日消外会誌　29（4）：873～877，1996年

特集4

大腸癌転移性決定因子としての糖鎖分子シアリルLe^x抗原とその糖鎖構造改変による転移制御の試み

大阪府立成人病センター第1外科，東京大学薬学部生体異物免疫学教室*

中森　正二　亀山　雅男　今岡　真義　安田　卓司
中野　博史　大東　弘明　平塚　正弘　佐々木　洋
石川　治　甲　利幸　古河　洋　岩永　剛
泉　由紀*　入村　達郎*

糖鎖抗原シアリルLe^x（sLe^x）およびシアリルLe^a（sLe^a）が大腸癌転移性発現に関与する分子であるか臨床例および細胞モデルから検討した．大腸癌根治切除159例において，sLe^x発現陽性群の無再発率生存率は有意に不良であったが，sLe^a発現性との相関は認められなかった．多変量解析にて，sLe^x高発現性は，有意な独立再発規定因子であった．さらに，sLe^x発現変異大腸癌細胞を用い，その転移形質を解析すると，sLe^x高発現細胞のヌードマウスでの肝転移性は高く，ヒト血管内皮細胞への接着性も低発現細胞に比べ高く，その接着性は，糖鎖合成阻害剤や抗セレクチン抗体により抑制された．これらの結果は，sLe^x高発現性が大腸癌の転移形質発現に関与し，糖鎖構造改変により大腸癌の転移性を抑制しうる可能性が示唆しているものと考えられた．

Key words: colorectam cancer, metastasis, carbohydrate, antigen

はじめに

癌細胞が原発巣を離れ遠隔臓器において転移巣を形成するまでには，1）癌細胞の原発巣からの離脱と周囲への浸潤，2）血管内への進入，3）遠隔臓器への移動，脈間内での血小板や白血球との腫瘍栓の形成，4）血管内皮細胞への着床，5）血管外への脱出と遠隔臓器での増殖といった複離なステップを経なければならない．なかでも，血管内皮細胞と癌細胞の接着は必須の過程といえよう[1]．

近年，大腸癌細胞表面に存在する糖鎖抗原であるシアリルLe^x（sLe^x）やシアリルLe^a（sLe^a）が，血管内皮細胞接着因子であるセレクチンのリガンドであることが判明し，これらの糖鎖抗原の発現性と転移との関係が注目されている[2]．また，これらの糖鎖発現性が大腸癌の重要な予後規定因子であることも報告され，大腸癌の転移との関連性が示唆されている[3)4)]．今回，われわれは，これら糖鎖抗原の発現性変化が，大腸癌転移性決定因子として臨床経過に反映しているか否かを検討するとともに，sLe^x発現変異大腸癌細胞を用い，sLe^x発現性と接着性との関わりを解析し，糖鎖構造の改変による接着制御の可能性を検討した．

対象と方法

臨床例におけるSLX発現の検討：大阪府立成人病センターにおいて根治切除された大腸癌159症例を対象とした．ホルマリン包埋標本から代表切片を薄切し，抗sLe^xモノクロナール抗体FH6および抗sLe^aモノクロナール抗体CA19-9にて免疫組織化学染色を行い，染色された細胞の癌組織における割合を検討した．腫瘍におけるsLe^x発現性陽性，陰性の判定は，染色細胞数の占める割合が5％以上のものを発現陽性とし，それ以外のものを発現陰性とした．生存率はKaplan-Meier法で算出し，統計学的処理はχ^2検定およびLog-rank検定を用いた．また，Coxの比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行い，大腸癌の再発に及ぼす因子について検討した．

sLe^x発現変異細胞の解析：ヒト大腸癌樹立細胞株KM12から抗sLe^xモノクローナル抗体FH6を用いて

＊第46回日消外会総会シンポ1・消化器癌転移の機序と対策
＜1995年11月15日受理＞
別刷請求先：中森　正二
〒537 大阪市東成区中道1－3－3　大阪府立成人病センター第1外科

Table 1　Correlation between sLe^x and sLe^a expression and clinicopathologic features

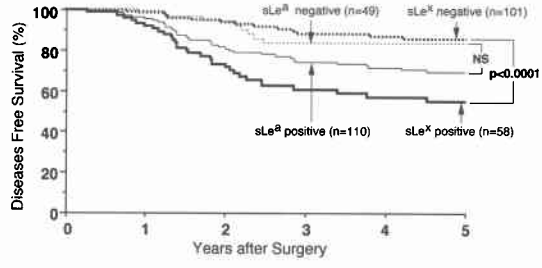
Factor	sLe^x negative (n=101)	sLe^x positive (n=58)	p value	sLe^a negative (n=49)	sLe^a positive (n=110)	p value
Age(60≧/61≦)	54/57	26/32	0.38	24/25	56/54	0.96
Sex						
Man/Woman	67/34	32/24	0.43	36/13	65/45	0.12
Tumor Location						
C, A/T/DS/Rs, Ra, Rb	12/36/53	8/24/26	0.65	4/17/28	16/43/51	0.28
Histologic Type						
well/Mod. or poor	68/33	26/32	0.01	35/14	59/51	0.04
Death						
m, sm/mp/, ss. a1/se, a2, si ai	22/22/43/14	7/7/24/20	0.01	12/14/16/7	17/15/51/57	0.03
Lymph node metastasis						
n(−)/n(+)	75/26	26/32	0.000	39/10	62/48	0.01
Lymph vessel invasion						
ly(−)/ly(+)	58/43	20/38	0.01	28/21	50/60	0.23
Venous invasion						
v(−)/v(+)	67/34	27/31	0.02	33/1	61/49	0.22
Stage						
0, I/II/IIIa/IIIb	37/38/19/7	11/15/15/17	0.000	22/17/7/3	26/36/27/21	0.03

FACS（fluorescence-activated cell sorter）にて選別分離した sLe^{x}発現性の異なる変異細胞(高 sLe^{x}発現細胞 KM12HX，低 sLe^{x}発現細胞 KM12LX)[5]を使い，*in vivo, in vitro* における変異細胞の転移形質を検討した．*in vivo* における転移能は，ヌードマウスの脾臓に 1×10^6の細胞を接種し，12週間後にヌードマウスに生じた肝転移数を調べた．*in vitro* における転移形質として，血管内皮細胞への接着性を検討した．接着性は ^{51}Cr にてラベルした一定放射活性量の細胞をヒト臍帯静脈内皮細胞（human umbilical vein endothelial cell : HUVEC）上に撒き，一定時間後洗浄にて浮遊細胞を除いた後，接着した細胞の放射活性を測定し求めた．また，変異細胞間における転移および癌化関連遺伝子の発現性の差を，Northern blot 法にて発現の違いを検討した．

結　果

臨床例における sLe^{x}発現と予後との相関：根治切除された159例における sLe^{x}発現陽性例58例（36.5%），sLe^{a}発現陽性例110例（69.2%）であった．臨床病理学的所見との比較では，sLe^{x}の発現性と組織型，深達度，リンパ節転移の有無，リンパ管侵襲および静脈侵襲の有無，ステージと，sLe^{a}発現性と組織型，深達度，リンパ節転移の有無，ステージとの間に相関が認められ（**Table 1**），sLe^x，sLe^{a}発現性の高い腫瘍に病理組織学的に悪性度が高いものが多かった．実際，陽性例の術後再発率は陰性例に比べて不良で，特に，

Fig. 1　Correlation between Disease free survival and Expression of sLe^x and sLe^a in 159 patients with colorectal cancer.



sLe^{x}発現陽性群の無再発群は統計的にも有意に不良であった(**Fig. 1**)．これら糖鎖抗原の悪性度指標として有用性を Cox の比例ハザードモデルを用いた多変量解析にて検討すると，sLe^{x}の発現性は再発率に寄与する有意な独立した因子であることが判明した（**Table 2**）．

sLe^{x}発現変異細胞の分子細胞生物学的解析：臨床例の検討から，大腸癌の再発に sLe^{x}発現性が大きく関与している可能性が認められたため，sLe^{x}発現性の異なる変異細胞モデルを用いて，大腸癌の再発にもっとも関与する肝転移に関して，転移性の差をヌードマウス脾注による肝転移形成能から検討した．その結果，sLe^{x}高発現性の KM12HX 細胞(以下，HX)は sLe^{x}低発現細胞 KM12LX（以下，LX）に比べ有意に肝臓への転

Table 2 Factors influencing disease recurrence by multivariate analysis

Factor	β value	SD	p value
sLe^x expression	1.36	0.413	0.001
sLe^a expression	0.133	0.455	0.770
Age	0.085	0.378	0.822
Sex	0.047	0.389	0.904
Location	0.354	0.248	0.156
Histologic Type	0.455	0.296	0.125
Depth	0.597	0.229	0.010
Lymph node metastasis	0.117	0.157	0.459
Lymphatic vessel invasion	0.015	0.425	0.972
Venous invasion	0.441	0.366	0.188

Table 3 Hepatic metastasis assay by splenic injection in nude mice

	KM12-LX	KM12-HX
No. of mice with liver metastasis	8/17[a]	4/16[a]
No. of Metastases in Liver (median) (Range)	0[b] (0～13)	12[b] (0～50)

a : $p<0.05$, b : $p<0.01$

移性が高いことがわかった (**Table 3**)[6].

ヌードマウスでの転移性に関与するsLe^{x}以外の他の分子の発現に差がないか，大腸癌の悪性化および転移に関係するとされる5種類の遺伝子の発現についてNorthern blot法にて検討してみた．転移増殖に関与すると考えられるフォスフォリボ蛋白P2, nm23, p53の遺伝子発現に顕著な差は認められなかった．癌細胞の接着性に関与していると考えられる32Kdラミニン結合蛋白遺伝子の発現も両者間に差を認めず，浸潤に関与すると考えられる蛋白分解酵素のウロキナーゼ，Typel V型コラゲナーゼ (72kd) 遺伝子の発現にも差を認めなかった．しかしながら，sLe^{x}合成の最終段階を担うと考えられるα-(1,3/1,4) フコース転移酵素遺伝子の発現レベルは，HX細胞で高く，LX細胞や母細胞では検出できず (**Fig. 2**)，HX，LX細胞におけるsLe発現性の違いが，この酵素の発現性の違いによるためである可能性が推測された．

ヌードマウスでの肝転移実験は動物モデルの実験であり，必ずしもヒトの癌転移を反映していない可能性ある．sLe^{x}は血管内皮接着因子であるセレクチンのリガンドであり，この接着を介して癌転移に関与している可能性から，sLe^{x}発現変異細胞を用いてHUVECの接着性および糖鎖構造の改変による制御を検討した．

Fig. 2 Expression of progression-or metastasis-related gene in KM12 cells. C : Parental cell line ; KM12C, LX : LOW expressor of sLe^x ; KM12LX, HX : High expressor of sLe^x ; KM12HX. p2 ; Phosphoriboprotein p2, nm23 ; nm23/NDPKinase, 32Kd L.B.P. ; 32Kd laminine binding protein, u-PA ; Urokinase type plasminogen activator, α-(1,3/1,4) FT ; α-(1,3/1,4) fucosyl transferase, GAPDH : glycelardehyde-3-phosphate decydrogenase used as internal control of amount of mRNA applied.

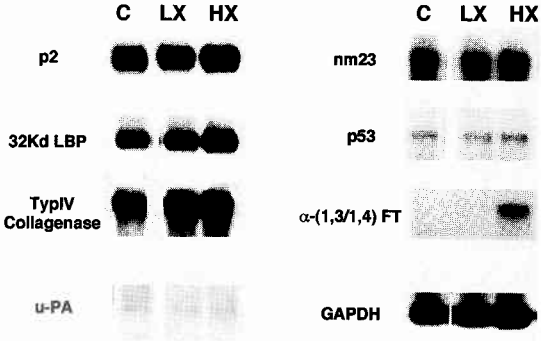
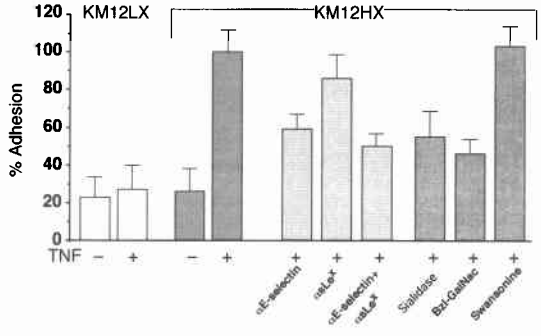


Fig. 3 Adhesion ability of sLe^x variants on HUVEC activated by TNF and inhibition by the anti sLe^x antibody, anti E-selectin antibody, or inhibitors of carbocydrate synthesis ; Bzl-α-GalNac and Sialidase, Swansonine.



LX，HX細胞ともにHUVECへの接着性は低かったが，HUVECをTNFで処理し血管内皮細胞接着因子であるE-セレクチンをHUVEC上に発現させると，HX細胞のみに接着性の増加が見られ，接着性は約3倍あがった．この接着性はsLe^{x}に対する抗体では，10%程度の低下しか認められなかったが，血管接着因子E-セレクチンに特異的な抗体や抗sLe^{x}との同時処理にて約1/2低下し，さらに，O-リンク糖鎖の合成阻害

剤である benzyl-N-acetyl-α-D-galactosaminide (BZl-α-GalNac) やシアル酸を sLe^{x}糖鎖より分解し糖鎖構造を変えるシアリダーゼにより抑制された．しかしながら，N-リンク糖鎖合成阻害剤であるスワンソニンでは，影響を受けなかった (**Fig. 3**)[6]．

考　察

癌化に伴う糖鎖分子の発現異常はよく知られており，今回検討された糖鎖分子 sLe^{x}や sLe^{a}はそれぞれ腫瘍マーカーSLX や CA19-9として癌の存在や治療効果の判定に用いられてきたものである．これまで，その生物学的機能はほとんどわかっていなかったが，1980年代の末になって免疫学の研究から，白血球の血管内皮への接着に大きな役割を果たしていることが判明し，血管内皮細胞との接着が重要な役割をしている癌の転移においても俄然注目されるようになった．

本研究では臨床例を使った検討から，大腸癌細胞表面に発現する糖鎖抗原である sLe^{x}が，大腸癌の再発すなわち，癌の転移性と相関する重要な因子であることを示した．この事は，sLe^{x}発現が再発予後に関する生物学的悪性度招示す一因子となる可能性を示したものであると考えられる．

さらに，ヒト実験細胞モデルを使った実験の結果は，ヒト大腸癌細胞において，sLe^{x}発現性の増加が sLe^{x}とセレクチンの接着を介して転移形質獲得に密接に関わっていることを示した．また，セレクチンに対する抗体や糖鎖合成の制御，糖鎖構造の改変により大腸癌細胞の血管内皮細胞への接着性が低下したが，これは，大腸癌転移を制御するための新しい治療開発の可能性を示唆するものであると考える．

なお，sLe^{x}は単に接着分子としてだけでなく，細胞接着時に細胞内情報伝達に影響し，細胞の運動性や浸潤性に関与する可能性も考えられる．実際，白血球では，細胞表面糖鎖が糖鎖とセレクチンを介した緩い接着が引き金となり，インテグリンなどを介した強固な接着が始まるものと考えられている．また，血管内皮細胞に接着した癌細胞が浸潤するためには，血管内皮細胞は重要なバリアーとなっており，血管内皮細胞の開裂が生じなければ，癌細胞は浸潤できない．その引き金が，細胞表面の糖鎖成分と血管内皮細胞上の接着因子の接着である可能性もある．今後，癌細胞におけるこのような細胞間性報伝達分子としての糖鎖分子の機能も注目されるべきであろう．

今回の検討では，sLe^{x}と極めて類似の構造を持つ糖鎖抗原である sLe^{a}が臨床例において有用な予後指標となりえなかった．なぜ，同じような生物学特性を持つ分子である一方のみが，予後に相関したかは不明な点であるが，転移性や予後との関連性は sLe^{a}でもある程度認められたことは事実であり，sLe^{a}高発現性が大腸癌の予後に関連する独立した因子であるとの報告もある[4]．今後，sLe^{x}と sLe^{a}の役割の違いや臓器特異性が問題になるものと考えられるが，いずれにせよ，このような糖鎖分子が，大腸癌の転移性に影響を与える分子であることは確からしいことは事実であり，どのような方法を取るかについてはまだ多くの問題を残しているが，糖鎖構造を改変することにより，大腸癌の悪性化すなわち転移性を制御できる可能性が予測される．

文　献

1) 中森正二，明渡　均：癌転移．その研究の現状．癌と化療　**19**：2289—2296，1992
2) Irimura T, Nakamori S, Matsushita Y et al: Colorectal cancer metastasis determined by carbohydrate-mediated cell adhesion: Role of sialyl-Le^x antigens. Semin Cancer Biol **4**：319—324，1993
3) Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S et al: Increased expression of sialyl lewis^x antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: Clinicopathological and immunohistochemical study. Cancer Res **53**：3632—3617，1993
4) Nakayama T, Watanabe M, Katsumata T et al: Expression of sialyl Lewis^a as a new prognostic factor for patients with advanced colorectal carcinoma. Cancer **75**：2051—2056，1995
5) Matsushita Y, Nakamori S, Seftor EA et al: Human colon carcinoma cells with increased invasive capacity obtained by selection for sialyl-dimeric Le^x antigen. Exp Cell Res **196**：20—25，1991
6) Izumi Y, Taniuchi Y, Tsuji T et al: Characterization of human colon carcinoma variant cells selected for sialyl Le^x carbohydrate antigen: Liver colonization and adhesion to vascular endothelial cells. Exp Cell Res **216**：215—221，1995

Colorectal Cancer Metastasis Determined by Carbohydrate Antigen Sialy Lewis X —Inhibition of Metastatic Phenotypes by the Modification of Carbohydrorate Structure—

Shoji Nakamori, Masao Kameyama, Shingi Imaoka, Takushi Yasuda, Hiroshi Nakano, Hiroaki Ohigashi, Masahiro Hiratsuka, Yo Sasaki, Osamu Ishikawa, Toshiyuki Kabuto, Hiroshi Furukawa, Takeshi Iwanaga, Yuki Izumi* and Tatsuro Irimura*
Department of Surgery, The Center for Adult Diseases, Osaka
*Department of Chemical Toxicology and Immunochemistry, Faculty of Pharmacoseutical Science, The University of Tokyo

Sialyl Lewis-X antigen (sLe^x) and sialy Lewis-a antigen (sLe^a) are expressed in colorectal carcinomas and were recently shown to be a ligand for endothelial adhesion molecule E-selectin. In order to determined whether expression of cell surface sLe^x and sLe^a is associated with the metastatic potential of human colorectal carcinoma (CRC), we examined sLe^x and sLe^a expression in tissue samples obtained from 159 CRC patients to investigate whether this antigen expression could serve as a prognostic parameter, and examined metastatic phenotypes in variant CRC cell lines for high and low cell surface levels of sLe^x (KM12HX and KM12LX, respectively). Clinical records showed that the disease-free survival rate for CRC patients with high levels of sLe^x was significantly poorer than for patients with low levels of this antigen. Cox's multivariate analysis revealed that the sLe^x expression level was one of the significant discriminants of recurrence in colorectal cancer patients. KM12HX showed a higher metastatic potential in nude mice and greater adhesive ability in vitro than KM12LX cells. This increased adhesiveness of KM12HX was inhibited by anti-E-selectin antibody, an inhibitor of carbohydrate synthesis, benzyl-N-acetyl-α-D-galactosaminide, and sialidase. These results suggest that sLe^x expression could be involved in colon cancer metastasis and that sLe^x might prove to be a potent marker of recurrence in CRC patients. Also, they suggest the possibility of regulation of the metastatic potential of CRC by inhibition of carbohydrate antigen synthesis.

Reprint requests: Shoji Nakamori Department of Surgery, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases
1-3-3 Nakamichi, Higashinari, Osaka, 537 JAPAN