

癌組織微小環境における  
MUC1 とレクチンの相互作用による  
腫瘍悪性化機構の解析

谷田 周平

## 目次

1: 序論	1
2: Galectin-3 の MUC1 結合部位の同定と結合に伴う $\beta$ -catenin のリクルート	6
2-1: 材料と方法	6
2-1-1: 細胞の培養	6
2-1-2: FACS	6
2-1-3: 細胞溶解液の調製	6
2-1-4: イムノブロットイング	6
2-1-5: 免疫染色	7
2-1-6: 細胞表面のビオチン化	7
2-1-7: 免疫沈降	7
2-1-8: N-glycanase 処理	8
2-1-9: O-glycanase 処理	8
2-1-10: O-glycanase と neuraminidase 処理	8
2-1-11: MUC1-ND, -CD の分離	8
2-1-12: Galectin-3 と細胞表面分子の架橋	9
2-1-13: Galectin-3 による細胞の刺激と $\beta$ -catenin のリクルート	9
2-2: 結果	10
2-2-1: 3T3/MUC1 細胞における MUC1 と Galectin-3 の発現	10
2-2-2: 細胞表面の MUC1 と Galectin-3 の局在	10
2-2-3: 3T3/MUC1 および 3T3/mock 細胞表面上の Galectin-3 の比較	10
2-2-4: Galectin-3 の MUC1-ND への結合	10
2-2-5: MUC1 発現細胞への Galectin-3 の結合に伴う MUC1-CD への $\beta$ -catenin のリクルート	12
2-3: 考察	14
3: Siglec-9 の MUC1 への結合に伴うシグナル伝達	17
3-1: 材料と方法	17
3-1-1: 細胞の培養	17
3-1-2: 細胞溶解液の調製	17
3-1-3: イムノブロットイング	17
3-1-4: Siglec 結合糖タンパク質の解析	18
3-1-5: プレートアッセイ	18

3-1-6: 免疫組織染色	18
3-1-7: $\beta$ -catenin の免疫染色	18
3-1-8: FACS	19
3-1-9: 可溶性 Siglec-9 および増殖因子による細胞の刺激	19
3-1-10: 免疫沈降	20
3-1-11: 可溶性 Siglec-9 の 3T3/MUC1 細胞への結合に伴う $\beta$ -catenin のリクルート	20
3-1-12: 3T3/MUC1 および HCT116/MUC1 細胞と HEK293/Siglec-9 細胞の共培養に伴う $\beta$ -catenin のリクルート	20
3-1-13: 細胞の neuraminidase 処理	20
3-1-14: 細胞質および核画分の分離	20
3-1-15: 増殖・生存能の測定	20
3-2: 結果	22
3-2-1: MUC1 と Siglec-9 の結合	22
3-2-2: ヒト癌組織における Siglec-9 発現細胞の分布	22
3-2-3: MUC1-Siglec-9 シグナル伝達における成長因子の関与の有無	22
3-2-4: 可溶性 Siglec-9 の MUC1 への結合による MUC1-CD への $\beta$ -catenin のリクルート	23
3-2-5: Siglec-9 発現細胞と MUC1 発現細胞の細胞間相互作用に伴う MUC1-CD への $\beta$ -catenin のリクルート	24
3-2-6: Siglec-9 の結合によるリン酸化 $\beta$ -catenin の減少と $\beta$ -catenin の核移行の亢進	25
3-3: 考察	27
4: 結論	30
5: 謝辞	31
6: 引用文献	32

## 1. 序論

中腔器官や腺を覆う粘膜上皮細胞は、膜結合型および分泌型の Mucin を産生し、内腔面の潤滑や保護作用を担うとともに病原菌や共生微生物とも相互作用する。当研究室では、上皮性悪性腫瘍において発現される Mucin の生物学的意義について研究してきた。Mucin は、一定のアミノ酸配列のユニットのくり返し構造であるタンデムリピートをコアタンパク質にもつ巨大な糖タンパク質である。コアタンパク質の遺伝子は 20 数種類報告されており、膜結合型 Mucin と分泌型 Mucin に二分される。タンデムリピート中のアミノ酸にはセリン、スレオニン残基が多く含まれ、O-グリコシル型糖鎖が多く結合している [1,2]。上皮性悪性腫瘍細胞では、シアリル Tn ( Sia  $\alpha$ 2-6 GalNAc-Ser/Thr ) 抗原のような正常細胞においては見られない異常な O-グリコシド型糖鎖が生合成され [3]、いわゆる癌関連糖鎖抗原と呼ばれる。癌関連糖鎖抗原の中には、TF ( Gal  $\beta$ 1-3 GalNAc-Ser/Thr ), Tn ( GalNAc-Ser/Thr ) 抗原のような生合成の中間体も含まれる。また、癌化に伴う細胞の極性の消失により、それらの異常な Mucin は癌組織全体に分布し、血中にも流出する。実際、癌細胞の産生するムチンが癌患者血清中に検出され、癌の診断マーカーとして用いられている。さらに、血液中の Mucin 濃度が高い癌患者は 5 年生存率が低いことが報告されている [4]。

当研究室では、ヒト結腸癌由来細胞株 LS180 細胞や SW1116 細胞を免疫原としてマウスを免疫し、癌関連糖鎖抗原を認識するモノクローナル抗体を 3 種類(MLS128, MLS132, MSW113)作製し、これらのエピトープは、順に GalNAc-Ser/Thr ( Tn 抗原)のクラスター構造、NeuAc  $\alpha$ 2-6 GalNAc-Ser/Thr (シアリル Tn 抗原)のクラスター構造、NeuAc  $\alpha$ 2-3 Gal  $\beta$ 1-3 (Fuc  $\alpha$ 1-4) GlcNAc (シアリルルイス a 抗原)であることを明らかにした [5-9]。Mucin の生物学的機能にも注目し、分泌型 Mucin のマクロファージに対する影響を検討する過程で、Mucin が Scavenger receptor に結合することを見出した。すなわち、LS180 細胞の産生する Mucin が Scavenger receptor を介してマクロファージを活性化し、その結果として、Cyclooxygenase-2 ( COX-2 )が誘導され、Prostaglandin E<sub>2</sub> ( PGE<sub>2</sub> ) の産生が亢進することを示した[10-14]。COX-2 の誘導に伴い過剰産生された PGE<sub>2</sub> は、Bcl-2 発現の亢進 [15,16]、免疫機能の抑制 [17]、腫瘍血管新生の促進 [18,19] などの様々な生物学的機能を発揮することが報告されている。さらに、分泌型 Mucin と樹状細胞上の Sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins ( Siglec )-3 の相互作用によって樹状細胞のアポトーシスが誘導されること [20]、さらには、分泌型 Mucin と Siglec-9 の相互作用によって樹状細胞より Th-2 誘導型のサイトカインが産生されることを示した [21]。また、担癌マウスの血流中の Mucin が脾臓マージナルゾーン B 細胞上の Siglec-2 に結合し、同細胞の消失を

もたらすことを明らかにした[22,23]。

このように癌細胞の産生する Mucin が、癌の増殖、進展に有利な環境づくりにおいて重要な役割を担っていることが考えられる。さらに、一般的に膜結合型 Mucin についても、より悪性度の高い細胞において発現が亢進することが知られており、シグナル伝達等の生物学的機能が注目されている。代表的な膜結合型 Mucin であり、上皮組織に最も普遍的に分布している MUC1 を対象として、MUC1 による腫瘍悪性化に関するシグナル伝達を中心とした研究を行った。

MUC1 は、乳腺、肺、前立腺、消化管などの上皮性の癌に広範囲に高発現している [24]。MUC1 は、正常上皮細胞においては、アピカル側に存在するが、細胞が癌化すると細胞極性が失われ、細胞膜全体に発現するようになる [25]。MUC1 は、一本のポリペプチド鎖として翻訳されるが、細胞膜への輸送時の小胞体において、Sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin (SEA) ドメインの自己切断により 2 つのサブユニットに切断されるが、疎水性の相互作用によって安定なヘテロ二量体として細胞膜に輸送される [26-28]。この 2 つのサブユニットは、細胞膜外ドメインである N 末端ドメイン (MUC1-ND) 及び、58 アミノ酸からなる短い細胞外ドメイン、28 アミノ酸からなる膜貫通ドメインと 72 アミノ酸からなる細胞質内ドメインを含む C 末端ドメイン (MUC1-CD) で構成される [29]。MUC1-ND は、20 アミノ酸のくり返し配列であるタンデムリピートを含み [30,31]、その中に多く存在するセリン、スレオニン残基が O-グリコシル化されている。また、細胞表面に発現した後に切断された MUC1-ND も血中などに見いだされる。細胞質内ドメインには、セリンリッチモチーフ [32] に加えて、計 7 つのチロシン残基が存在し、上皮成長因子受容体(EGFR) [33]、c-Src [34]、Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) [35]、c-Abl [36]、Protein kinase C- $\delta$  (PKC $\delta$ ) [37]、血小板由来成長因子受容体- $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ) [38]、繊維芽細胞成長因子受容体-3 (FGFR-3) [39] などのキナーゼにより、チロシン、セリン、スレオニン残基がリン酸化を受ける。その中で EGFR 及び c-Src による 46 番目のチロシン ( $_{46}\text{Tyr}$ ) のリン酸化は、 $\beta$ -catenin との直接の相互作用を安定化させることが報告されている [40]。 $\beta$ -catenin と MUC1-CD の複合体は、核またはミトコンドリア内に移行するが [41-45]、核移行の場合は、腫瘍形成能を齎すことが報告されている [43,45-47]。MUC1 を介したシグナル伝達として、エクストドメインに CD8 のポリペプチド鎖をもつ CD8/MUC1 キメラタンパクを強制発現させた細胞に、抗 CD8 抗体による刺激を与えた場合において Extracellular signal regulated protein kinases 1/2 (ERK1/2) 経路の活性化が報告されている [48]。MUC1 の過剰発現は、腫瘍形成能を齎すと共に、膵臓癌の肺転移の亢進 [49]、抗癌剤、酸化ストレスによるアポトーシスの抑制 [44,46,50-52]、付着依存性増殖、非付着依存性増殖 [33,44] など、様々な作用をもたらすことが報告されている。

以上のことから、MUC1 はシグナル伝達分子として働くことが示されているが、上記 CD8/MUC1 キメラタンパク質を用いた報告および Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) をリガンドとした情報伝達 [48,53,54] 以外は、MUC1 が直接の受容体として機能しているのではなく、他のシグナル伝達分子からの刺激に伴うキナーゼ活性の亢進に端を発したシグナル伝達である。肺癌細胞株である T47D 細胞に発現している MUC1 の主要糖鎖は、シアル酸の結合したコア 1 構造であることが知られている。MUC1 発現細胞の共存下で、ヒト末梢血単球を樹状細胞に分化させると、樹状細胞のアポトーシス、機能不全がもたらされる。しかし、糖鎖をもたない、あるいは、Tn 抗原のみをもつ MUC1 を発現する細胞を用いた場合においては、この効果が消失する。このことは、シアル酸を含む O-グリカンが樹状細胞上のレクチンと反応することを示唆している [55,56]。癌組織微小環境では、癌細胞に加えて、浸潤した免疫細胞などを含む間質細胞が混在している。また、同環境下においては、様々なレクチンを発現している免疫細胞およびレクチンそのものが混在し、癌細胞上の Mucin との糖鎖を介した相互作用がネットワークを形成し、シグナル伝達が生じる可能性が十分に想定される。このような癌組織微小環境下でのシグナル伝達が癌細胞の悪性化に関与しているものと考えられる。癌組織微小環境で想定される Mucin – レクチンネットワークの中で、レクチンとしては、Galectin-3 や Siglec family などが挙げられる。Galectin-3 は  $\beta$ -ガラクトシドを認識するレクチンで、癌細胞自体も細胞外に分泌するため、癌組織微小環境では高濃度に存在するものと考えられる。Siglec family は主に免疫細胞上に発現し、シアル酸を含む糖鎖を認識することから、癌組織微小環境に浸潤してきた免疫細胞上の Siglec と MUC1 との相互作用が考えられた。(図1)。

Galectin は可溶性で糖鎖の非還元末端にガラクトースを含む糖鎖構造 ( $\beta$ -ガラクトシド) に特異的に結合するレクチンファミリーである。Galectin は比較的分子量 (14~35 kDa) のタンパク質であり、いずれも約 135 アミノ酸からなる高い相同性を持つ S 型糖認識ドメイン (S-CRD : S - carbohydrate recognition domain) を持っている。Galectin ファミリーにおいて、この S-CRD には 3 種類の異なる分子型が存在する。これら Galectin は、(i) S-CRD 単独あるいは短い N 末端側ペプチドを持ち、単量体あるいはホモ二量体として存在するプロト型、(ii) 1つの S-CRD の N 末端側に、レクチン以外のキメラ型の小型ドメインとグリシン、チロシン、グルタミン、プロリンに富む繰り返し配列からなるリンカーを持つキメラ型、(iii) 2つの S-CRD が 1つのペプチド上に並び (ii) の繰り返し配列からなるリンカーを持つタンデムリピート型の 3 種類に分類される。十数種の Galectin が知られ、哺乳類に加えて鳥類、魚類、線虫、海綿、菌類由来の Galectin に関しても多くの研究がなされている。Galectin は細胞と細胞外マトリックスの相互作用のモジュレーターとして働き、すべて

の多細胞生物の分化や成長に必須であると考えられている [57]。その中で、Galectin-3 は唯一キメラ型に分類され、細胞質 [58]、核周囲やミトコンドリア膜 [59] に多く存在する。細胞質中に存在する Galectin-3 は抗アポトーシス活性を持ち [60]、核に存在する Galectin-3 は mRNA 前駆体スプライシングを促進する [61,62]。細胞外への放出機構については明らかにされていないが、Galectin-3 は細胞表面にも検出される。細胞表面の Galectin-3 は細胞同士の接着や細胞とマトリックスの相互作用に関与している [63-65]。また、Galectin-3 は血液中でも検出され、肺癌患者における血流中の Galectin-3 は正常時よりも 5 倍程度に増加することが知られている [66]。このように Galectin-3 と癌の進行や増殖との間には関連があるとされている [65, 67]。従って、癌組織微小環境下に分泌された Galectin-3 がオートクラインあるいはパラクライン的に MUC1 と相互作用することは容易に想定できる。

Siglec はその構造的特徴から、免疫グロブリンスーパーファミリーにも属し、そのエクストドメインは、シアル酸との結合に関わる N 末端側の V set Ig-like ドメインとさらにいくつかの C2 set Ig-like ドメインで構成される。また、多くの Siglec は細胞質側に抑制性のシグナル伝達に関わる Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) をもつ。ヒトにおいては、現在までに 15 種類の Siglec が同定されており、シアル酸を含む糖鎖構造を認識するという点では共通の性質を示すが、それぞれ微妙に異なる糖鎖結合性をもつ。この結合性の違いが各 Siglec に特異的な作用をもたらしていることが推測される [68]。中でも、Siglec-9 は、単球、マクロファージ、樹状細胞、好中球、B 細胞、NK 細胞および T 細胞サブセットなどの多種のヒト白血球上に発現しており [69]、N 末端側の V set Ig ドメインに NeuAc $\alpha$ 2-3/6Gal を含む糖鎖構造を認識し結合することが知られている [70,71]。また、近年報告された新しい機能のひとつとして、Siglec-9 は活性化 T 細胞上の Prohibitin と結合し、T 細胞受容体からのシグナルを仲介する Prohibitin の機能を阻害することにより、T 細胞の活性化を抑制することが発見されている [72]。癌組織に浸潤した免疫細胞と MUC1 発現癌細胞において、Siglec と MUC1 を介した相互作用が生じることは十分に予想される。なお本研究では、Siglec-9 の強制発現細胞 (HEK293/Siglec-9) を用いた一部の研究を除いて、膜型の Siglec-9 の代わりに可溶性の Siglec-9 (sSiglec-9) を用いた。

MUC1 発現細胞における MUC1 を介したシグナル伝達については、上述の ERK の活性化の系と、Wnt/Wingless シグナル伝達経路のひとつである  $\beta$ -catenin を介した系 [73] が考えられたが本研究では  $\beta$ -catenin の系について検討した (図 2)。

$\beta$ -Catenin は、2 つの異なる機能をもつ細胞内分子である。その 1 つは、 $\alpha$ -catenin を通じて Cadherin に連結し、Actin filament とリンクさせることで、細胞の接着に関与する機能であり、他方は、核内に移行して核内の転写因子である Tcf/Lef と結合し、細胞の増殖あるいは発生に関わる遺伝子の転写を活性化する機能である [74,75]。細胞内の  $\beta$ -catenin レ

ベルは、Adenomatous Polyposis Coli (APC) タンパク質、axin と複合体を形成した GSK-3 $\beta$  によって調節されている [76-78]。 $\beta$ -Catenin は、はじめに Casein kinase 1 $\alpha$  により、<sup>44</sup>Ser と <sup>33</sup>Ser が、続いて GSK-3 $\beta$  により、<sup>37</sup>Ser、<sup>41</sup>Thr がリン酸化される [79,80]。このリン酸化を受けた  $\beta$ -catenin が F-BOX タンパク質である  $\beta$ -Trcp、FWD1 に認識され、ユビキチン化を受け、Proteasome により分解されることにより調節が行われている [81-83]。

本研究では、これらの分子的背景をもとに、癌組織微小環境における癌細胞の増殖・進展に関わる MUC1 の新規分子機構について解析した結果を述べる。前半は、Galectin-3 のオートクライン/パラクライン的な MUC1 への結合に伴うシグナル伝達について、後半は、免疫細胞上に発現する Siglec-9 をカウンターレセプターとする MUC1 を介したシグナル伝達とその生物学的作用について述べる。



## 2. Galectin-3 の MUC1 結合部位の同定と結合に伴う $\beta$ -catenin のリクルート

### 2-1. 材料と方法

#### 2-1-1. 細胞の培養

マウス繊維芽細胞由来細胞株 3T3 細胞（以下、3T3 細胞）は、American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。同細胞にヒト MUC1cDNA を導入した強制発現株である 3T3 APR-MUC1 細胞（以下、3T3/MUC1 細胞）は、10% ウシ胎児血清、2 mM L-グルタミンを含む PPMI1640 (日水製薬)を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。

#### 2-1-2. FACS

細胞（3T3/mock, 3T3/MUC1 ;  $1 \times 10^6$  細胞）を Phosphate buffered saline (PBS) で 2 回、0.5% BSA/PBS で 2 回洗浄後、マウス抗 MUC1-ND 抗体（mouse anti-CD227 Ab, BD Pharmingen™）を含む 0.5% Bovine serum albumin (BSA)/PBS 中で、4°C、2 時間、反応させた。0.5% BSA/PBS で 2 回洗浄後、2 次抗体として Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ウサギ抗マウス IgG (Zymed) を含む同溶液中で、4°C、1 時間、遮光下で反応させた。0.5% BSA/PBS で 3 回洗浄後、Fluorescence activated cell sorting (FACS) Calibur (Becton Dickinson)を用いて解析した。

#### 2-1-3. 細胞溶解液の調製

細胞を、PBS で2回洗浄後、細胞抽出用溶液（1% NP-40, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.14 M 塩化ナトリウム, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai Tesque)）中に細胞を懸濁後、超音波処理（5 秒, 5 回）を行い、4°C、14,000×g で 20 分間遠心し、上清を細胞溶解液として用いた。

#### 2-1-4. イムノブロットイング

試料を電気泳動（用途に応じて 6~12% ゲルを使用）後、MUC1-ND は Zeta probe blotting membranes (Bio-Rad, 以下 Zeta 膜), それ以外の分子については Immuno-Blot™ PVDF membrane (Bio-Rad, 以下 PVDF 膜) を用いて転写し、5% BSA/PBS または 3% スキムミルクでブロッキングを行った。目的に応じて、マウス抗 MUC1-ND 抗体, ハムスター抗 MUC1-CD 抗体 (Arm.Ham Anti-MUC1 Ab5 Ab, Neo Markers), ヤギ抗 Galectin-3 抗体 (Santa Cruz), マウス抗  $\beta$ -actin 抗体 (SIGMA), マウス抗  $\beta$ -catenin 抗体 (Santa Cruz) を含む 5%BSA/PBS 溶液中で膜を 4°C で一晩、反応させた。TBS-T (25 mM Tris-HCl, pH 7.5,

0.15 M 塩化ナトリウム, 0.05% Tween-20) で 4 回洗浄後、2 次抗体として、Horseradish peroxidase (HRP) 標識ウサギ抗マウス IgG (Zymed) または HRP 標識ヤギ抗ハムスター IgG (Santa Cruz) を含む TBS-T 溶液中、室温で 1 時間反応させた。膜を TBS-T で 5 回洗浄した後、Chemilumi One L (Nacalai Tesque) を用いて発色させた。バンドの濃さは、Image J (NIH) を用い数値化した。

#### 2-1-5. 免疫染色

細胞表面の染色では、3T3/mock, 3T3/MUC1 細胞 ( $5 \times 10^3$  細胞) を低温の PBS で洗浄後、10% ヤギ血清でブロッキングを行い、マウス抗 MUC1-ND 抗体, ヤギ抗 Galectin-3 抗体またはコントロール IgG を含む 1% BSA/PBS 溶液中で、4°C で、2 時間反応させた。低温の PBS で洗浄後、Alexa Fluor<sup>®</sup>-488 標識ウサギ抗マウス IgG (Molecular Probes<sup>™</sup>), Alexa Fluor<sup>®</sup>-594 標識ウサギ抗ヤギ IgG (Molecular Probes<sup>™</sup>) を含む 1% BSA/PBS 中、4°C で、1 時間反応させた。低温の PBS で洗浄後、4% パラホルムアルデヒドおよび 4'-6-diamino-2-phenylindole (DAPI) を含む PBS 中で反応させ、同様に PBS で洗浄後、ProLong<sup>®</sup> Gold Antifade Reagents (invitrogen) を用いて、封入し、共焦点顕微鏡 (Leica microsystems, TCS SPE, Obj;  $\times 63$ ) により顕鏡した。細胞内も含めて染色する場合は以下のように行った。3T3/mock, 3T3/MUC1 細胞 ( $5 \times 10^3$  細胞) を PBS で洗浄後、4% パラホルムアルデヒドを含む PBS 中、室温で、20 分間反応させ、PBS で洗浄後、0.1% Triton<sup>®</sup> X-100 を含む 10% ヤギ血清でブロッキングを行った。次いで、マウス抗 MUC1-ND 抗体, ヤギ抗 Galectin-3 抗体またはコントロール IgG を含む 0.1% Triton<sup>®</sup> X-100/1% BSA/PBS 溶液中、4°C で、2 時間反応させた。PBS で洗浄後、Alexa Fluor<sup>®</sup>-488 標識ウサギ抗マウス IgG (Molecular Probes<sup>™</sup>), Alexa Fluor<sup>®</sup>-594 標識ウサギ抗ヤギ IgG (Molecular Probes<sup>™</sup>), DAPI を含む 0.1% Triton<sup>®</sup> X-100/1% BSA/PBS 中、4°C で、1 時間反応させた。PBS で洗浄した後に、ProLong<sup>®</sup> Gold Antifade Reagents (invitrogen) を用いて封入し、共焦点顕微鏡 (Leica microsystems, TCS SPE, Obj;  $\times 63$ ) により顕鏡した。

#### 2-1-6. 細胞表面のビオチン化

標識する細胞を、0.1 mg/ml EZ-Link<sup>®</sup> Sulfo-NHS-Biotin (Thermo) を含む PBS 中で、4°C, 1 時間反応させた。過剰のビオチンは、0.1 M グリシンを含む PBS により洗浄し、取り除いた。

#### 2-1-7. 免疫沈降

Galectin-3 の免疫沈降は以下のように行った。2-1-6. 項の方法でビオチン標識した細胞を

2-1-3. 項の細胞抽出用溶液を用い、細胞を氷上で 30 分静置後、4°C, 14,000×g の条件下で 20 分間遠心し、上清を細胞溶解液として得た。調製した細胞抽出液に、ヤギ抗 Galectin-3 抗体またはコントロール IgG を加え、4°C, 2 時間反応させた。PureProteome™ Protein G Magnetic Beads (MILLIPORE) を加え、4°C, 1 時間反応させた後、細胞抽出用溶液で Beads を洗浄し、試料を得た。試料は 2-1-4. 項と同様に 電気泳動後、ウェスタンブロッティングし、膜をブロッキング後、HRP 標識ストレプトアビジン (invitrogen) あるいは 2-1-4. 項で用いた抗体により、Galectin-3 を検出した。

MUC1-CD および  $\beta$ -catenin の免疫沈降は以下のように行った。2-1-3. 項に従い、得られた細胞抽出液に、ハムスター抗 MUC1-CD 抗体、マウス抗  $\beta$ -catenin 抗体またはコントロール IgG を加え 4°C, 2 時間反応させた。さらに、Protein G-Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare) を加え、4°C, 1 時間反応させた後、細胞抽出用溶液で Beads を洗浄し、試料を得た。

#### 2-1-8. N-Glycanase 処理

細胞抽出液 (250  $\mu$ g protein) を、Glycopeptidase F (10 mU, TaKaRa) を含む 100 mM Tris-HCl, pH 8.6 溶液中で、37°C, 17 時間処理した。

#### 2-1-9. O-Glycanase 処理

MUC1-ND 画分 (10  $\mu$ g protein) を O-glycanase ( $2 \times 10^5$  U, BioLabs inc.) を含む 0.25% SDS, 1% NP-40, 20 mM Dithiothreitol (DTT), 50 mM リン酸緩衝液, pH 7.5 溶液中で、37°C, 17 時間処理した。

#### 2-1-10. O-Glycanase と neuraminidase 処理

MUC1-ND 画分 (10  $\mu$ g protein) を O-glycanase ( $2 \times 10^5$  U, BioLabs inc.) および neuraminidase (50 mU, *Arthrobacter ureafaciens*, Nacalai tesque) を含む 0.25% SDS, 1% NP-40, 20 mM DTT, 50 mM リン酸緩衝液, pH 7.5 溶液中で、37°C, 17 時間処理した。

#### 2-1-11. MUC1-ND, -CD の分離

ビオチン化した 3T3/MUC1 細胞を 2-1-3. 項に示した方法により調製したビオチン標識した 3T3/MUC1 細胞溶解液を、ゲル濾過のカラム (Sepharose™ CL-6B gel, GE-Healthcare, 2.8  $\times$  91 cm) にかき、ゲル濾過溶出液 (25 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.15 M 塩化ナトリウム, 0.5 % Triton® X-100) を通し、分画した。80 画分 (8 ml/tube) に分画し、ドットブロット法により、各画分を Zeta 膜に転写後、HRP 標識ストレプトアビジンを用いて発色し、細胞表面

のタンパク質の溶出位置を確認した。MUC1 を含む画分を集め、4M グアニジン塩酸を含む塩化セシウム密度勾配遠心 (10°C, 36,000 rpm, 72 h, HITACHI, P40ST rotor) を行い、24 画分 (0.5 ml/tube) に分画した。得られた画分をドットブロット法により、Zeta 膜および PVDF 膜に転写し、それぞれ MUC1-ND, -CD を検出後、MUC1-ND あるいは MUC1-CD のみを含む画分を得た。また、ゲル濾過溶出液に対し透析した試料を電気泳動後、ウエスタンブロッティングし、MUC1-ND と MUC1-CD が分離されたことを確認した。

#### 2-1-12. Galectin-3 と細胞表面分子の架橋

3T3/MUC1 細胞 ( $2 \times 10^7$  細胞) に Galectin-3 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) を加え、4°C, 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、1 mg/ml 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate) (DTSSP, Thermo Fisher Scientific) を含む PBS 中で 4°C, 1 時間反応させ、架橋した。細胞を 50 mM のグリシンを含む PBS で洗浄し、3-1-3. 項に従い細胞抽出液を得た。

#### 2-1-13. Galectin-3 による細胞の刺激と $\beta$ -catenin のリクルート

3T3/mock および 3T3/MUC1 細胞 ( $4.5 \times 10^5$  細胞) を 48 時間培養後、PBS で洗浄し、さらに、細胞表面に結合した Galectin-3 を除く為に、30 mM ラクトースを含む無血清培地により洗浄した。さらに無血清の培地に置き換え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 1 時間培養した。上記前処理を行った後、Galectin-3 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で所定時間培養した後、細胞抽出液を得た。細胞抽出液に、3-1-7. 項に示した方法で、抗 MUC1-CD 抗体を加え免疫沈降物を得た。沈降物を電気泳動、ウエスタンブロッティング後に共沈した  $\beta$ -catenin を検出した。

## 2-2. 結果

### 2-2-1. 3T3/MUC1 細胞における MUC1 と Galectin-3 の発現

一般的には、MUC1 を発現している上皮性癌細胞が用いられているが、本研究では、癌細胞のもつジェネティックあるいはエピジェネティックな影響を排除し、MUC1 固有の機能を明らかにする目的で 3T3 細胞を用いた。3T3 細胞に MUC1cDNA を導入し、安定的な MUC1 発現株を作成し、MUC1 の細胞表面の発現を FACS を用い確認した ( 図 3A )。また、細胞溶解液を調製し、電気泳動後、ウェスタンブロッティングを行い MUC1-ND, -CD, および Galectin-3 の発現についても確認した。また、MUC1 の発現に伴う Galectin-3 の発現に変化は見られなかった ( 図 3B )。

### 2-2-2. 細胞表面における MUC1 と Galectin-3 の局在

細胞表面での MUC1 と Galectin-3 の分布を抗 MUC1-ND 抗体および抗 Galectin-3 抗体を用いて共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。本来、細胞質に存在する Galectin-3 は何らかの機構により細胞外に放出されることが知られている。3T3/MUC1 細胞においても細胞表面に Galectin-3 が認められると共に、細胞表面上の MUC1-ND と Galectin-3 の分布は完全に一致していた ( 図 4A )。また、両分子はドット状に検出され、Galectin-3 による MUC1 の架橋が示唆された。一方、3T3/mock 細胞では細胞表面の Galectin-3 による発色は僅かであった。細胞表面に存在する一般的な糖タンパク質や糖脂質と比較して、MUC1 は O-グリカンを大量に発現し、Galectin-3 との結合能が高いことを示している。また、細胞内の Galectin-3 を観察すると、3T3/mock 及び 3T3/MUC1 細胞における差異は見られなかった ( 図 4B )。

### 2-2-3. 3T3/MUC1 および 3T3/mock 細胞表面上の Galectin-3 のレベル

細胞表面上に存在する Galectin-3 のレベルを測定する為に、細胞表面分子をビオチン化した。細胞溶解液より、Galectin-3 を免疫沈降し、試料とした。試料を電気泳動後、ウェスタンブロッティングにより、膜に転写し、HRP 標識ストレプトアビジンを用いて検出することにより、細胞表面に存在した Galectin-3 のみを検出した。3T3/MUC1 細胞表面の Galectin-3 のレベルは、3T3/mock 細胞の約 2 倍の量であった ( 図 5A, B )。このことから、MUC1 を介して Galectin-3 が細胞表面に保持されていることが示唆された。

### 2-2-4. Galectin-3 の MUC1-ND への結合

Galectin-3 の MUC1 への結合については、いくつかの異なる報告がなされている。一方は、

MUC1-ND 上の O-グリカンとの結合を示す報告 [85]、他方は MUC1-CD 上の N-グリカンとの結合を示す報告である [86]。Galectin-3 の結合部位の同定を試みた。3T3/MUC1 細胞の細胞溶解液より Galectin-3 を免疫沈降した試料を電気泳動後、ウエスタンブロッティングにより、膜に転写し、共沈した MUC1 の各ドメインを検出した。MUC1-ND 及び MUC1-CD 共に Galectin-3 との共沈がみられた ( 図 6A )。これは MUC1-ND, -CD 両ドメインが強い相互作用により結合している為、どちらか片方のドメインに結合していたとしても双方のドメインが検出されているものと考えられる。Galectin-3 の結合に MUC1-CD の持つ N-グリカンが関与するという Ramasamy et al. [86] の報告より、細胞溶解液を N-glycanase 処理し、N-グリカンを切断した後、同様に Galectin-3 と共沈した各ドメインについて検出を行った。N-glycanase 処理を行った場合の試料において MUC1-ND の分子サイズは僅かに減少し、MUC1-CD は 17 kDa の分子に集約していた ( 図 6B )。MUC1-CD には 4 本の N-グリカンが結合しているとされており、N-glycanase 処理により、すべての N-グリカンが切断されたことを意味する。従って、N-グリカンが存在しなくても、Galectin-3 と MUC1 が相互作用していることになり、MUC1-ND 上の O-グリカンが Galectin-3 の MUC1 への結合に関与していることが強く示唆された。しかし、これはあくまで間接的な証明であり、両ドメインと Galectin-3 の直接的な結合を示すには十分ではないと考え、MUC1-ND, -CD を分離し、それぞれのドメインについて Galectin-3 との相互作用を検討した。まず、3T3/MUC1 細胞の細胞表面をビオチンにより標識し、細胞抽出液をゲル濾過にかけ、得られた画分のドットプロットより、表面分子の分布を調べ、各画分のドットの濃さを測定しグラフ化した ( 図 7A, B )。MUC1 を含む画分を集め、4 M グアニジン塩酸存在下で、塩化セシウム密度勾配遠心を行った ( 図 7C )。得られた画分をドットプロットし、MUC1-ND 及び -CD を検出した ( 図 7D )。画分の 3~5 を MUC1-ND のみを含む画分 ( Fraction a )、画分の 21~23 を MUC1-CD のみを含む画分 ( Fraction b ) として回収した。Fraction a, b を試料とし、電気泳動後、ウエスタンブロッティングにより、膜に転写し、各画分に、他方のドメインの混入の有無を検証したところ、相互の混入は皆無であることを確認した ( 図 7E )。MUC1-ND, -CD の画分に Galectin-3 を加え、結合させた後、抗 Galectin-3 抗体による免疫沈降物を電気泳動、ウエスタンブロッティング後に MUC1-ND, -CD を検出した。その結果、沈降物に検出されたのは MUC1-ND であり、MUC1-CD は検出されなかった ( 図 8A, B )。さらに、生理的状态における MUC1-ND への Galectin-3 の結合を確認する目的で、3T3/MUC1 細胞に Galectin-3 を 4°C, 30 分間反応させ、PBS で洗浄した後、DTSSP を用いてタンパク質間を架橋した。この細胞の抽出液より、同様に、MUC1-ND, -CD を分離し、電気泳動後、ウエスタンブロッティングにより、両ドメインの分離を確認した。各画分の MUC1-ND 及び MUC1-CD を免疫沈降し、沈降物を電気泳動、

ウエスタンブロッティング後、Galectin-3 を検出した。なお、DTSSP は分子内にジスルフィド結合を持ち還元状態での電気泳動で Galectin-3 は架橋されたタンパク質より分離される ( 図 8C )。Galectin-3 は、MUC1-ND 画分にのみ検出され、MUC1-CD 画分では検出されなかった。従って、生理的な状態においても、Galectin-3 は MUC1-CD ではなく MUC1-ND と結合することがわかった。MUC1-ND は多数の O-グリカンを持つことが知られている。そこで、O-glycanase 処理を行い、O-グリカンを切断した場合の Galectin-3 の結合について検討した。O-glycanase 処理を行うと MUC1-ND の分子サイズが、僅かに減少したことから、部分的に O-グリカンが除去されたことが予想された ( 図 8D, lane b )。また、neuraminidase 処理を同時に行うことで、MUC1-ND の糖鎖が著しく切断されることがわかった ( 図 8D, lane c )。酵素未処理および上記の条件で処理した試料について、Galectin-3 との結合について検討した。O-Glycanase 処理を行ったとき、MUC1-ND と Galectin-3 の結合に少し影響がみられた ( 図 8D, lane e )。また、neuraminidase 処理も加えることで、MUC1-ND と Galectin-3 の結合は完全に消失することがわかった ( 図 8D, lane f )。シアル酸の存在が近傍の糖鎖にも影響し、O-glycanase による切断が不十分であったことが予想される。結果的にシアル酸除去後に O-glycanase が作用し、Galectin-3 の結合活性が消失したものと考えられる。すなわち、MUC1-ND 上の TF 抗原が Galectin-3 の結合に関与していることが示唆された。

#### 2-2-5. MUC1 発現細胞への Galectin-3 の結合に伴う MUC1-CD への $\beta$ -catenin のリクルート

細胞外に分泌された Galectin-3 は、細胞間の相互作用や接着、ラティス構造の形成などに機能していることが知られている [87,88]。Galectin-3 は二量体あるいは五量体などの多量体を形成することで、多くの細胞表面の糖タンパク質を架橋し、より強いシグナル伝達の引き金となると考えられる。しかしながら、細胞表面上の MUC1 へのリガンドの結合によるシグナル伝達についてはほとんど研究されていない。数少ない例として、ICAM-1 が MUC1 に直接結合し、細胞内のカルシウム濃度が増加することが報告されている[53,54]、Pseudomonas aeruginosa やフラジェリンも MUC1 に結合し、シグナルを惹起する [89]。MUC1-CD は Scaffold protein として知られており、EGF などの成長因子の受容体への結合に伴い、近傍に存在する MUC1 の細胞質ドメインがリン酸化され、各種因子 (  $\beta$ -catenin, p120 catenin, p53, estrogen receptor  $\alpha$  など ) のリクルートが報告されている。中でも、 $\beta$ -catenin のリクルートは細胞増殖や形質転換などの調節に深く関わっており重要である。まず、MUC1 の強制発現による  $\beta$ -catenin の発現量に対する影響の有無について検討した。3T3/mock および 3T3/MUC1 細胞の細胞抽出液を電気泳動し、ウエスタンブロッティング

後に  $\beta$ -catenin を検出したところ、MUC1 の強制発現による  $\beta$ -catenin の発現量に変化はみられなかった (図 9A)。次に、Galectin-3 の結合による MUC1-CD への  $\beta$ -catenin のリクルートについて検討した。各細胞は、血清中の成長因子の影響を取り除く為に、無血清の培養液に置き換え、1 時間培養した。また、すでに細胞表面に結合している Galectin-3 を除去する為に、30 mM のラクトースを含む無血清の培養液で細胞を洗浄した。Galectin-3 存在化で、37°C, 30 分、培養後に細胞を可溶化し、得られた細胞抽出液より免疫沈降した MUC1-CD あるいは  $\beta$ -catenin を電気泳動し、ウェスタンブロッティング後に MUC1-CD と共沈した  $\beta$ -catenin あるいは  $\beta$ -catenin と共沈した MUC1-CD を検出した (図 9B)。その結果、Galectin-3 の結合に伴い MUC1-CD に  $\beta$ -catenin がリクルートされることがわかった。また、Galectin-3 の処理を経時的に行い、MUC1-CD と共沈する  $\beta$ -catenin について検討した。Galectin-3 処理後、30 分で MUC1-CD と  $\beta$ -catenin の共沈は最大となり、その後は、減少傾向にあることがわかった (図 9C, D)。



### 2-3. 考察

MUC1 上の糖鎖への Galectin-3 の結合はすでに多くの報告で示されている。一般的に糖鎖の付加は個々の細胞のもつ糖転移酵素群によって規定される。繊維芽細胞に発現させた MUC1 について、その発現およびその糖鎖付加のヘテロジェナイティについて、FACS ( 図 3A ) および、電気泳動 ( 図 3B ) を用いて検討した。細胞表面での発現は FACS により確認すると共に、電気泳動、ウエスタンブロッティングによる解析では、MUC1-ND, -CD はそれぞれ 250 kDa 付近のスミアーなバンド、15~25 kDa の複数のバンドとして検出された。これらの電気泳動上のパターンは、上皮細胞に発現する MUC1 と基本的に同じパターンを示した。すなわち、MUC1-ND は N-glycanase ( 図 6B ) や O-glycanase ( 図 8D ) 処理によって、分子サイズに変化がみられることから、それらのグリカンの付加によるヘテロジェナイティにより、スミアーなバンドとなったものと考えられる。また、MUC1-CD については、上皮細胞に発現した MUC1-CD についても同様のヘテロジェナイティが認められ、N-グリカンの結合数の違いによって生じる分子種の違いと考えられる。また、Galectin-3 の発現については、以前の報告で膵臓癌細胞において、MUC1 の発現の亢進が Galectin-3 の発現を誘導するとされているが、3T3/MUC1 および 3T3/mock 細胞を比較した場合、前者の方が増加している傾向はみられたが、細胞表面上の MUC1 と Galectin-3 が結合し、保持されていることで、増加している可能性が高い ( 図 3B, 図 4A )。

Galectin-3 は細胞の内外に存在し、それぞれ独自の機能を有する。細胞外の Galectin-3 は細胞表面のガラクトース含有の糖鎖に結合することで、様々な影響を細胞に与えるものと予想される。MUC1 は Galectin-3 の内在性のリガンドであることが既に報告されている [13-16] が、細胞接着との関連性を検討したものである。即ち、Galectin-3 の結合は MUC1 の細胞表面における分布を局在化させ、接着分子を露出させることで、癌細胞間の接着あるいは癌細胞と血管内皮細胞の接着を高め、結果として、癌細胞の転移を促進するとされている。本研究においても、MUC1 を発現することによって、細胞表面上により多くの Galectin-3 が保持されていることは、共焦点レーザー顕微鏡による観察 ( 図 4A ) や細胞表面をビオチン標識して得た生化学的手法による結果 ( 図 5 ) からも確認された。さらに、細胞表面の MUC1 と Galectin-3 がドット上に共局在したことは、Galectin-3 の MUC1 への結合により、MUC1 が多量体を形成したことを示唆している。また、このような形状は一般的に MUC1 に強いシグナルを伝達する可能性を示唆している。次により明確に Galectin-3 と MUC1 の結合を示す目的で、共沈実験を行った。図 6A に示すように、抗 Galectin-3 抗体により、MUC1-ND および -CD の共沈が確認された。Galectin-3 の MUC1 上の結合部位については、MUC1-ND 上の O-グリカン [85] と MUC1-CD 上の N-グリカ

ン [86] であるという異なる報告があり、明確になっていない。図 6B に示すように、N-glycanase 処理後も MUC1-ND および -CD は Galectin-3 と共に共沈した。この結果は、O-グリカンへの結合を強く示唆しているが、酵素消化が不完全である可能性や N-グリカンに結合しないということは断定できない。従って、最終的には、MUC1-ND と -CD を分離して、Galectin-3 との結合を調べた。図 7D, E に示すように両ドメインが相互に混入すること無く分離された。Galectin-3 との共沈実験 ( 図 8A, B ) では、MUC1-ND への結合が認められたが、MUC1-CD への結合は認められなかった。Galectin-3 は MUC1-CD 上の N-グリカンに結合するという報告もあり、個々の細胞によって異なる可能性も残されている。当研究室では、ヒト大腸癌細胞由来細胞株 HCT116 細胞についても同様の実験を試みたが、同様の結果を得ている ( 森 勇伍ら 未発表データ )。さらに、MUC1-ND と MUC1-CD を分離するためには、高濃度のグアニジン塩酸を使用して変性させる必要がある。変性タンパク質への Galectin-3 の結合と生理的状況下での結合に相違がみられる可能性も否定できない。そこで、3T3/MUC1 細胞を Galectin-3 とインキュベートした後に DTSSP により、近傍のタンパク質同士を架橋した。その後、同じ手法で両タンパク質を分離し、架橋された Galectin-3 を検出したところ、同様に MUC1-ND に結合することがわかった ( 図 8C )。MUC1-ND は O-グリカンに富む糖タンパク質であり、Galectin-3 の結合部位であることが強く示唆されたことから、O-glycanase 処理後の変化を見たところ、分子サイズも Galectin-3 の結合活性も大きな変化は見られなかった。しかしながら、neuraminidase と共に処理した場合、MUC1-ND のバンドは低分子化し、Galectin-3 の結合活性も消失した。脱シアル化した糖鎖については、O-glycanase により著しく低分子化したことから、多くの糖鎖は、シアロ TF やジシアロ TF 抗原であることが示唆された。シアル酸の結合した状態では、O-glycanase が作用しにくく、Galectin-3 の結合部位と予想される TF 抗原も切断されなかったものと考えられる。Galectin-3 に結合する糖鎖としては、ポリラクトサミン構造や TF 抗原が考えられるが、これらの結果は、ポリラクトサミン構造をもつ比較的長い糖鎖ではなく、TF 抗原の可能性が高いことがわかった。

細胞外における Galectin-3 は、細胞間の相互作用や接着、ラティス構造の形成などを担うとされている [87,88]。それらの機能に加えて、Galectin-3 は二量体あるいは五量体などの多量体を形成することで、多くの細胞表面の糖タンパク質を架橋することから、Galectin-3 の結合は強いシグナル伝達の引き金となると考えられた。増殖因子を起点とした MUC1 を経由したシグナル伝達の場合、MUC1-CD に様々な因子がリクルートされることが示されてきた。中でも  $\beta$ -catenin は癌細胞の悪性形質の発現と密接な関係があることから、MUC1 への Galectin-3 の結合についても  $\beta$ -catenin のリクルートについて検討した。細胞抽出液からの MUC1-CD と  $\beta$ -catenin の共沈は、Galectin-3 で処理した細胞のみに認められたこ

とから、Galectin-3 の結合に伴う現象であることがわかった ( 図 9B )。MUC1 と作用するキナーゼとして、c-Src が知られているが、3T3/MUC1 細胞においては、Galectin-3 の MUC1-ND への結合が、MUC1 のコンフォメーションに変化を齎し [92-94]、c-Src のキナーゼ作用により、MUC1-CD への  $\beta$ -catenin のリクルートが亢進したものと考えられる。Galectin-3 の生物学的作用は結合する細胞表面の分子の作用に委ねられる。 $\beta$ -Integrin [95] や EGFR [96] に結合するという報告もあり、前者の場合、Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) 上の N-グリカンに結合し、ERK1/2 のリン酸化を抑制し細胞増殖が阻害される [97]。従って、細胞への影響は複数の受容体を介したものになる可能性がある。しかしながら、MUC1 のタンデムリピート上の O-グリカンには多くのリガンド糖鎖が存在するものと予想される。また、癌組織微小環境には高濃度に Galectin-3 が存在するものと考えられ、MUC1 と Galectin-3 の相互作用は新たな腫瘍悪性化の分子機構のひとつとなるものと考えられる。

### 3. Siglec-9 の MUC1 への結合に伴うシグナル伝達

#### 3-1. 材料と方法

##### 3-1-1. 細胞の培養

3T3/mock および 3T3/MUC1 細胞は 2-1-1 項と同様に作成し、培養した。ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞, ヒト大腸癌由来細胞株 HCT116 細胞, ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 細胞は ATCC より購入した。HEK293 細胞に空ベクターもしくは fSiglec-9 ( full length Siglec-9 ) を強制発現した HEK293/mock および HEK293/Siglec-9 細胞は、10% ウシ胎児血清、2 mM L-グルタミン、25 mM D-グルコースを含むダルベッコ変法イーグル培地(日水製薬)を用いて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。HCT116 細胞に空ベクターもしくはヒト MUC1cDNA を導入した HCT116/pIRES puro2 ( HCT116/Mock ) 細胞 および HCT116/pIRES puro2-MUC1 ( HCT116/MUC1 ) 細胞は、56°C, 30 分間、非動化処理した 10% ウシ胎児血清 ( 10% 非動化血清 ), 4 mM L-グルタミン, 1 μg/ml ピューロマイシンを含むダルベッコ変法イーグル培地 ( DMEM, 日水製薬 ) を用いて、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。A549 細胞は、10% ウシ胎児血清を含む F-12 K 培地を用いて、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。

##### 3-1-2. 細胞溶解液の調製

2-1-3. 項に記載した方法により行った。

##### 3-1-3. イムノブロッティング

電気泳動, ウェスタンブロッティングは、2-1-4. 項と同様に行った。目的に応じて、マウス抗 MUC1-ND 抗体, ハムスター抗 MUC1-CD 抗体 ( Arm.Ham Anti-MUC1 Ab5 Ab, Neo Markers ), マウス抗 β-actin 抗体 ( SIGMA ), マウス抗 β-catenin 抗体 ( Santa Cruz ), ウサギ抗 EGFR 抗体 ( Cell Signaling ), ウサギ抗 FGFR-3 抗体, ウサギ抗 c-Src 抗体 ( Cell Signaling ), ウサギ抗 Lyn 抗体 ( Cell Signaling ), ウサギ抗 Lck 抗体 ( Santa Cruz ), マウス抗リン酸化 β-catenin 抗体 ( Santa Cruz ), マウス抗 Histone 2B 抗体 ( Cell Signaling ), マウス抗 IκB-α 抗体 ( Santa Cruz ), ウサギ抗 c-myc 抗体 ( Cell Signaling ), を含む 5% BSA/PBS 溶液中で膜を 4°C, 一晩、反応させた。TBS-T で 4 回洗浄後、一次抗体の動物種に応じて、二次抗体として、それぞれ HRP 標識ウサギ抗マウス IgG ( Zymed ), HRP 標識ヤギ抗ハムスター IgG ( Santa Cruz ), HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG ( Zymed ) を含む TBS-T 溶液中、室温で 1 時間反応させた。以下、2-1-4. 項と同様に行った。

#### 3-1-4. Siglec 結合糖タンパク質の解析

3-1-2. 項に従い得た細胞抽出液に、Fc-tag Siglec-3, -5, -9 (R&D) および His-tag Siglec-1 (R&D)を加え (2  $\mu$ g protein)、4°C, 2 時間反応させた後、Protein G-Sepharose™ 4 Fast Flow または Nickel-nitrilotriacetic acid-agarose (Qiagen) を加え、4°C, 1 時間反応させた。樹脂を細胞抽出液により洗浄し、沈降物を得た。

#### 3-1-5. プレートアッセイ

Universal Bind 96-well plates (Corning) に PBS または MUC1-ND を 0.5  $\mu$ g 含む PBS を加え、4°C, 2 時間反応させた。2.5% BSA/PBS 溶液中でブロッキングを行った後、可溶性 Siglec-9 を加え、4°C, 2 時間反応させた。0.2 M NaCl, 0.05% Tween 20 を含む 50 mM リン酸緩衝液, pH7.5 により洗浄した後、HRP 標識 Protein G (GE Healthcare) を含む同溶液中で 4°C, 2 時間反応させた。同溶液で洗浄した後、TMB peroxidase substrate system (Nacalai Tesque) を用いて発色し、450 nm の吸光度を測定した。

#### 3-1-6. 免疫組織染色

パラフィン包埋された膵臓癌, 乳癌, 大腸癌及び正常組織切片をキシレンおよびエタノールにより脱パラフィンし、10 mM クエン酸緩衝液, pH 6.0 溶液中で 100°C, 15 分間処理し、抗原を賦活化させた。PBS で洗浄後、5% BSA/PBS 中、室温で 30 分間ブロッキングを行った。切片をマウス抗 MUC1-ND 抗体, ウサギ抗 Siglec-9 抗体 (ABGENT) またはコントロール IgG を含む 1% BSA/PBS 中、4°C, 一晩反応させた。PBS で洗浄後、Alexa Fluor®-488 標識ヤギ抗マウス IgG (Molecular Probes™), Alexa Fluor®-594 標識ヤギ抗ウサギ IgG (Molecular Probes™) および DAPI を含む 1% BSA/PBS 中、室温で 1 時間反応させた。切片を PBS で洗浄後、ProLong® Gold Antifade Reagents (Invitrogen) を用いて封入し、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS®, IX70, Obj;  $\times$ 20) により顕鏡した。蛍光観察後の切片を Hematoxylin-Eosin (HE) 染色し、蛍光像と同位置の HE 染色像を得た。

#### 3-1-7. $\beta$ -Catenin の免疫染色

3T3/MUC1 細胞 (5  $\times$  10<sup>3</sup> 細胞) を無血清培養液中で、37°C, 1 時間培養した後、可溶性 Siglec-9 (2.5  $\mu$ g/ml) または PBS を添加し、1 時間反応させた。4% パラホルムアルデヒドを含む PBS 中、室温で、20 分間処理した。PBS で洗浄後、0.1% Triton® X-100 を含む 10% ヤギ血清でブロッキングを行い、マウス抗  $\beta$ -catenin 抗体またはコントロール IgG を含む 0.1% Triton® X-100/1% BSA/PBS 溶液中、室温で 2 時間反応させた。PBS で洗浄後、Alexa

Fluor<sup>®</sup>-488 標識ヤギ抗マウス IgG, Propidium iodide (PI) を含む 0.1% Triton<sup>®</sup> X-100/1% BSA/PBS 中、室温で、1 時間反応させた。PBS で洗浄した後に、ProLong<sup>®</sup> Gold Antifade Reagents (invitrogen) を用いて封入し、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS<sup>®</sup>, IX70, Obj; ×20) により顕鏡した。MUC1-CD との共局在を観察する場合は、同様の試料を用いて、一次抗体としてマウス抗  $\beta$ -catenin 抗体, ハムスター抗 MUC1-CD 抗体を含む 0.1% Triton<sup>®</sup> X-100/1% BSA/PBS 溶液中、室温で 2 時間反応させた。PBS で洗浄後、Alexa Fluor<sup>®</sup>-488 標識ヤギ抗マウス IgG, DyLight 594 標識ヤギ抗ハムスター IgG および DAPI を用いて染色し、共焦点顕微鏡 (Leica microsystems, TCS SPE, Obj; ×63) により顕鏡した。

### 3-1-8. FACS

細胞 (3T3/mock, 3T3/MUC1, HEK293/mock, HEK293/Siglec-9, HCT116/MUC1;  $1 \times 10^6$  または  $5 \times 10^5$  細胞) を PBS と、0.5% BSA/PBS でそれぞれ 2 回洗浄後、ウサギ抗 EGFR 抗体 (Santa Cruz), ウサギ抗 FGFR-3 抗体 (Santa Cruz), マウス抗 Siglec-9 抗体 (R&D), およびコントロール IgG (マウス, ウサギ) を含む 0.5% BSA/PBS 中で、4°C, 2 時間、反応させ、0.5% BSA/PBS で 2 回洗浄した。二次抗体として FITC 標識ウサギ抗マウス IgG (Zymed), Alexa Fluor<sup>®</sup>-488 標識ヤギ抗ウサギ IgG (Molecular Probes<sup>™</sup>) を含む同溶液中で、4°C, 1 時間、遮光下で反応させ、0.5% BSA/PBS で 3 回洗浄後、FACS Calibur (Becton Dickinson) を用いて解析した。

細胞 (3T3/MUC1, HCT116/MUC1;  $1 \times 10^6$  または  $5 \times 10^5$  細胞) を PBS と、0.5% BSA/PBS でそれぞれ 2 回洗浄後、Fc-tag Siglec-9 (R&D, 以下 Siglec-9-Fc), ビオチン標識 MAM (Vector Laboratories Inc.) を含む 0.5% BSA/PBS 中で、4°C, 2 時間、反応させ、0.5% BSA/PBS で 2 回洗浄した。FITC 標識 Protein G (Zymed) または FITC 標識ストレプトアビジン (BD Pharmingen<sup>™</sup>) を含む同溶液中で、4°C, 1 時間、遮光下で反応させ、0.5% BSA/PBS で 3 回洗浄後、FACS Calibur (Becton Dickinson) を用いて解析した。

### 3-1-9. 可溶型 Siglec-9 および増殖因子による細胞の刺激

細胞 ( $4.5 \times 10^5$  細胞) を 48 時間培養し、PBS で洗浄後、無血清の培地に置き換え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 1 時間培養した。可溶型 Siglec-9 (1~10  $\mu$ g/ml), EGF (PEPROTECH INC., 20 ng/ml) または FGF2 (R&D, 30 ng/ml) を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で所定時間培養した後、細胞を回収し、細胞抽出液を得た。また、c-Src の関与を検討する実験においては、10  $\mu$ M の 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-D]pyrimidine (PP2) を含む培養液で処理後に可溶型 Siglec-9 を加えた。

#### 3-1-10. 免疫沈降

3-1-2. 項に従い、得られた細胞抽出液に、マウス抗 MUC1-ND 抗体、ハムスター抗 MUC1-CD 抗体、マウス抗  $\beta$ -catenin 抗体、ウサギ抗 EGFR 抗体、ウサギ抗 FGF-3 抗体またはコントロール IgG を加え 4°C, 2 時間反応させた。さらに Protein G-Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare) を加え、4°C, 1 時間反応させた後、細胞抽出用溶液で Beads を洗浄し、試料を得た。

#### 3-1-11. 可溶性 Siglec-9 の 3T3/MUC1 細胞への結合に伴う $\beta$ -catenin のリクルート

3T3/mock, 3T3/MUC1, HCT116/MUC1 および A549 細胞 ( $4.5 \times 10^5$  細胞) を 48 時間培養後、3-1-9. 項に示した方法で可溶性 Siglec-9 により処理した。回収した細胞より得られた細胞抽出液に、3-1-10. 項に示した方法で、抗 MUC1-CD 抗体または抗  $\beta$ -catenin 抗体を加え免疫沈降物を得た。沈降物を電気泳動、ウエスタンブロッティング後に共沈した  $\beta$ -catenin または MUC1-CD を検出した。

#### 3-1-12. 3T3/MUC1 および HCT116/MUC1 細胞と HEK293/Siglec-9 細胞の共培養に伴う $\beta$ -catenin のリクルート

3T3/MUC1, HCT116/MUC1, HEK293/mock 及び HEK293/Siglec-9 細胞は、Cell Dissociation Buffer Enzyme-Free Hank's-based (gibco®) を用い、ディッシュから剥離し、マイクロチューブ内において無血清培地中で、37°C, 1 時間インキュベートした。この間、一部の 3T3/MUC1 および HCT116/MUC1 細胞については neuraminidase 処理を行った (次項参照)。MUC1 発現細胞 ( $1 \times 10^6$  細胞) を HEK293/mock あるいは HEK293/Siglec-9 細胞 ( $1 \times 10^6$  細胞) と混合し、37°C で攪拌しながら 20 分間、インキュベートした。マイクロチューブを遠心し、得た細胞塊より、3-1-2, 3-1-10, 3-1-3. 項に従い MUC1-CD にリクルートした  $\beta$ -catenin を検出した。

#### 3-1-13. 細胞の neuraminidase 処理

無血清の培地中において、3T3/MUC1 および HCT116/MUC1 細胞 ( $1 \times 10^6$  細胞) に対して、neuraminidase (50 mU, *Arthrobacter ureafaciens*) を加え、37°C, 1 時間処理した。

#### 3-1-14. 細胞質および核画分の分離

Halwani et al. [84] の方法に従った。

#### 3-1-15. 増殖・生存能の測定

3T3/MUC1 細胞 ( $2 \times 10^3$  細胞) を 96 well plate で一晩培養し、PBS で洗淨後、無血清の培地に変換した。可溶型 Siglec-9 ( $2.5 \mu\text{g/ml}$ ) を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  で 20 分間培養した。培地に 10% になるように血清を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  で 24, 48, 72 時間培養した後、MTT 細胞数測定キット (Nacalai Tesque) を用い、細胞数を測定した。



## 3-2. 結果

### 3-2-1. MUC1 と Siglec-9 の結合

癌組織微小環境に浸潤する免疫細胞上には様々な Siglec 分子が発現している。その中で MUC1 と結合する Siglec 分子を検索した。3T3/MUC1 細胞の細胞抽出液に、tag 付きの Siglec-1, -3, -5 および -9 を加え、結合物を回収した。結合物を電気泳動し、ウエスタンブロットティング後に MUC1-ND を検出した( 図 10A )。いずれの Siglec も、MUC1 に結合したが、中でも、Siglec-9 に対する結合性が高いことが明らかとなった ( 図. 10A, lane b)。3T3/MUC1 細胞の培養上清から精製した MUC1-ND と tag 付きの Siglec-9 を用いたプレートアッセイによってもその結合が確認された ( 図 10B )。

### 3-2-2. ヒト癌組織における Siglec-9 発現細胞の分布

癌組織微小環境に浸潤した免疫細胞上の Siglec-9 と癌細胞上の MUC1 が相互作用する可能性について、それぞれの抗体を用いて両分子の分布を可視化した。MUC1 は従来の知見通り、各種上皮性悪性腫瘍に広く発現されていることが確認された。また、正常組織にも少量ながらその発現が認められ、癌化に伴って MUC1 の発現が上昇するという従来の知見と一致した。癌組織において、Siglec-9 陽性細胞は、MUC1 陽性細胞の中に散在し、一部の細胞で両分子の共局在を示す像が得られた。なお、正常組織においては、腔の内側 ( アピカル側 ) に MUC1 が分布し、Siglec-9 陽性細胞は腔の外側に散見された ( 図 11 )。これは上皮細胞の極性が保持された状態では、双方の細胞は物理的に接近出来ない状況を示していると考えられる。

### 3-2-3. MUC1 シグナル伝達における成長因子の関与の有無

ヒト乳癌細胞株およびマウス乳腺細胞において、MUC1 のシグナル伝達に EGFR や FGFR の関与が報告されている。これらの報告では、MUC1 と受容体が複合体を形成し、EGF や FGF の刺激により、MUC1 への  $\beta$ -catenin のリクルートが促進される。3T3/MUC1 細胞の系においても本現象の有無を確認するために、3T3/MUC1 細胞における EGFR および FGFR の発現およびシグナル伝達への関与を検討した。まず、FACS により、3T3/MUC1 細胞表面の EGFR および FGFR の発現を調べた ( 図 12 A )。3T3/MUC1 細胞上には、FGFR-3 の発現は認められたが、EGFR の発現は認められなかった。次に、増殖因子等の刺激の無い状態において、同細胞上の MUC1 と FGFR-3 の相互作用の可能性について免疫沈降法により検討した( 図 12B )。抗 MUC1-ND 抗体を用いた免疫沈降において、FGFR-3 の共沈はみられなかった ( 図 12B, lane c )。また、抗 FGFR-3 抗体を用いた免疫沈降にお

いても、MUC1-ND の共沈はみられなかったことから( 図 12B, lane b )、両分子は未刺激下、平常状態において、相互作用していないことが示唆された。さらに、FGF ( 図 12C ) および可溶性 Siglec-9 ( 図 12D ) による刺激時における MUC1 と FGFR-3 の相互作用についても同様に検討した。また、EGFR の発現がみられる HCT116/MUC1 細胞においても、抗 MUC1-ND 抗体および抗 EGFR 抗体を用い、同様の手法により、MUC1 と EGFR の相互作用について検討した ( 図 12E )。いずれの場合も MUC1 と増殖因子受容体との相互作用は検出されなかった。

3-2-4. 可溶性 Siglec-9 の MUC1 への結合による MUC1-CD への  $\beta$ -catenin のリクルート  
上述したように、従来の報告では、増殖因子の増殖因子受容体への結合が、共局在する MUC1 のリン酸化、そして、MUC1-CD への  $\beta$ -catenin のリクルートを促進するとされている。このような増殖因子の受容体との相互作用を介さずに、可溶性 Siglec-9 の MUC1 への結合による MUC1-CD への  $\beta$ -catenin のリクルートの可能性について検討した。3T3/mock あるいは 3T3/MUC1 細胞を、可溶性 Siglec-9 により、20 分間処理し、細胞を回収した。細胞抽出液より、抗 MUC1-CD 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物を SDS-PAGE し、ウエスタンブロッティング後に MUC1-CD と共に  $\beta$ -catenin を検出した ( 図 13A, lane a-d )。同様に得た細胞抽出液に抗  $\beta$ -catenin 抗体を用いて免疫沈降を行い、MUC1-CD の共沈についても検討した ( 図 13A, lane e, f )。3T3/MUC1 細胞において、可溶性 Siglec-9 の処理を行った場合に、MUC1-CD と共沈する  $\beta$ -catenin が増加し、また、 $\beta$ -catenin と共沈する MUC1-CD も検出されたことから、Siglec-9 の MUC1 への結合に伴い MUC1-CD に  $\beta$ -catenin がリクルートされることがわかった ( 図 13A, lane d, f )。同様の実験を、ヒトの大腸癌細胞である HCT116 に MUC1 を強制発現させた細胞 (HCT116/MUC1) と、MUC1 を内在するヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 細胞を用いて行った ( 図 13A, lane g-j )。これらの細胞株においても、3T3/MUC1 細胞と同様に可溶性 Siglec-9 の処理により、MUC1-CD への  $\beta$ -catenin のリクルートが亢進した。これらのことから、Siglec-9 の MUC1 への結合が直接的に MUC1-CD への  $\beta$ -catenin のリクルートを促進していると考えられる。次に、この相互作用による  $\beta$ -catenin のリクルートに関して、時間および濃度依存性について検討した。まず、可溶性 Siglec-9 の濃度を 2.5  $\mu$ g/ml として、0~40 分間経時的に細胞を処理した ( 図 13B )。また、可溶性 Siglec-9 による処理時間を 20 分として、可溶性 Siglec-9 の濃度を 0~5  $\mu$ g/ml で細胞を処理した ( 図 13C )。MUC1-CD への  $\beta$ -catenin のリクルートは、可溶性 Siglec-9 の処理後 20 分で最大となった ( 図 13D )。また、処理する可溶性 Siglec-9 の濃度依存的に MUC1-CD への  $\beta$ -catenin のリクルートを亢進することがわかった ( 図 13E )。MUC1-CD のリン酸化に関与するキナーゼは c-Src,

Lyn および Lck とされており [41,90,91]、これらのキナーゼによるリン酸化により、 $\beta$ -catenin のリクルートが促進されることが知られている。そこで、まず、3T3/MUC1 細胞についてこれらの分子の発現を調べた。細胞抽出液を電気泳動し、ウエスタンブロッティング後に、それぞれの分子の抗体を用いて検討した ( 図 14A lane a )。3T3/MUC1 細胞には c-Src および Lck の発現が認められ、Lyn は発現していなかった。次に、可溶性 Siglec-9 の処理を行った細胞の抽出液より、抗 MUC1-CD 抗体を用いて免疫沈降を行い、共沈するキナーゼを検出した ( 図 14A lane b, c )。可溶性 Siglec-9 の処理を行った場合において、MUC1-CD への c-Src のリクルートが認められたことから、c-Src が可溶性 Siglec-9 の MUC1 への結合による MUC1-CD への  $\beta$ -catenin のリクルートを促進していることが示唆された。そこで、Src family kinase の阻害剤である PP2 の存在下において、可溶性 Siglec-9 の刺激による MUC1-CD への  $\beta$ -catenin のリクルートに対する影響を調べた ( 図 14B )。PP2 処理した 3T3/MUC1 細胞では、MUC1-CD への  $\beta$ -catenin のリクルートが約 60% 減少した ( 図 14C )。これらの結果より、Siglec-9 の MUC1 への結合により、c-Src が MUC1-CD をリン酸化し、 $\beta$ -catenin のリクルートを亢進していることがわかった。

### 3-2-5. Siglec-9 発現細胞と MUC1 発現細胞の細胞間相互作用に伴う MUC1-CD への $\beta$ -catenin のリクルート

より生理的状況に近い条件での MUC1 と Siglec-9 の相互作用を検討する目的で Siglec-9 発現細胞を作成し、膜結合型 Siglec-9 の MUC1 への結合に伴うシグナル伝達について検討した。HEK293 細胞に、Siglec-9 cDNA を導入して、強制発現株を得た。得られた細胞を FACS により解析し、Siglec-9 の発現を確認した ( 図 15A )。さらに、上述のシグナル伝達が、シアル酸依存的であることを確認するために、3T3/MUC1 および HCT116/MUC1 細胞を neuraminidase 処理し、細胞表面のシアル酸の除去を試みた。シアル酸の除去の確認は、 $\alpha$ 2-3 結合シアル酸を認識する MAM レクチンの結合を調べた。3T3/MUC1 細胞の場合はほぼ完全に MAM の結合活性が消失したが、HCT116/MUC1 細胞の場合はコントロールレベルまでは下がらなかった。立体的障害も原因のひとつと考えられる ( 図 15B )。また、neuraminidase 処理を行った細胞の細胞抽出液を電気泳動し、ウエスタンブロッティング後に、抗 MUC1-ND 抗体を用いて MUC1 を検出した ( 図 15C )。いずれの細胞においても neuraminidase 処理により、MUC1-ND の分子サイズが見かけ上、増加した。これは MUC1 上の糖鎖に多数存在するシアル酸の切断によりシアル酸に由来する陰性荷電が減少することから、電気泳動において移動度が減少するためと考えられる。次に、MUC1 発現細胞を neuraminidase 処理することによる Siglec-9 の結合の減少を可溶性 Siglec-9 を用いた FACS により検討した。Neuraminidase 処理により、Siglec-9 の結合が完全に消失している

ことを確認した(図 15D)。3T3/MUC1 細胞または HCT116/MUC1 細胞と HEK293/Siglec-9 または HEK293/mock 細胞を混合し、37°C で 20 分間インキュベーション後、細胞抽出液を得た。得られた抽出液より、抗 MUC1-CD 抗体を用いて免疫沈降し、共沈する  $\beta$ -catenin を上述した方法により検出した(図 16A)。両 MUC1 発現株は共に Siglec-9 発現細胞と混合した場合において、MUC1-CD への  $\beta$ -catenin のリクルートが見られ、また、neuraminidase 処理した細胞では、MUC1-CD への  $\beta$ -catenin のリクルートは消失した(図 16B)。これらのことから、膜結合型分子間の相互作用によっても、MUC1 のシグナル伝達が惹起されることがわかった。さらにそのシグナル伝達には、シアル酸が必須で、Siglec-9 をカウンターレセプターとするシグナル伝達であることが再確認された。

### 3-2-6. Siglec-9 の結合によるリン酸化 $\beta$ -catenin の減少と $\beta$ -catenin の核移行の亢進

$\beta$ -Catenin は癌細胞の悪性化に重要な因子であり、 $\beta$ -catenin 自体の安定化あるいは分解は癌細胞にとって重要な意味をもつ。 $\beta$ -Catenin はリン酸化されると最終的に分解されることが知られている。また、 $\beta$ -catenin は核に移行し、その生物学的機能を発揮することから、Siglec-9 の MUC1 への結合後の  $\beta$ -catenin の挙動について検討した。3T3/MUC1 細胞および 3T3/mock 細胞を可溶性 Siglec-9 存在下または非存在下で 40 分間培養後、細胞を回収し、細胞抽出液を得た。細胞抽出液を電気泳動し、ウエスタンブロッティング後に、抗リン酸化  $\beta$ -catenin 抗体により、リン酸化  $\beta$ -catenin を検出し、バンドの濃さを比較した。3T3/mock 細胞では Siglec-9 の処理の有無に関わらず、リン酸化  $\beta$ -catenin の割合は変化しなかったが、3T3/MUC1 細胞においては、Siglec-9 処理により、リン酸化  $\beta$ -catenin の割合が未処理と比較して減少していることがわかった(図 17A, B)。この結果は、Siglec-9 が MUC1 と結合することにより、 $\beta$ -catenin の MUC1-CD へのリクルートが亢進することにより、GSK-3 $\beta$  による  $\beta$ -catenin のリン酸化を阻害し、それに続くユビキチン化、さらにはプロテアソームによる分解が抑制されることを示唆し、より悪性の形質転換に寄与しているものと考えられる。次に、MUC1-CD にリクルートされた  $\beta$ -catenin の核移行について、細胞染色および生化学的手法により検討した。3T3/MUC1 細胞を Siglec-9 存在下または非存在下で 37°C, 1 時間培養した後、細胞を固定し、核を PI により、 $\beta$ -catenin を抗  $\beta$ -catenin 抗体および蛍光標識した二次抗体を用いて染色した。Siglec-9 未処理の細胞では、 $\beta$ -catenin は細胞質に多く存在し、Siglec-9 処理した細胞では、 $\beta$ -catenin の核への移行が見られた(図 18A)。次に、同様に処理した細胞より、細胞質画分と核画分を分離し、それぞれの画分を電気泳動し、ウエスタンブロッティング後に細胞質マーカーの I $\kappa$ B- $\alpha$ 、核マーカーの Histone 2B の抗体を用いて、それぞれのタンパク質を検出し、それぞれの画分に相互の混入が無いことを確認した(図 18B, lane a, b)。分離した核画分の抽出液に抗  $\beta$ -catenin 抗体

を用いて免疫沈降を行い、沈降物を電気泳動し、ウエスタンブロッティング後に  $\beta$ -catenin を検出した。核に移行した  $\beta$ -catenin は Siglec-9 処理により明らかに増加したことがわかった ( 図 18C, lane b )。また、 $\beta$ -catenin と MUC1-CD の共局在についても、それぞれの蛍光標識抗体で染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察した。Siglec-9 未処理の細胞においては、両分子は核内には見られず、細胞膜の細胞質側および細胞質に分布していた。一方、Siglec-9 で処理した細胞では、核において両分子の共局在が観察された ( 図 19A )。これらのことから、Siglec-9 の MUC1 への結合後に、リクルートされた  $\beta$ -catenin は MUC1-CD と共に複合体の形で核に移行したものと考えられる。次に、Siglec-9 の結合による 3T3/MUC1 細胞の増殖・生存能に対する影響について検討した。無血清の培養液中、Siglec-9 存在下で 3T3/MUC1 細胞を 20 分間培養し、その後 10% 血清を含む培養液中で 72 時間まで培養した。24 時間経過時に一部細胞を回収し、細胞抽出液を電気泳動し、ウエスタンブロッティング後に抗 c-myc 抗体を用いて c-myc を検出したところ、Siglec-9 処理した細胞において c-myc の発現の亢進がみられた ( 図 19B )。また、48, 72 時間後の細胞について、MTT assay を行ったところ、Siglec-9 による増殖・生存能の亢進が確認された ( 図 19C )。

### 3-3. 考察

免疫細胞は細胞表面に多くのレクチンを発現しているが、中でも **Siglec family** はシアログリカンを認識することから **MUC1** 上に発現する **O-グリカン** は好適なリガンド糖鎖となることが予想された [98,99]。また、癌組織微小環境においては癌細胞と浸潤してきた免疫細胞と相互作用する可能性が高い。そこで、マクロファージや樹状細胞表面に発現している **Siglecs** について、**MUC1-ND** との結合の有無を検討したところ、**Siglec-1, -3** なども含めて多くの **Siglec** が、**MUC1-ND** と結合したが、**Siglec-9** が最も高い結合性を示した ( 図 10A )。 **Siglec-9** の結合糖鎖特異性は比較的広く、 $\alpha$ 2-3 および  $\alpha$ 2-6 結合シアル酸を含む糖鎖に結合することによるものと考えられる。**Siglec-9** は好中球、単球/マクロファージや樹状細胞に広く発現しており [69,100]、実際に、ヒト膀胱癌、乳癌および大腸癌組織に、**Siglec-9** 陽性細胞が散在していることがわかった ( 図 11 )。また、これらの癌組織を形成する癌細胞はすべて **MUC1** 陽性細胞であり、浸潤した **Siglec-9** 陽性細胞と接触している像が得られた。従って、**Siglec-9** は **MUC1** のカウンターレセプターとなり得ると考えられた。

**MUC1** と癌細胞の進展には関連性があることが指摘されてきたが、具体的な分子的背景は増殖因子の受容体への結合が起点となり、**MUC1** はそのシグナルの中継分子としての役割が明らかにされてきた。これらの細胞では **EGFR** あるいは **FGFR** と **MUC1** が細胞膜中で複合体を形成し、実際に両分子を発現する細胞の細胞抽出液より、一方の分子を免疫沈降すると他方の分子が共沈するとされている。そこで、**FGFR** を発現している **3T3/MUC1** あるいは **EGFR** を発現している **HCT116/MUC1** 細胞を用いて共沈実験を試みたが、相互作用は認められなかった ( 図 12B, E )。また、それぞれのリガンドの結合による効果も認められなかった ( 図 12C, D )。さらに、**HCT116/MUC1** 細胞においては **EGFR** シグナル伝達阻害剤の存在下においても **MUC1** を介したシグナル伝達に変化は認められなかった ( 森勇伍ら 未発表データ )。従って、今回明らかにした **MUC1** への **Siglec-9** の結合に伴う  $\beta$ -catenin のリクルートはこれらの増殖因子の受容体に依存しない新規なシグナル伝達経路であることがわかった。

**Siglec-9** の **MUC1-ND** への結合に伴う  $\beta$ -catenin のリクルートは、**MUC1** 強制発現株である **3T3/MUC1**, **HCT116/MUC1** のみならず、**MUC1** 発現細胞の **A549** 細胞でも認められた ( 図 13A )。従って、**MUC1** の強制発現に伴う特異な現象ではないことがわかった。**MUC1-CD** をリン酸化するキナーゼとしては、**c-Src**, **Lck**, **Lyn** が知られている。その内、**3T3/MUC1** 細胞には、**c-Src** と **Lck** が存在したが、可溶型の **Siglec-9** の結合に伴い **MUC1-CD** と共沈したのは **c-Src** であった ( 図 14A )。 **c-Src** の阻害剤である **PP2** で処理すると、**MUC1-CD** への  $\beta$ -catenin のリクルートが抑制されたことから、**c-Src** の介在す

るシグナル伝達であることがわかった(図 14B, C)。すなわち、Siglec-9 の結合に伴い、c-Src による MUC1-CD のリン酸化が  $\beta$ -catenin のリクルートを促進するものと考えられる。これまで、可溶性の Siglec-9 を MUC1 のリガンドとしてきたが、癌組織微小環境においては、マクロファージや樹状細胞上の膜結合型レクチンである Siglec-9 をリガンドとすることが、より生理的状況を反映している。そこで、Siglec-9 を強制発現した HEK293 細胞を作成した(図 15A)。一方で、細胞間同士の相互作用の場合、様々な分子の関与も否定できない。MUC1 上のシアル酸を除去することによるシグナル伝達の消失は Siglec-9 をリガンドとすることの傍証になると考え、3T3/MUC1 および HCT116/MUC1 細胞を neuraminidase 処理し、その効果も検討した。細胞表面からのシアル酸の除去は MAM の結合を FACS で解析することにより確認した(図 15B)。また、MUC1 上のシアル酸の除去は電気泳動で確認した(図 15C)。なお、脱シアル化した MUC1-ND は泳動上高分子側にシフトする。これは、シアル酸の陰性荷電が消失することによる結果と考えられる。また neuraminidase 処理した細胞への可溶性 Siglec-9 の結合の消失も FACS で確認した(図 15D)。図 16 に示すように、両細胞を共培養した場合でも明確に MUC1-CD に  $\beta$ -catenin がリクルートされた。また、neuraminidase 処理により、 $\beta$ -catenin のリクルートが消失したことから、細胞間においても Siglec-9 をカウンターレセプターとして、MUC1 にシグナルが惹起されることがわかった。

MUC1 は巨大分子で、かつ、O-グリカン上のシアル酸の陰性荷電により、棒状分子となることから、細胞膜表面より突出して (~250 nm) 存在する。一般的な接着分子は、20~30 nm [101] であることから、他の細胞表面分子に妨げられることなく、Siglec-9 分子と相互作用できるものと予想される。また、MUC1 上には多くの Siglec-9 リガンド糖鎖を保持していることから、親和性を高める要因と考えられる。一方、Siglec-9 発現細胞においては、同一細胞上に発現しているシスリガンドにより影響を受ける。一般的に、Siglec family はシスリガンドによってマスクされていると考えられている。しかしながら、細胞膜上のシアル酸付加は細胞の生理的状況によって変化する可能性も指摘されている。あるいは MUC1 上のシアログリカンは多価であり、より親和性の強いトランスリガンドには結合する可能性も考えられる。

Siglec-9 の結合により、MUC1-CD に  $\beta$ -catenin がリクルートされたが、これは  $\beta$ -catenin の全体的な代謝に影響を与える可能性があった。上述したように、 $\beta$ -catenin は癌の悪性形質と密接な関係のある因子である。GSK3- $\beta$  により、リン酸化された  $\beta$ -catenin はプロテアソームにより分解されることが知られている [79,80]。また、GSK3- $\beta$  は MUC1-CD の STDRSP<sub>46</sub>YE モチーフと結合し、セリン残基をリン酸化することにより、MUC1 と  $\beta$ -catenin の相互作用を抑制することが報告されている [35,41]。図 17 に示すように、

3T3/MUC1 細胞を可溶性 Siglec-9 により処理すると、リン酸化  $\beta$ -catenin が減少することがわかった。この結果は、Siglec-9 の結合に伴う MUC1-CD への  $\beta$ -catenin のリクルートが  $\beta$ -catenin を安定化させ、分解を防ぐことになり、同時に核移行を促進することにつながるものと考えられる。また、Siglec-9 は、3T3/MUC1 および 3T3/mock 細胞の細胞表面の様々な糖鎖に結合すると予想される。3T3/mock 細胞においては、Siglec-9 の処理の有無に関わらず、リン酸化  $\beta$ -catenin のレベルに差はみられなかった。従って、他の糖タンパク質への Siglec-9 の結合が、少なくとも  $\beta$ -catenin を介したシグナル伝達系には関与していないことを示している。MUC1-CD の核移行については、FGF を起点とするシグナル伝達においても明らかにされているが、その分子的背景は、MUC1-CD 中の CQC モチーフにより、MUC1-CD が二量体化し、Importin  $\beta$  および Nup62 と相互作用することで、核内に移行するとされている [102]。本研究の系においても、 $\beta$ -catenin の核移行が Siglec-9 の処理により、亢進することが、細胞染色および生化学的手法で明確となった (図 18)。また、MUC1-CD と  $\beta$ -catenin の核内における共局在も明らかとなった (図 19A)。さらに、 $\beta$ -catenin シグナル伝達の下流にある細胞周期の促進遺伝子である c-myc の発現が、Siglec-9 の処理により亢進し、事実、細胞増殖が促進された (図 19B,C)。MUC1 を介したシグナル伝達は、増殖因子を起点とするシグナルを中継する分子として、捉えられていたが、本研究において、MUC1 へのレクチンの結合によっても結果的には同様のシグナル伝達が惹起されることがわかった。増殖因子あるいは増殖因子受容体を欠く癌組織においては、MUC1 を介した直接的な作用が機能しているものと考えられる。さらに、Siglec-9 は細胞内に ITIM をもつ抑制性受容体であり、MUC1 の結合が Siglec-9 発現免疫細胞のどのような機能を抑制するかについても興味深い問題である。

以上、癌組織微小環境において、癌細胞自身あるいは間質細胞より産生された Galectin-3 は、オートクラインあるいはパラクライン的に作用し、癌細胞自身の悪性を促進した。また、免疫細胞上の Siglec-9 との相互作用も同様に、腫瘍の増殖を促進した。これらレクチンによる腫瘍悪性化機構を対象とした新たな治療法の開発に繋がることが期待される。



#### 4. 結論

MUC1 は多くの上皮性悪性腫瘍細胞に過剰に発現する膜結合型の糖タンパク質である。細胞表面から突出した分子であることから、物理的なバリアーとしての機能が取り上げられてきた。しかし、この事実は癌微組織小環境において浸潤した免疫細胞上のレクチンや間質に分泌されたレクチン等と容易に相互作用が可能であることを示唆している。

シグナル伝達分子としての MUC1 は増殖因子受容体からのシグナル伝達に付随してシグナルを中継する分子として限定されてきた。本研究はレクチンとの結合によるシグナル伝達の可能性について検討した。レクチンとしては多くの癌細胞でその産生が増加することが知られている Galectin-3 と免疫細胞上に発現する Siglec-9 を取り上げ以下の様な結果を得た。

- 1) ヒト癌組織標本を用いて Siglec-9 陽性細胞が MUC1 陽性癌組織に混在し、両分子の相互作用の可能性を示唆した。
- 2) Galectin-3 および可溶型 Siglec-9 と MUC1-ND との結合は、プルダウンアッセイやプレートアッセイにより確認された。
- 3) Galectin-3 の MUC1 への結合により、 $\beta$ -catenin が MUC1-CD にリクルートされることがわかった。
- 4) 可溶型 Siglec-9 によっても MUC1-CD に  $\beta$ -catenin がリクルートされることがわかった。
- 5) 4) の現象は、c-Src 阻害剤の PP2 により阻害されることから、刺激に伴い c-Src により MUC1-CD がリン酸化され、 $\beta$ -catenin のリクルートが促進されるものと考えられる。
- 6)  $\beta$ -catenin のリクルート後、MUC1-CD/ $\beta$ -catenin 複合体は核に輸送された。
- 7)  $\beta$ -catenin 経路の下流にある c-myc が誘導され、細胞の増殖が促進された。

以上の結果より、MUC1 は、従来、明らかにされてきた増殖因子受容体を中継するシグナル伝達分子としての機能に加えて、Alternative pathway として、レクチンの結合に伴うシグナル伝達分子の機能も持つことがわかった。従って、本研究は、増殖因子を起点とするシグナル伝達を増強したり、あるいは、増殖因子またはその受容体の発現が乏しい癌細胞においても癌細胞の増殖を担う経路となることが考えられる。

## 5. 謝辞

本研究を行うにあたり、御懇意なる御指導と御鞭撻を承りました 恩師 京都産業大学 工学部（現 総合生命科学部）中田 博 教授 に深甚な謝意を表します。

本研究において、癌および正常組織標本の提供と病理学的観点からの御助言を賜りました 大阪市立大学大学院 医学研究科 腫瘍外科学講座（外科学第一）八代 正和 先生、澤田 鉄二 先生、平川 弘聖 先生に深く感謝致します。

さらに、本研究に種々の有益なる御助言を賜りました 秋田 薫 氏、藤本 祥彰 氏、藤本（太田）麻利子 氏、石田 有希子 氏、井上 瑞江氏、戸田 宗豊 氏、藤本 崇宏 氏、木村（竹内）紀子 氏、吉田 周平 氏、圓山 浩二 氏、中嶋 章雄 氏、万木 肇 氏、荒木 大介 氏、荒木 佳奈子 氏、橋本（谷口）絢美 氏、堀江 信貴 氏、中川 裕介 氏、江川 顕弘 氏、清水 磨奈美 氏、鈴木 孝正 氏、友田 育美 氏、新田 和也 氏、浅野 慶太 氏、池田 心平 氏、伊澤 英記 氏、中山 龍彦 氏、森 勇伍 氏、奥村 蓉子 氏、笹野 昂太 氏、堀田 美夕紀 氏、和澤 元 氏、音川 豊香 氏、田中 みなみ 氏、寺石 幸祐 氏、西尾 隆男 氏、竹内 香奈 氏、田中 涼太 氏、廿日岩 美穂 氏、見掛 ほなみ 氏、芦田 笑里 氏、北尾 美里 氏、北山 英輝 氏、溝上 侑也 氏、小川 翔平 氏、中嶋 祐太 氏、山口 萌 氏に深く感謝致します。

## 6. 引用文献

1. 中田博. わかる実験医学シリーズ ポストゲノム時代の糖鎖生物学がわかる (谷口直之編). (2002) 羊土社., 37-43.
2. 中田博. 上皮性がん細胞の産生するムチンの特徴と腫瘍組織における生物学的意義. (2005) 生化学 第77巻 第7号., 642-546.
3. 石田秀治・池北雅彦・掛樋一晃・木曾眞・北島健・木全弘治・古川鋼一・堀戸重臣・宮坂昌之ほか鈴木康夫監訳. 糖鎖生物学 (2003) 丸善株式会社
4. Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Furukawa H, Ishikawa O, Sasaki Y, Kabuto T, Iwanaga T, Matsushita Y, Irimura T. (1993). "Increased expression of sialyl Lewisx antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma : clinicopathological and immunohistochemical study." *Cancer Res.* **53**(15):3632-7.
5. Nakada H, Numata Y, Inoue M, Tanaka N, Kitagawa H, Funakoshi I, Fukui S, Yamashina I. (1991). "Elucidation of an essential structure recognized by an anti-GalNAc alpha-Ser(Thr) monoclonal antibody(MLS 128)." *J. Biol. Chem.* **266**(19):12402-5.
6. Nakada H, Inoue M, Numata Y, Tanaka N, Funakoshi I, Fukui S, Mellors A, Yamashina I. (1993). "Epitopic structure of Tn glycoprotein A for an anti-Tn antibody(MLS 128)." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**(6):2495-9.
7. Inoue M, Nakada H, Tanaka N, Yamashina I. (1994). "Tn antigen is expressed on leukosialin from T-Lymphoid cells." *Cancer Res.* **54**(1):85-8.
8. Tanaka N, Nakada H, Inoue M, Yamashina I. (1999). "Binding characteristics of an anti-Sialpha2-6GalNAc alpha-Ser/Thr(Sialyl Tn) monoclonal antibody(MLS 132)." *Eur. J. Biochem.* **263**(1):27-32.
9. Kitagawa H, Nakada H, Numata Y, Kurosaka A, Fukui S, Funakoshi I, Kawasaki T, Yamashina I. (1988). "A monoclonal antibody that recognizes sialyl-Lea oligosaccharide, but is distinct from NS 19-9 as to epitope recognition." *J. Biochem.* **104**(5):817-21.
10. Inaba T, Sano H, Kawahito Y, Hla T, Akita K, Toda M, Yamashina I, Inoue M, Nakada H. (2003). "Induction of cyclooxygenase-2 in monocyto/macrophage by mucins secreted from colon cancer cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**(5):2736-41.
11. Yokoigawa N, Takeuchi N, Toda M, Inoue M, Kaibori M, Yanagida H, Tanaka H, Ogura T, Takada H, Okumura T, Kwon AH, Kamiyama Y, Nakada H. (2005). "Enhanced production of interleukin 6 in peripheral blood monocytes stimulated with mucins secreted into the bloodstream." *Clin. Cancer Res.* **11**(17):6127-32.

12. Sugihara I, Yoshida M, Shigenobu T, Takagi H, Maruyama K, Takeuchi N, Toda M, Inoue M, Nakada H. (2006). "Defferent progression of tumor xenografts between mucin-producing and mucin-non-producing mammary adenocarcinoma-bearing mice." *Cancer Res.* **66**(12):6175-82.
13. 中田博. 糖鎖科学の新展開 (谷口直之監修). (2005) NTS. , 11-17
14. 中田博. 遺伝子医学 MOOK3 糖鎖と病気 (谷口直之編). (2005) メディカルドゥ., 80-81.
15. Tsujii M. and R.N.DuBois (1995). "Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2." *Cell* **83**(3):493-501.
16. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. (1998). "Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells." *Cancer Res.* **58**(2):362-6.
17. Plescia OJ, Smith AH, Grinwich K. (1975). "Subversion of immune system by tumor cells and role of prostaglandins." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**(5):1848-51.
18. Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, Jothy S. (1995). "Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer." *Cancer Res.* **55**(12):2556-9.
19. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. (1998). "Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells." *Cell* **93**(5):705-16.
20. Ishida A, Ohta M, Toda M, Murata T, Usui T, Akita K, Inoue M, Nakada H. (2008). "Mucin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells during maturation." *Proteomics.* **8**(16):3342-9.
21. Ohta M, Ishida A, Toda M, Akita K, Inoue M, Yamashita K, Watanabe M, Murata T, Usui T, Nakada H. (2010) "Immunomodulation of monocyte-derived dendritic cells through ligation of tumor-produced mucins to Siglec-9." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **402**(4):663-9.
22. Toda M, Hisano R, Yurugi H, Akita K, Maruyama K, Inoue M, Adachi T, Tsubata T, Nakada H. (2009). "Ligation of tumor-produced mucins to CD22 dramatically impairs splenic marginal zone B cells." *J. Biochem.* **417**(3):673-83.
23. Toda M, Akita K, Inoue M, Taketani S, Nakada H. (2008). "Downmodulation of B cell signal transduction by ligation of mucins to CD22." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**(1):45-50
24. Kufe D, Inghirami G, Abe M, Hayes D, Justi-Wheeler H, Schlom J. (1984). "Differential reactivity of novel monoclonal antibody(DF3) with human malignant versus benign breast tumors." *Hybridoma.* **3**(3):223-32.
25. Croce MV, Isla-Larrain MT, Rua CE, Rabassa ME, Gendler SJ, Segal-Eiras A. (2003). "Pattarns of MUC1 tissue expression defined by an anti-MUC1 cytoplasmic tail monoclonal antibody in breast cancer." *J. Histochem. Cytochem.* **51**(6):781-8.

26. Ligtenberg MJ, Krujshaar L, Buijs F, van Meijer M, Litvinov SV, Hilkens J. (1992). "Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor." *J. Biol. Chem.* **267**(9):6171-7.
27. Levitin F, Stern O, Weiss M, Gil-Henn C, Ziv R, Prokocimer Z, Smorodinsky NI, Rubinstein DB, Wreschner DH. (2005). "The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain." *J. Biol. Chem.* **280**(39):33374-6.
28. Macao B, Johansson DG, Hansson GC, Hard T. (2006). "Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin." *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**(1):71-6.
29. Merlo GR, Siddiqui J, Cropp CS, Liscia DS, Lidereau R, Callahan R, Kufe DW. (1989). "DF3 tumor-associated antigen gene is located in a region on chromosome 1q frequently altered in primary human breast cancer." *Cancer Res.* **49**(24 Pt 1):6966-71.
30. Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Rothbard J, Burchell JA. (1988). "A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats." *J. Biol. Chem.* **263**(26):12820-3.
31. Siddiqui J, Abe M, Hayes D, Shani E, Yunis E, Kufe D. (1988). "Isolation and sequencing of cDNA coding for the human DF3 breast carcinoma-associated antigen." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**(7):2320-3.
32. Huang L, Ren J, Chen D, Li Y, Kharbanda S, Kufe D. (2003). "MUC1 cytoplasmic domain coactivates Wnt target gene transcription and confers transformation." *Cancer Biol. Ther.* **2**(6):702-6.
33. Li Y, Ren J, Yu W, Li Q, Kuwahara H, Yin L, Carraway KL 3rd, Kufe D. (2001). "The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin." *J. Biol. Chem.* **276**(38):35239-42.
34. Li Y, Kuwahara H, Ren J, Wen G, Kufe D. (2001). "The c-Src tyrosine kinase regulates signaling of the human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen with GSK3beta and beta-catenin." *J. Biol. Chem.* **276**(9):6061-4.
35. Li Y, Bharti A, Chen D, Gong J, Kufe D. (1998). "Interaction of glycogen synthase kinase 3beta with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin." *Mol. Cell. Biol.* **18**(12):7216-24.
36. Raina D, Ahmad R, Kumar S, et al. (2006). "MUC1 oncoprotein blocks nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage." *EMBO. J.* **25**(16):3774-83.
37. Ren J, Li Y, Kufe D. (2002). "Protein kinase Cdelta regulates function of DF3/MUC1 carcinoma

- antigen in beta-catenin signaling." *J. Biol. Chem.* **277**(20):17616-22.
38. Singh PK, Wen Y, Swanson BJ, Shanmugam K, Kazlauskas A, Cerny RL, Gendler SJ, Hollingsworth MA. (2007). "Platelet-derived growth factor receptor beta-mediated phosphorylation of MUC1 enhances invasiveness in pancreatic adenocarcinoma cells." *Cancer Res.* **67**(11):5201-10.
39. Ren J, Raina D, Chen W, Li G, Huang L, Kufe D. (2006). "MUC1 oncoprotein functions in activation of fibroblast growth factor receptor signaling." *Mol. Cancer Res.* **4**(11):873-83.
40. Huang L, Chen D, Liu D, Yin L, Kharbanda S, Kufe D. (2005). "MUC1 oncoprotein blocks GSK3beta-mediated phosphorylation and degradation of beta-catenin." *Cancer Res.* **65**(22):10413-22.
41. Li Y, Chen W, Ren J, Yu WH, Li Q, Yoshida K, Kufe D. (2003). "DF3/MUC1 signaling in multiple myeloma cells is regulated by interleukin-7." *Cancer Biol. Ther.* **2**(2):187-93.
42. Li Y, Yu WH, Ren J, Chen W, Huang L, Kharbanda S, Loda M, Kufe D. (2003). "Heregulin targets gamma-catenin to the nucleolus by a mechanism dependent on the DF3/MUC1 protein." *Mol. Cancer Res.* **1**(10):765-75.
43. Li Y, Liu D, Chen D, Kharbanda S, Kufe D. (2003). "Human DF3/MUC1 carcinoma-associated protein functions as an oncogene." *Oncogene.* **22**(38):6107-10.
44. Wen Y, Caffrey TC, Wheelock MJ, Johnson KR, Hollingsworth MA. (2003). "Nuclear association of the cytoplasmic tail of MUC1 and beta-catenin." *J. Biol. Chem.* **273**(39):38029-39.
45. Ren J, Agata N, Chen D, Li Y, Yu WH, Huang L, Raina D, Chen W, Kharbanda S, Kufe D. (2004). "Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anti-cancer agents." *Cancer Cell.* **5**(2):163-75.
46. Wei X, Xu H, Kufe D. (2005). "Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response." *Cancer Cell.* **7**(2):167-78.
47. Raina D, Kharbanda S, Kufe D. (2004). "The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic PI3K/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts." *J. Biol. Chem.* **279**(20):20607-12.
48. Meerzaman D, Shapiro PS, Chul Kim K. (2001). "Involvement of the MAP kinase ERK2 in MUC1 mucin signaling." *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **281**(1):86-91.
49. Satoh S, Hinoda Y, Hayashi T, Burdick MD, Imai K, Hollingsworth MA. (2000). "Enhancement of metastatic properties of pancreatic cancer cells by MUC1 gene encoding an anti-adhesion molecule." *Int. J. Cancer.* **88**(4):507-18.
50. Schroeder JA, Adriance MC, Thompson MC, Camenisch TD, Gendler SJ. (2003). "MUC1 alters beta-catenin-dependent tumor formation and promotes cellular invasion." *Oncogene.* **22**(9):1324-32.
51. Yin L, Huang L, Kufe D. (2004). "MUC1 oncoprotein activates the FOXO3a transcription factor in a survival response to oxidative stress." *J. Biol. Chem.* **279**(44):45721-7.

52. Li Yin, Li Y, Ren J, Kuwahara H, Kufe D. (2003). "Human MUC1 carcinoma antigen regulates intracellular oxidant levels and the apoptotic response to oxidative stress." *J. Biol. Chem.* **278**(37):35458-64.
53. Rahn JJ, Shen Q, Mah BK, Hugh JC. (2004) "MUC1 initiates a calcium signal after ligation by intercellular adhesion molecule-1." *J. Biol. Chem.* **279**(28):29386-90.
54. Shen Q, Rahn JJ, Zhang J, Gunasekera N, Sun X, Shaw AR, Hendzel MJ, Hoffman P, Bernier A, Hugh JC. (2008) "MUC1 initiates Src-CrkL-Rac1/Cdc42-mediated actin cytoskeletal protrusive motility after ligating intercellular adhesion molecule-1." *Mol Cancer Res.* **6**(4):555-67.
55. Kiertscher SM, Luo J, Dubinett SM, Roth MD. (2000). "Tumor promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells." *J. Immunol.* **164**(3):20607-12.
56. Rughetti A, Pellicciotta I, Biffoni M, Bäckström M, Link T, Bennet EP, Clausen H, Noll T, Hansson GC, Burchell JM, Frati L, Taylor-Papadimitriou J, Nuti M. (2005). "Recombinant tumor-associated MUC1 glycoprotein impairs the differentiation and function of dendritic cells." *J. Immunol.* **174**(12):7764-72.
57. N.シャロン・H.リス・レクチン 第2版 歴史、構造・機能から応用まで (2006) シュブリンガー・フェアラーク東京株式会社., 305-308
58. Gritzmacher CA, Robertson MW, Liu FT. (1988) "IgE-binding protein. Subcellular location and gene expression in many murine tissues and cells." *J. Immunol.* **141**(8):2801-6.
59. Yu F, Finley RL, Raz A, Kim HR. (2002) "Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation." *J. Biol. Chem.* **277**(18):15819-27.
60. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. (1996) "Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(13):6737-42.
61. Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. (1995) "Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(4):1213-7.
62. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. (2002) "Intracellular functions of galectins." *Biochim. Biophys. Acta.* **1572**(2-3):263-73.60.
63. Hughes RC. (2001) "Galectins as modulators of cell adhesion." *Biochimie.* **83**(7):667-76.
64. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. (2002) "Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?" *Trends Immunol.* **23**(6):313-20.
65. Liu FT, Rabinovich GA. (2005) "Galectins as modulators of tumour progression." *Nat. Rev. Cancer.* **5**(1):29-41.

66. Iurisci I, Tinari N, Natoli C, Angelucci D, Cianchetti E, Iacobelli S. (2000) "Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients." *Clin. Cancer Res.* **6**(4):1389-93.
67. Takenaka Y, Fukumori T, Raz A. (2004) "Galectin-3 and metastasis." *Glycoconj. J.* **19**(7-9):543-9.
68. Crocker PR. (2004). "CD33-related siglecs in immune system." *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. Vol. **16** NO.91., 357-370.
69. Zhang JQ, Nicoll G, Jones C, Crocker PR. (2000). "Siglec-9, a novel sialic acid binding member of the immunoglobulin superfamily expressed broadly on human blood leukocytes." *J. Biol. Chem.* **275**(29):22121-6.
70. Blixt O, Collins BE, van de Nieuwenhof IM, Crocker PR, Paulson JC. (2003). "Sialoside specificity of the siglec family assessed using novel multivalent probes." *J. Biol. Chem.* **278**(33):31007-19.
71. 山地俊之・川口しのぶ・中川和博・橋本康弘. 遺伝子医学 MOOK3 糖鎖と病気 (谷口直之編). (2005) メディカルドゥ., 130-137.
72. Yurugi H, Tanida S, Akita K, Ishida A, Toda M, Nakada H. (2013) "Prohibitins function as endogenous ligands for Siglec-9 and negatively regulate TCR signaling upon ligation." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **434**(2):376-81.
73. Polakis P. (2000). "Wnt signaling and cancer." *Genes Dev.* **14**(15):1837-51.
74. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H. (1997). "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC<sup>-</sup>-colon carcinoma" *Science.* **275**(5307):1784-7.
75. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." *Science.* **275**(5307):1787-90.
76. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. (1996). "Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly." *Science.* **272**(5264):1023-6.
77. Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P. (1995). "Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli(APC) tumor-suppressor protein." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**(7):3046-50.
78. Zeng L, Fagotto F, Zhang T, Hsu W, Vasicek TJ, Perry WL 3<sup>rd</sup>, Lee JJ, Tilghman SM, Gumbiner BM, Costantini F. (1997). "The mouse fused locus encodes axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation." *Cell.* **90**(1):181-92.
79. Lui C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. (2002). "Control of



- beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism." *Cell Press*. **108**(6):837-47.
80. Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW. (1997). "Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin." *J. Biol. Chem.* **272**(40):24735-8.
81. Latres E, Chiaur DS, Pagano M. (1999). "The human F box protein beta-Trcp associates with the Cull1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin." *Oncogene*. **18**(4):849-54.
82. Liu C, Kato Y, Zhang Z, Do VM, Yankner BA, He X. (1999). "beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates xenopus axis formation." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**(11):6273-8
83. Kitagawa M, Hatakeyama S, Shirane M, Matsumoto M, Ishida N, Hattori K, Nakamichi I, Kikuchi A, Nakayama K, Nakayama K. (1999). "An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin." *EMBO J.* **18**(9):2401-10.
84. Halwani R, Cen S, Javanbakht H, Saadatmand J, Kim S, Shiba K, Kleiman L. (2004) "Cellular distribution of Lysyl-tRNA synthetase and its interaction with Gag during human immunodeficiency virus type 1 assembly." *J Virol.* **78**(14):7553-64.
85. Yu LG, Andrews N, Zhao Q, McKean D, Williams JF, Connor LJ, Gerasimenko OV, Hilkens J, Hirabayashi J, Kasai K, Rhodes JM. (2007) "Galectin-3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion." *J. Biol. Chem.* **282**(1):773-81.
86. Ramasamy S, Duraisamy S, Barbashov S, Kawano T, Kharbanda S, Kufe D. (2007) "The MUC1 and galectin-3 oncoproteins function in a microRNA-dependent regulatory loop." *Mol. Cell.* **27**(6):992-1004.
87. Roff CF, Wang JL. (1983) "Endogenous lectins from cultured cells. Isolation and characterization of carbohydrate-binding proteins from 3T3 fibroblasts." *J. Biol. Chem.* **258**(17):10657-63.
88. Nieminen J, Kuno A, Hirabayashi J, Sato S. (2007) "Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer." *J. Biol. Chem.* **282**(2):1374-83.
89. Lillehoj EP, Kim H, Chun EY, Kim KC. (2004) "Pseudomonas aeruginosa stimulates phosphorylation of the airway epithelial membrane glycoprotein Muc1 and activates MAP kinase." *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **287**(4):L809-15.
90. Al Masri A, Gendler SJ. (2005) "Muc1 affects c-Src signaling in PyV MT-induced mammary tumorigenesis." *Oncogene*. **24**(38):5799-808.

91. Mukherjee P, Tinder TL, Basu GD, Gendler SJ. (2005) "MUC1 (CD227) interacts with Ick tyrosine kinase in Jurkat lymphoma cells and normal T cells." *J. Leukoc. Biol.* **77**(1):90-9.
92. Ochieng J, Platt D, Tait L, Hogan V, Raz T, Carmi P, Raz A. (1993) "Structure-function relationship of a recombinant human galactoside-binding protein." *Biochemistry.* **32**(16):4455-60.
93. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. (1994) "Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins." *J. Biol. Chem.* **269**(33):20807-10.
94. Ahmad N, Gabius HJ, André S, Kaltner H, Sabesan S, Roy R, Liu B, Macaluso F, Brewer CF. (2004) "Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes." *J. Biol. Chem.* **279**(12):10841-7.
95. Furtak V, Hatcher F, Ochieng J. (2001) "Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**(4):845-50.
96. Partridge EA, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Pawling J, Cheung P, Granovsky M, Nabi IR, Wrana JL, Dennis JW. (2004) "Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis." *Science.* **306**(5693):120-4.
97. Tadokoro T, Ikekita M, Toda T, Ito H, Sato T, Nakatani R, Hamaguchi Y, Furukawa K. (2009) "Involvement of Galectin-3 with vascular cell adhesion molecule-1 in growth regulation of mouse BALB/3T3 cells." *J. Biol. Chem.* **284**(51):35556-63.
98. Varki A, Angata T. (2006) "Siglecs--the major subfamily of I-type lectins." *Glycobiology.* **16**(1):1R-27R.
99. Angata T, Varki A. (2000) "Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of siglec-9, a new member of the CD33-related group of siglecs. Evidence for co-evolution with sialic acid synthesis pathways." *J. Biol. Chem.* **275**(29):22127-35.
100. Lock K, Zhang J, Lu J, Lee SH, Crocker PR. (2004) "Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells." *Immunobiology.* **209**(1-2):199-207.
101. Becker JW, Erickson HP, Hoffman S, Cunningham BA, Edelman GM. (1989) "Topology of cell adhesion molecules." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**(3):1088-92.
102. Leng Y, Cao C, Ren J, Huang L, Chen D, Ito M, Kufe D. (2007) "Nuclear import of the MUC1-C oncoprotein is mediated by nucleoporin Nup62." *J. Biol. Chem.* **282**(27):19321-30.

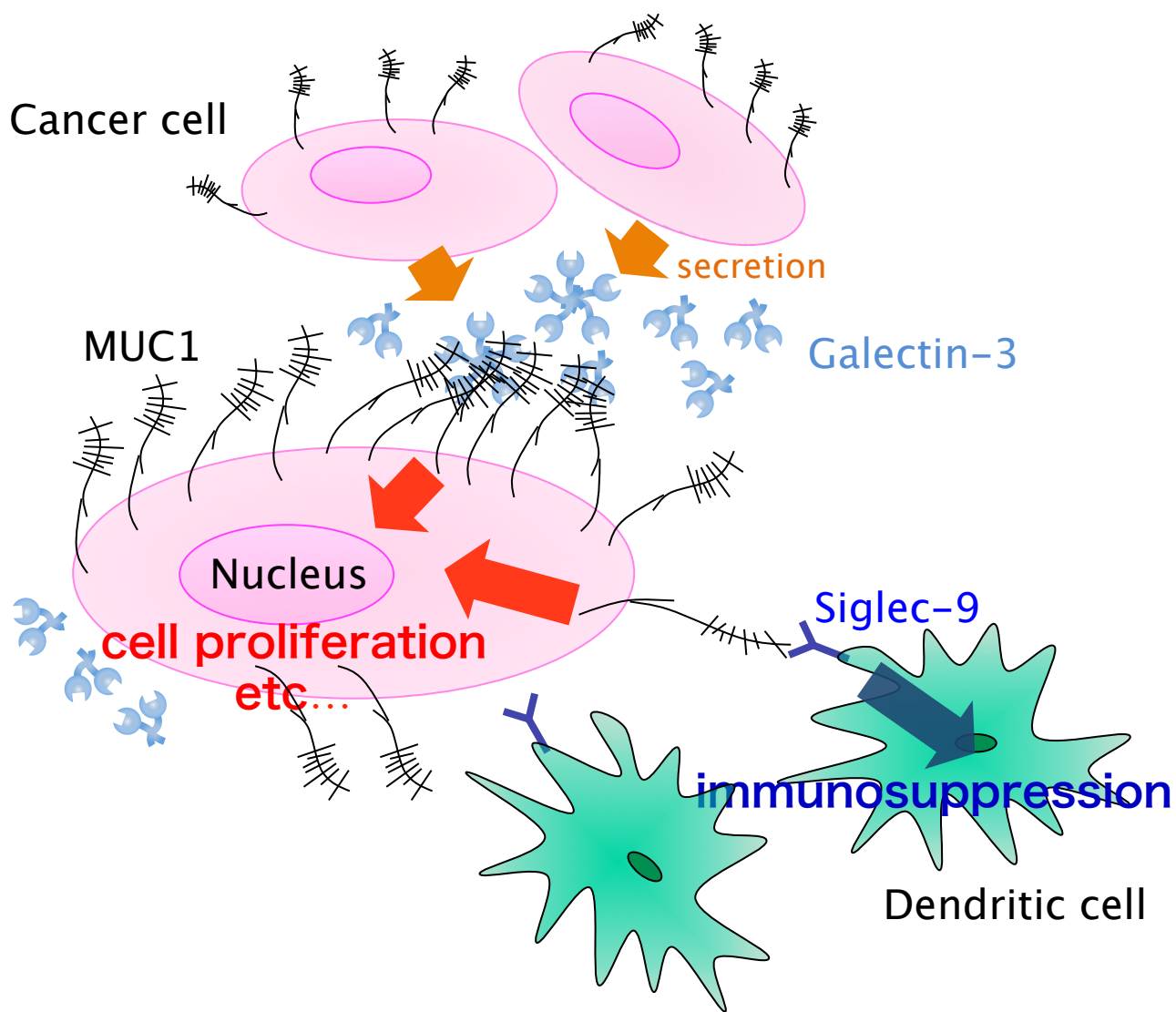


図1 癌組織微小環境における、癌細胞とレクチンの相互作用の模式図

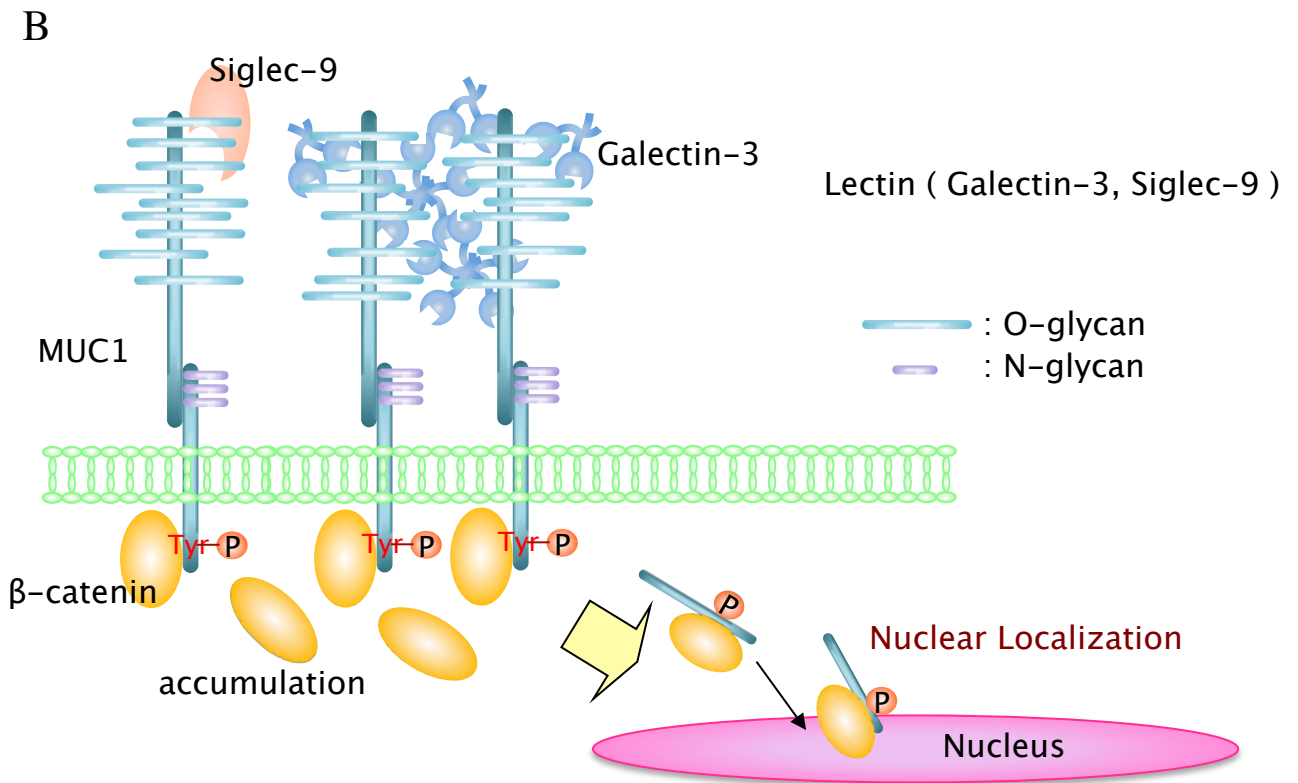
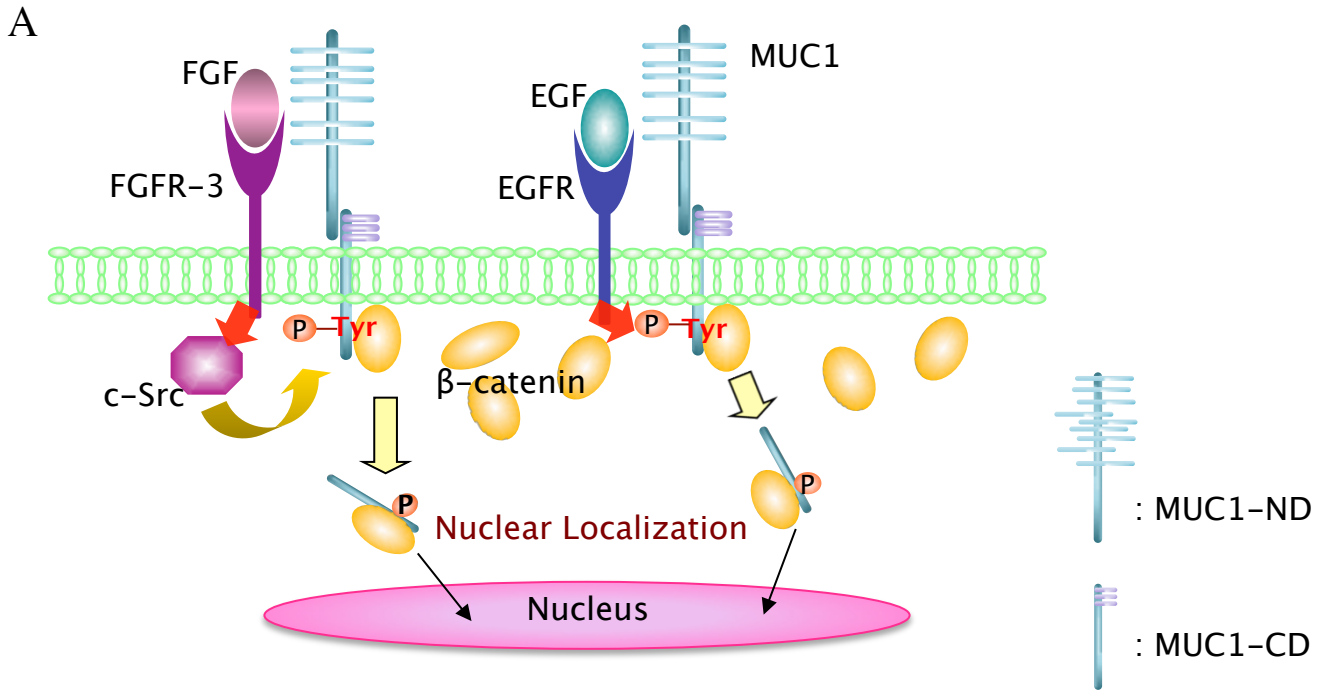


図2 MUC1を介した増殖因子を起点とするシグナル伝達の模式図(A)とレクチンを起点とするシグナル伝達の想定図(B)

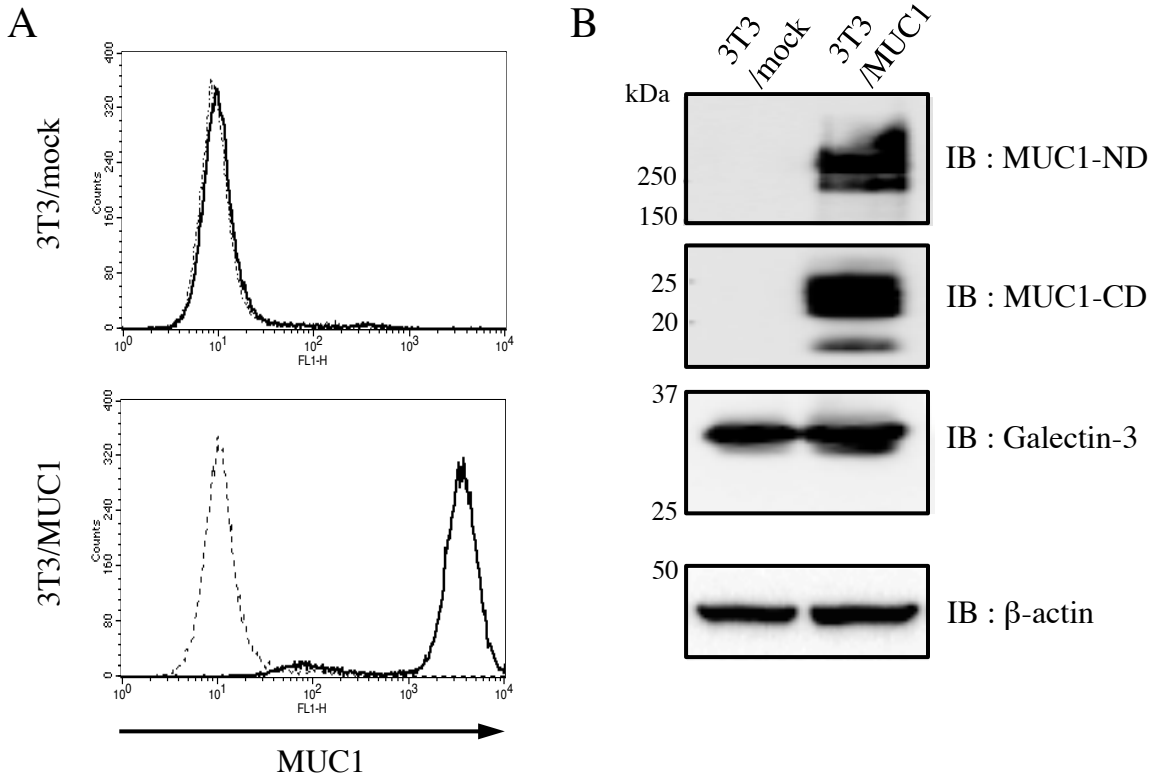


図3 3T3/MUC1, 3T3/mock 細胞における、MUC1 と Galectin-3 の発現

A : 3T3/MUC1, 3T3/mock 細胞を、抗 MUC1-ND 抗体 (—) および FITC 標識二次抗体で処理し、FACS により解析した。コントロール抗体 (----)

B : 3T3/MUC1, 3T3/mock 細胞の細胞抽出液を電気泳動後、ウエスタンブロッティングし、抗 MUC1-ND 抗体, 抗 MUC1-CD 抗体, 抗 Galectin-3 抗体, 抗  $\beta$ -actin 抗体を用いて検出した。

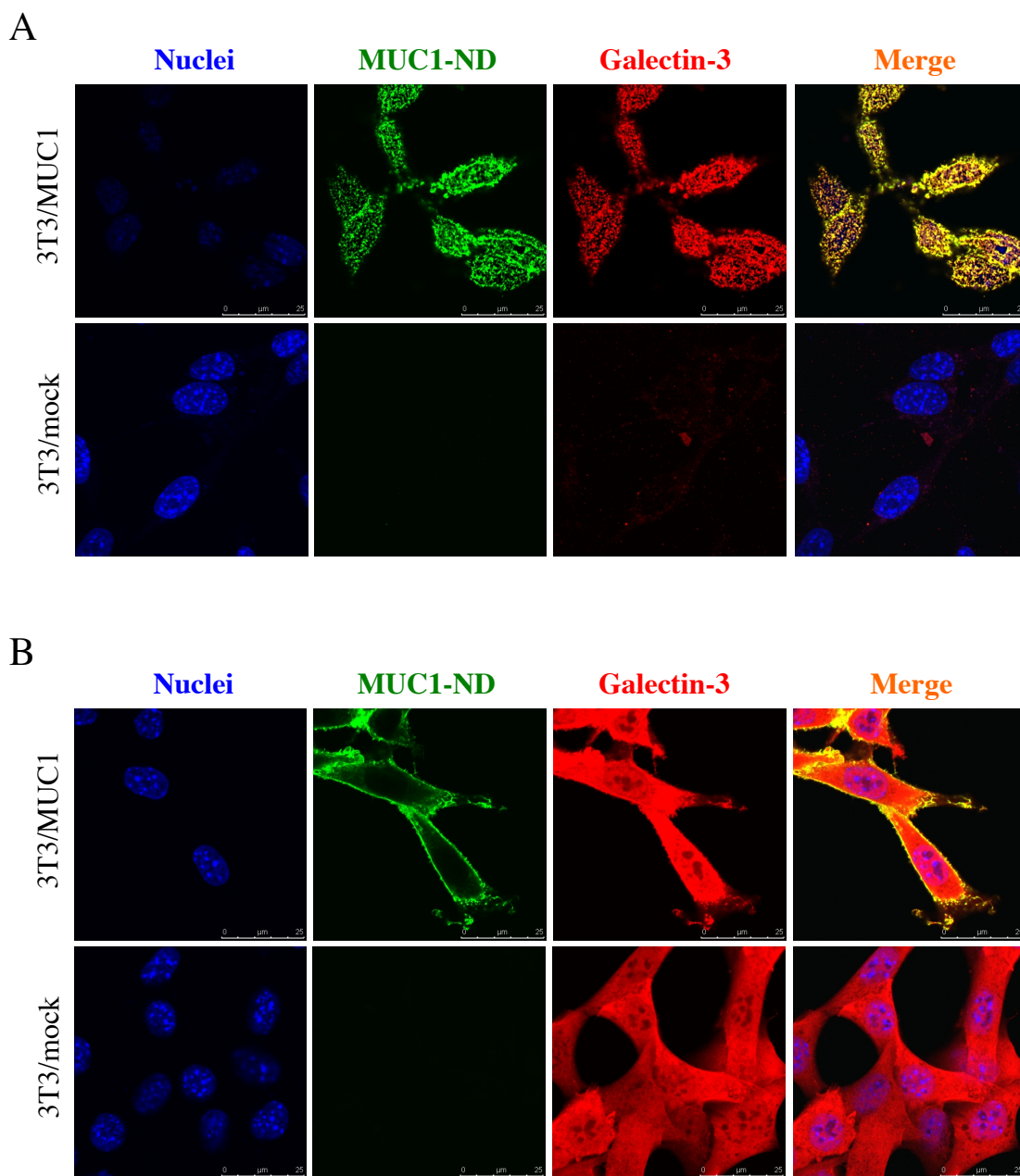


図4 3T3/MUC1, 3T3/mock 細胞における Galectin-3 の分布

A: 3T3/MUC1, 3T3/mock 細胞を、抗 MUC1-ND 抗体と Alexa Fluor<sup>®</sup>-488 標識二次抗体および、抗 Galectin-3 抗体と Alexa Fluor<sup>®</sup>-594 標識二次抗体を用いて、細胞染色を行った。

B: 細胞のブロッキング時に、Triton<sup>®</sup>X-100 を加え細胞膜の透過処理を行った後、A と同様に細胞染色を行った。

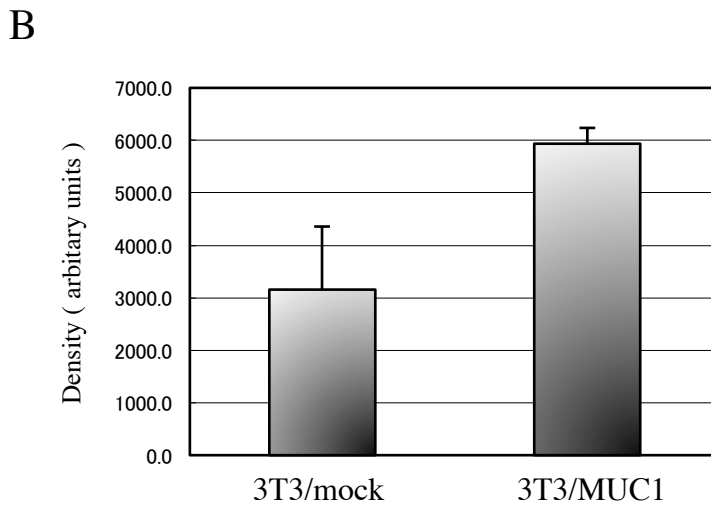
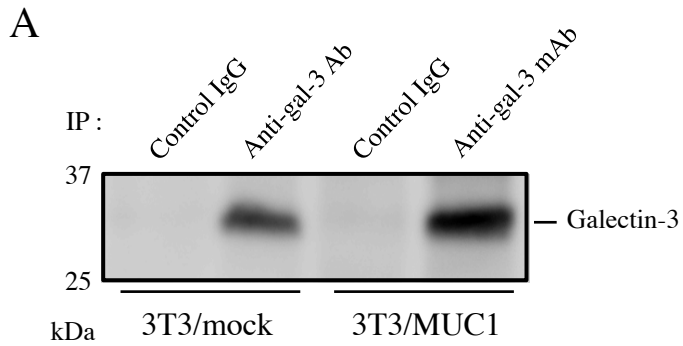


図5 3T3/MUC1, 3T3/mock 細胞における細胞表面の Galectin-3

A: 3T3/MUC1, 3T3/mock 細胞の細胞表面をビオチン化し、細胞抽出液を得た。抗 Galectin-3 抗体を用いて免疫沈降を行い、電気泳動後、ウエスタンブロッティングし、HRP 標識ストレプトアビジンにより、細胞表面の Galectin-3 を検出した。

B: A で得られたバンドの濃さを Image J により、数値化し、グラフ化した。

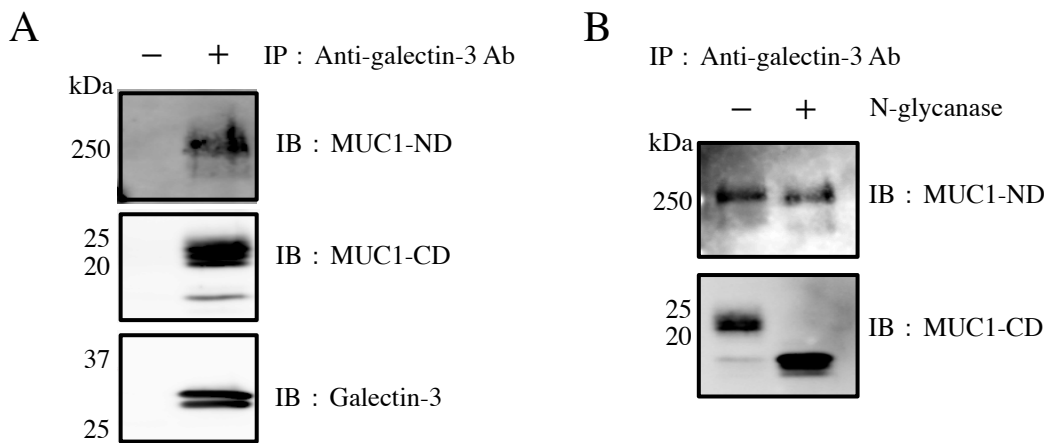


図 6 MUC1 への Galectin-3 の結合

**A** : 3T3/MUC1 細胞の細胞抽出液より、抗 Galectin-3 抗体を用いて免疫沈降を行った。電気泳動、ウエスタンブロッティング後に、抗 MUC1-ND 抗体, 抗 MUC1-CD 抗体, 抗 Galectin-3 抗体により検出した。

**B** : 3T3/MUC1 細胞の細胞抽出液 (250  $\mu\text{g}$ ) を N-glycanase 処理した。同液より抗 Galectin-3 抗体を用いて免疫沈降し、電気泳動、ウエスタンブロッティング後に、抗 MUC1-ND 抗体, 抗 MUC1-CD 抗体により検出した。



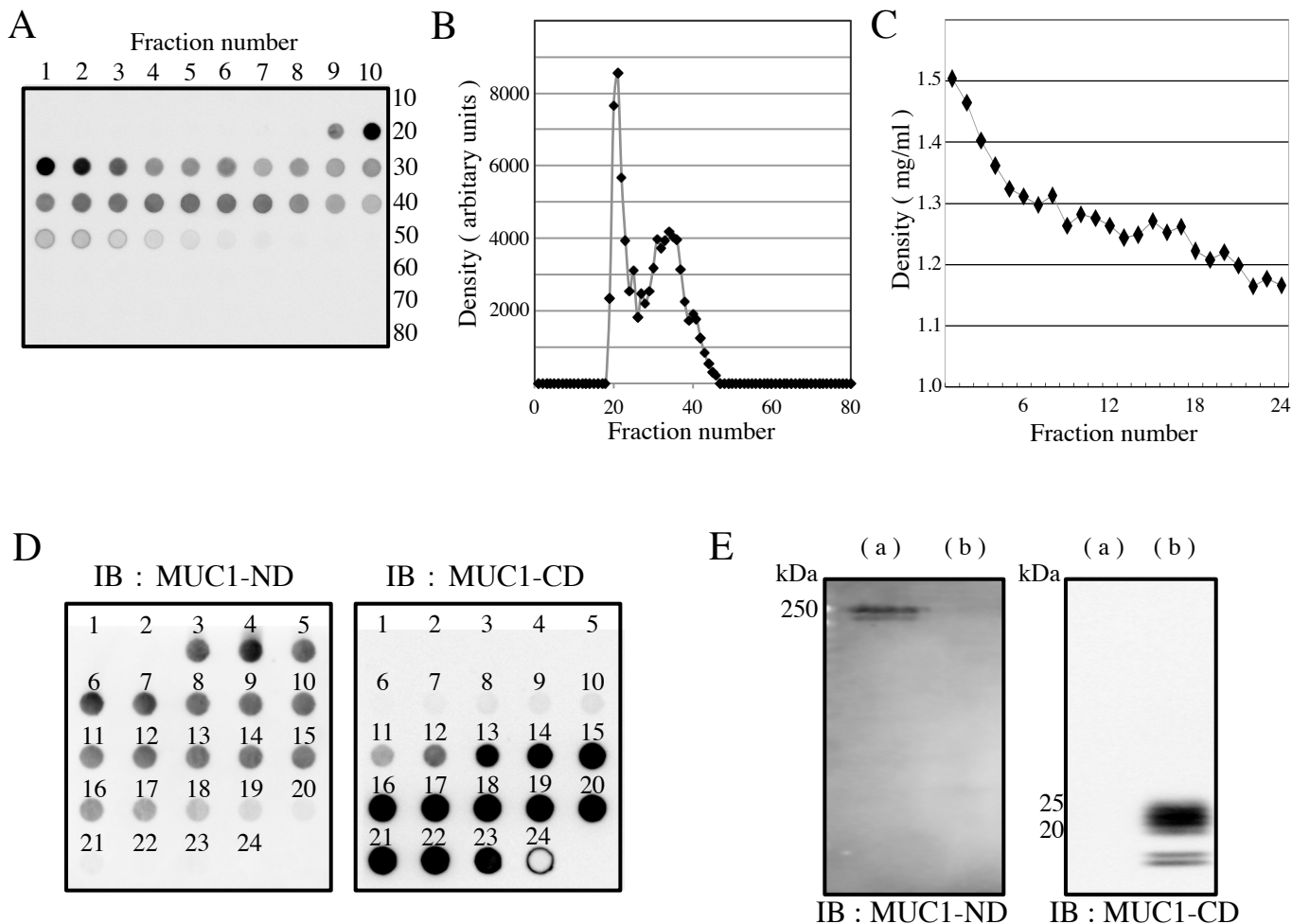


図7 MUC1-ND, MUC1-CD の分離

A: 3T3/MUC1 細胞の細胞表面をビオチン化し、細胞抽出液を得た。細胞抽出液をゲル濾過にかけ、得られた画分の一部をドットブロットし、HRP 標識ストレプトアビジンを用いて検出した。

B: A で得られたドットの濃さを数値化してグラフ化した。

C: B における画分 20~25 を CsCl 密勾配遠心にかけ、得られた 24 画分の密度を測定した。

D: C で得られた画分をドットブロットし、抗 MUC1-ND 抗体と抗 MUC1-CD 抗体を用いて検出した。

E: D で得られた高密度の画分 (3~5) および低密度の画分 (21~23) それぞれを電気泳動、ウェスタンブロッティングし、抗 MUC1-ND 抗体, 抗 MUC1-CD 抗体を用いて検出した。

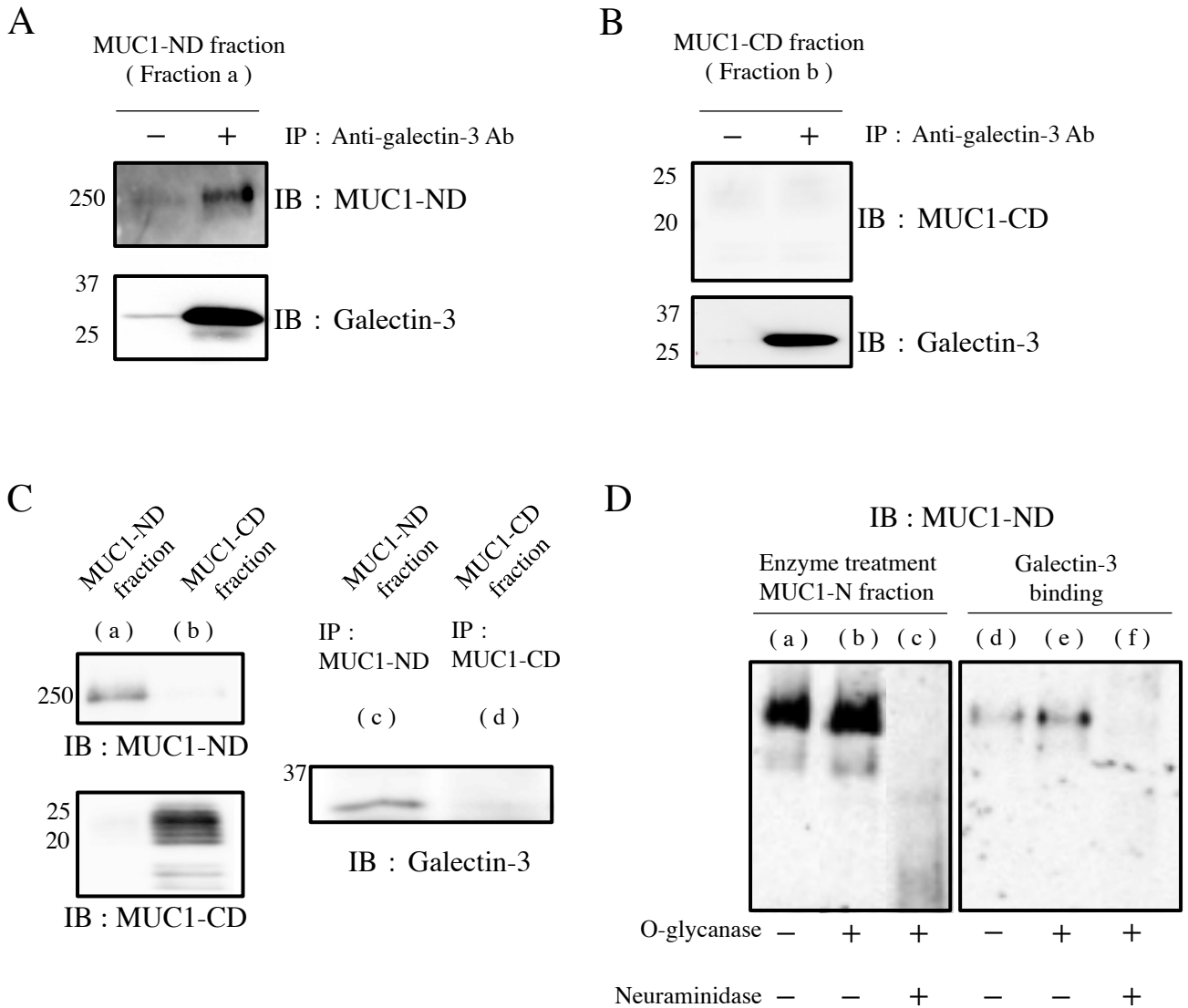


図 8 MUC1-ND への Galectin-3 の結合

A, B : CsCl 密度勾配遠心により分離した MUC1-ND, -CD (10  $\mu$ g) それぞれに、Galectin-3 (1  $\mu$ g) を加えインキュベート後、抗 Galectin-3 抗体を用いて免疫沈降した。電気泳動、ウエスタンブロッティング後に、抗 MUC1-ND 抗体, 抗 MUC1-CD 抗体により検出した。

C : Galectin-3 を結合させた 3T3/MUC1 細胞に DTSSP を加え細胞表面のタンパク質を架橋した。同細胞の細胞抽出液を調製し、CsCl 密度勾配遠心を行い、MUC1-ND, -CD を分離した。各画分を電気泳動、ウエスタンブロッティングし、両分子の分離を確認した (lanes a, b)。得られた MUC1-ND, -CD を抗 MUC1-ND 抗体, 抗 MUC1-CD 抗体によって免疫沈降し、電気泳動、ウエスタンブロッティング後に、抗 Galectin-3 抗体を用いて検出した (lanes c, d)。

D : C で得られた MUC1-ND を O-glycanase 処理 (lane b, e), neuraminidase および Oglycanase 処理 (lane c, f) した。MUC1-ND 画分 (lanes a-c) または抗 Galectin-3 抗体を用いた免疫沈降物 (lanes d-f) を電気泳動、ウエスタンブロッティング後に抗 MUC1-ND 抗体を用いて検出した。

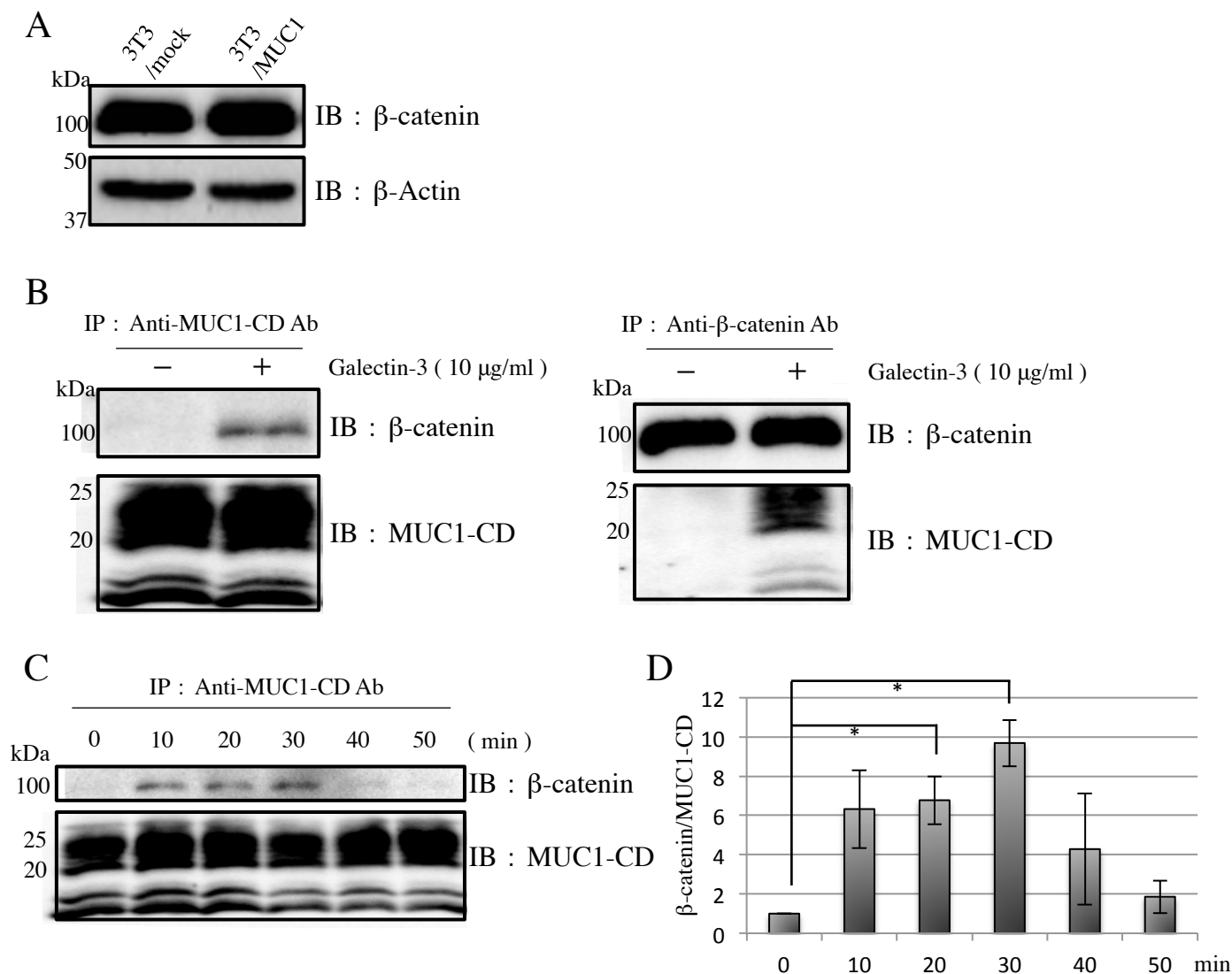


図.9 Galectin-3 の MUC1-ND への結合に伴う MUC1-CD への  $\beta$ -catenin のリクルート

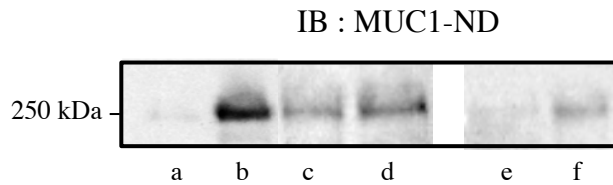
A: 3T3/MUC1, 3T3/mock 細胞の細胞抽出液を電気泳動、ウエスタンブロッティング後に抗  $\beta$ -catenin 抗体および抗  $\beta$ -actin 抗体を用いて検出した。

B: 3T3/MUC1 細胞を Galectin-3 (10  $\mu$ g/ml) の存在下あるいは非存在下において、30 分間培養した。同細胞より細胞抽出液を調製し、抗 MUC1-CD 抗体または抗  $\beta$ -catenin 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物を電気泳動、ウエスタンブロッティング後に、抗  $\beta$ -catenin 抗体、抗 MUC1-CD 抗体を用いて検出した。

C: 3T3/MUC1 細胞を Galectin-3 存在下で、0~50 分間培養した。同細胞の細胞抽出液を調製し、抗 MUC1-CD 抗体によって免疫沈降し、電気泳動、ウエスタンブロッティング後に、抗  $\beta$ -catenin 抗体、抗 MUC1-CD 抗体を用いて検出した。

D: C で得られたバンドの濃さを数値化して、0 分の値を 1 として、 $\beta$ -catenin/MUC1-CD の値をヒストグラムで示した (means $\pm$ SD, n=3, \*p<0.05)。

A



B

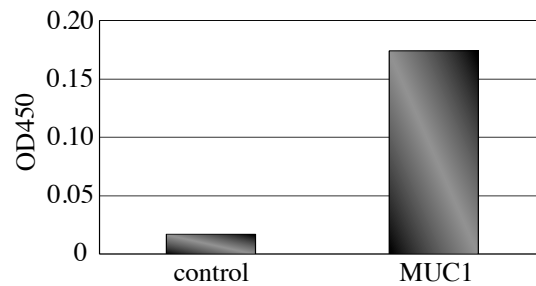


図 10 可溶性 Siglec-9 の MUC1 への結合

A : 3T3/MUC1 細胞の細胞抽出液に、Fc-tag Siglec-3 ( lane c ), -5 ( lane d ), -9 ( lane b ) および His-tag Siglec-1 ( lane f ) を加えた。Siglecs と結合したタンパク質は、Protein G-Sepharose または Ni-NTA-agarose を用いて沈降させ、沈降物を電気泳動、ウエスタンブロッティング後に抗 MUC1-ND 抗体を用いて検出した。コントロールとして、Protein G-Sepharose のみ ( lane a ), Ni-NTA-agarose のみ ( lane e ) を加えて同様の処理を行った。

B : 培養上清より調製した MUC1 をプレートに固相化して、Siglec-9-Fc との結合を調べた。

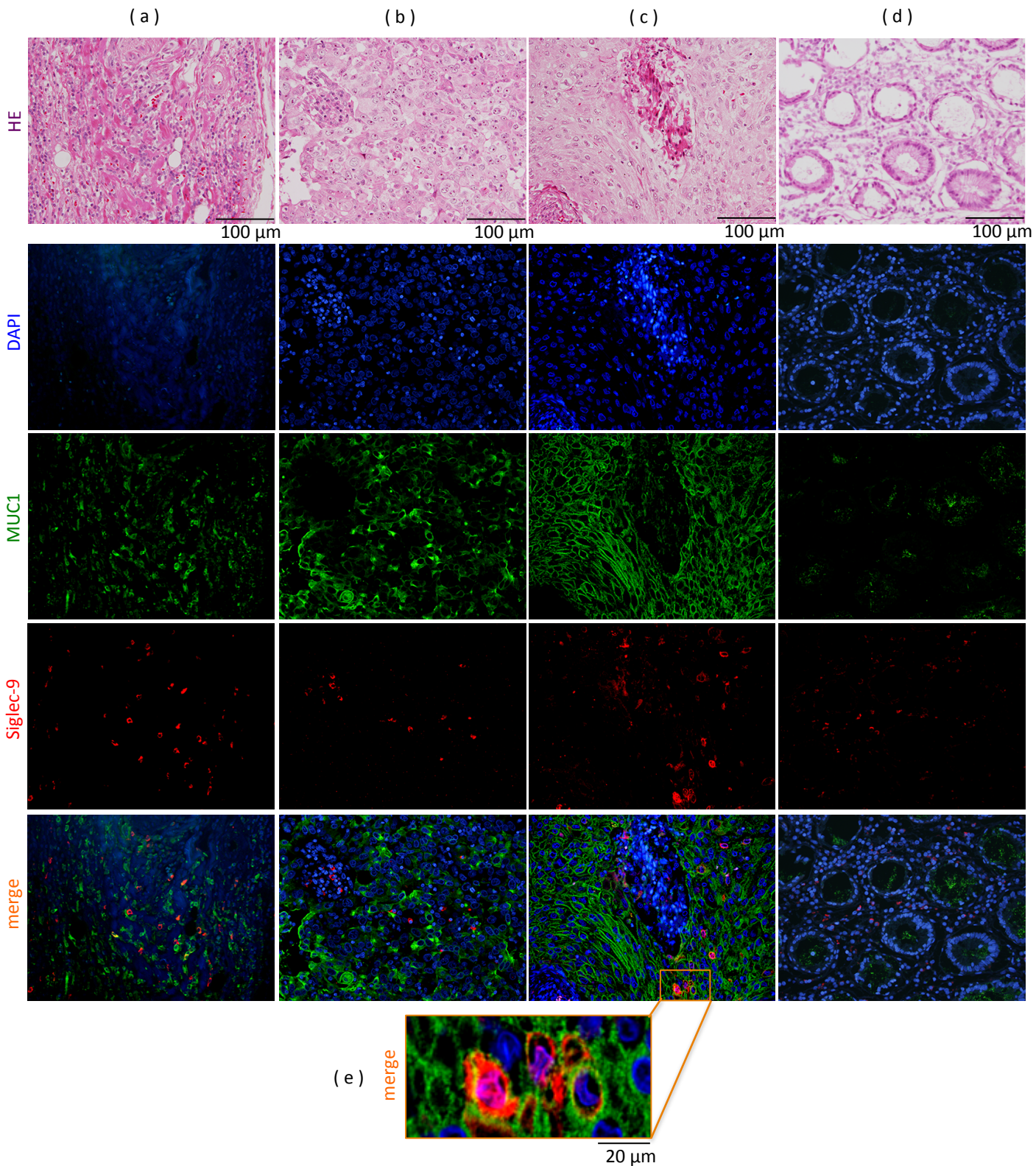
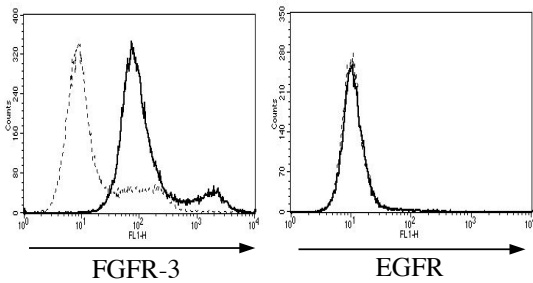


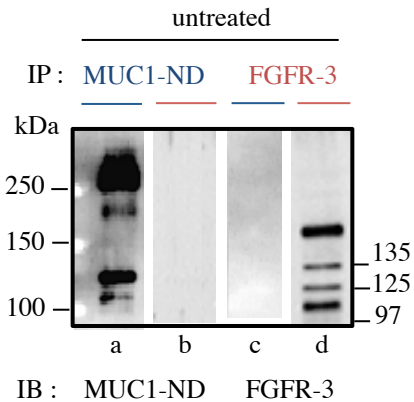
図 11 癌組織微小環境下における Siglec-9 陽性細胞の分布

ヒト膵臓癌 (a)、乳癌 (b)、大腸癌 (c)、正常大腸組織 (d) のパラフィン包埋切片を H&E 染色、DAPI (blue)、抗 Siglec-9 抗体と Alexa Fluor®-594 標識二次抗体 (red) および抗 MUC1-ND 抗体と Alexa Fluor®-488 標識二次抗体 (green) により免疫染色した。大腸癌における拡大像を (e) に示した。

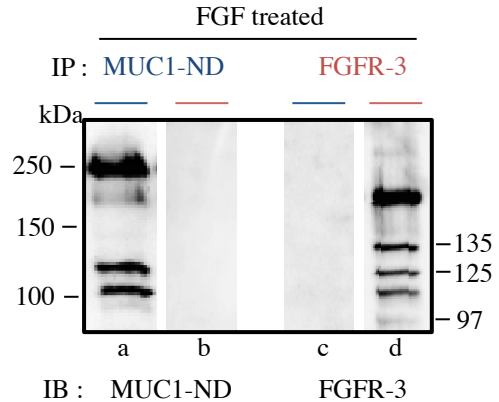
A



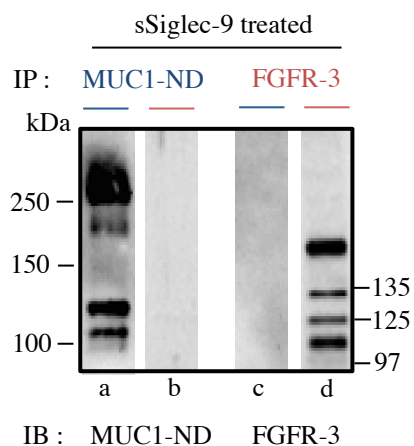
B



C



D



E

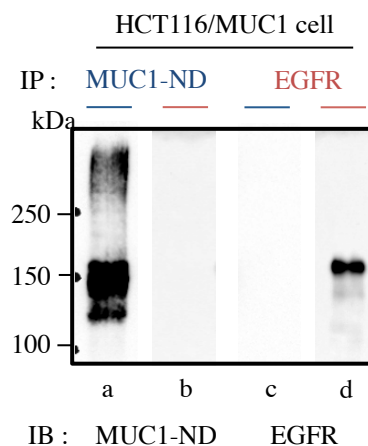


図 12 MUC1 と共沈するタンパク質の解析

A: FGFR-3 および EGFR の発現を、抗 FGFR-3 抗体、抗 EGFR 抗体を用いて FACS により解析した (—)。コントロール抗体 (---)

B: 3T3/MUC1 細胞の細胞抽出液より、MUC1-ND (lanes a, c) および FGFR-3 (lanes b, d) を抗 MUC1-ND 抗体、抗 FGFR-3 抗体を用いて免疫沈降した。沈降物を電気泳動、ウエスタンブロッティング後、抗 MUC1-ND 抗体または抗 FGFR-3 抗体を用いて検出した。

C, D: 3T3/MUC1 細胞を FGF (C), Siglec-9 (D) により処理した後、B と同様の操作を行った。

E: HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液より、MUC1-ND (lanes a, c) および EGFR (lanes b, d) を抗 MUC1-ND 抗体または抗 EGFR 抗体を用いて免疫沈降した。沈降物を電気泳動、ウエスタンブロッティング後、抗 MUC1-ND 抗体または抗 EGFR 抗体を用いて検出した。

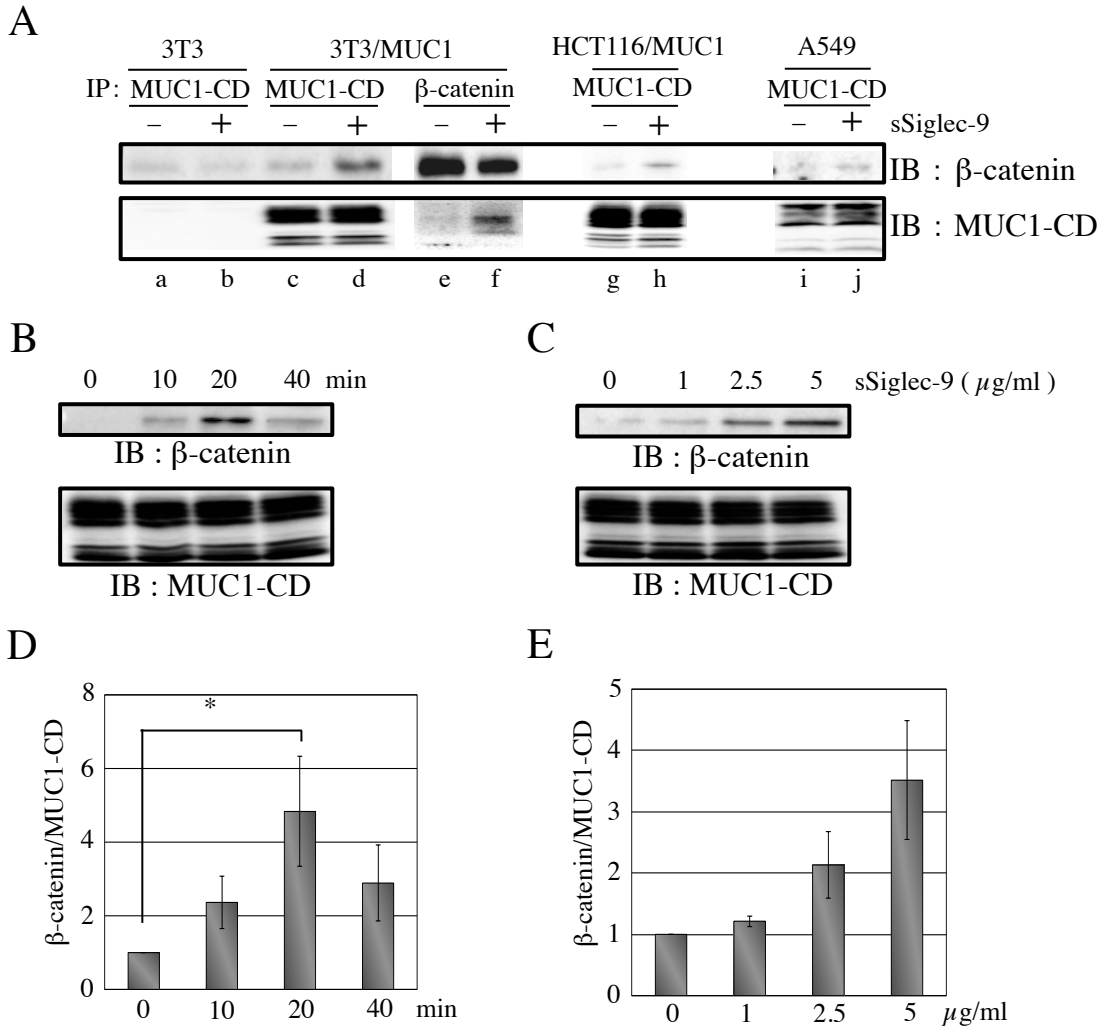


図 13 Siglec-9 の MUC1 への結合による β-catenin のリクルート

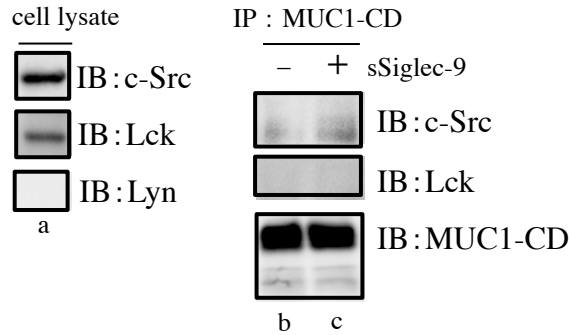
A: 3T3/mock (lanes a, b), 3T3/MUC1 (lanes c~f), HCT116/MUC1 (lanes g, h), A549 (lanes i, j) 細胞を sSiglec-9 により 20 分間処理し、細胞抽出液を調製した。抽出液より、抗 MUC1-CD 抗体または抗 β-catenin 抗体を用いて免疫沈降した。沈降物を電気泳動、ウエスタンブロッティング後、MUC1-CD および β-catenin を検出した。

B: 3T3/MUC1 細胞を sSiglec-9 存在下で 0~40 分間培養し、回収した細胞の細胞抽出液より、MUC1-CD と共沈した β-catenin を検出した。

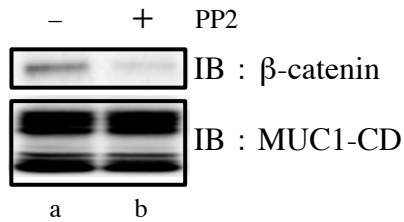
C: 3T3/MUC1 細胞を sSiglec-9 (0~5 μg) 存在下で 20 分間培養し、回収した細胞の細胞抽出液より、MUC1-CD と共沈した β-catenin を検出した。

D, E: B, C におけるバンドの濃さを数値化し、0 分での値を 1 として、β-catenin/MUC1-CD の値をヒストグラムで示した (means±SD, n=5, \*p<0.05)。

A



B



C

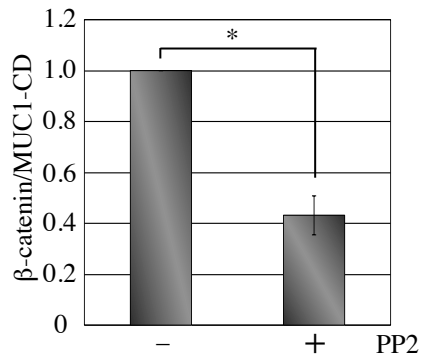


図 14 Siglec-9 の MUC1 への結合による  $\beta$ -catenin のリクルートに関与するキナーゼ

A: 3T3/MUC1 細胞の抽出液を電気泳動後、ウエスタンブロッティングし、c-Src, Lck, Lyn を検出した (lane a)。sSiglec-9 処理 (20 分) または未処理の 3T3/MUC1 細胞の抽出液より、MUC1-CD を免疫沈降し共沈した沈降物を電気泳動、ウエスタンブロッティングし、c-Src, Lck, Lyn を検出した (lanes b, c)。

B: PP2 存在, 非存在下で 3T3/MUC1 細胞 を sSiglec-9 処理 (20 分) した。回収した細胞の細胞抽出液より、MUC1-CD と共沈した  $\beta$ -catenin を検出した。

C: B のバンドの濃さを数値化し、PP2 非存在下での値を 1 として、 $\beta$ -catenin/MUC1-CD の値をヒストグラムで示した (means $\pm$ SD, n=3, \*p<0.01)。



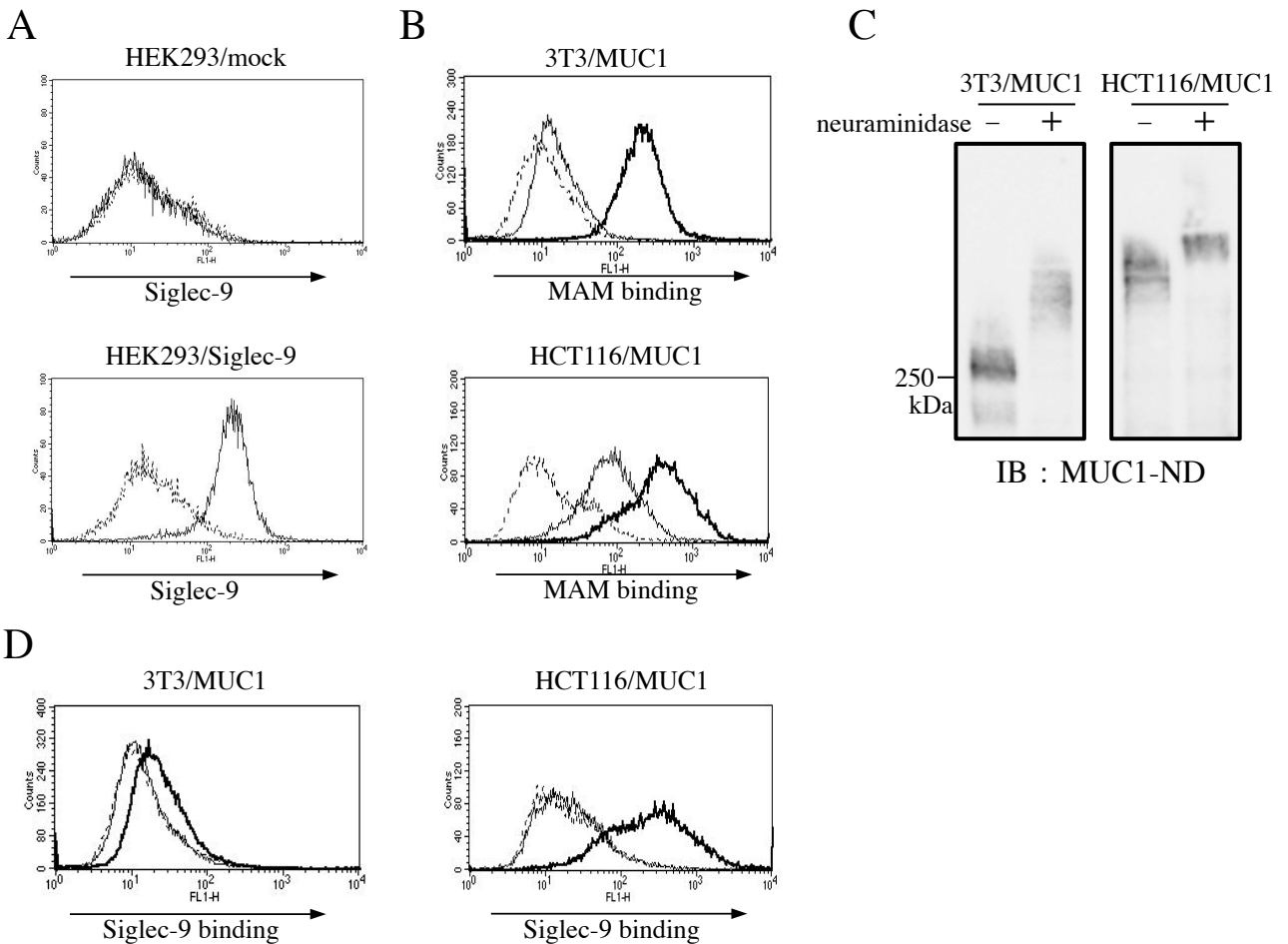


図 15 MUC1 発現細胞の neuraminidase 処理と Siglec-9 の結合

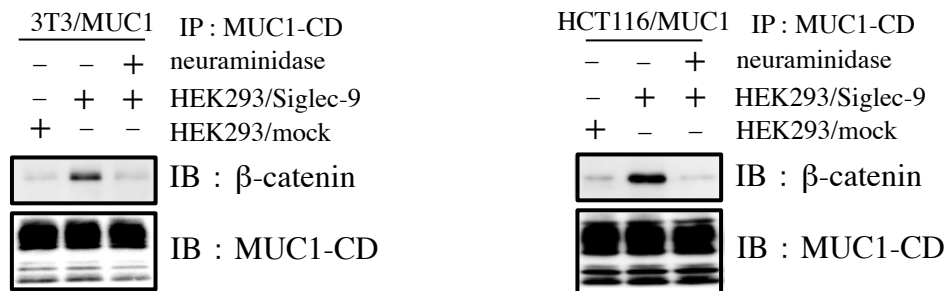
A : HEK293/Siglec-9 と HEK293/mock 細胞における Siglec-9 の発現を FACS により解析した。抗 Siglec-9 抗体 (——), コントロール抗体 (----)

B : Neuraminidase 処理 (——), 未処理 (——) の 3T3/MUC1, HCT116/MUC1 細胞表面への MAM の結合について、FACS を用いて解析した。コントロール (----)

C : Neuraminidase 処理, 未処理の 3T3/MUC1, HCT116/MUC1 細胞の細胞抽出液を電気泳動, ウェスタンブロッティング後、MUC1-ND を検出した。

D : Neuraminidase 処理 (——), 未処理 (——) の 3T3/MUC1, HCT116/MUC1 細胞への Siglec-9 の結合を FACS を用いて解析した。

A



B

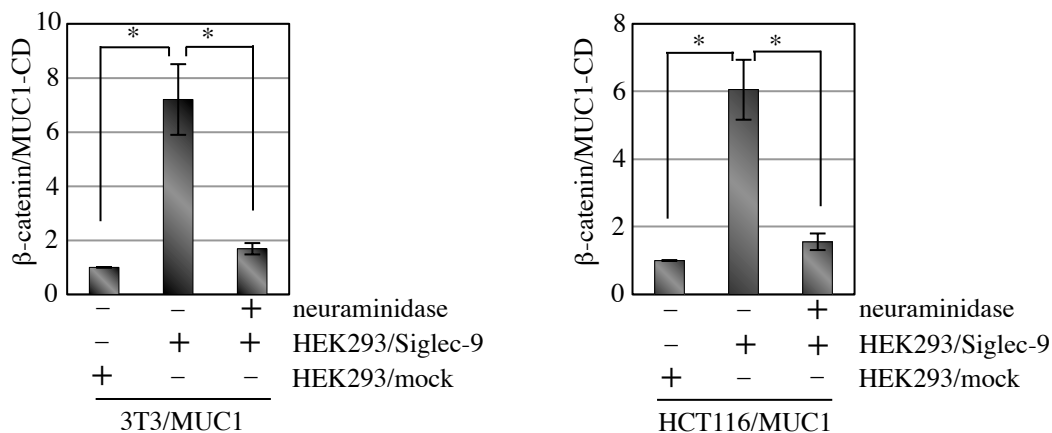


図 16 Siglec-9 と MUC1 を介した細胞間相互作用に伴う MUC1 への  $\beta$ -catenin のリクルート

A : Neuraminidase 処理, 未処理の 3T3/MUC1, HCT116/MUC1 細胞を HEK293/mock, HEK293/Siglec-9 細胞と共培養した。MUC1-CD と共沈した  $\beta$ -catenin を検出した。

B : A のバンドの濃さを数値化し、HEK293/mock 細胞との共培養での値を 1 として、 $\beta$ -catenin/MUC1-CD の値をヒストグラムで示した ( means $\pm$ SD, n=3, \*p<0.05 )。

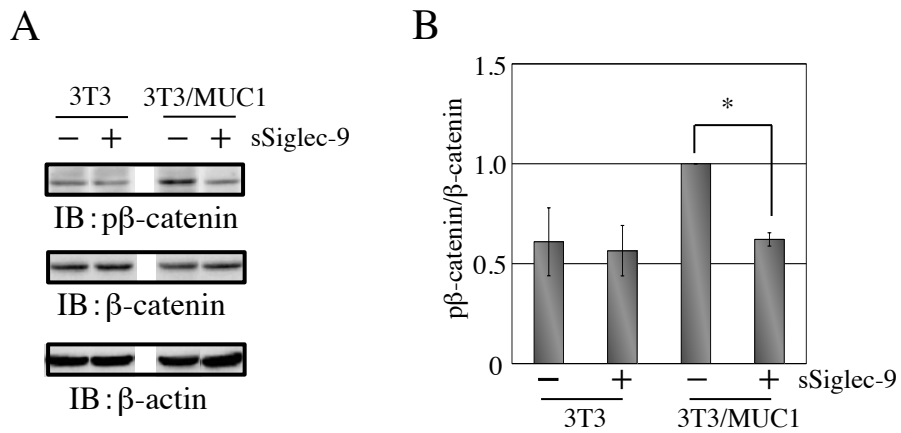


図 17 Siglec-9 処理に伴うリン酸化  $\beta$ -catenin の減少

A : 3T3/mock, 3T3/MUC1 細胞を sSiglec-9 存在下, 非存在下で 40 分間培養し、細胞を回収した。細胞抽出液を電気泳動, ウェスタンブロッティング後、リン酸化  $\beta$ -catenin,  $\beta$ -catenin,  $\beta$ -actin を検出した。

B : A のバンドの濃さを数値化し、3T3/MUC1 細胞で sSiglec-9 未処理の値を 1 として、リン酸化  $\beta$ -catenin/ $\beta$ -catenin の値をヒストグラムで示した ( means $\pm$ SD, n=4, \*p<0.001 )。

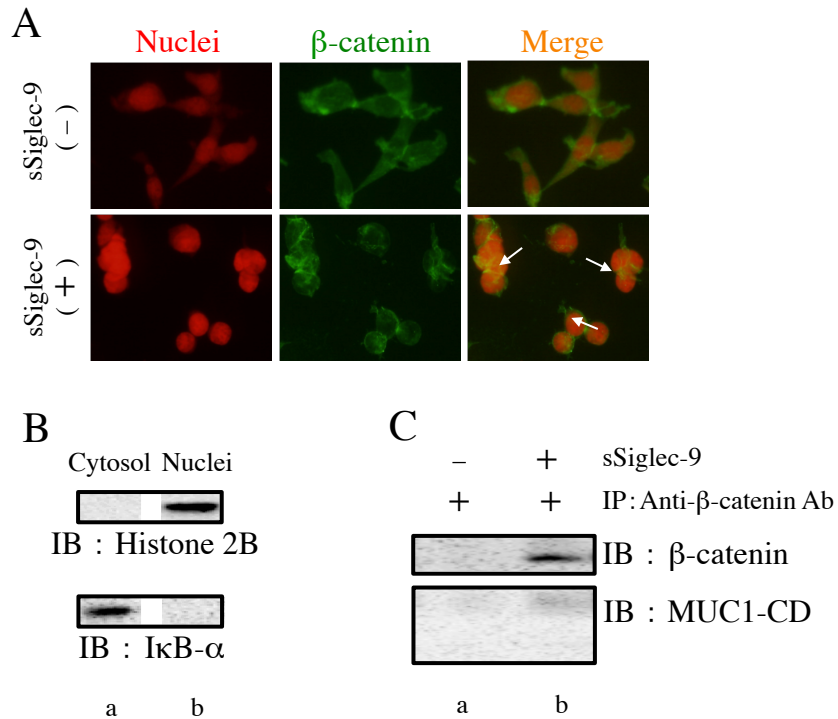


図 18 Siglec-9 の結合による  $\beta$ -catenin の核移行の促進

A : 3T3/MUC1 細胞を sSiglec-9 存在下または非存在下で 1 時間培養し、抗  $\beta$ -catenin 抗体と PI を用いて染色した。

B : A と同様に処理した細胞より、細胞質画分,核画分 を分離した。得られた画分を電気泳動,ウエスタンブロッティング後、Histone 2B, I $\kappa$ B- $\alpha$  を検出した。

C : B で得られた核画分より抗  $\beta$ -catenin 抗体を用いて免疫沈降した。得られた沈降物を電気泳動,ウエスタンブロッティング後、 $\beta$ -catenin, MUC1-CD を検出した。

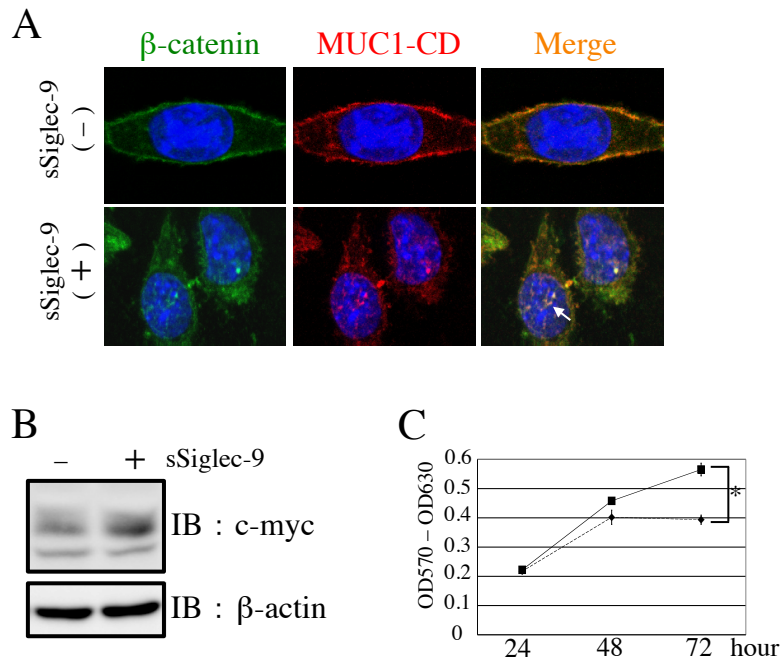


図. 19 Siglec-9 の結合による  $\beta$ -catenin の核移行と細胞増殖の亢進

A : 3T3/MUC1 細胞を sSiglec-9 存在下または非存在下で 1 時間培養後、核を染色すると共に、 $\beta$ -catenin, MUC1-CD の分布を可視化した。

B : A と同様に処理した細胞より得られた細胞抽出液を電気泳動、ウエスタンブロッティング後、c-myc,  $\beta$ -actin を検出した。

C : 3T3/MUC1 細胞を sSiglec-9 存在下 (■—■) または非存在下 (◆—◆) で 20 分間培養し、通常の培地に変換して 72 時間まで培養した。細胞の増殖を MTT assay を用いて測定した。