競合し、LLO に取り込まれることで *N*-結合型糖鎖修飾に影響を与える [56, 57]。2-DG は、さらに ATP 合成を阻害することによって、LLO の生合成と伸長を妨げる可能性もある。低用量の 2-DG による前処理が、がん幹細胞性を促進する可能性について検討するため、Has2^{+Neo} 細胞を種々の濃度の 2-DG で 8 日間処理し、CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様細胞の数を測定した。増殖阻害効果は 0.2 mM 2-DG で明らかであり、2 mM 2-DG では Has2^{+Neo} 細胞の 80% 以上がアポトーシスを起こした。そこで Has2^{+Neo} 細胞を低用量の 2-DG (0.1 mM) で最大 8 日間処理した。低用量 TM による前処理と同様に、長期および低用量の 2-DG 処理は、Has2^{+Neo} 細胞の成熟型 LLO 合成を部分的に妨害し、Has2^{ΔNeo} 細胞と同程度まで低下させた (図 11A-C)。グライコミクスと階層的クラスタリング解析の結果、低用量 2-DG (0.1 mM) で前処理した Has2^{+Neo} 細胞では、*N*-結合型糖鎖プロファイルが、Has2^{ΔNeo} 細胞様に変化したことが明らかとなった (図 12A-C および表 3)。TM 処理とは異なり、2-DG 処理では、2-DG を取り込んだ糖鎖が新たに合成されるため、コンプレックス型およびハイブリッド型 *N*-結合型糖鎖のパターンが有意に変化した (図 12B および表 3)。

興味深いことに、低用量 TM による前処理は、CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様細胞の数を用量および時間依存的に増加させ、細胞集団全体を CD24 低発現へとシフトさせた (図 13A, B)。培地から TM を除去すると、CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様細胞の数は、未処理細胞で観察されたレベルにまで戻り、この変化が可逆的であることが示唆された (図 13B)。また、細胞内 UDP-GlcNAc プールを増加させる GlcN の添加が、TM 前処理の効果を部分的に抑制したことから (図 14)、TM 前処理によるがん幹細胞性の促進は、TM 耐性細胞のクローン選択によらないことが示唆された。また、低用量の 2-DG 前処理も CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様細胞の数を用量依存的に増加させ (図 15)、がん幹細胞制御における糖代謝ストレスの重要な役割を裏付けた。

次に、乳がん幹細胞の自己複製能の指標であるマンモスフィア形成能を評価した。CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様の細胞数の増加と一致して、低用量 (0.05 および 0.1 μg/ml) の TM による前処理は、未処理よりもマンモスフィア形成を亢進させた (図 16)。

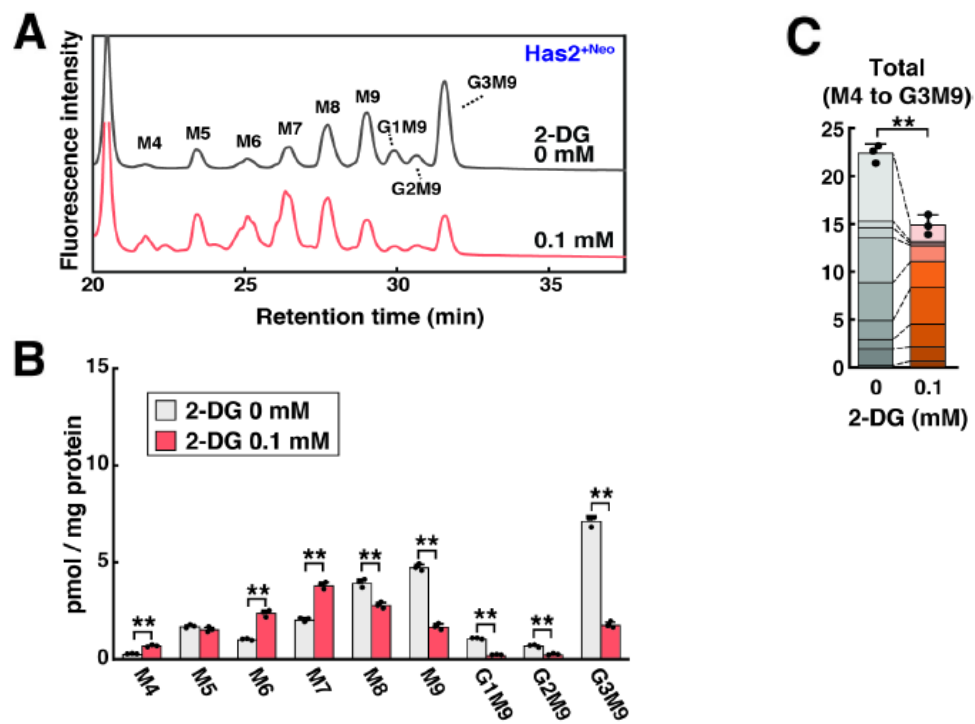


図 11. 低用量の 2-DG 処理による LLO 生合成の部分的阻害

(A-C) LLO 糖鎖の HPLC プロファイル (A) と定量結果 (B, C)。Has2⁺Neo 細胞を 0.1 mM 2-DG で 8 日間処理し、細胞内の LLO レベルを分析した。データは両側スチューデントの t 検定を用いて平均値±標準偏差 (n=3) を示す。** $p < 0.01$ 。

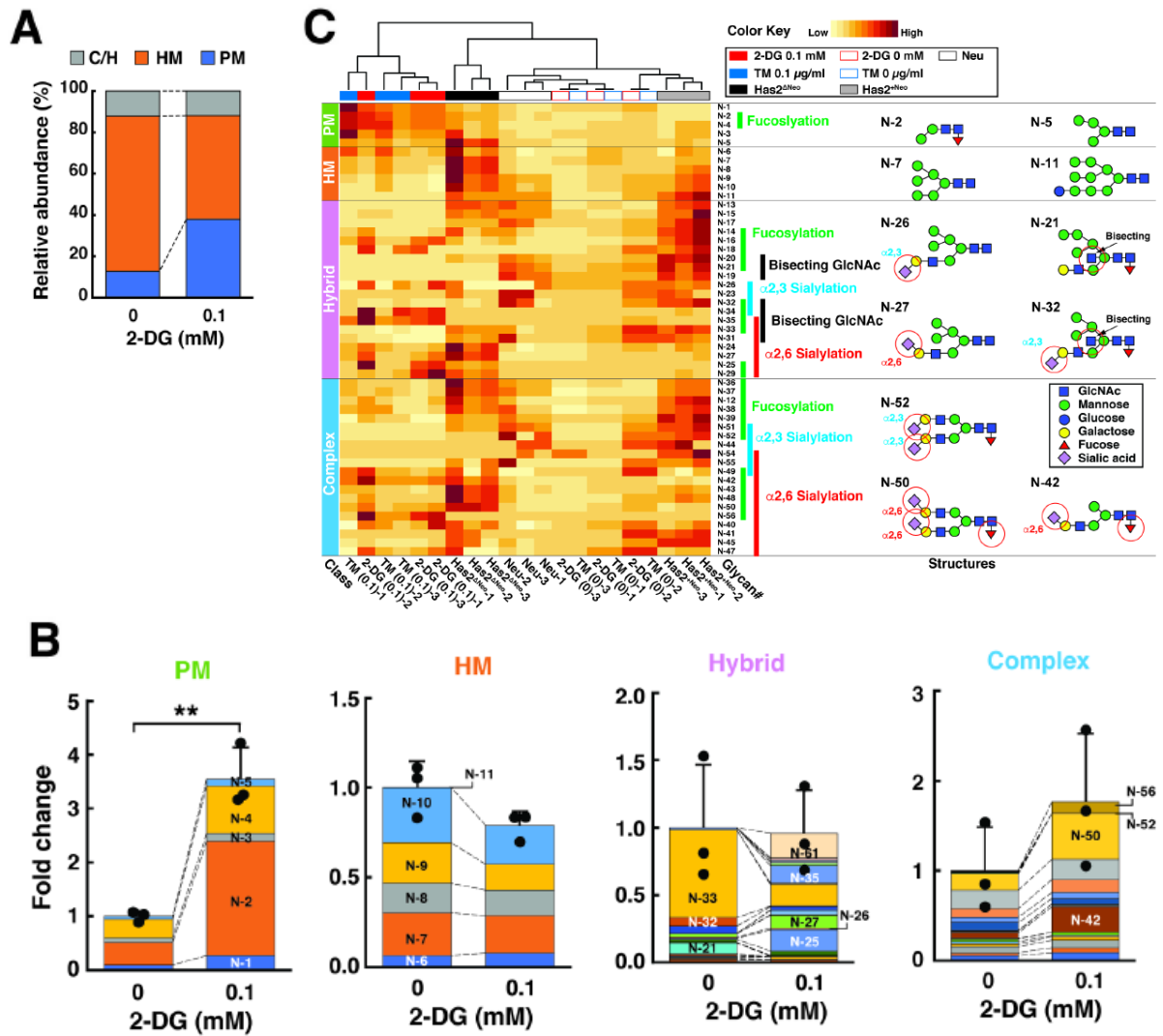


図 12. 低用量の 2-DG 処理による *N*-結合型糖鎖プロファイルの変化

(A) 2-DG 処理細胞と未処理細胞における *N*-結合型糖鎖の組成。Has2^{+Neo} 細胞を 0.1 mM 2-DG で 8 日間処理し、*N*-結合型糖鎖の組成を分析した。*N*-結合型糖鎖の組成は、全 *N*-結合型糖鎖に対する各糖鎖種の比率で表した。(B) パウチマンノース型、高マンノース型、コンプレックス型、ハイブリッド型 *N*-結合型糖鎖の相対量。各糖鎖構造を表す色や相対量の詳細は、表 3 に記載している。データは両側スチューデントの *t* 検定を用いて平均値±標準偏差 (n=3) を示す。***p* < 0.01。(C) *N*-結合型糖鎖の定量的糖鎖プロファイルに基づく階層的クラスタリング解析。ヒートマップは、2-DG 処理細胞と未処理細胞における *N*-結合型糖鎖の存在量を正規化したものである。Neu 細胞、Has2^{+Neo} 細胞、Has2^{ΔNeo} 細胞、TM 処理細胞のデータセットは図 6D および 10C から再利用した。各糖鎖構造や相対量の詳細は、表 1-3 に記載している。*N*-結合型糖鎖の重要な修飾は、ヒートマップ右側のバーと糖鎖構造の赤丸で示す。

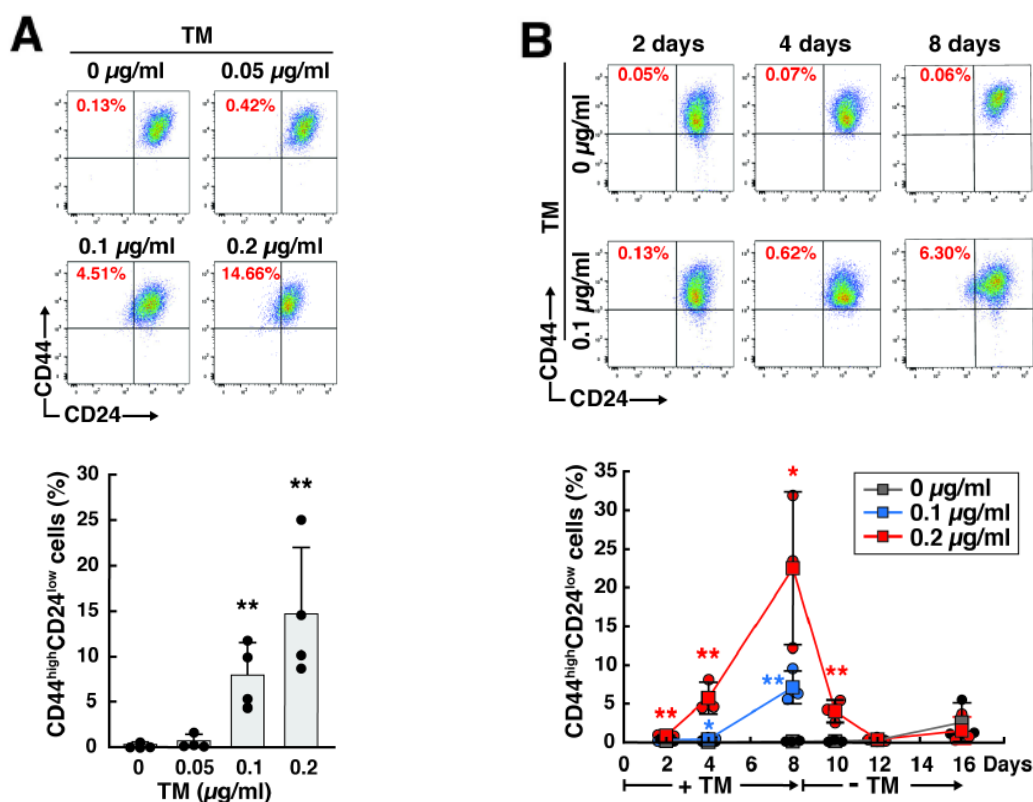


図 13. 低用量の TM 処理による CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様細胞の増加

(A, B) 低用量の TM で処理したがん細胞における CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様細胞のフローサイトメトリー解析。(A) Has2⁺Neo 細胞を異なる用量の TM で 8 日間処理し、フローサイトメトリーにより CD24 と CD44 の発現を解析した。データは両側スチューデントの t 検定を用いて平均値±標準偏差 (n=4) を示す。***p* < 0.01。(B) Has2⁺Neo 細胞を 0.1 µg/ml および 0.2 µg/ml の TM 存在下または非存在下で 8 日間処理した。異なる時点において CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様細胞数を測定した。データは両側スチューデントの t 検定を用いて平均値±標準偏差 (n=3) を示す。**p* < 0.05, ***p* < 0.01。(※同研究室の岩本 明歩氏により得られたデータ)

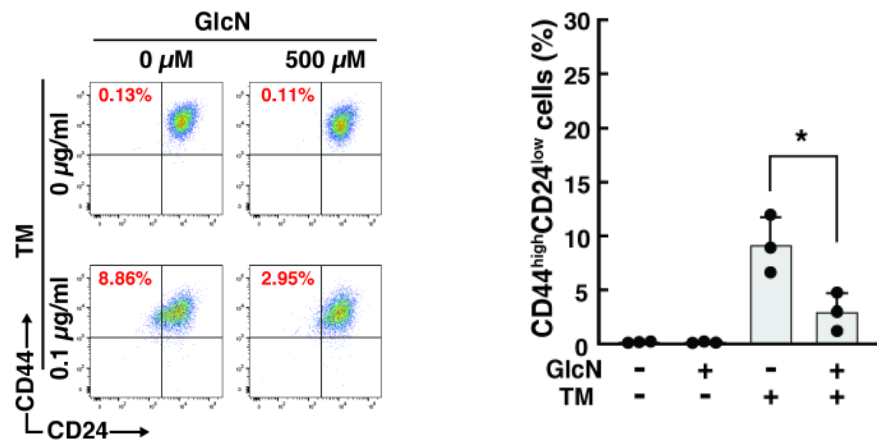


図 14. 低用量の TM 処理による CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様細胞の増加と可逆性

CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様細胞に対する GlcN の効果。Has2⁺Neo 細胞を 0.1 μg/ml TM および 500 μM GlcN、またはそのいずれかで 8 日間処理した後、フローサイトメトリーにより CD24 と CD44 の発現を解析した。データは両側スチューデントの t 検定を用いて平均値±標準偏差 (n=3) を示す。**p* < 0.05。(※同研究室の岩本 明歩氏により得られたデータ)

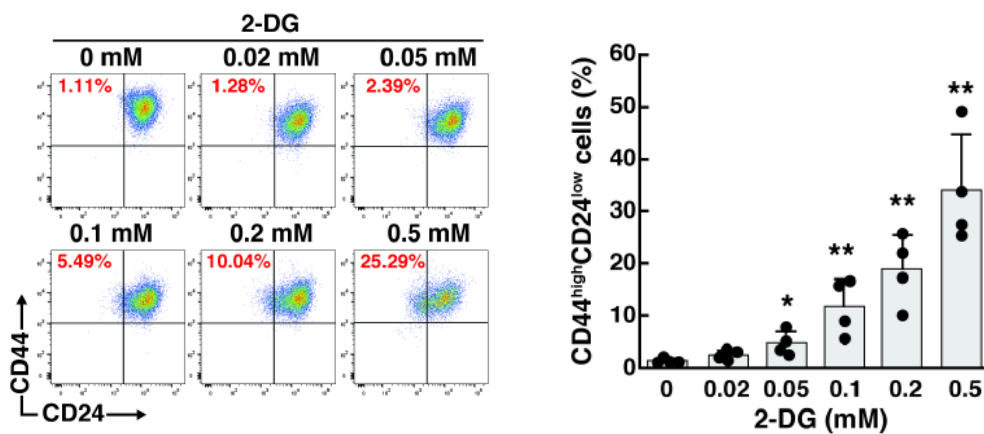


図 15. 低用量の 2-DG 処理による CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様細胞の増加

低用量の 2-DG で処理したがん細胞における CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様細胞のフローサイトメトリー解析。Has2⁺Neo 細胞を異なる用量の 2-DG で 8 日間処理し、フローサイトメトリーにより CD24 と CD44 の発現を解析した。データは両側スチューデントの t 検定を用いて平均値±標準偏差 (n=4) を示す。**p* < 0.05, ***p* < 0.01。(※同研究室の岩本 明歩氏と蘆田 紗和子氏により得られたデータ)

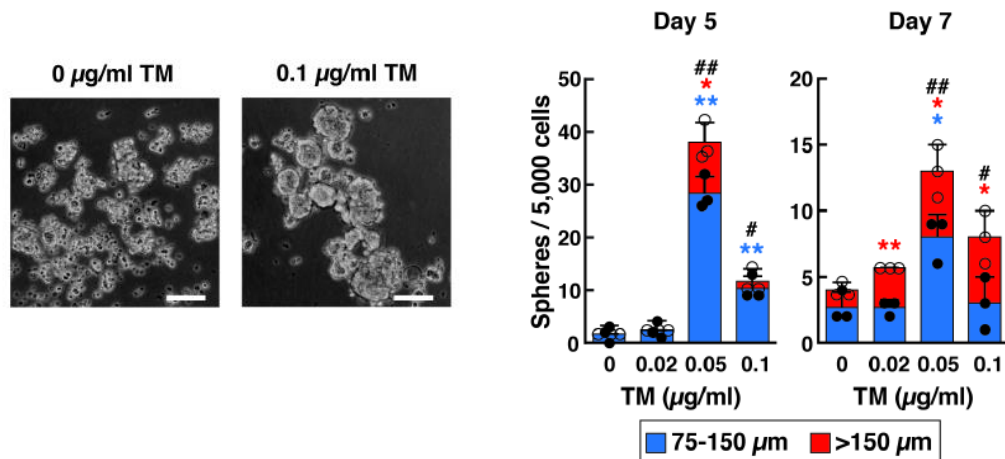


図 16. 低用量の TM 処理によるがん幹細胞の表現型の増加

低用量の TM で処理したがん細胞におけるマンモスフィア形成。Has2^{+Neo} 細胞を低用量の TM で 8 日間処理し、同濃度の TM を含むスフェロイド形成培地の存在下でさらに 7 日間培養した。位相差顕微鏡下で画像を撮影し、マンモスフィア形成の数を集計した。スケールバーは 100 µm を示す。データは両側スチューデントの t 検定を用いて平均値±標準偏差 (n=3) を示す。*, #*p* < 0.05, **, ##*p* < 0.01。(※同研究室の櫻井 彩弥音氏と松尾 俊氏により得られたデータ)

5-6. 低用量 TM および 2-DG の長期処理による化学療法抵抗性の増強効果

がん幹細胞は従来の化学療法薬に耐性を示し、治療後のがん再発の要因であると考えられている。Has2^{ΔNeo} および Has2^{+Neo} 細胞を白金由来の化学療法薬であるシスプラチンで処理し、蛍光標識 Annexin V と propidium iodide (PI) の二重染色によって初期および後期のアポトーシス細胞数を測定した。50 µM のシスプラチンに曝された後、Has2^{+Neo} 細胞は初期および後期アポトーシス細胞数の著しい増加を示したが、対照的に Has2^{ΔNeo} 細胞はこの用量に対して耐性を示した (図 17)。次に、化学療法抵抗性に対する TM または 2-DG 前処理の効果を検討した。低用量の TM (0.1 µg/ml) または 2-DG (0.1mM) による前処理により、シスプラチンによって誘導されるアポトーシス細胞の数が有意に低下した (図 18A、B)。

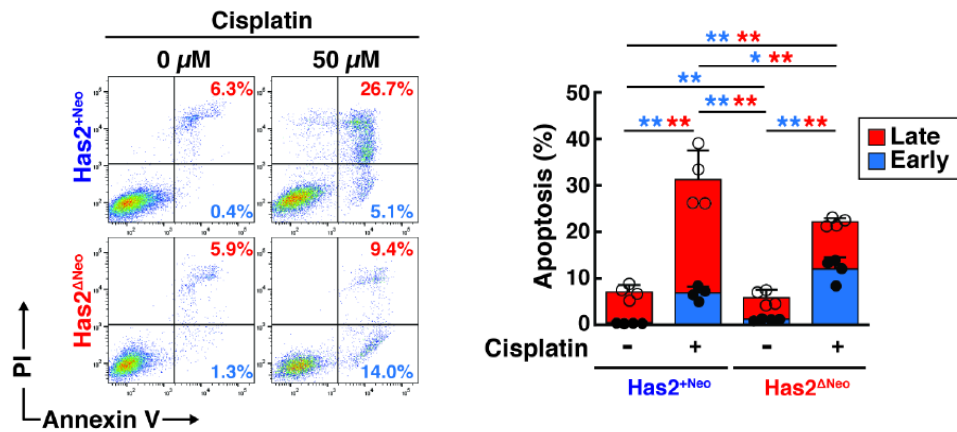


図 17. ヒアルロン酸産生能の異なる初代乳がん細胞におけるシスプラチン耐性

Has2⁺Neo 細胞および Has2^ΔNeo 細胞におけるシスプラチン誘導性アポトーシス。Has2^ΔNeo 細胞と Has2⁺Neo 細胞を 50 μM のシスプラチン存在下または非存在下で 16 時間処理した。蛍光標識 Annexin V と PI で二重染色後、アポトーシス細胞をフローサイトメトリーにより解析した。初期アポトーシス細胞と後期アポトーシス細胞は、それぞれ Annexin V⁺/PI⁻ または Annexin V⁺/PI⁺ の亜集団として表した。データは両側スチューデントの t 検定を用いて平均値±標準偏差 (n=4) を示す。**p* < 0.05, ***p* < 0.01。 (※同研究室の北川 未唯氏と蘆田 紗和子氏により得られたデータ)

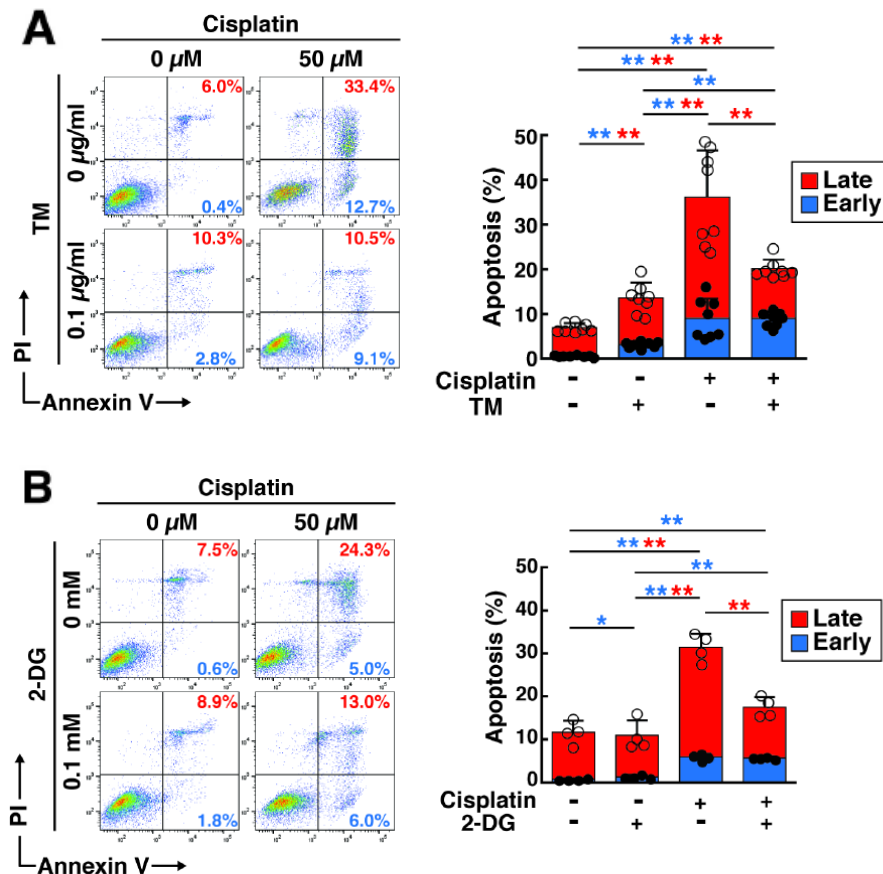


図 18. 低用量の TM または 2-DG 処理によるシスプラチン耐性の増強

(A, B) 低用量の TM または 2-DG で処理した Has2^{Neo} 細胞におけるシスプラチン誘導性アポトーシス。Has2^{Neo} 細胞を 0.1 μ g/ml TM (A) または 0.1mM 2-DG (B) で 8 日間処理した後、50 μ M シスプラチン存在下または非存在下でさらに 16 時間処理した。蛍光標識 Annexin V と PI で二重染色後、アポトーシス細胞をフローサイトメトリーにより解析した。データは両側スチューデントの t 検定を用いて平均値 \pm 標準偏差 ((A) n=8、(B) n=4) を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。(※同研究室の北川 未唯氏と蘆田 紗和子氏により得られたデータ)

5-7. 糖代謝ストレス下における Notch および WNT/ β -カテニンシグナル関連遺伝子の発現変化

続いて、低容量糖代謝ストレスに対応した遺伝子発現プロファイルを明らかにするため、RNA-seq 解析を行った。低用量の TM または 2-DG で前処理した細胞について、RNA-seq データ (16478 遺伝子) の階層的クラスタリングを行った結果、2 種類の前処理細胞間で類似したトランスクリプトームプロファイルが得られた (図 19A)。細胞間で発現パターンが異なった遺伝子 (DEGs) は 5 種類しか見られず (図 19B)、両者のトランスクリプトームプロファイルは類似していることが確認された。

Molecular Signatures Database (MSigDB) の hallmark 遺伝子セットを用いて、低用量 TM で前処理した細胞と未処理の細胞を比較するために、遺伝子セットエンリッチメント解析 (GSEA) を行った。GSEA による機能解析の結果、TM で前処理した細胞において、"Notch シグナル"と "WNT/ β -カテニンシグナル"に関連する遺伝子の発現上昇が明らかになった (図 20A)。同様の傾向は、2-DG で前処理した細胞と未処理の細胞との比較でも確認された (図 20B)。これらの結果は、階層的クラスタリングによるヒートマップを用いてさらに裏付けられた。Notch3 は Notch シグナルのデータセット中、最も増加した遺伝子として同定され、DLL1 と Notch1 は Notch シグナルと WNT/ β -カテニンシグナルの両方のデータセットで共に増加した (図 20C)。KEGG パスウェイ解析では、TM で前処理した細胞において Notch シグナルの亢進が認められ、Notch 受容体やリガンド、さらに Hey や Hes などの標的遺伝子の発現が上昇していることが明らかとなった (図 20D)。

RNA-seq のデータとほぼ一致して、RT-qPCR でも TM および 2-DG 前処理細胞において Notch3 の遺伝子発現が有意に増加した (図 21A)。興味深いことに、Notch3 は Has2 Δ Neo 細胞でも増加しており、これら糖代謝ストレスが共通して Notch シグナル伝達経路を活性化することが明らかとなった。また、フローサイトメトリー解析の結果、mRNA レベルの顕著な上昇と一致して、細胞表面における Notch3 の発現が TM および 2-DG 前処理細胞で有意に上昇していることが明らかとなった (図 21B)。

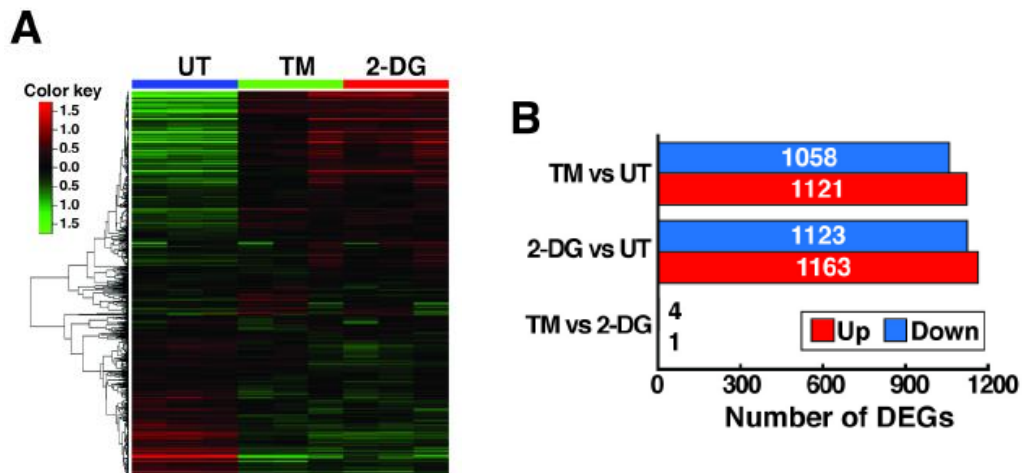
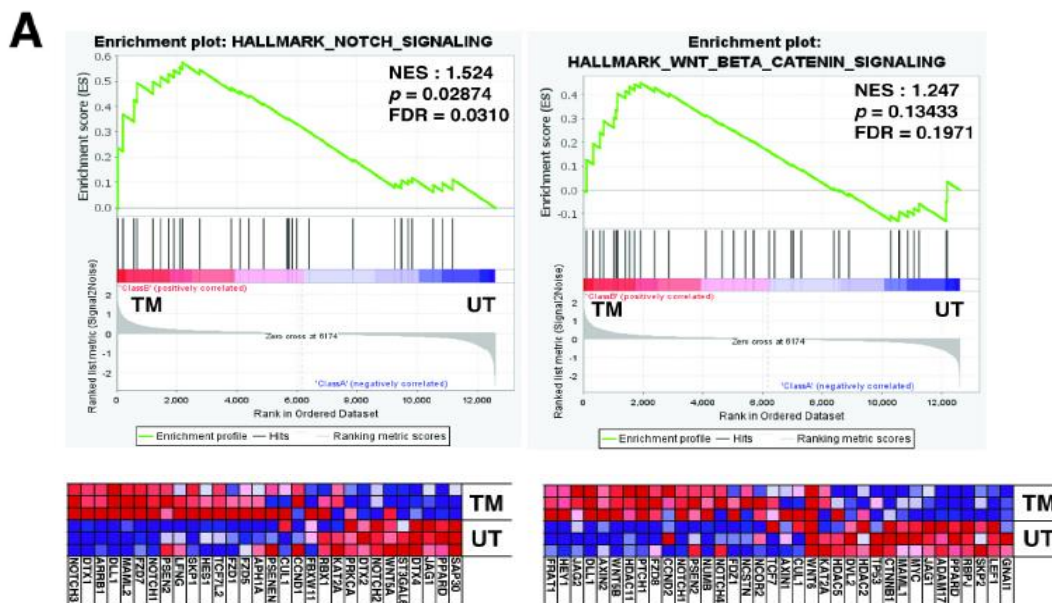
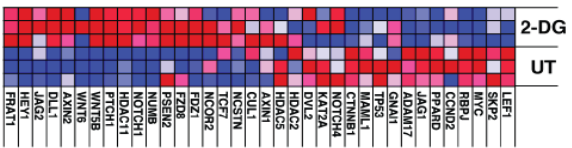
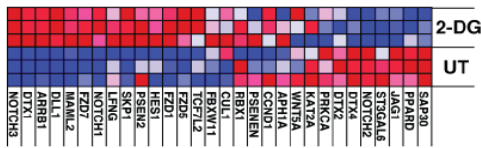
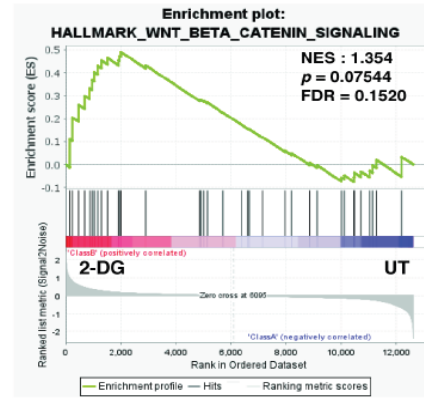
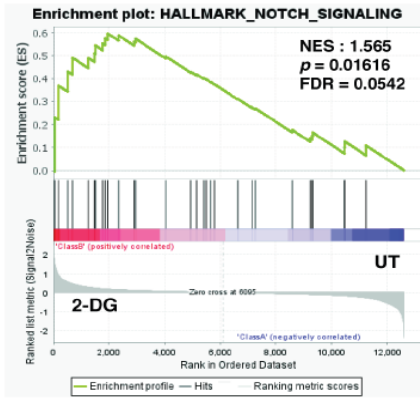


図 19. TM および 2-DG で処理したがん細胞における RNA-seq 解析

(A) 0.1 μ g/ml TM または 0.1mM 2-DG で前処理した Has2⁺Neo 細胞の RNA-seq 解析。RNA-seq データは、未処理細胞 (UT) の結果と比較し、階層的クラスタリングのヒートマップで表した ($|\log_2\text{FC}| \geq 2$ および $\text{FDR} < 0.1$)。赤色と緑色は、それぞれ発現が増加した遺伝子と減少した遺伝子を示す。(B) 各処理群のサンプル間の DEG 数。赤色と青色のバーは、それぞれ増加した遺伝子と減少した遺伝子の数を示す。

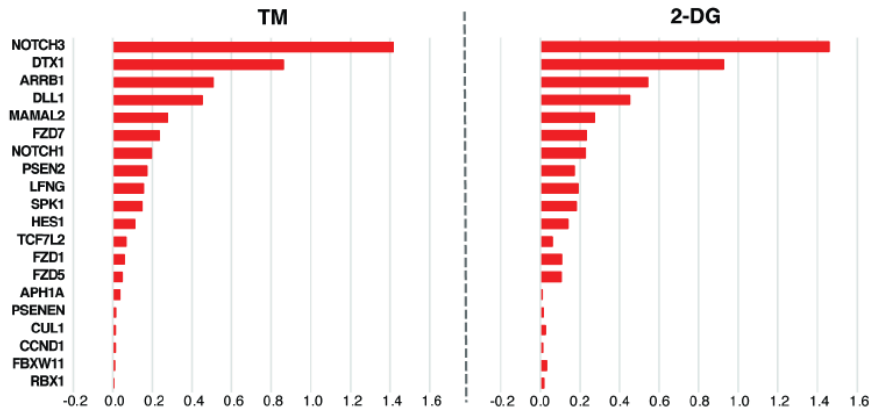


B

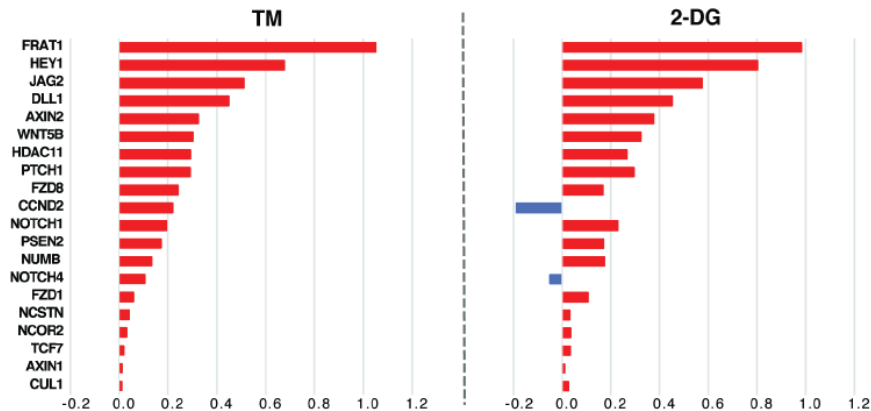


C

NOTCH



WNT



D

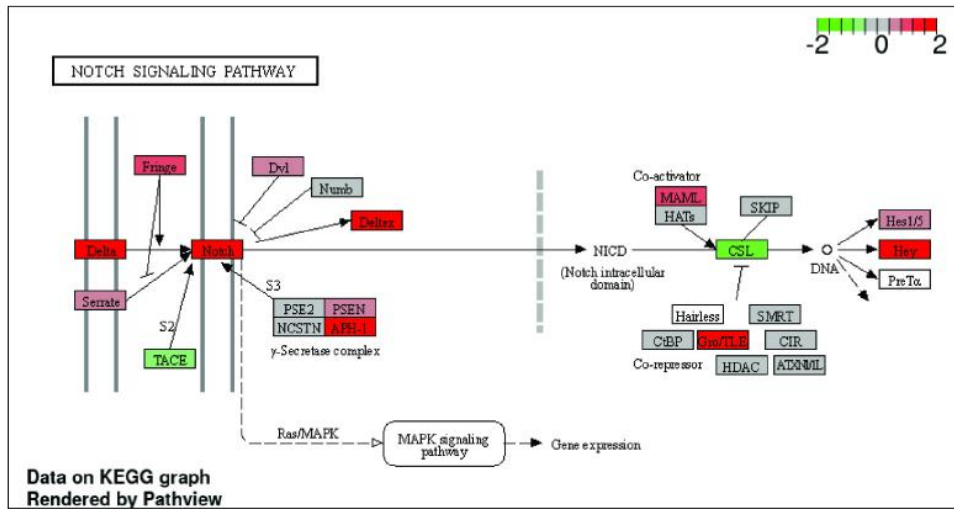


図 20. 低用量 TM および 2-DG で前処理したがん細胞の GSEA

(A,B) 低用量 TM (A) または 2-DG (B) で前処理した細胞の GSEA。0.1 μ g/ml TM または 0.1 mM 2-DG で前処理した Has2^{+Neo} 細胞の RNA-seq 解析を行い、未処理細胞 (UT) の結果と比較した。(C) TM または 2-DG 処理細胞において、発現量の変化が確認された “Notch シグナル” および “WNT/ β -カテニンシグナル” 関連遺伝子のトップ 20。(D) RNA-seq データの KEGG パスウェイ解析。赤色と緑色はそれぞれ増加した遺伝子と減少した遺伝子を示す。

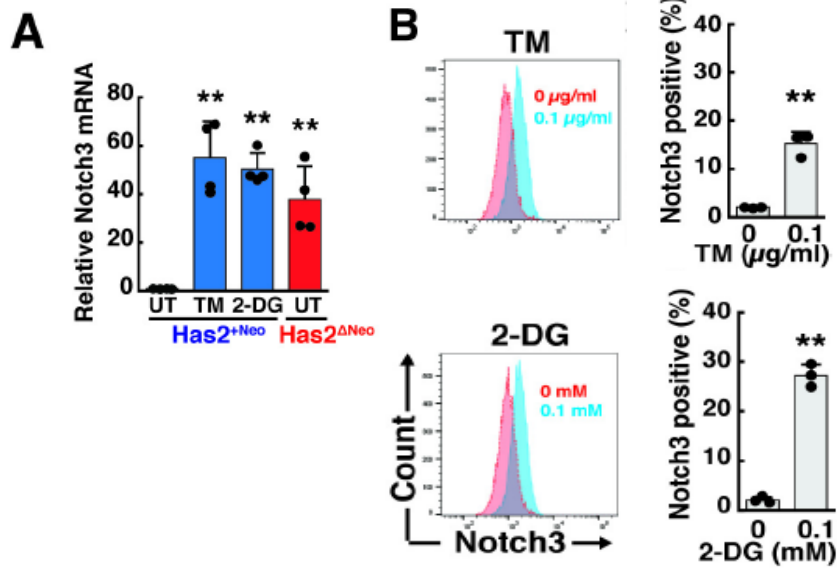


図 21. 低用量 TM および 2-DG で前処理したがん細胞における Notch3 の発現解析

(A) Has2^{ΔNeo}細胞と Has2^{+Neo}細胞における Notch3 発現の RT-qPCR 解析。Has2^{+Neo}細胞を 0.1 μg/ml TM または 0.1mM 2-DG で 8 日間処理し、RT-qPCR で Notch3 の mRNA レベルを解析した。Notch3 の発現レベルは、GAPDH により正規化した。データは両側スチューデントの t 検定を用いて平均値±標準偏差 (n=4) を示す。***p* < 0.01。 (B) TM および 2-DG 処理による Notch3 の発現誘導。Has2^{+Neo}細胞を 0.1 μg/ml TM または 0.1mM 2-DG で 8 日間処理し、フローサイトメトリーにより細胞表面の Notch3 発現を解析した。データは両側スチューデントの t 検定を用いて平均値±標準偏差 (n=3) を示す。***p* < 0.01。

5-8. Notch シグナルによるがん幹細胞性の制御

Notch および WNT/ β -カテニンシグナル伝達経路の活性化が、がん幹細胞性の制御に関与していることが知られている[58-61]。低容量糖代謝ストレスが、これらのシグナル伝達経路を介してがん幹細胞性を調節していることが考えられるため、次に、がん幹細胞性の制御における Notch シグナルの役割について解析した。ヒアルロン酸過剰産生 Has2^{ΔNeo}細胞を各種 Notch 阻害剤で処理した結果、Notch 阻害剤は、用量依存的にマンモスフィア形成を抑制した (図 22A)。次に、Notch シグナルが化学療法に対する耐性を増強する可能性について調べるため、Notch 阻害剤 (LY411575) とシスプラチンの細胞毒性に対する相乗効果をアボトーシスアッセイにより評価した。その結果、LY411575 は、シスプラチンの細胞毒性効果を増強した (図 22B)。これらの知見は、糖代謝ストレスが、Notch シグナルの活性化を通して、部分的にがん幹細胞性と化学療法抵抗性を増強することを示唆している。

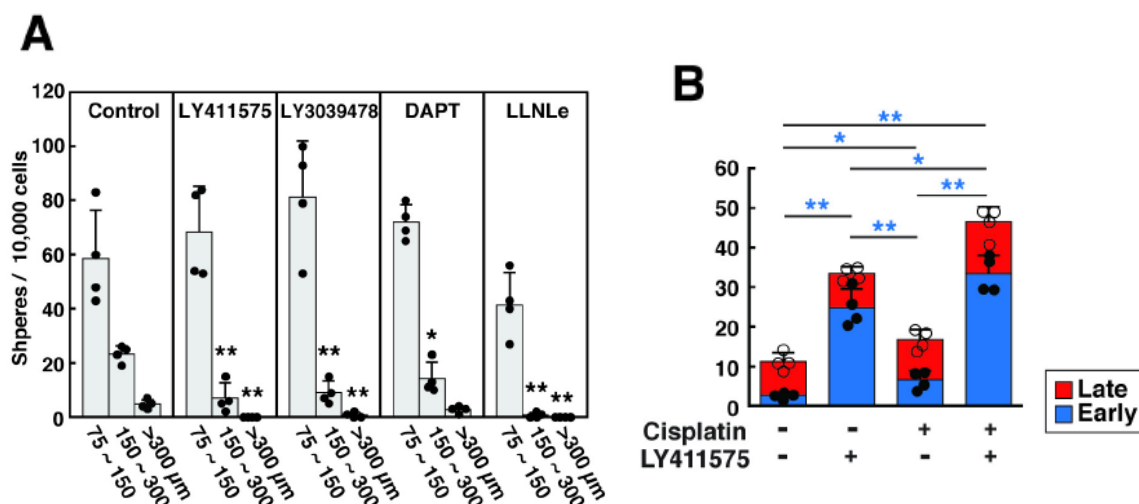


図 22. Notch シグナルの阻害によるがん幹細胞性と化学療法抵抗性の抑制

(A) Notch シグナルの阻害によるマンモスフィア形成の抑制。Has2^{ΔNeo}細胞を 50 μM LY411575、50 μM LY3039478、20 μM DAPT、または 1 μM LLNLe を含むスフェロイド形成培地で 7 日間培養した。位相差顕微鏡下でマンモスフィア形成の数を集計した。スケールバーは 100 μm を示す。データは両側スチューデントの t 検定を用いて平均値±標準偏差 (n=4) を示す。**p* < 0.05, ***p* < 0.01。 (B) Notch シグナルの阻害によるシスプラチン誘導性アポトーシスの増強。Has2^{ΔNeo}細胞を 50 μM LY411575 で 8 日間処理し、50 μM のシスプラチン存在下または非存在下でさらに 16 時間処理した。蛍光性の Annexin V と PI で二重染色後、アポトーシス細胞をフローサイトメトリーにより解析した。初期アポトーシス細胞と後期アポトーシス細胞は、それぞれ Annexin V⁺/PI⁻または Annexin V⁺/PI⁺の亜集団として表された。データは両側スチューデントの t 検定を用いて平均値±標準偏差 (n=4) を示す。**p* < 0.05, ***p* < 0.01。(※同研究室の櫻井 彩弥音氏と松尾 俊氏により得られたデータ)

5-9. GlcN および Man 添加による N-結合型糖鎖合成の部分的回復

糖ヌクレオチドの細胞内プールの減少が、Has2^{ΔNeo}細胞における N-結合型糖鎖組成の変化を説明できる可能性について明らかにするため、Has2^{ΔNeo}細胞を外因性 GlcN および Man、またはそのいずれかで処理した後に、糖ヌクレオチドの細胞内プールを分析した (図 23A)。その結果、GlcN の添加後 24 時間で、細胞内の UDP-GlcNAc プールが有意に増加した (図 23B)。さらに、Has2^{ΔNeo}細胞を高濃度の外因性 Man で処理すると、UDP-Glc、UDP-GlcUA、および GDP-Man の細胞内レベルが有意に上昇した (図 23B)。UDP-GlcNAc または GDP-Man の細胞内レベルは、GlcN と Man を併用した場合よりも、各処理を単独で行った場合の方がはるかに高かった。これらの結果は、GlcN と Man の併用処理では、N-結合型糖鎖が適切にプロセッシングされることで、それぞれの糖ヌクレオチドの不均衡な蓄積が解消できたことを示唆している。

次に、Has2^{ΔNeo}細胞を外因性 GlcN および Man、またはそのいずれかで処理した後、N-結合型糖鎖プロファイルについて質量分析により解析した。これらヘキソースの添加により、細胞内 UDP-GlcNAc と GDP-Man のレベルが増加し、同時に Has2^{ΔNeo}細胞において変化した N-結合型糖鎖パターンが一部回復した (図 24A, B)。具体的には、GlcN と Man の併用処理により Has2^{ΔNeo}細胞で増加したパウチマンノース型の N-結合型糖鎖が減少し (図 24A, B)、同様に、コンプレックス型の N-結合型糖鎖全体の割合が減少した (図 24B)。ヒアルロン酸の過剰産生や低用量 TM 前処理の効果とは逆に、これら単糖による処理は、末端に α2,6 結合したシアル酸を持つ N-結合型糖鎖の合成を有意に抑制した (表 4)。以上の結果は、GlcN と Man による併用処理が、ヒアルロン酸過剰産生がん細胞における N-結合型糖鎖修飾を部分的に回復させることを示唆している。

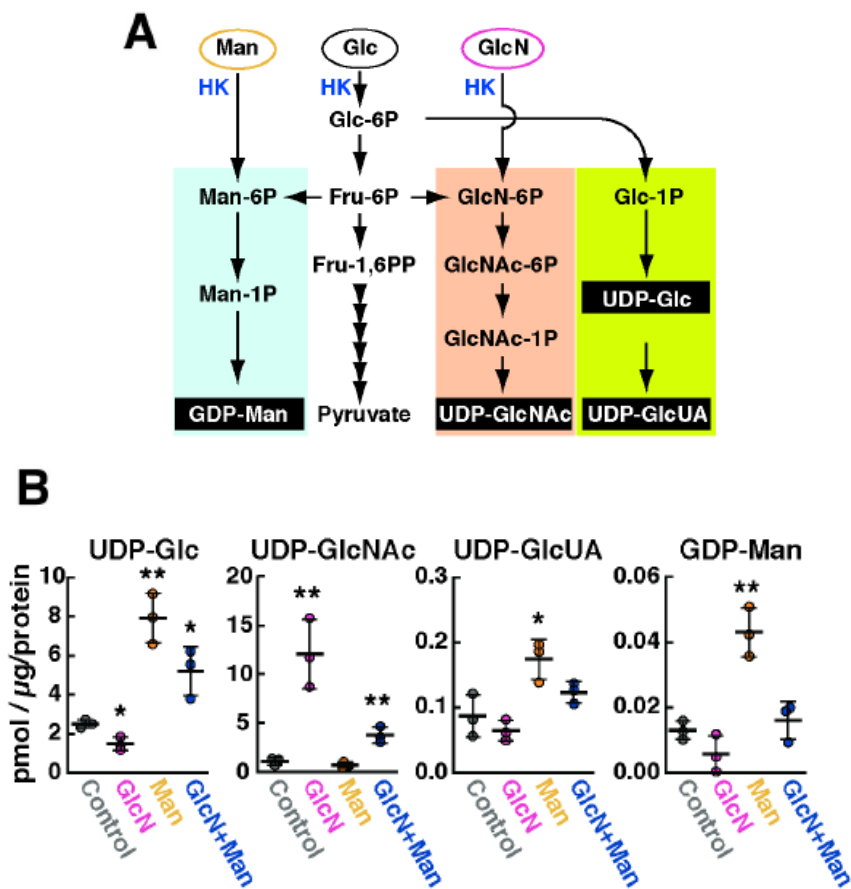


図 23. GlcN と Man の添加による細胞内糖ヌクレオチドプールの変化

(A) GlcN と Man 処理後の糖ヌクレオチド代謝。(B) GlcN と Man の添加による糖ヌクレオチドの細胞内レベル。Has2^{ΔNeo}細胞を 500 μM GlcN および 20mM Man、またはそのいずれかの存在下で 24 時間培養し、イオンペア逆相 HPLC を用いて糖ヌクレオチドの細胞内レベルを測定した。データは両側スチューデントの t 検定を用いて平均値±標準偏差 (n=3) を示す。**p* < 0.05, ***p* < 0.01。(※同研究室の寺西由紀子氏により得られたデータ)

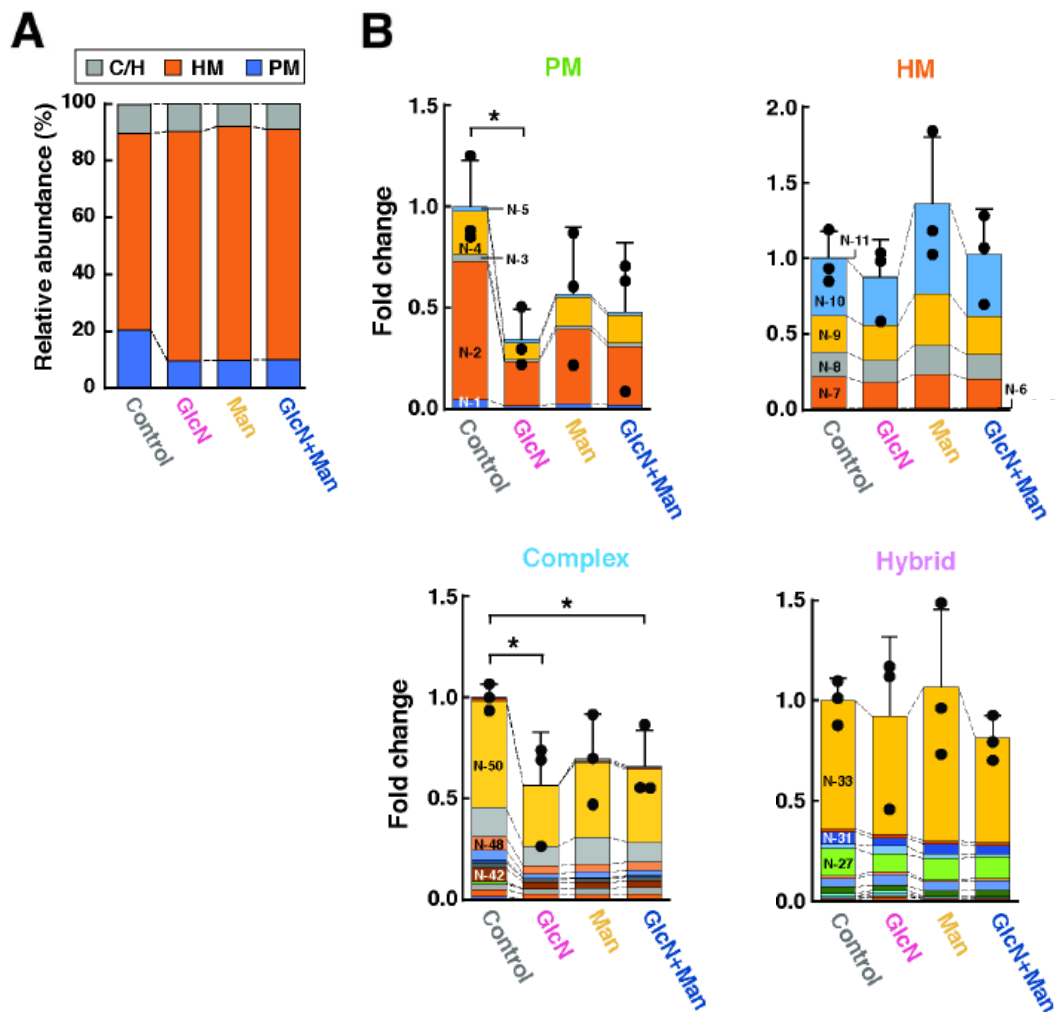


図 24. GlcN および Man の添加による *N*-結合型糖鎖プロファイルの変化

(A, B) ヒアルロン酸過剰産生がん細胞において GlcN と Man を添加した際の *N*-結合型糖鎖の組成 (A) とパウチマンノース型、高マンノース型、コンプレックス型、ハイブリッド型 *N*-結合型糖鎖の相対量 (B)。Has2^{ΔNeo} 細胞を 500 μ M GlcN および 20mM Man、またはそのいずれかの存在下で 8 日間培養し、MALDI-TOF-MS を用いて *N*-結合型糖鎖の組成を分析した。各糖鎖構造を表す色や相対量の詳細は、表 4 に記載している。データは両側スチューデントの *t* 検定を用いて平均値 \pm 標準偏差 (*n*=3) を示す。**p* < 0.05。

5-10. GlcN および Man 添加によるがん幹細胞性の抑制とシスプラチン治療効果の増強

続いて、GlcN と Man の添加による *N*-結合型糖鎖修飾の回復が、ヒアルロン酸過剰産生がん細胞のがん幹細胞性を抑制できるかどうかについて検討した。Has2^{ΔNeo} 細胞を外因性 GlcN および Man、またはそのいずれかを培地中に添加した後、CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様細胞の数を測定した。GlcN または Man で処理すると、CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞

胞様細胞の数が時間依存的に減少した (図 25A)。また、GlcN と Man の併用処理は、単独処理に比べてがん幹細胞様細胞数をより減少させた。さらに、GlcN と Man の併用処理は、未処理の細胞に比べてマンモスフィア形成のサイズを有意に減少させた (図 25B)。マンモスフィア形成に関しては、GlcN 処理だけで強い阻害効果があり、これは以前の研究と一致している [62]。

GlcN と Man がヒアルロン酸の過剰産生により促進されたがん幹細胞性を抑制したことから、最後にこれらのヘキソースによる処理が、がん増殖に影響を与えるかどうかについて調査した。GlcN と Man で前処理した Has2^{ΔNeo} 細胞を免疫不全マウスの皮下に移植した。担がんマウスにはヘキソースを含んだ飲料水を週 3 回の経口投与および自由摂取可能な給水瓶として設置することにより摂取させた (図 26A)。GlcN と Man の併用投与は、がんの増殖を有意に抑制し、シスプラチンの治療効果をさらに増強させた (図 26B, C)。

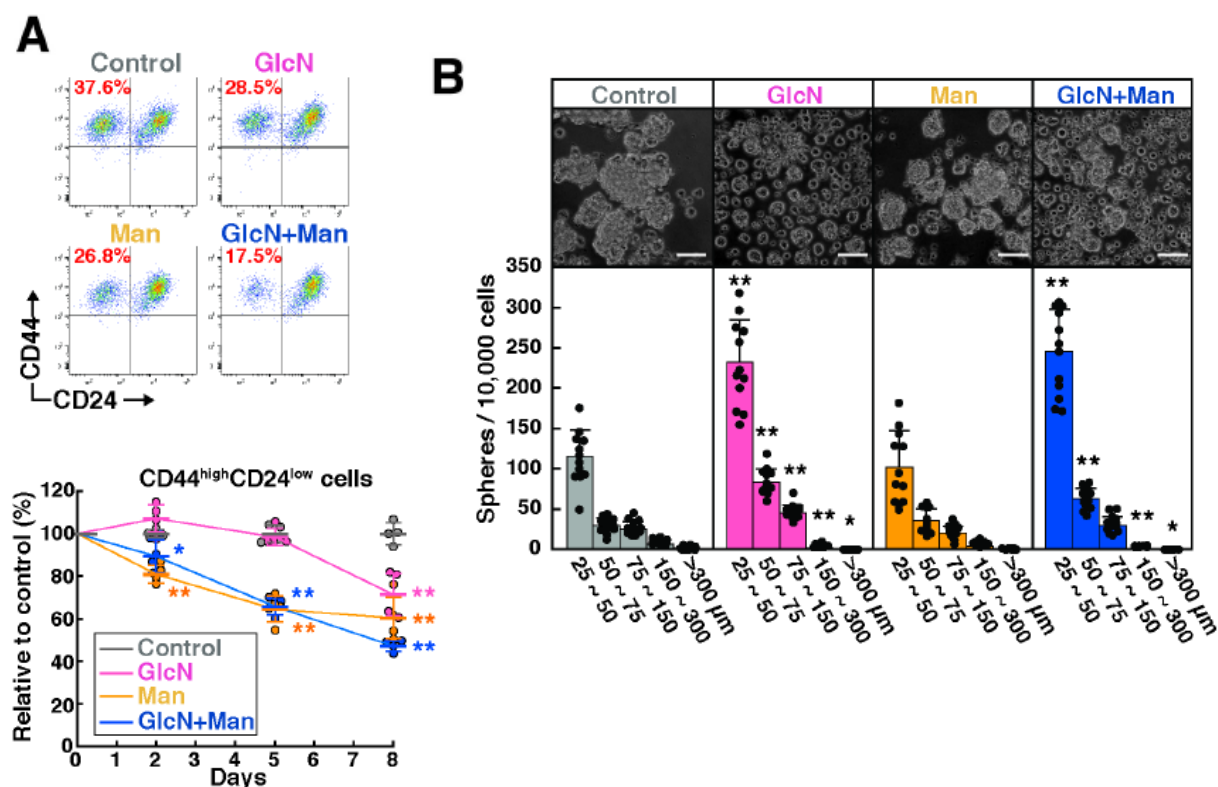


図 25. GlcN および Man の添加による CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様細胞の減少

(A) CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様細胞数に対する GlcN と Man の効果。Has2^{ΔNeo} 細胞を 500 μM GlcN および 20mM Man、またはそのいずれかの存在下で 8 日間培養し、FACS により CD24 と CD44 の発現を解析した。データは両側スチューデントの t 検定を用いて平均値 ± 標準偏差 (n=4) を示す。*p < 0.05, **p < 0.01。 (B) Has2^{ΔNeo} 細胞において GlcN および Man を添加した際のマンモスフィア形成。Has2^{ΔNeo} 細胞を 500 μM GlcN

および 20mM Man、またはそのいずれかの存在下で 8 日間培養し、同濃度の GlcN および Man、またはそのいずれかを含有スフェロイド形成培地でさらに 7 日間培養した。位相差顕微鏡下で画像を撮影し、マンモスフィア形成の数を集計した。スケールバーは 100 μm を示す。データは両側スチューデントの t 検定を用いて平均値 \pm 標準偏差 ($n=12$) を示す。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。(※同研究室の櫻井彩弥音氏と松尾 俊氏により得られたデータ)

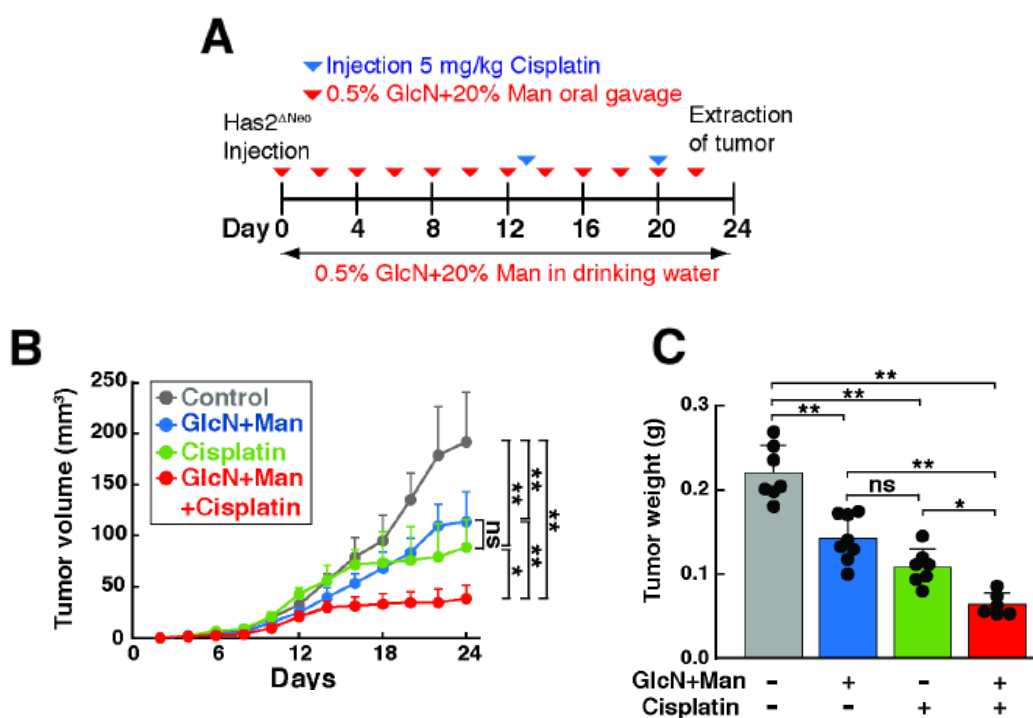


図 26. GlcN および Man によるシスプラチン治療効果の増強

(A) 腫瘍形成実験の計画。(B) GlcN および Man 投与による腫瘍形成の抑制。移植した腫瘍の大きさは、2 日おきに 24 日間測定し、腫瘍体積は「長さ \times 幅² \times 0.5」により算出した。(3-4 匹のマウス/グループ)。データは Tukey の検定を用いた。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。(C) 動物実験終了時の腫瘍重量 (3-4 匹のマウス/グループ)。データは Tukey の検定を用いた。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。

6. 考察

本研究で得られた主な結果は次の通りである：（１）ヒアルロン酸産生によって誘発される慢性的な糖代謝ストレスは、LLO 合成や *N*-結合型糖鎖プロファイルを変化させることにより、がん幹細胞性と抗がん剤耐性を促進した。（２）*N*-結合型糖鎖修飾阻害剤である TM や解糖系阻害剤である 2-DG による低用量処理もまた、LLO 合成と *N*-結合型糖鎖プロファイルを変化させ、がん幹細胞性と抗がん剤耐性を促進した。（３）TM あるいは 2-DG の低用量処理は、Notch シグナル伝達経路を活性化し、Notch シグナルの阻害は、がん幹細胞性の指標であるマンモスフィア形成とシスプラチン耐性を減弱した。（４）GlcN と Man 処理による *N*-結合型糖鎖修飾の回復は、マンモスフィア形成とシスプラチン耐性を減弱した。以上、得られた４つの結果に基づき、本研究では、低容量の糖代謝ストレスが、*N*-結合型糖鎖修飾の変化と Notch シグナルの活性化を通じて、がん細胞のがん幹細胞性と抗がん剤耐性を促進するという新たな機構を提唱する（図 28）。

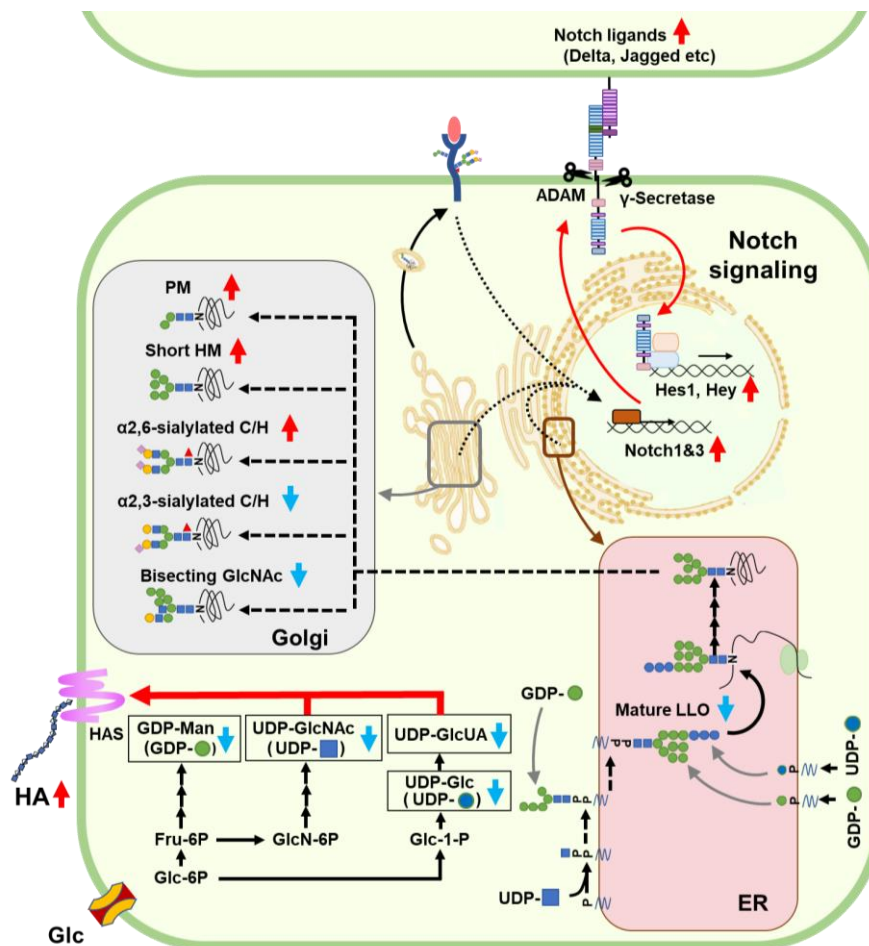


図 28 低容量の糖代謝ストレスが *N*-結合型糖鎖修飾の変化と Notch シグナルの活性化を通じてがん幹細胞性と抗がん剤耐性の促進を導く模式図

がん細胞は、その活発な代謝や増殖のため、大量かつ継続的な栄養の供給を必要とし、持続的な代謝ストレスに曝されている。グルコースの供給が不十分な細胞環境下では、がん細胞は AMPK シグナル伝達経路の活性化や AKT のリン酸化、活性酸素種の産生を通じて適応し、アポトーシスを回避して生存する [7, 63, 64]。本研究ではさらに、低容量の糖代謝ストレスによる *N*-結合型糖鎖修飾の変化が、Notch および WNT/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化することを明らかにした。

Notch シグナル伝達経路は、多細胞生物において進化的によく保存された細胞間のシグナル情報伝達経路であり、様々な組織構築過程において、細胞の増殖や分化など細胞の運命決定や組織・器官の恒常性の維持に寄与している。Notch 受容体は機能的な細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインから成る I 型膜貫通タンパク質であり、哺乳動物では Notch1-4 の 4 つのアイソフォームが同定されている。Notch シグナル伝達経路では、Notch 受容体と隣接細胞の膜上に発現する Notch リガンド (Delta や Jagged など) が直接相互作用することによってシグナルが伝達され、Hey や Hes などの標的遺伝子の活性化を通じて細胞の増殖や分化に関与する (図 28) [65-67]。がん細胞では、しばしば Notch 受容体の過剰発現が見られ、Notch3 を含む Notch シグナルの異常な活性化が乳がんを含めた様々ながん種における発がんやがん幹細胞性、抗がん剤耐性の制御に重要であることが報告されている [68-72]。また最近の研究では、Notch 受容体や Notch リガンドの *N*-結合型糖鎖修飾が、Notch シグナルの活性化に重要な役割を果たすことも明らかになってきている [73, 74]。本研究における TM および 2-DG 処理による Notch 関連遺伝子の解析結果から、低容量の糖代謝ストレスが Notch 受容体や Notch リガンドを含む膜結合タンパク質の *N*-結合型糖鎖を変化させることにより Notch シグナルの活性化を導くことが考えられた。さらに、Notch 阻害剤処理によるがん幹細胞性の解析結果から、Notch シグナルとがん幹細胞性や抗がん剤耐性を制御していることが明らかとなった。これらの知見に基づいて本研究の結果は、ヒアルロン酸合成などによって引き起こされる低容量の糖代謝ストレスが、タンパク質の *N*-結合型糖鎖修飾の変化を引き起こして Notch シグナルなどの幹細胞関連シグナルを活性化し、がん幹細胞性や抗がん剤耐性の促進に寄与することを示唆している (図 28)。

N-結合型糖鎖修飾は、多くの膜結合タンパク質や分泌タンパク質の適切なフォールディングや分泌、構造的完全性、動態、機能において重要な翻訳後修飾である。従って、*N*-結合型糖鎖修飾パターンの変化は、細胞の増殖や生存、幹細胞性に関わる様々なシグナル伝達や遺伝子発現に深く関与する。本研究における糖鎖構造の網羅的解析から、ヒアルロン酸の過剰産生や低用量 TM 処理により *N*-結合型糖鎖プロファイルが共に変化し、主にパウチマンノース型と比較的短い高マンノース型 *N*-結合型糖鎖レベルの増加、コンプレックス型の *N*-結合型糖鎖 (末端に α 2,6 結合したシアル酸を持つ糖鎖および *N*-結合型糖鎖コアにフコースが結合した糖鎖種) の増加、そしてバイセクティング GlcNAc 構造を有するハイブリッド型 *N*-結合型糖鎖レベルの減少が明らかとなった。

単純な構造を持つパウチマンノース型 *N*-結合型糖鎖は、従来、下等生物において特徴的に見られる構造と考えられてきた。しかしながら、最近の生物学的分析や免疫組織化学的研究から、パウチマンノース型 *N*-結合型糖鎖は、免疫や発生、がんなど、哺乳類における多くの生物学的プロセスに関与している可能性が明らかになってきた[75-77]。興味深いことに、パウチマンノース型 *N*-結合型糖鎖は、がんや特定の幹細胞集団など、ある一定の病態生理学的な条件でのみ確認されている[78-80]。例えば、3 つの Man が結合したトリマンノシド構造を持つパウチマンノース糖鎖に高い特異性を示す Mannitou モノクローナル抗体は、がん幹細胞で多く見られるサイトケラチン陽性がん細胞の亜集団を染色する。これらの知見と共に、本研究の結果は、パウチマンノース型 *N*-結合型糖鎖ががん幹細胞性と密接に関連していることを支持する。

高マンノース型 *N*-結合型糖鎖の中でも短い Man₅₋₇GlcNAc₂ 糖鎖レベルの増加は、ヒアルロン酸過剰産生がん細胞や低用量の TM で処理したがん細胞で認められた。小胞体 (ER) 関連分解促進 α -マンノシダーゼ様 (EDEP) ファミリーは、Man₉GlcNAc₂ 糖鎖構造を Man₅₋₇GlcNAc₂ 糖鎖構造にトリミングすることにより、ER 関連タンパク質分解 (ERAD) に関与している[81]。さらに、Man₈GlcNAc₂ 糖鎖構造は、通常はゴルジ体に移動した後、 α -マンノシダーゼ活性を介して Man₅GlcNAc₂ 糖鎖構造に段階的にトリミングされる。従って、Man₅₋₇GlcNAc₂ 糖鎖構造の継続的な蓄積は、ER とゴルジ体におけるストレス応答機構を惹起することが考えられ、このことがストレス耐性獲得に働いている可能性が考えられた。今後は、ER とゴルジ体におけるストレス応答が、がん細胞のストレス耐性に働く機構について解析を進める計画である。

糖鎖の α 2,6 シアリル化は、がん幹細胞性の獲得と維持に重要であることが知られている[11, 13]。例えば、*N*-結合型糖鎖の α 2,6 シアリル化を担う主要なシアル酸転移酵素である ST6GAL1 は、膵臓がん幹細胞において重要な役割を果たしている。本研究では、ヒアルロン酸の過剰産生と TM の低用量処理の両方が、 α 2,6 シアリル化した糖鎖種を有意に増加させることを見出し、この修飾が、がん幹細胞性の獲得に重要であることを示唆した。RNA-seq 解析の結果、*N*-結合型糖鎖末端のシアリル化に関与する 4 つの酵素、 α 2,3 シアル酸転移酵素 (ST3GAL3、ST3GAL4、ST3GAL6) と α 2,6 シアル酸転移酵素 (ST6GAL1) の遺伝子発現に有意な変化が認められないことから、これらのシアル酸転移酵素の遺伝子発現の変化が、シアリル化パターンの変化の要因ではないと考えられた。*N*-結合型糖鎖におけるバイセクティング GlcNAc 構造は、シアル酸転移酵素の触媒活性を阻害することが知られており[82]、 α 2,6 シアリル化は α 2,3 シアリル化よりもバイセクティング GlcNAc 構造の影響を受けにくい[83]。従って、低容量の糖代謝ストレスに曝されたがん細胞で α 2,6 シアリル化した *N*-結合型糖鎖が増加する 1 つの理由として、バイセクティング GlcNAc 構造の減少が考えられた。

本研究では、低容量の糖代謝ストレスが、*N*-結合型糖鎖修飾の変化と Notch シグナルの活性化を通じて、がん細胞のがん幹細胞性と抗がん剤耐性を促進するという新たな機構を

明らかにした。さらに、GlcN と Man の併用処理によって *N*-結合型糖鎖の構造パターンを回復させることで、がん幹細胞性を抑制し、抗がん剤の抗腫瘍効果を高めることが出来ることを示した。将来、代謝に基づくがん治療法は、治療抵抗性がん幹細胞集団を減少させるための新たな治療法となり得ると考えられる。

7. 表

					Neu		
Class	Color*	No	Composition	Theor. m/z	Exp 1	Exp 2	Exp 3
PM		N-1	(Hex)2 (HexNAc)2	1178.5	0.054	0.085	0.053
		N-2	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1	1324.6	0.520	0.698	0.365
		N-3	(Hex)3 (HexNAc)2	1340.5	0.071	0.089	0.056
		N-4	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)1	1486.6	0.247	0.313	0.222
		N-5	(Hex)4 (HexNAc)2	1502.6	0.065	0.102	0.062
HM		N-6	(Hex)2 + (Man)3(GlcNAc)2	1664.7	0.057	0.069	0.049
		N-7	(Hex)3 + (Man)3(GlcNAc)2	1826.7	0.174	0.213	0.158
		N-8	(Hex)4 + (Man)3(GlcNAc)2	1988.8	0.132	0.162	0.125
		N-9	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2	2150.8	0.275	0.326	0.254
		N-10	(Hex)6 + (Man)3(GlcNAc)2	2312.9	0.330	0.388	0.286
		N-11	(Hex)7 + (Man)3(GlcNAc)2	2474.9	0.001	0.001	0.001
Hybrid		N-13	(Hex)2 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	1867.7	0.010	0.014	0.009
		N-14	(Hex)2 (HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2013.8	0.016	0.030	0.016
		N-15	(Hex)3 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2029.8	0.016	0.021	0.017
		N-16	(Hex)3 (HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2175.8	0.007	0.011	0.006
		N-17	(Hex)4 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2191.8	0.008	0.024	0.020
		N-18	(Hex)4 (HexNAc)1(Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2337.9	0.000	0.000	0.000
		N-19	(Hex)4 (HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	2394.9	0.012	0.020	0.014
		N-20	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2378.9	0.015	0.032	0.022
		N-21	(Hex)4 (HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2541.0	0.130	0.232	0.185
		N-22	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	2525.0	0.000	0.000	0.000
		N-23	(Hex)2 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2171.9	0.000	0.013	0.013
		N-24	(Hex)2 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2199.9	0.014	0.023	0.011
		N-25	(Hex)2 (HexNAc)1 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2346.0	0.004	0.000	0.000
		N-26	(Hex)3 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2333.9	0.012	0.000	0.000
		N-27	(Hex)3 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2361.9	0.016	0.021	0.012
		N-28	(Hex)3 (HexNAc)1 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2480.0	0.000	0.000	0.000
		N-29	(Hex)3 (HexNAc)1 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2508.0	0.000	0.000	0.000
		N-30	(Hex)4 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2524.0	0.000	0.000	0.000
		N-31	(Hex)3 (HexNAc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2565.0	0.039	0.099	0.035
		N-32	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2683.1	0.000	0.250	0.194
		N-33	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2711.1	0.404	0.633	0.324
		N-34	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)2 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2829.1	0.000	0.000	0.000
		N-35	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2857.1	0.000	0.000	0.000
Complex		N-12†	(Hex)1 (HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	1851.7	0.054	0.088	0.048
		N-36	(HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	1689.7	0.096	0.167	0.104
		N-37	(HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	1892.8	0.168	0.237	0.137
		N-38	(Hex)1 (HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2054.8	0.042	0.077	0.040
		N-39	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2216.9	0.042	0.077	0.044
		N-40	(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2037.8	0.013	0.020	0.000
		N-41	(Hex)1 (HexNAc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2240.9	0.000	0.000	0.000
		N-42	(Hex)1 (HexNAc)1 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2183.9	0.030	0.099	0.022
		N-43	(Hex)1 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2387.0	0.031	0.047	0.000
		N-44	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2374.9	0.019	0.000	0.020
		N-45	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2403.0	0.069	0.103	0.055
		N-46	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2[a2,3/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2707.1	0.000	0.000	0.000
		N-47	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2[a2,6/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2735.1	0.024	0.028	0.011
		N-48	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2549.0	0.081	0.158	0.075
		N-49	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)2[a2,3/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2853.2	0.128	0.000	0.000
		N-50	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)2[a2,6/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2881.2	0.078	0.141	0.041
		N-51	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2521.0	0.028	0.049	0.033
		N-52	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)2[a2,3/a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2825.1	0.047	0.079	0.000
		N-53	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2740.1	0.000	0.000	0.000
		N-54	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)3[a2,3/a2,3/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	3376.4	0.000	0.000	0.018
		N-55	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)3[a2,3/a2,6/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	3404.4	0.000	0.032	0.000
		N-56	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2695.1	0.000	0.000	0.000

			Has2 ^{Neo}			Has2 ^{ΔNeo}			Average			SD			Student's t-test p-value
Class	Color*	No	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Neu	Has2 ^{Neo}	Has2 ^{ΔNeo}	Neu	Has2 ^{Neo}	Has2 ^{ΔNeo}	Has2 ^{Neo} vs Has2 ^{ΔNeo}
PM		N-1	0.048	0.058	0.030	0.140	0.079	0.129	0.064	0.045	0.116	0.018	0.014	0.033	0.0263
		N-2	0.286	0.209	0.167	1.438	0.817	1.069	0.527	0.221	1.108	0.167	0.061	0.312	0.0085
		N-3	0.119	0.121	0.079	0.224	0.104	0.134	0.072	0.106	0.154	0.106	0.024	0.062	0.2825
		N-4	0.510	0.478	0.313	0.692	0.354	0.478	0.260	0.434	0.508	0.047	0.106	0.171	0.5573
		N-5	0.120	0.093	0.059	0.516	0.270	0.327	0.076	0.091	0.371	0.022	0.031	0.129	0.0215
HM		N-6	0.086	0.081	0.049	0.148	0.082	0.101	0.058	0.072	0.110	0.010	0.020	0.034	0.1719
		N-7	0.309	0.308	0.198	0.745	0.448	0.522	0.182	0.271	0.572	0.028	0.064	0.155	0.0359
		N-8	0.238	0.262	0.155	0.500	0.305	0.351	0.140	0.218	0.385	0.020	0.056	0.102	0.0674
		N-9	0.386	0.430	0.281	0.666	0.422	0.468	0.285	0.366	0.518	0.037	0.077	0.130	0.1544
		N-10	0.485	0.550	0.355	0.708	0.472	0.499	0.335	0.463	0.560	0.051	0.099	0.129	0.3637
		N-11	0.003	0.004	0.002	0.002	0.002	0.001	0.001	0.003	0.002	0.000	0.001	0.000	0.1267
Hybrid		N-13	0.016	0.018	0.013	0.017	0.015	0.012	0.011	0.016	0.014	0.003	0.003	0.003	0.5348
		N-14	0.044	0.057	0.038	0.040	0.019	0.027	0.021	0.046	0.029	0.008	0.009	0.011	0.1026
		N-15	0.026	0.051	0.026	0.025	0.018	0.025	0.018	0.034	0.023	0.003	0.014	0.004	0.2482
		N-16	0.022	0.027	0.015	0.011	0.006	0.008	0.008	0.021	0.008	0.002	0.006	0.002	0.0199
		N-17	0.028	0.041	0.019	0.013	0.009	0.013	0.017	0.030	0.012	0.008	0.011	0.002	0.0526
		N-18	0.008	0.012	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.003	0.000	0.0127
		N-19	0.014	0.021	0.021	0.000	0.000	0.000	0.015	0.018	0.000	0.004	0.004	0.000	0.0017
		N-20	0.046	0.066	0.055	0.015	0.010	0.011	0.023	0.056	0.012	0.009	0.010	0.003	0.0020
		N-21	0.216	0.328	0.366	0.012	0.008	0.009	0.182	0.303	0.010	0.051	0.078	0.002	0.0028
		N-22	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	ND
		N-23	0.007	0.000	0.008	0.006	0.000	0.000	0.008	0.005	0.002	0.007	0.005	0.000	0.4126
		N-24	0.037	0.029	0.025	0.084	0.046	0.060	0.016	0.030	0.063	0.006	0.006	0.019	0.0476
		N-25	0.021	0.014	0.014	0.071	0.046	0.061	0.001	0.016	0.059	0.000	0.004	0.013	0.0050
		N-26	0.010	0.011	0.013	0.012	0.000	0.000	0.004	0.011	0.004	0.000	0.002	0.000	0.1467
		N-27	0.044	0.045	0.023	0.191	0.125	0.140	0.016	0.037	0.152	0.005	0.012	0.034	0.0054
		N-28	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	ND
		N-29	0.007	0.000	0.003	0.025	0.017	0.019	0.000	0.004	0.020	0.000	0.004	0.004	0.0074
		N-30	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-31	0.074	0.062	0.078	0.061	0.048	0.056	0.057	0.071	0.055	0.036	0.008	0.006	0.0585
		N-32	0.189	0.256	0.199	0.015	0.012	0.014	0.148	0.215	0.013	0.131	0.037	0.001	0.0007
		N-33	1.014	0.888	0.793	0.814	0.614	0.633	0.454	0.899	0.687	0.161	0.111	0.110	0.0795
		N-34	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-35	0.000	0.009	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.005	0.000	0.1164
Complex		N-12†	0.193	0.218	0.138	0.217	0.114	0.144	0.063	0.183	0.158	0.021	0.041	0.053	0.5588
		N-36	0.212	0.213	0.154	0.433	0.190	0.245	0.122	0.193	0.289	0.039	0.034	0.127	0.2737
		N-37	0.244	0.224	0.197	0.422	0.226	0.282	0.181	0.222	0.310	0.051	0.023	0.101	0.2121
		N-38	0.074	0.085	0.072	0.090	0.056	0.072	0.053	0.077	0.073	0.021	0.007	0.017	0.6903
		N-39	0.094	0.128	0.116	0.055	0.036	0.038	0.055	0.113	0.043	0.019	0.017	0.011	0.0039
		N-40	0.027	0.036	0.018	0.045	0.025	0.036	0.011	0.027	0.035	0.010	0.009	0.010	0.3578
		N-41	0.021	0.023	0.016	0.019	0.016	0.000	0.000	0.020	0.012	0.000	0.003	0.010	0.2575
		N-42	0.092	0.065	0.053	0.320	0.201	0.271	0.050	0.070	0.264	0.042	0.020	0.060	0.0060
		N-43	0.093	0.051	0.053	0.270	0.159	0.178	0.026	0.066	0.202	0.024	0.024	0.059	0.0209
		N-44	0.034	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.013	0.020	0.000	0.011	0.018	0.000	0.1260
		N-45	0.197	0.201	0.203	0.167	0.134	0.045	0.076	0.200	0.115	0.025	0.003	0.063	0.0792
		N-46	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	ND
		N-47	0.044	0.036	0.027	0.099	0.000	0.000	0.021	0.036	0.033	0.009	0.009	0.000	0.9378
		N-48	0.231	0.181	0.142	0.466	0.295	0.352	0.105	0.185	0.371	0.046	0.045	0.087	0.0300
		N-49	0.000	0.159	0.136	0.325	0.000	0.273	0.043	0.099	0.200	0.000	0.086	0.175	0.4199
		N-50	0.222	0.118	0.050	1.297	1.327	1.158	0.087	0.130	1.261	0.050	0.086	0.090	0.0001
		N-51	0.048	0.063	0.049	0.025	0.019	0.018	0.037	0.053	0.021	0.011	0.009	0.004	0.0039
		N-52	0.048	0.057	0.037	0.011	0.011	0.011	0.042	0.047	0.011	0.040	0.010	0.000	0.0030
		N-53	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	ND
		N-54	0.022	0.043	0.024	0.000	0.000	0.000	0.006	0.030	0.000	0.000	0.011	0.000	0.0104
		N-55	0.012	0.018	0.011	0.012	0.000	0.016	0.011	0.014	0.009	0.000	0.004	0.008	0.4774
		N-56	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	ND

p < 0.05

表 1. マウス乳がん細胞における *N*-結合型糖鎖の構造と相対量

各糖鎖構造の N 番号は、図 6 に記載の番号に対応している。*; 図 6C のグラフ凡例のカラー表。†; 本研究では N-12 をコンプレックス型として集計した。ND; 未同定

Class	Color*	No	Composition	Theor. m/z	TM (0 µg/ml)			TM (0.1 µg/ml)			TM (0.2 µg/ml)		
					Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3
PM		N-1	(Hex)2 (HexNAc)2	1178.5	0.068	0.118	0.098	0.546	0.270	0.185	0.083	0.019	0.069
		N-2	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1	1324.6	0.400	0.457	0.407	2.818	2.107	1.521	0.358	0.207	0.479
		N-3	(Hex)3 (HexNAc)2	1340.5	0.083	0.099	0.082	0.325	0.193	0.119	0.040	0.016	0.042
		N-4	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)1	1486.6	0.414	0.353	0.265	1.225	1.024	0.716	0.206	0.166	0.353
		N-5	(Hex)4 (HexNAc)2	1502.6	0.064	0.052	0.041	0.203	0.164	0.081	0.027	0.020	0.041
HM		N-6	(Hex)2 + (Man)3(GlcNAc)2	1664.7	0.081	0.062	0.052	0.111	0.112	0.076	0.029	0.030	0.052
		N-7	(Hex)3 + (Man)3(GlcNAc)2	1826.7	0.273	0.234	0.206	0.308	0.355	0.231	0.090	0.094	0.146
		N-8	(Hex)4 + (Man)3(GlcNAc)2	1988.8	0.179	0.175	0.138	0.195	0.244	0.163	0.067	0.071	0.098
		N-9	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2	2150.8	0.229	0.264	0.188	0.199	0.253	0.185	0.081	0.086	0.120
		N-10	(Hex)6 + (Man)3(GlcNAc)2	2312.9	0.293	0.377	0.249	0.258	0.324	0.260	0.154	0.153	0.193
		N-11	(Hex)7 + (Man)3(GlcNAc)2	2474.9	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001
Hybrid		N-13	(Hex)2 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	1867.7	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-14	(Hex)2 (HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2013.8	0.021	0.026	0.013	0.018	0.015	0.012	0.013	0.013	0.013
		N-15	(Hex)3 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2029.8	0.000	0.009	0.005	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-16	(Hex)3 (HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2175.8	0.007	0.009	0.007	0.011	0.010	0.008	0.000	0.005	0.000
		N-17	(Hex)4 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2191.8	0.008	0.012	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-18	(Hex)4 (HexNAc)1(Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2337.9	0.001	0.005	0.000	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000
		N-19	(Hex)4 (HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	2394.9	0.007	0.007	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-20	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2378.9	0.009	0.016	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	0.000
		N-21	(Hex)4 (HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2541.0	0.069	0.133	0.048	0.000	0.010	0.014	0.000	0.012	0.008
		N-22	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	2525.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-23	(Hex)2 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2171.9	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-24	(Hex)2 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2199.9	0.021	0.028	0.018	0.031	0.027	0.022	0.022	0.018	0.019
		N-25	(Hex)2 (HexNAc)1 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2346.0	0.008	0.014	0.006	0.000	0.015	0.015	0.009	0.011	0.010
		N-26	(Hex)3 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2333.9	0.007	0.011	0.007	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000
		N-27	(Hex)3 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2361.9	0.026	0.037	0.019	0.045	0.036	0.033	0.021	0.024	0.015
		N-28	(Hex)3 (HexNAc)1 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2480.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-29	(Hex)3 (HexNAc)1 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2508.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000
		N-30	(Hex)4 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2524.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-31	(Hex)3 (HexNAc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2565.0	0.047	0.079	0.038	0.042	0.029	0.024	0.027	0.032	0.018
		N-32	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2683.1	0.046	0.106	0.038	0.016	0.006	0.015	0.000	0.011	0.000
		N-33	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2711.1	0.523	1.010	0.425	0.278	0.189	0.285	0.169	0.309	0.142
		N-34	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)2 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2829.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000
		N-35	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2857.1	0.011	0.024	0.010	0.065	0.051	0.072	0.025	0.048	0.022
Complex		N-12†	(Hex)1 (HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	1851.7	0.063	0.069	0.030	0.067	0.074	0.043	0.000	0.028	0.032
		N-36	(HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	1689.7	0.062	0.000	0.035	0.088	0.064	0.046	0.026	0.034	0.033
		N-37	(HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	1892.8	0.080	0.082	0.042	0.130	0.146	0.091	0.062	0.108	0.095
		N-38	(Hex)1 (HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2054.8	0.026	0.038	0.018	0.050	0.053	0.028	0.034	0.054	0.042
		N-39	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2216.9	0.023	0.037	0.021	0.000	0.030	0.018	0.000	0.024	0.022
		N-40	(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2037.8	0.028	0.039	0.021	0.000	0.033	0.019	0.031	0.033	0.031
		N-41	(Hex)1 (HexNAc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2240.9	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-42	(Hex)1 (HexNAc)1 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6]+ (Man)3(GlcNAc)2	2183.9	0.071	0.078	0.045	0.217	0.184	0.164	0.111	0.207	0.141
		N-43	(Hex)1 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2387.0	0.021	0.040	0.000	0.041	0.028	0.030	0.000	0.033	0.027
		N-44	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2374.9	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-45	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2403.0	0.075	0.120	0.059	0.051	0.054	0.042	0.049	0.071	0.049
		N-46	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2[a2,3/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2707.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.074	0.000	0.000
		N-47	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2[a2,6/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2735.1	0.050	0.098	0.034	0.000	0.040	0.035	0.000	0.057	0.035
		N-48	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2549.0	0.082	0.139	0.063	0.118	0.102	0.095	0.060	0.082	0.052
		N-49	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)2[a2,3/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2853.2	0.126	0.367	0.122	0.259	0.163	0.142	0.049	0.250	0.067
		N-50	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)2[a2,6/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2881.2	0.149	0.293	0.091	0.294	0.226	0.306	0.364	0.583	0.273
		N-51	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2521.0	0.000	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-52	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)2[a2,3/a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2825.1	0.000	0.038	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-53	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2740.1	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-54	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)3[a2,3/a2,3/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	3376.4	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.073	0.040
		N-55	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)3[a2,3/a2,6/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	3404.4	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-56	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2695.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	0.035	0.000	0.030	0.000

Class	Color*	No	Average			SD			Student's t-test p-value
			TM (0 µg/ml)	TM (0.1 µg/ml)	TM (0.2 µg/ml)	TM (0 µg/ml)	TM (0.1 µg/ml)	TM (0.2 µg/ml)	TM 0 vs TM 0.1
PM		N-1	0.095	0.334	0.057	0.025	0.189	0.034	0.0952
		N-2	0.421	2.149	0.348	0.031	0.650	0.136	0.0100
		N-3	0.088	0.212	0.033	0.212	0.104	0.014	0.1091
		N-4	0.344	0.988	0.242	0.075	0.257	0.098	0.0140
		N-5	0.052	0.149	0.029	0.012	0.063	0.011	0.0575
HM		N-6	0.065	0.099	0.037	0.015	0.020	0.013	0.0805
		N-7	0.238	0.298	0.110	0.034	0.062	0.031	0.2133
		N-8	0.164	0.201	0.079	0.023	0.041	0.016	0.2448
		N-9	0.227	0.212	0.096	0.038	0.036	0.021	0.6583
		N-10	0.306	0.281	0.167	0.065	0.037	0.023	0.5884
		N-11	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.3739
Hybrid		N-13	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-14	0.020	0.015	0.013	0.006	0.003	0.000	0.2477
		N-15	0.005	0.002	0.000	0.004	0.000	0.000	0.3880
		N-16	0.008	0.010	0.002	0.001	0.002	0.000	0.2341
		N-17	0.009	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.0034
		N-18	0.002	0.002	0.000	0.003	0.000	0.000	0.9633
		N-19	0.006	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.0006
		N-20	0.011	0.000	0.002	0.004	0.000	0.000	0.0135
		N-21	0.083	0.008	0.007	0.044	0.007	0.006	0.0433
		N-22	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	ND
		N-23	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-24	0.022	0.027	0.020	0.005	0.004	0.002	0.3090
		N-25	0.009	0.010	0.010	0.004	0.009	0.001	0.9059
		N-26	0.008	0.003	0.000	0.002	0.000	0.000	0.1610
		N-27	0.027	0.038	0.020	0.009	0.006	0.005	0.1777
		N-28	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	ND
		N-29	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-30	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	ND
		N-31	0.055	0.032	0.025	0.022	0.009	0.007	0.1706
		N-32	0.063	0.013	0.004	0.037	0.006	0.000	0.0801
		N-33	0.652	0.251	0.207	0.314	0.053	0.090	0.0940
		N-34	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-35	0.015	0.063	0.032	0.008	0.010	0.014	0.0032
Complex		N-12†	0.054	0.061	0.020	0.021	0.016	0.017	0.6546
		N-36	0.032	0.066	0.031	0.031	0.021	0.005	0.1989
		N-37	0.068	0.123	0.088	0.023	0.028	0.024	0.0606
		N-38	0.027	0.044	0.044	0.010	0.014	0.010	0.1649
		N-39	0.027	0.016	0.015	0.008	0.015	0.013	0.3224
		N-40	0.029	0.017	0.032	0.009	0.017	0.001	0.3362
		N-41	0.007	0.000	0.000	0.013	0.000	0.000	0.3739
		N-42	0.065	0.188	0.153	0.017	0.027	0.049	0.0025
		N-43	0.021	0.033	0.020	0.020	0.007	0.018	0.3626
		N-44	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-45	0.085	0.049	0.056	0.031	0.006	0.013	0.1266
		N-46	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	ND
		N-47	0.061	0.025	0.031	0.033	0.022	0.029	0.1961
		N-48	0.095	0.105	0.065	0.040	0.012	0.015	0.6987
		N-49	0.205	0.188	0.122	0.140	0.062	0.111	0.8591
		N-50	0.178	0.275	0.407	0.104	0.043	0.159	0.2069
		N-51	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-52	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-53	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-54	0.007	0.000	0.038	0.000	0.000	0.037	0.3739
		N-55	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-56	0.000	0.024	0.010	0.000	0.021	0.000	0.1169

p < 0.05

表 2. TM 処理細胞における N-結合型糖鎖の構造と相対量

*; 図 10B のグラフ凡例のカラー表。†; 本研究では N-12 をコンプレックス型として集計。

ND; 未同定

Class	Color*	No	Composition	Theor. m/z	2-DG (0 mM)			2-DG (0.1 mM)		
					Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3
PM		N-1	(Hex)2 (HexNAc)2	1178.5	0.068	0.118	0.098	0.249	0.293	0.271
		N-2	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1	1324.6	0.400	0.457	0.407	1.883	2.609	1.869
		N-3	(Hex)3 (HexNAc)2	1340.5	0.083	0.099	0.082	0.155	0.147	0.138
		N-4	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)1	1486.6	0.414	0.353	0.265	0.829	1.046	0.784
		N-5	(Hex)4 (HexNAc)2	1502.6	0.064	0.052	0.041	0.142	0.128	0.105
HM		N-6	(Hex)2 + (Man)3(GlcNAc)2	1664.7	0.081	0.062	0.052	0.081	0.082	0.071
		N-7	(Hex)3 + (Man)3(GlcNAc)2	1826.7	0.273	0.234	0.206	0.198	0.220	0.207
		N-8	(Hex)4 + (Man)3(GlcNAc)2	1988.8	0.179	0.175	0.138	0.126	0.148	0.156
		N-9	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2	2150.8	0.229	0.264	0.188	0.122	0.151	0.157
		N-10	(Hex)6 + (Man)3(GlcNAc)2	2312.9	0.293	0.377	0.249	0.172	0.236	0.243
		N-11	(Hex)7 + (Man)3(GlcNAc)2	2474.9	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
Hybrid		N-13	(Hex)2 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	1867.7	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-14	(Hex)2 (HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2013.8	0.021	0.026	0.013	0.016	0.028	0.013
		N-15	(Hex)3 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2029.8	0.000	0.009	0.005	0.000	0.005	0.000
		N-16	(Hex)3 (HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2175.8	0.007	0.009	0.007	0.018	0.019	0.015
		N-17	(Hex)4 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2191.8	0.008	0.012	0.007	0.000	0.000	0.000
		N-18	(Hex)4 (HexNAc)1(Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2337.9	0.001	0.005	0.000	0.000	0.009	0.009
		N-19	(Hex)4 (HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	2394.9	0.007	0.007	0.005	0.000	0.000	0.000
		N-20	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2378.9	0.009	0.016	0.008	0.000	0.000	0.000
		N-21	(Hex)4 (HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2541.0	0.069	0.133	0.048	0.000	0.000	0.000
		N-22	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	2525.0	0.000	0.000	0.000	0.011	0.010	0.000
		N-23	(Hex)2 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2171.9	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-24	(Hex)2 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2199.9	0.021	0.028	0.018	0.033	0.044	0.025
		N-25	(Hex)2 (HexNAc)1 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2346.0	0.008	0.014	0.006	0.137	0.224	0.112
		N-26	(Hex)3 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2333.9	0.007	0.011	0.007	0.018	0.015	0.006
		N-27	(Hex)3 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2361.9	0.026	0.037	0.019	0.109	0.116	0.060
		N-28	(Hex)3 (HexNAc)1 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2480.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000
		N-29	(Hex)3 (HexNAc)1 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2508.0	0.000	0.000	0.000	0.051	0.011	0.035
		N-30	(Hex)4 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2524.0	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000
		N-31	(Hex)3 (HexNAc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2565.0	0.047	0.079	0.038	0.021	0.034	0.015
		N-32	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2683.1	0.046	0.106	0.038	0.000	0.004	0.008
		N-33	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2711.1	0.523	1.010	0.425	0.119	0.243	0.117
		N-34	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)2 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2829.1	0.000	0.000	0.000	0.009	0.013	0.007
		N-35	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2857.1	0.011	0.024	0.010	0.111	0.192	0.088
		N-57‡	(Hex)2 (HexNAc)1 (Fuc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	2159.8	0.000	0.000	0.000	0.024	0.031	0.020
		N-58‡	(Hex)3 (HexNAc)1 (Fuc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	2321.9	0.000	0.000	0.000	0.013	0.014	0.011
		N-59‡	(Hex)2 (HexNAc)1 (Fuc)2 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2464.0	0.000	0.000	0.000	0.016	0.024	0.013
		N-60‡	(Hex)3 (HexNAc)2 (NeuAc)2[a2,3/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2841.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000
		N-61‡	(Hex)2 (HexNAc)1 (Fuc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2492.0	0.000	0.000	0.000	0.164	0.252	0.133
Complex		N-12‡	(Hex)1 (HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	1851.7	0.063	0.069	0.030	0.091	0.127	0.050
		N-36	(HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	1689.7	0.062	0.000	0.035	0.053	0.077	0.033
		N-37	(HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	1892.8	0.080	0.082	0.042	0.087	0.113	0.049
		N-38	(Hex)1 (HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2054.8	0.026	0.038	0.018	0.038	0.055	0.028
		N-39	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2216.9	0.023	0.037	0.021	0.000	0.036	0.000
		N-40	(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2037.8	0.028	0.039	0.021	0.053	0.037	0.025
		N-41	(Hex)1 (HexNAc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2240.9	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-42	(Hex)1 (HexNAc)1 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2183.9	0.071	0.078	0.045	0.255	0.420	0.171
		N-43	(Hex)1 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2387.0	0.021	0.040	0.000	0.038	0.055	0.000
		N-44	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2374.9	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-45	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2403.0	0.075	0.120	0.059	0.067	0.074	0.040
		N-46	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2[a2,3/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2707.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-47	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2[a2,6/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2735.1	0.050	0.098	0.034	0.071	0.080	0.047
		N-48	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2549.0	0.082	0.139	0.063	0.129	0.204	0.101
		N-49	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)2[a2,3/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2853.2	0.126	0.367	0.122	0.154	0.393	0.127
		N-50	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)2[a2,6/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2881.2	0.149	0.293	0.091	0.518	0.728	0.289
		N-51	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2521.0	0.000	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-52	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)2[a2,3/a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2825.1	0.000	0.038	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-53	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2740.1	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-54	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)3[a2,3/a2,3/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	3376.4	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000
		N-55	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)3[a2,3/a2,6/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	3404.4	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-56	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2695.1	0.000	0.000	0.000	0.117	0.170	0.097

Class	Color*	No	Average		SD		Student's <i>t</i> -test
			2-DG (0 mM)	2-DG (0.1 mM)	2-DG (0 mM)	2-DG (0.1 mM)	<i>p</i> -value
PM		N-1	0.095	0.271	0.025	0.022	0.0008
		N-2	0.421	2.121	0.031	0.423	0.0023
		N-3	0.088	0.147	0.010	0.009	0.0014
		N-4	0.344	0.886	0.075	0.140	0.0041
		N-5	0.052	0.125	0.012	0.019	0.0045
HM		N-6	0.065	0.078	0.015	0.006	0.2382
		N-7	0.238	0.208	0.034	0.011	0.2290
		N-8	0.164	0.143	0.023	0.016	0.2614
		N-9	0.227	0.143	0.038	0.019	0.0264
		N-10	0.306	0.217	0.065	0.039	0.1120
		N-11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.3739
Hybrid		N-13	0.001	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-14	0.020	0.019	0.006	0.008	0.8955
		N-15	0.005	0.002	0.004	0.000	0.3496
		N-16	0.008	0.018	0.001	0.002	0.0020
		N-17	0.009	0.000	0.003	0.000	0.0034
		N-18	0.002	0.006	0.003	0.005	0.3261
		N-19	0.006	0.000	0.001	0.000	0.0006
		N-20	0.011	0.000	0.004	0.000	0.0135
		N-21	0.083	0.000	0.044	0.000	0.0308
		N-22	0.000	0.007	0.000	0.006	0.1181
		N-23	0.002	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-24	0.022	0.034	0.005	0.010	0.1492
		N-25	0.009	0.157	0.004	0.059	0.0121
		N-26	0.008	0.013	0.002	0.006	0.2963
		N-27	0.027	0.095	0.009	0.030	0.0208
		N-28	0.000	0.004	0.000	0.000	0.3739
		N-29	0.000	0.032	0.000	0.020	0.0496
		N-30	0.000	0.004	0.000	0.000	0.3739
		N-31	0.055	0.024	0.022	0.010	0.0857
		N-32	0.063	0.004	0.037	0.004	0.0508
		N-33	0.652	0.160	0.314	0.072	0.0568
		N-34	0.000	0.009	0.000	0.003	0.0060
		N-35	0.015	0.130	0.008	0.055	0.0223
		N-57‡	0.000	0.025	0.000	0.006	0.0016
		N-58‡	0.000	0.013	0.000	0.001	0.0001
		N-59‡	0.000	0.018	0.000	0.006	0.0056
		N-60‡	0.000	0.003	0.000	0.000	0.3739
		N-61‡	0.000	0.183	0.000	0.062	0.0068
Complex		N-12†	0.054	0.089	0.021	0.039	0.2393
		N-36	0.032	0.054	0.031	0.022	0.3745
		N-37	0.068	0.083	0.023	0.032	0.5532
		N-38	0.027	0.040	0.010	0.013	0.2453
		N-39	0.027	0.012	0.008	0.000	0.2982
		N-40	0.029	0.038	0.009	0.014	0.4089
		N-41	0.007	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-42	0.065	0.282	0.017	0.126	0.0420
		N-43	0.021	0.031	0.020	0.028	0.6267
		N-44	0.007	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-45	0.085	0.060	0.031	0.018	0.3145
		N-46	0.000	0.000	0.000	0.000	ND
		N-47	0.061	0.066	0.033	0.017	0.8192
		N-48	0.095	0.145	0.040	0.053	0.2618
		N-49	0.205	0.225	0.140	0.146	0.8733
		N-50	0.178	0.512	0.104	0.220	0.0758
		N-51	0.009	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-52	0.013	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-53	0.006	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-54	0.007	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-55	0.005	0.000	0.000	0.000	0.3739
		N-56	0.000	0.128	0.000	0.038	0.0041

$p < 0.05$

表 3. 2-DG 処理細胞における *N*-結合型糖鎖の構造と相対量

*; 図 12B のグラフ凡例のカラー表。†; 本研究では N-12 をコンプレックス型として集計。

‡: これらの構造は 2-DG 処理したサンプルでのみ観察。ND; 未同定

					Control		
Class	Color*	No	Composition	Theor. m/z	Exp 1	Exp 2	Exp 3
PM		N-1	(Hex)2 (HexNAc)2	1178.5	0.036	0.050	0.053
		N-2	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1	1324.6	0.601	0.860	0.586
		N-3	(Hex)3 (HexNAc)2	1340.5	0.031	0.039	0.034
		N-4	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)1	1486.6	0.197	0.279	0.156
		N-5	(Hex)4 (HexNAc)2	1502.6	0.024	0.030	0.025
HM		N-6	(Hex)2 + (Man)3(GlcNAc)2	1664.7	0.012	0.014	0.014
		N-7	(Hex)3 + (Man)3(GlcNAc)2	1826.7	0.171	0.238	0.196
		N-8	(Hex)4 + (Man)3(GlcNAc)2	1988.8	0.143	0.197	0.157
		N-9	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2	2150.8	0.209	0.296	0.221
		N-10	(Hex)6 + (Man)3(GlcNAc)2	2312.9	0.322	0.456	0.353
		N-11	(Hex)7 + (Man)3(GlcNAc)2	2474.9	0.001	0.001	0.001
Hybrid		N-13	(Hex)2 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	1867.7	0.000	0.000	0.000
		N-14	(Hex)2 (HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2013.8	0.010	0.000	0.019
		N-15	(Hex)3 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2029.8	0.005	0.000	0.000
		N-16	(Hex)3 (HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2175.8	0.000	0.000	0.000
		N-17	(Hex)4 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2191.8	0.008	0.011	0.011
		N-18	(Hex)4 (HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2337.9	0.000	0.000	0.000
		N-19	(Hex)4 (HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	2394.9	0.000	0.000	0.000
		N-20	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2378.9	0.004	0.010	0.000
		N-21	(Hex)4 (HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2541.0	0.012	0.013	0.009
		N-22	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	2525.0	0.000	0.000	0.000
		N-23	(Hex)2 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2171.9	0.000	0.000	0.000
		N-24	(Hex)2 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2199.9	0.033	0.035	0.034
		N-25	(Hex)2 (HexNAc)1 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2346.0	0.038	0.044	0.040
		N-26	(Hex)3 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2333.9	0.010	0.015	0.016
		N-27	(Hex)3 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2361.9	0.132	0.164	0.114
		N-28	(Hex)3 (HexNAc)1 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2480.0	0.000	0.000	0.000
		N-29	(Hex)3 (HexNAc)1 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2508.0	0.018	0.024	0.020
		N-30	(Hex)4 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2524.0	0.005	0.000	0.000
		N-31	(Hex)3 (HexNAc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2565.0	0.058	0.071	0.049
		N-32	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2683.1	0.015	0.019	0.015
		N-33	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2711.1	0.670	0.695	0.555
		N-34	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)2 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2829.1	0.000	0.000	0.000
		N-35	(Hex)3 (HexNAc)2 (Fuc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2857.1	0.000	0.000	0.000
Complex		N-12†	(Hex)1 (HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	1851.7	0.011	0.011	0.022
		N-36	(HexNAc)1 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	1689.7	0.030	0.037	0.038
		N-37	(HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	1892.8	0.023	0.027	0.034
		N-38	(Hex)1 (HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2054.8	0.004	0.000	0.000
		N-39	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2216.9	0.004	0.000	0.000
		N-40	(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2037.8	0.007	0.010	0.011
		N-41	(Hex)1 (HexNAc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2240.9	0.000	0.000	0.000
		N-42	(Hex)1 (HexNAc)1 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2183.9	0.065	0.067	0.068
		N-43	(Hex)1 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2387.0	0.022	0.032	0.026
		N-44	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2374.9	0.000	0.000	0.000
		N-45	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2403.0	0.011	0.014	0.012
		N-46	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2[a2,3/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2707.1	0.000	0.000	0.000
		N-47	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2[a2,6/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2735.1	0.048	0.052	0.044
		N-48	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2549.0	0.064	0.075	0.055
		N-49	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)2[a2,3/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2853.2	0.153	0.160	0.118
		N-50	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)2[a2,6/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2881.2	0.601	0.491	0.489
		N-51	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2521.0	0.000	0.000	0.000
		N-52	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)1 (NeuAc)2[a2,3/a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2825.1	0.000	0.000	0.000
		N-53	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)1[a2,3] + (Man)3(GlcNAc)2	2740.1	0.000	0.000	0.000
		N-54	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)3[a2,3/a2,3/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	3376.4	0.022	0.022	0.000
		N-55	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)3[a2,3/a2,6/a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	3404.4	0.000	0.000	0.018
		N-56	(Hex)2 (HexNAc)2 (Fuc)2 (NeuAc)1[a2,6] + (Man)3(GlcNAc)2	2695.1	0.000	0.000	0.000

			GlcN			Man			GlcN+Man		
Class	Color*	No	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3
PM		N-1	0.017	0.019	0.011	0.032	0.012	0.035	0.026	0.035	0.000
		N-2	0.199	0.327	0.121	0.549	0.123	0.426	0.431	0.387	0.045
		N-3	0.011	0.017	0.015	0.030	0.012	0.018	0.025	0.033	0.005
		N-4	0.061	0.125	0.057	0.238	0.057	0.118	0.209	0.156	0.030
		N-5	0.009	0.019	0.016	0.025	0.013	0.012	0.021	0.025	0.007
HM		N-6	0.006	0.017	0.015	0.017	0.012	0.006	0.011	0.015	0.007
		N-7	0.113	0.212	0.186	0.300	0.231	0.147	0.195	0.254	0.132
		N-8	0.096	0.182	0.167	0.268	0.181	0.125	0.168	0.204	0.111
		N-9	0.155	0.271	0.254	0.468	0.289	0.257	0.269	0.312	0.169
		N-10	0.217	0.363	0.370	0.804	0.479	0.500	0.437	0.509	0.284
		N-11	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001
Hybrid		N-13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-14	0.007	0.013	0.033	0.017	0.017	0.000	0.010	0.000	0.017
		N-15	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-16	0.000	0.009	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-17	0.000	0.013	0.018	0.015	0.000	0.000	0.010	0.000	0.009
		N-18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-20	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000
		N-21	0.000	0.018	0.021	0.021	0.000	0.000	0.011	0.000	0.011
		N-22	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-23	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-24	0.016	0.031	0.034	0.032	0.029	0.025	0.024	0.038	0.025
		N-25	0.025	0.058	0.080	0.056	0.044	0.036	0.038	0.065	0.045
		N-26	0.008	0.014	0.024	0.022	0.000	0.000	0.016	0.000	0.015
		N-27	0.048	0.096	0.114	0.144	0.095	0.085	0.101	0.131	0.089
		N-28	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-29	0.020	0.042	0.059	0.024	0.018	0.021	0.023	0.000	0.020
		N-30	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-31	0.023	0.046	0.050	0.075	0.042	0.037	0.038	0.051	0.034
		N-32	0.010	0.017	0.023	0.024	0.000	0.020	0.015	0.019	0.013
		N-33	0.306	0.761	0.703	1.062	0.491	0.744	0.509	0.628	0.428
		N-34	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Complex		N-12†	0.000	0.009	0.000	0.016	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000
		N-36	0.011	0.020	0.045	0.037	0.029	0.000	0.000	0.052	0.022
		N-37	0.011	0.021	0.038	0.028	0.035	0.024	0.022	0.041	0.029
		N-38	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-39	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-40	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-41	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-42	0.016	0.034	0.049	0.033	0.026	0.027	0.027	0.043	0.029
		N-43	0.009	0.017	0.030	0.021	0.023	0.017	0.016	0.031	0.016
		N-44	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-45	0.000	0.010	0.000	0.015	0.000	0.000	0.008	0.000	0.010
		N-46	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-47	0.012	0.021	0.023	0.042	0.021	0.025	0.022	0.031	0.023
		N-48	0.021	0.047	0.052	0.049	0.028	0.035	0.035	0.057	0.035
		N-49	0.042	0.116	0.137	0.150	0.084	0.153	0.071	0.141	0.084
		N-50	0.136	0.395	0.364	0.503	0.212	0.390	0.340	0.418	0.307
		N-51	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-52	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-53	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-54	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.027	0.000	0.028	0.000
		N-55	0.007	0.000	0.000	0.022	0.013	0.000	0.000	0.024	0.000
		N-56	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

			Average				SD			
Class	Color*	No	Control	GlcN	Man	GlcN+Man	Control	GlcN	Man	GlcN+Man
PM		N-1	0.046	0.016	0.026	0.020	0.009	0.004	0.012	0.018
		N-2	0.682	0.216	0.366	0.288	0.154	0.104	0.220	0.211
		N-3	0.035	0.014	0.020	0.021	0.004	0.003	0.009	0.014
		N-4	0.210	0.081	0.138	0.132	0.062	0.038	0.092	0.092
		N-5	0.026	0.015	0.017	0.018	0.003	0.005	0.007	0.009
HM		N-6	0.013	0.013	0.012	0.011	0.001	0.005	0.006	0.004
		N-7	0.202	0.170	0.226	0.193	0.034	0.051	0.076	0.061
		N-8	0.165	0.148	0.191	0.161	0.028	0.046	0.072	0.047
		N-9	0.242	0.227	0.338	0.250	0.047	0.063	0.114	0.073
		N-10	0.377	0.317	0.594	0.410	0.070	0.086	0.182	0.115
		N-11	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001
Hybrid		N-13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-14	0.009	0.018	0.011	0.009	0.009	0.013	0.010	0.009
		N-15	0.002	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-16	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000
		N-17	0.010	0.010	0.005	0.006	0.002	0.009	0.000	0.005
		N-18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-20	0.005	0.000	0.000	0.002	0.005	0.000	0.000	0.000
		N-21	0.011	0.013	0.007	0.007	0.002	0.011	0.000	0.006
		N-22	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-23	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-24	0.034	0.027	0.029	0.029	0.001	0.010	0.003	0.008
		N-25	0.041	0.054	0.045	0.050	0.003	0.028	0.010	0.014
		N-26	0.014	0.015	0.007	0.010	0.003	0.008	0.000	0.009
		N-27	0.137	0.086	0.108	0.107	0.025	0.034	0.031	0.022
		N-28	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-29	0.021	0.041	0.021	0.014	0.003	0.020	0.003	0.012
		N-30	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-31	0.059	0.040	0.051	0.041	0.011	0.015	0.020	0.009
		N-32	0.016	0.017	0.015	0.016	0.002	0.007	0.013	0.003
		N-33	0.640	0.590	0.766	0.522	0.075	0.248	0.286	0.100
Complex		N-34	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-12†	0.015	0.003	0.005	0.004	0.006	0.000	0.000	0.000
		N-36	0.035	0.025	0.022	0.025	0.004	0.017	0.019	0.026
		N-37	0.028	0.023	0.029	0.031	0.006	0.013	0.006	0.010
		N-38	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-39	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-40	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-41	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-42	0.066	0.033	0.028	0.033	0.002	0.017	0.004	0.008
		N-43	0.027	0.019	0.021	0.021	0.005	0.011	0.003	0.009
		N-44	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-45	0.012	0.003	0.005	0.006	0.001	0.000	0.000	0.005
		N-46	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-47	0.048	0.019	0.029	0.025	0.004	0.006	0.011	0.005
		N-48	0.064	0.040	0.037	0.043	0.010	0.017	0.011	0.012
		N-49	0.144	0.098	0.129	0.099	0.023	0.050	0.039	0.037
		N-50	0.527	0.298	0.368	0.355	0.064	0.142	0.147	0.057
		N-51	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-52	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-53	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		N-54	0.015	0.000	0.009	0.009	0.013	0.000	0.000	0.000
		N-55	0.006	0.002	0.012	0.008	0.000	0.000	0.011	0.000
		N-56	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Class	Color*	No	Student's <i>t</i> -test <i>p</i> -value		Dunnett's test <i>p</i> -value		
			Control vs GlcN	Control vs GlcN+Man	Control vs GlcN	Control vs Man	Control vs GlcN+Man
PM		N-1	0.0060	0.0879	0.0354	0.1688	0.0684
		N-2	0.0122	0.0593	0.0313	0.1432	0.0646
		N-3	0.0026	0.1825	0.0545	0.1817	0.2107
		N-4	0.0375	0.2864	0.1531	0.5276	0.4695
		N-5	0.0270	0.2176	0.1524	0.2632	0.3413
HM		N-6	0.7874	0.3743	0.9884	0.9176	0.8324
		N-7	0.4254	0.8491	0.8442	0.9142	0.9960
		N-8	0.6123	0.8951	0.9532	0.8633	0.9990
		N-9	0.7546	0.8853	0.9902	0.3627	0.9986
		N-10	0.4003	0.6925	0.8730	0.1370	0.9739
		N-11	0.1816	0.8309	0.6813	0.9985	0.9954
Hybrid		N-13	ND	ND	ND	ND	ND
		N-14	0.4213	0.9901	0.6539	0.9908	1.0000
		N-15	0.8177	0.3739	0.9707	0.7616	0.7616
		N-16	0.1446	ND	0.0805	1.0000	1.0000
		N-17	0.9934	0.2911	1.0000	0.7068	0.8264
		N-18	ND	ND	ND	ND	ND
		N-19	ND	ND	ND	ND	ND
		N-20	0.1801	0.4024	0.1809	0.1809	0.4520
		N-21	0.8477	0.3369	0.9953	0.8809	0.8930
		N-22	ND	ND	ND	ND	ND
		N-23	ND	ND	ND	ND	ND
		N-24	0.2658	0.3750	0.4275	0.6599	0.7276
		N-25	0.4423	0.3442	0.6320	0.9695	0.8446
		N-26	0.7725	0.5748	0.9926	0.7189	0.9371
		N-27	0.1059	0.1994	0.1400	0.5036	0.4825
		N-28	ND	ND	ND	ND	ND
		N-29	0.1556	0.4417	0.1633	0.9999	0.8502
		N-30	0.3739	0.3739	0.4044	0.4044	0.4044
		N-31	0.1426	0.0873	0.2923	0.8365	0.3303
		N-32	0.8932	0.8201	0.9994	0.9913	0.9994
		N-33	0.7554	0.1767	0.9795	0.7851	0.8112
		N-34	ND	ND	ND	ND	ND
		N-35	ND	ND	ND	ND	ND
Complex		N-12†	0.0692	0.1147	0.1679	0.2765	0.2104
		N-36	0.3873	0.5246	0.8484	0.7228	0.8250
		N-37	0.5945	0.7301	0.8544	0.9996	0.9772
		N-38	0.3739	0.3739	0.4044	0.4044	0.4044
		N-39	0.3739	0.3739	0.4044	0.4044	0.4044
		N-40	0.0024	0.0024	0.0000	0.0000	0.0000
		N-41	ND	ND	ND	ND	ND
		N-42	0.0265	0.0025	0.0071	0.0033	0.0068
		N-43	0.3105	0.3703	0.4603	0.6439	0.6652
		N-44	ND	ND	ND	ND	ND
		N-45	0.0653	0.1226	0.2331	0.3612	0.4709
		N-46	ND	ND	ND	ND	ND
		N-47	0.0020	0.0031	0.0023	0.0289	0.0103
		N-48	0.0979	0.0787	0.1120	0.0767	0.1621
		N-49	0.2278	0.1490	0.3920	0.9367	0.3985
		N-50	0.0637	0.0255	0.0843	0.2587	0.2109
		N-51	ND	ND	ND	ND	ND
		N-52	ND	ND	ND	ND	ND
		N-53	ND	ND	ND	ND	ND
		N-54	0.1161	0.6712	0.4095	0.8995	0.9158
		N-55	0.5904	0.8641	0.9431	0.8528	0.9928
		N-56	ND	ND	ND	ND	ND

$p < 0.05$

表 4. 単糖を添加した細胞における *N*-結合型糖鎖の構造と相対量

*; 図 24B のグラフ凡例のカラー表。†; 本研究では N-12 をコンプレックス型として集計。

ND; 未同定

8. 参考文献

- [1] Z. Yu, T.G. Pestell, M.P. Lisanti, R.G. Pestell, Cancer stem cells, *Int J Biochem Cell Biol* 44(12) (2012) 2144-51.
- [2] J.M. Rosen, C.T. Jordan, The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm, *Science* 324(5935) (2009) 1670-3.
- [3] M. Al-Hajj, M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S.J. Morrison, M.F. Clarke, Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7) (2003) 3983-8.
- [4] G. Manic, A. Sistigu, F. Corradi, M. Musella, R. De Maria, I. Vitale, Replication stress response in cancer stem cells as a target for chemotherapy, *Semin Cancer Biol* 53 (2018) 31-41.
- [5] Y. Daniel, E. Lelou, C. Aninat, A. Corlu, F. Cabillic, Interplay between Metabolism Reprogramming and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Stem Cells, *Cancers (Basel)* 13(8) (2021).
- [6] P. Sancho, D. Barneda, C. Heeschen, Hallmarks of cancer stem cell metabolism, *Br J Cancer* 114(12) (2016) 1305-12.
- [7] E. Lee, J. Yang, M. Ku, N.H. Kim, Y. Park, C.B. Park, J.S. Suh, E.S. Park, J.I. Yook, G.B. Mills, Y.M. Huh, J.H. Cheong, Metabolic stress induces a Wnt-dependent cancer stem cell-like state transition, *Cell Death Dis* 6(7) (2015) e1805.
- [8] A.F. Nardy, L. Freire-de-Lima, C.G. Freire-de-Lima, A. Morrot, The sweet side of immune evasion: role of glycans in the mechanisms of cancer progression, *Front Oncol* 6 (2016) 54.
- [9] N. Very, T. Lefebvre, I. El Yazidi-Belkoura, Drug resistance related to aberrant glycosylation in colorectal cancer, *Oncotarget* 9(1) (2018) 1380-1402.
- [10] N. Taniguchi, Y. Kizuka, Glycans and cancer: role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics, *Adv Cancer Res* 126 (2015) 11-51.
- [11] T. Khan, H. Cabral, Abnormal glycosylation of cancer stem cells and targeting strategies, *Front Oncol* 11 (2021) 649338.
- [12] M.R. Walker, H.L. Goel, D. Mukhopadhyay, P. Chhoy, E.R. Karner, J.L. Clark, H. Liu, R. Li, J.L. Zhu, S. Chen, L.K. Mahal, B.A. Bensing, A.M. Mercurio, O-linked α 2,3 sialylation defines stem cell populations in breast cancer, *Sci Adv* 8(1) (2022) eabj9513.
- [13] M.J. Schultz, A.T. Holdbrooks, A. Chakraborty, W.E. Grizzle, C.N. Landen, D.J. Buchsbaum, M.G. Conner, R.C. Arend, K.J. Yoon, C.A. Klug, D.C. Bullard, R.A. Kesterson, P.G. Oliver, A.K. O'Connor, B.K. Yoder, S.L. Bellis, The tumor-associated glycosyltransferase ST6Gal-I regulates stem cell transcription factors and confers a cancer

stem cell phenotype, *Cancer Res* 76(13) (2016) 3978-88.

[14] A. Buffone, V.M. Weaver, Don't sugarcoat it: How glycocalyx composition influences cancer progression, *J Cell Biol* 219(1) (2020).

[15] H. Fernandes, S. Cohen, S. Bishayee, Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/DeltaEGFR) expressed in cancer cells, *J Biol Chem* 276(7) (2001) 5375-83.

[16] T. Tsuda, Y. Ikeda, N. Taniguchi, The Asn-420-linked sugar chain in human epidermal growth factor receptor suppresses ligand-independent spontaneous oligomerization. Possible role of a specific sugar chain in controllable receptor activation, *J Biol Chem* 275(29) (2000) 21988-94.

[17] K. Kaszuba, M. Grzybek, A. Orłowski, R. Danne, T. Róg, K. Simons, Ü. Coskun, I. Vattulainen, N-Glycosylation as determinant of epidermal growth factor receptor conformation in membranes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(14) (2015) 4334-9.

[18] H. Guo, T. Nagy, M. Pierce, Post-translational glycoprotein modifications regulate colon cancer stem cells and colon adenoma progression in *Apc(min/+)* mice through altered Wnt receptor signaling, *J Biol Chem* 289(45) (2014) 31534-49.

[19] N.M. Akella, G. Le Minh, L. Ciraku, A. Mukherjee, Z.A. Bacigalupa, D. Mukhopadhyay, V.L. Sodi, M.J. Reginato, O-GlcNAc Transferase Regulates Cancer Stem-like Potential of Breast Cancer Cells, *Mol Cancer Res* 18(4) (2020) 585-598.

[20] C. Chokchaitaweessuk, T. Kobayashi, T. Izumikawa, N. Itano, Enhanced hexosamine metabolism drives metabolic and signaling networks involving hyaluronan production and O-GlcNAcylation to exacerbate breast cancer, *Cell Death Dis* 10(11) (2019) 803.

[21] M. Aebi, N-linked protein glycosylation in the ER, *Biochim Biophys Acta* 1833(11) (2013) 2430-7.

[22] P. Stanley, K.W. Moremen, N.E. Lewis, N. Taniguchi, M. Aebi, N-Glycans, in: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, R.L. Schnaar, P.H. Seeberger (Eds.), *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press Copyright © 2022 The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California; published by Cold Spring Harbor Laboratory Press; doi:10.1101/glycobiology.4e.9. All rights reserved., Cold Spring Harbor (NY), 2022, pp. 103-16.

[23] N. Itano, T. Sawai, O. Miyaishi, K. Kimata, Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells, *Cancer Res* 59(10) (1999) 2499-504.

[24] T. Kobayashi, T. Chanmee, N. Itano, Hyaluronan: Metabolism and Function,

Biomolecules 10(11) (2020).

- [25] K. Ropponen, M. Tammi, J. Parkkinen, M. Eskelinen, R. Tammi, P. Lipponen, U. Agren, E. Alhava, V.M. Kosma, Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer, *Cancer Res* 58(2) (1998) 342-7.
- [26] M.A. Anttila, R.H. Tammi, M.I. Tammi, K.J. Syrjänen, S.V. Saarikoski, V.M. Kosma, High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer, *Cancer Res* 60(1) (2000) 150-5.
- [27] P. Auvinen, R. Tammi, J. Parkkinen, M. Tammi, U. Agren, R. Johansson, P. Hirvikoski, M. Eskelinen, V.M. Kosma, Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival, *Am J Pathol* 156(2) (2000) 529-36.
- [28] P. Heldin, C.Y. Lin, C. Kolliopoulos, Y.H. Chen, S.S. Skandalis, Regulation of hyaluronan biosynthesis and clinical impact of excessive hyaluronan production, *Matrix Biol* 78-79 (2019) 100-117.
- [29] T. Chanmee, P. Ontong, T. Izumikawa, M. Higashide, N. Mochizuki, C. Chokchaitaweek, M. Khansai, K. Nakajima, I. Kakizaki, P. Kongtawelert, N. Taniguchi, N. Itano, Hyaluronan production regulates metabolic and cancer stem-like properties of breast cancer cells via hexosamine biosynthetic pathway-coupled HIF-1 signaling, *J Biol Chem* 291(46) (2016) 24105-24120.
- [30] N. Itano, L. Zhuo, K. Kimata, Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression, *Cancer Sci* 99(9) (2008) 1720-5.
- [31] N. Itano, K. Kimata, Altered hyaluronan biosynthesis in cancer progression, *Semin Cancer Biol* 18(4) (2008) 268-74.
- [32] T. Chanmee, P. Ontong, N. Mochizuki, P. Kongtawelert, K. Konno, N. Itano, Excessive hyaluronan production promotes acquisition of cancer stem cell signatures through the coordinated regulation of Twist and the transforming growth factor β (TGF- β)-Snail signaling axis, *J Biol Chem* 289(38) (2014) 26038-26056.
- [33] N. Itano, T. Sawai, M. Yoshida, P. Lenas, Y. Yamada, M. Imagawa, T. Shinomura, M. Hamaguchi, Y. Yoshida, Y. Ohnuki, S. Miyauchi, A.P. Spicer, J.A. McDonald, K. Kimata, Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties, *J Biol Chem* 274(35) (1999) 25085-92.
- [34] M.G. Buse, Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290(1) (2006) E1-e8.
- [35] R.M. de Queiroz, E. Carvalho, W.B. Dias, O-GlcNAcylation: The Sweet Side of the Cancer, *Front Oncol* 4 (2014) 132.
- [36] Y. Fardini, V. Dehennaut, T. Lefebvre, T. Issad, O-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark?, *Front Endocrinol (Lausanne)* 4 (2013) 99.

- [37] K. Sasai, Y. Ikeda, T. Fujii, T. Tsuda, N. Taniguchi, UDP-GlcNAc concentration is an important factor in the biosynthesis of beta1,6-branched oligosaccharides: regulation based on the kinetic properties of N-acetylglucosaminyltransferase V, *Glycobiology* 12(2) (2002) 119-27.
- [38] K.S. Lau, E.A. Partridge, A. Grigorian, C.I. Silvescu, V.N. Reinhold, M. Demetriou, J.W. Dennis, Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation, *Cell* 129(1) (2007) 123-34.
- [39] H. Koyama, T. Hibi, Z. Isogai, M. Yoneda, M. Fujimori, J. Amano, M. Kawakubo, R. Kannagi, K. Kimata, S. Taniguchi, N. Itano, Hyperproduction of hyaluronan in neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: possible involvement of versican/PG-M, *Am J Pathol* 170(3) (2007) 1086-99.
- [40] H. Koyama, N. Kobayashi, M. Harada, M. Takeoka, Y. Kawai, K. Sano, M. Fujimori, J. Amano, T. Ohhashi, R. Kannagi, K. Kimata, S. Taniguchi, N. Itano, Significance of tumor-associated stroma in promotion of intratumoral lymphangiogenesis: pivotal role of a hyaluronan-rich tumor microenvironment, *Am J Pathol* 172(1) (2008) 179-93.
- [41] N. Fujitani, J. Furukawa, K. Araki, T. Fujioka, Y. Takegawa, J. Piao, T. Nishioka, T. Tamura, T. Nikaido, M. Ito, Y. Nakamura, Y. Shinohara, Total cellular glycomics allows characterizing cells and streamlining the discovery process for cellular biomarkers, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(6) (2013) 2105-10.
- [42] Y. Kita, Y. Miura, J. Furukawa, M. Nakano, Y. Shinohara, M. Ohno, A. Takimoto, S. Nishimura, Quantitative glycomics of human whole serum glycoproteins based on the standardized protocol for liberating N-glycans, *Mol Cell Proteomics* 6(8) (2007) 1437-45.
- [43] J. Furukawa, Y. Shinohara, H. Kuramoto, Y. Miura, H. Shimaoka, M. Kuroguchi, M. Nakano, S. Nishimura, Comprehensive approach to structural and functional glycomics based on chemoselective glycoblotting and sequential tag conversion, *Anal Chem* 80(4) (2008) 1094-101.
- [44] H. Hanamatsu, T. Nishikaze, N. Miura, J. Piao, K. Okada, S. Sekiya, S. Iwamoto, N. Sakamoto, K. Tanaka, J.I. Furukawa, Sialic acid linkage specific derivatization of glycosphingolipid glycans by ring-opening aminolysis of lactones, *Anal Chem* 90(22) (2018) 13193-13199.
- [45] K. Nakajima, S. Kitazume, T. Angata, R. Fujinawa, K. Ohtsubo, E. Miyoshi, N. Taniguchi, Simultaneous determination of nucleotide sugars with ion-pair reversed-phase HPLC, *Glycobiology* 20(7) (2010) 865-71.
- [46] Y. Harada, K. Nakajima, Y. Masahara-Negishi, H.H. Freeze, T. Angata, N. Taniguchi, T. Suzuki, Metabolically programmed quality control system for dolichol-linked oligosaccharides, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(48) (2013) 19366-71.

- [47] A. Massarweh, M. Bosco, S. Iatmanen-Harbi, C. Tessier, L. Amana, P. Busca, I. Chantret, C. Gravier-Pelletier, S.E. Moore, Brefeldin A promotes the appearance of oligosaccharyl phosphates derived from Glc3Man9GlcNAc2-PP-dolichol within the endomembrane system of HepG2 cells, *J Lipid Res* 57(8) (2016) 1477-91.
- [48] Y. Harada, K. Nakajima, S. Li, T. Suzuki, N. Taniguchi, Protocol for analyzing the biosynthesis and degradation of N-glycan precursors in mammalian cells, *STAR Protoc* 2(1) (2021) 100316.
- [49] A. Ceroni, K. Maass, H. Geyer, R. Geyer, A. Dell, S.M. Haslam, GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans, *J Proteome Res* 7(4) (2008) 1650-9.
- [50] P.J. Cock, C.J. Fields, N. Goto, M.L. Heuer, P.M. Rice, The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants, *Nucleic Acids Res* 38(6) (2010) 1767-71.
- [51] A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics* 30(15) (2014) 2114-20.
- [52] C. Prieto, D. Barrios, RaNA-Seq: Interactive RNA-Seq analysis from FASTQ files to functional analysis, *Bioinformatics* (2019).
- [53] S.X. Ge, E.W. Son, R. Yao, iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data, *BMC Bioinformatics* 19(1) (2018) 534.
- [54] A. Subramanian, P. Tamayo, V.K. Mootha, S. Mukherjee, B.L. Ebert, M.A. Gillette, A. Paulovich, S.L. Pomeroy, T.R. Golub, E.S. Lander, J.P. Mesirov, Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(43) (2005) 15545-50.
- [55] V.K. Mootha, C.M. Lindgren, K.F. Eriksson, A. Subramanian, S. Sihag, J. Lehar, P. Puigserver, E. Carlsson, M. Ridderstråle, E. Laurila, N. Houstis, M.J. Daly, N. Patterson, J.P. Mesirov, T.R. Golub, P. Tamayo, B. Spiegelman, E.S. Lander, J.N. Hirschhorn, D. Altshuler, L.C. Groop, PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes, *Nat Genet* 34(3) (2003) 267-73.
- [56] A. Ahadova, J. Gebert, M. von Knebel Doeberitz, J. Kopitz, M. Kloor, Dose-dependent effect of 2-deoxy-D-glucose on glycoprotein mannosylation in cancer cells, *IUBMB Life* 67(3) (2015) 218-26.
- [57] C. Ma, H.Y. Tsai, Q. Zhang, L. Senavirathna, L. Li, L.S. Chin, R. Chen, S. Pan, An Integrated Proteomic and Glycoproteomic Investigation Reveals Alterations in the N-Glycoproteomic Network Induced by 2-Deoxy-D-Glucose in Colorectal Cancer Cells, *Int J Mol Sci* 23(15) (2022).
- [58] M. Xiu, Y. Wang, B. Li, X. Wang, F. Xiao, S. Chen, L. Zhang, B. Zhou, F. Hua, The role

of Notch3 signaling in cancer stemness and chemoresistance: molecular mechanisms and targeting strategies, *Front Mol Biosci* 8 (2021) 694141.

[59] Q. Zhang, C. Lu, T. Fang, Y. Wang, W. Hu, J. Qiao, B. Liu, J. Liu, N. Chen, M. Li, R. Zhu, Notch3 functions as a regulator of cell self-renewal by interacting with the β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma, *Oncotarget* 6(6) (2015) 3669-79.

[60] M.J. Kim, A.R. Kim, J.Y. Jeong, K.I. Kim, T.H. Kim, C. Lee, K. Chung, Y.H. Ko, H.J. An, Correlation of ALDH1 and Notch3 Expression: Clinical implication in Ovarian Carcinomas, *J Cancer* 8(16) (2017) 3331-3342.

[61] C.H. Fang, Y.T. Lin, C.M. Liang, S.M. Liang, A novel c-Kit/phospho-prohibitin axis enhances ovarian cancer stemness and chemoresistance via Notch3-PBX1 and β -catenin-ABCG2 signaling, *J Biomed Sci* 27(1) (2020) 42.

[62] R. Hosea, N.S. Hardiany, O. Ohneda, S.I. Wanandi, Glucosamine decreases the stemness of human ALDH(+) breast cancer stem cells by inactivating STAT3, *Oncol Lett* 16(4) (2018) 4737-4744.

[63] A.A. Dayem, H.Y. Choi, J.H. Kim, S.G. Cho, Role of oxidative stress in stem, cancer, and cancer stem cells, *Cancers (Basel)* 2(2) (2010) 859-84.

[64] C. Magaway, E. Kim, E. Jacinto, Targeting mTOR and Metabolism in Cancer: Lessons and Innovations, *Cells* 8(12) (2019).

[65] A. Louvi, S. Artavanis-Tsakonas, Notch signalling in vertebrate neural development, *Nat Rev Neurosci* 7(2) (2006) 93-102.

[66] S.J. Bray, Notch signalling: a simple pathway becomes complex, *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(9) (2006) 678-89.

[67] R. Kopan, M.X. Ilagan, The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism, *Cell* 137(2) (2009) 216-33.

[68] T.P. Dang, A.F. Gazdar, A.K. Virmani, T. Sepetavec, K.R. Hande, J.D. Minna, J.R. Roberts, D.P. Carbone, Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer, *J Natl Cancer Inst* 92(16) (2000) 1355-7.

[69] A. Pannuti, K. Foreman, P. Rizzo, C. Osipo, T. Golde, B. Osborne, L. Miele, Targeting Notch to target cancer stem cells, *Clin Cancer Res* 16(12) (2010) 3141-52.

[70] S.M. McAuliffe, S.L. Morgan, G.A. Wyant, L.T. Tran, K.W. Muto, Y.S. Chen, K.T. Chin, J.C. Partridge, B.B. Poole, K.H. Cheng, J. Daggett, Jr., K. Cullen, E. Kantoff, K. Hasselbatt, J. Berkowitz, M.G. Muto, R.S. Berkowitz, J.C. Aster, U.A. Matulonis, D.M. Dinulescu, Targeting Notch, a key pathway for ovarian cancer stem cells, sensitizes tumors to platinum therapy, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(43) (2012) E2939-48.

[71] K.S. Papadakos, M. Bartoschek, C. Rodriguez, C. Gialeli, S.B. Jin, U. Lendahl, K. Pietras, A.M. Blom, Cartilage Oligomeric Matrix Protein initiates cancer stem cells through activation

of Jagged1-Notch3 signaling, *Matrix Biol* 81 (2019) 107-121.

[72] I.V. Ulasov, O. Mijanovic, S. Savchuk, E. Gonzalez-Buendia, A. Sonabend, T. Xiao, P. Timashev, M.S. Lesniak, TMZ regulates GBM stemness via MMP14-DLL4-Notch3 pathway, *Int J Cancer* 146(8) (2020) 2218-2228.

[73] Y. Meng, S. Sanlidag, S.A. Jensen, S.A. Burnap, W.B. Struwe, A.H. Larsen, X. Feng, S. Mittal, M.S.P. Sansom, C. Sahlgren, P.A. Handford, An N-glycan on the C2 domain of JAGGED1 is important for Notch activation, *Sci Signal* 15(755) (2022) eabo3507.

[74] E. Corcoran, A. Olayinka, M. di Luca, Y. Gusti, R. Hakimjavadi, B. O'Connor, E.M. Redmond, P.A. Cahill, N-Glycans on the extracellular domain of the Notch1 receptor control Jagged-1 induced Notch signalling and myogenic differentiation of S100 β resident vascular stem cells, *bioRxiv* (2023).

[75] K. Stavenhagen, L.C. Laan, C. Gao, A.Y. Mehta, J. Heimbürg-Molinaro, J.N. Glickman, I. van Die, R.D. Cummings, Tumor cells express pauci- and oligomannosidic N-glycans in glycoproteins recognized by the mannose receptor (CD206), *Cell Mol Life Sci* 78(14) (2021) 5569-5585.

[76] H. Leijon, T. Kaprio, A. Heiskanen, T. Satomaa, J.O. Hiltunen, M.M. Miettinen, J. Arola, C. Haglund, N-Glycomic profiling of pheochromocytomas and paragangliomas separates metastatic and nonmetastatic disease, *J Clin Endocrinol Metab* 102(11) (2017) 3990-4000.

[77] P.M. Angel, R.R. Drake, Y. Park, C.L. Clift, C. West, S. Berkhiser, G. Hardiman, A.S. Mehta, D.P. Bichell, Y.R. Su, Spatial N-glycomics of the human aortic valve in development and pediatric endstage congenital aortic valve stenosis, *J Mol Cell Cardiol* 154 (2021) 6-20.

[78] B. Zipser, D. Bello-DeOcampo, S. Diestel, M.-H. Tai, B. Schmitz, Mannitou Monoclonal Antibody Uniquely Recognizes Paucimannose, a Marker for Human Cancer, Stemness, and Inflammation, *J Carbohydr Chem* 31(4-6) (2012) 504-18.

[79] C.I. Balog, K. Stavenhagen, W.L. Fung, C.A. Koeleman, L.A. McDonnell, A. Verhoeven, W.E. Mesker, R.A. Tollenaar, A.M. Deelder, M. Wuhler, N-glycosylation of colorectal cancer tissues: a liquid chromatography and mass spectrometry-based investigation, *Mol Cell Proteomics* 11(9) (2012) 571-85.

[80] A.C. Dahmen, M.T. Fergen, C. Laurini, B. Schmitz, I. Loke, M. Thaysen-Andersen, S. Diestel, Paucimannosidic glycoepitopes are functionally involved in proliferation of neural progenitor cells in the subventricular zone, *Glycobiology* 25(8) (2015) 869-80.

[81] S. Ninagawa, T. Okada, Y. Sumitomo, Y. Kamiya, K. Kato, S. Horimoto, T. Ishikawa, S. Takeda, T. Sakuma, T. Yamamoto, K. Mori, EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step, *J Cell Biol* 206(3) (2014) 347-56.

[82] M. Nakano, S.K. Mishra, Y. Tokoro, K. Sato, K. Nakajima, Y. Yamaguchi, N. Taniguchi, Y. Kizuka, Bisecting GlcNAc is a general suppressor of terminal modification of N-glycan,

Mol Cell Proteomics 18(10) (2019) 2044-2057.

[83] J. Lu, T. Isaji, S. Im, T. Fukuda, A. Kameyama, J. Gu, Expression of N-acetylglucosaminyltransferase III suppresses α 2,3-sialylation, and its distinctive functions in cell migration are attributed to α 2,6-sialylation levels, J Biol Chem 291(11) (2016) 5708-5720.

9. 論文目録

本論文中に示した研究成果については、

Tolerable glycometabolic stress boosts cancer cell resilience through altered *N*-glycosylation and Notch signaling activation

Shungo Iwamoto*, Takashi Kobayashi*, Hisatoshi Hanamatsu*, Ikuko Yokota, Yukiko Teranishi, Akiho Iwamoto, Miyu Kitagawa, Sawako Ashida, Ayane Sakurai, Suguru Matsuo, Yuma Myokan, Aiyu Sugimoto, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata, Noriko Gotoh, Kazuki Nakajima, Takashi Nishikaze, Jun-ichi Furukawa, and Naoki Itano

*共同筆頭著者

Cell Death Dis. 2024, 15(1):53

に発表した。

10. 謝辞

本研究を遂行するに当たり、終始ご懇意なるご指導とご鞭撻を承りました恩師京都産業大学 生命科学部 板野 直樹教授に深甚な謝意を表します。

加えて、手厚いご指導やご助言をいただきました愛知医科大学 医学部 小林 孝助教をはじめ、MALDI-TOF MS 分析にご協力いただいた名古屋大学 糖鎖生命コア研究所 古川 潤一博士および花松 久寿博士、LLO 解析のプロトコルを提供いただいた原田 陽一郎博士に衷心より感謝するとともに、本研究にご協力いただいた当研究室の卒業生、学部生、大学院生等の皆様方に深く感謝いたします。

また、本論文を査読いただきました京都産業大学 生命科学部 加藤教授、潮田准教授に深く御礼申し上げます。