



Title	肝癌細胞株における浸潤能変化に伴うN型糖鎖変異に関する研究
Author(s)	高橋, 秀徳
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14319号
Issue Date	2020-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14319
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80218
Type	doctoral thesis
File Information	Hidenori_Takahashi.pdf



学 位 論 文

肝癌細胞株における浸潤能変化に伴う
*N*型糖鎖変異に関する研究
(Analysis of alterations in *N*-glycans
associated with invasive change
in liver cancer cell lines)

2020 年 12 月

北 海 道 大 学

高 橋 秀 徳

学 位 論 文

肝癌細胞株における浸潤能変化に伴う
*N*型糖鎖変異に関する研究
(Analysis of alterations in *N*-glycans
associated with invasive change
in liver cancer cell lines)

2020 年 12 月

北 海 道 大 学

高 橋 秀 徳

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	7 頁
諸言	8 頁
方法	10 頁
結果	16 頁
考察	36 頁
結論	39 頁
謝辞	40 頁
利益相反	41 頁
引用文献	42 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Hidenori Takahashi, Toshiya Kamiyama, Nozomi Hirane, Nozomi Kobayashi, Takeshi Aiyama, Akihisa Nagatsu, Shingo Shimada, Tatsuya Orimo, Tatsuhiko Kakisaka, Moto Fukai, Hideki Yokoo, Hirofumi Kamachi, Shin-Ichiro Nishimura, Akinobu Taketomi
Analysis of the correlation between alterations in *N*-glycans and invasiveness in liver cancer cell lines
Oncology Reports, 2020 年発表予定

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 高橋秀徳, 柿坂達彦, 神山俊哉, 相山健, 島田慎吾, 若山顕治, 折茂達也, 敦賀陽介, 蒲池浩文, 横尾英樹, 西村紳一郎, 武富紹信
肝癌細胞株における浸潤能と糖鎖異常の解析
第 53 回日本癌治療学会学術集会, 2015.10.29-31, 京都
2. 高橋秀徳, 柿坂達彦, 神山俊哉, 相山健, 島田慎吾, 若山顕治, 折茂達也, 敦賀陽介, 蒲池浩文, 横尾英樹, 西村紳一郎, 武富紹信
肝癌細胞株における uPA の発現変化に伴う浸潤能変化と糖鎖異常の解析
第 116 回日本外科学会定期学術集会, 2016.4.14-16, 大阪
3. Hidenori Takahashi, Toshiya Kamiyama, Tatsuhiko Kakisaka, Takeshi Aiyama, Shingo Shimada, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Hirofumi Kamachi, Hideki Yokoo, Shin-ichiro Nishimura, Akinobu Taketomi
Analysis of alternation of *N*-glycan and invasiveness associated with uPA expression in hepatocellular carcinoma cell-lines
Eighth Japanese-Mongolian International Joint Symposium on Surgical Treatment of Digestive Tract Cancers, 2016.8.26-28, Ulan Bator
4. Hidenori Takahashi, Toshiya Kamiyama, Tatsuhiko Kakisaka, Takeshi Aiyama, Shingo Shimada, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Hirofumi Kamachi, Hideki Yokoo, Shin-ichiro Nishimura, Akinobu Taketomi
Analysis of alternation of *N*-glycan and invasiveness associated with u-

PA expression in hepatocellular carcinoma cell-lines

International Liver Cancer Association 2016 - 10th Annual Conference,
2016.9.9-11, Vancouver

5. 高橋秀徳，神山俊哉，柿坂達彦，相山健，島田慎吾，若山顕治，折茂達也，
蒲池浩文，横尾英樹，西村紳一郎，武富紹信

Analysis of alternation of *N*-glycan and invasiveness associated with uPA
expression in hepatocellular carcinoma cell-lines

第 27 回日本消化器癌発生学会総会，2016.9.15-16，鹿児島

6. 高橋秀徳，神山俊哉，相山健，島田慎吾，若山顕治，折茂達也，柿坂達彦，
蒲池浩文，横尾英樹，西村紳一郎，武富紹信

Analysis of *N*-glycan alternation and invasiveness associated with uPA
expression in hepatocellular carcinoma cell-lines

第 75 回日本癌学会学術総会，2016.10.6-8，横浜

要旨

【背景と目的】

糖鎖修飾は最も一般的なタンパク質の翻訳後修飾の 1 つであり、タンパク質に大きな構造的、機能的変化をもたらす。N型糖鎖はタンパク質を修飾し、多くの生体内の反応を制御している。N 型糖鎖発現の変異は癌細胞の悪性度に大きく寄与することが示唆されている。近年、自動化糖鎖精製システムを用いて簡便に大規模な糖鎖解析を可能にする SweetBlot 法が開発され、N型糖鎖を定量的にプロファイリングするグライコブロットティング法が開発された。われわれはこれまでグライコブロットティング法を用いて肝癌患者 369 人の血清における N 型糖鎖の特異的変異についての報告をしてきた。この N型糖鎖の特異的変異は全生存期間と無病生存期間の短縮における独立した危険因子であり、臨床病理学的因子との解析により浸潤能と相関していた。癌細胞では正常細胞と異なる N 型糖鎖の発現が報告されており、これらの糖鎖の発現パターンを解明することで、癌の診断や治療において大きな進展をもたらす可能性がある。

癌細胞の浸潤能は悪性度に大きく関与する因子である uPA (urokinase-type plasminogen activator) と GnT-V (N-acetylglucosaminyltransferase V) は、癌の悪性度に寄与する重要な因子として知られている。uPA はセリンプロテアーゼの一種であり、酵素活性により、癌細胞の浸潤能を制御する組織線溶において重要な役割を果たしている。uPA は正常な肝臓組織と比較して肝癌組織で有意に発現が増強し、uPA 活性が浸潤能に強く影響を与える因子であり、再発の強い予測因子であることが報告されている。肝癌細胞株における uPA 発現は浸潤能と相関しており、uPA の発現を制御することで浸潤能を変化させることが可能である。GnT-V は糖鎖形成において β 1,6 分岐鎖の伸展を触媒する糖転移酵素である。GnT-V による β 1,6 分岐鎖の伸展は癌細胞の様々な細胞内経路に影響を与え、悪性度に影響を与えている。一方で GnT-V は、マトリプターゼと uPA の発現と活性化にも影響を与えている。

N 型糖鎖の変異と浸潤能の関係は部分的にしか解明されていない。本研究では、uPA と GnT-V の発現を変化させた肝癌細胞株を用いて、N型糖鎖発変異と浸潤能変化との相関について検討した。

【方法】

ヒト肝癌細胞株のうち、高浸潤能株である HLE、低浸潤能株である HepG2

を用いた． CRISPER-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - Associated Proteins 9) システムにより HLE 細胞株において uPA ノックアウト HLE 細胞を作成した． Stealth siRNA (small interfering RNA) により HLE 細胞株において uPA, GnT-V のノックダウン細胞株を樹立した． 続いてヒト uPA を増幅させる Whole uPA primer を作成し, rt-PCR (reverse transcription- polymerase chain reaction) によって増幅した． uPA の cDNA をレンチウイルス pLVSIN-IRES-ZsGreen1 ベクターを用いて HepG2 細胞へ形質導入し, uPA 過剰発現 HepG2 細胞株を樹立した． その際, uPA において糖鎖修飾を受ける 302 番目のアスパラギン残基をグルタミン残基に点置換した uPA を過剰発現させた変異型 HepG2 細胞 (*N*型糖鎖修飾の欠損した uPA を産生) を樹立した．

細胞タンパク質発現はウェスタンブロット, 浸潤能はマトリゲルインベーションチャンバーで評価した． 各細胞株の糖鎖発現はグライコプロッティング法を用いた MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) 質量分析により解析した． また, uPA の糖鎖発現評価のためヒト尿由来 uPA の糖鎖解析も行った． P 値は 0.05 未満を有意とした．

【結果】

HLE 細胞と HepG2 細胞における検討では HLE 細胞が HepG2 細胞より浸潤能が高く, uPA が高発現していた． 糖鎖解析では 10 種類の *N*型糖鎖発現が浸潤能と相関して HepG2 細胞よりも HLE 細胞で高かった． HLE における uPA ノックダウンの検討では, Stealth siRNA により HLE コントロール細胞と比較して uPA 発現の低下がみられ, 浸潤能の有意な低下を認めた． 糖鎖解析では 13 種類の *N*型糖鎖発現が HLE コントロール細胞と比較して HLE uPA ノックダウン細胞で低下した． HepG2 細胞における uPA 過剰発現の検討では, HepG2 uPA 過剰発現細胞株, HepG2 uPA 変異細胞株とコントロール細胞株間で比較した． HepG2 uPA 過剰発現細胞と HepG2 uPA 変異細胞では, コントロール細胞と比較して uPA の発現が高かった． 浸潤能は HepG2 uPA 過剰発現細胞では浸潤能は有意に高かったが, *N*型糖鎖を欠損した変異型 uPA を産生する HepG2 uPA 変異細胞の浸潤能は変化がみられなかった． 糖鎖解析ではコントロール細胞と比較して 22 種類の *N*型糖鎖の発現が HepG2 uPA 過剰発現細胞, HepG2 uPA 変異細胞で高かった．

HLE 細胞における GnT-V ノックダウンの検討では, Stealth siRNA により

コントロール細胞と比較して GnT-V 発現の低下がみられたが、uPA 発現は変化しなかった。浸潤能解析では、GnT-V をノックダウンさせることにより、uPA 発現には変化がないにもかかわらず HLE 細胞の浸潤能は有意に低下した。糖鎖解析では 18 種類の *N* 型糖鎖の発現が HLE GnT-V ノックダウン細胞において HLE コントロール細胞と比較して低下した。ヒト尿由来 uPA の糖鎖解析で 17 種類の *N* 型糖鎖が同定された。各細胞株に共通して浸潤能の変化と相関して発現変化する特異的な質量電荷比（以下 m/z ）1892 である *N* 型糖鎖が見いだされた。この *N* 型糖鎖はヒト尿由来 uPA においても発現していた。

【考察】

浸潤能の変化に伴う糖鎖発現の変化を解析することにより、浸潤能変化と発現が相関する特異的 *N* 型糖鎖（ m/z 1892）が見いだされた。この糖鎖はヒト尿由来 uPA にも発現しており、uPA を修飾する *N* 型糖鎖の一つであると考えられる。また、*N* 型糖鎖が欠損した uPA を産生する HepG2 uPA 変異細胞の浸潤能は、uPA 産生があるにもかかわらず亢進しなかった。このことから uPA の浸潤能制御には糖鎖修飾が必要であり、特異的 *N* 型糖鎖（ m/z 1892）が重要な因子であることが示唆される。この m/z 1892 の糖鎖発現の変化を測定することは肝臓細胞の悪性度評価に役立つ可能性がある。

GnT-V は糖鎖の分岐伸展することにより、マトリプターゼの発現亢進と安定化を促し転移を促進すること、マトリプターゼは uPA を活性させることが知られている。本研究では GnT-V をノックダウンし *N* 型糖鎖発現を変化させても uPA 発現は変化しなかったが浸潤能の低下がみられた。このことから、uPA 発現があっても糖鎖発現変化による直接的な uPA 活性の低下が起こっていると考えられ、マトリプターゼを介した間接的な経路による浸潤能制御の存在が推察された。

【結論】

uPA と GnT-V の発現を変化させることにより浸潤能の変化がおり、同時に *N* 型糖鎖発現に変化がみられた。浸潤能変化に相関して発現変化する特異的 *N* 型糖鎖（ m/z 1892）を同定した。この特異的 *N* 型糖鎖（ m/z 1892）は uPA を修飾する糖鎖のひとつと考えられた。uPA の機能は、GnT-V とマトリプターゼを介した間接的な経路によるコントロールの他に GnT-V による *N* 型糖鎖発現変化による直接的なコントロールを受け、特異的 *N* 型糖鎖（ m/z 1892）が関与していることが示唆された。糖鎖発現の変化は癌細胞の診断、治療に役立つ可能性

があり，特異的 *N*型糖鎖 (m/z 1892) は，新規バイオマーカーや標的分子治療の候補となりうる．

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下のとおりである.

aoWR, aminoxy-functionalized peptide reagent
cDNA, complementary DNA
CRISPER-Cas9, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - Associated Proteins 9
EGF, epidermal growth factor
FBS, fetal bovine serum
Fuc, Fucose
GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GlcNAc, *N*-acetylglucosamine
GnT-V, *N*-acetylglucosaminyltransferase V
Hex, Hexose
HexNAc, *N*-acetylhexosamine
JCRB, Japanese Cancer Research Resource Bank
KD, knockdown
KO, knockout
MALDI-TOF, Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry
Man, Mannose
MUT, mutation
NeuAc, *N*-Acetylneuraminic acid
PCR, polymerase chain reaction
PNGase F, Peptide-N-Glycosidase F
PTFE, Polytetrafluoroethylene
rt-PCR, reverse transcription- polymerase chain reaction
siRNA, small interfering RNA
uPA, urokinase-type plasminogen activator
WT, wild type

緒言

糖鎖修飾は最も一般的なタンパク質の翻訳後修飾の 1 つであり、真核細胞のタンパク質に大きな構造的、機能的変化をもたらす (Pilobello et al., 2007 ; Ohtsubo et al., 2006). *N*型糖鎖はタンパク質を修飾し、多くの生体内の反応を制御している (Helenius et al., 2001). *N*型糖鎖発現の変異は癌細胞の増殖、分化、浸潤、および転移に重要な役割を果たすことが示唆されている (Lin et al., 2020). 糖鎖は質量分析を使用して分析および解析することが可能であり、癌細胞から分泌、放出された糖鎖の働きについても解析が可能となってきた (Holst et al., 2019 ; Wang et al., 2020). 近年、自動化糖鎖精製システムを用いて簡便に大規模な糖鎖解析を可能にする SweetBlot 法が開発され (Miura et al., 2008), *N*型糖鎖を定量的にプロファイリングするグライコブロットティング法が開発された. われわれはこれまでグライコブロットティング法を用いて肝癌患者 369 人の血清における *N*型糖鎖の特異的変異についての報告をしてきた. この *N*型糖鎖の特異的変異は全生存期間と無病生存期間の短縮における独立した危険因子であった (Kamiyama et al., 2013). また、臨床病理学的因子との解析によりこの特異的糖鎖変異は浸潤能と相関していた. 一方で、ヒト脳腫瘍において、病期ごとの悪性度に相関する特定の糖鎖修飾パターンも報告されている (Furukawa et al., 2015). その他にも *N*型糖鎖修飾における変異は、いくつかの癌腫において悪性度に影響を与える可能性が報告されている (Kang et al., 2011 ; Vanhooren et al., 2009 ; Kirmiz et al., 2007 ; Alley et al., 2012 ; Lee et al., 2020). また、肝癌細胞において *N*型糖鎖へのフコシル化やシアル酸付加が悪性度に影響を与えることが報告されている (Comunale et al., 2009 ; Betesh et al., 2017 ; Mondal et al., 2011). 正常細胞と比較すると、癌細胞は正常細胞と異なる構造の *N*型糖鎖を発現しており、これらの糖鎖の発現パターンを解明することで、癌の診断や治療において大きな進展をもたらす可能性がある.

癌細胞の浸潤能は悪性度に大きく関与する因子である. uPA (urokinase-type plasminogen activator) と GnT-V (*N*-acetylglucosaminyltransferase V) は、癌の悪性度に寄与する重要な因子として知られている. uPA は、プラスミノゲンをプラスミンに変換するセリンプロテアーゼの一種であり、この酵素活性により、uPA は癌細胞の浸潤能をコントロールする反応系の一つである組織線溶において重要な役割を果たしている (Ahmed et al., 2014). uPA は、肝癌患

者の正常な肝臓組織と比較して、肝癌組織で有意に発現が増強されていることがわかっている (Zhou et al., 2006). 肝癌においては uPA 活性が浸潤能に強く影響を与える因子であり、再発の強い予測因子であることが報告されている (Itoh et al., 2000). また、肝癌細胞株における uPA 発現は浸潤能と相関しており、uPA の発現を制御することで浸潤能を変化させることが可能である (Kamiyama et al., 1998). GnT-V は、糖鎖形成において β 1,6 分岐鎖の伸展を触媒する糖転移酵素である. GnT-V による β 1,6 分岐鎖の伸展は、癌細胞の接着能、運動能、血管新生、およびアポトーシスに関与する細胞内経路に影響を与えることにより、転移能や悪性度に影響を与える (Handerson et al., 2003). 一方で GnT-V は、マトリプターゼと uPA の発現と活性化にも影響を与えている (Lee et al., 2000 ; Takeuchi et al., 2000 ; Ito et al., 2006).

肝癌を含む様々な癌において浸潤能を含む悪性度と *N* 型糖鎖の変異についての様々な報告がされてきた. *N* 型糖鎖の発現パターンと悪性度の研究が主であり、各糖鎖単位での検討は十分にされていない. 本研究では、肝癌における浸潤能変化と *N* 型糖鎖変異の関連について明らかにするために浸潤能をコントロールする因子である uPA と GnT-V に着目した. uPA と GnT-V の発現を亢進、低下させることにより浸潤能の亢進や低下を起こし、その浸潤能の変化に伴って *N* 型糖鎖がどのように発現変化するか、糖鎖の発現パターンなどに着目して検討を行った. また、uPA に結合し修飾する *N* 型糖鎖について検討するためにヒト尿由来 uPA の糖鎖解析を行った.

N 型糖鎖発現の変化については発現パターンの変化だけではなく各糖鎖単位での検討も報告されている. 本研究においては各糖鎖単位で浸潤能変化に伴って発現が増減する *N* 型糖鎖を検討することで浸潤能に関連する特異的 *N* 型糖鎖の検索を行った. 浸潤能と相関する特異的 *N* 型糖鎖の発現変化を同定することは癌の診断や治療に大きく貢献する可能性がある.

方法

1. 肝癌細胞株の維持

ヒト肝癌細胞株のうち高浸潤能細胞株として HLE 細胞株, 低浸潤能細胞株として HepG2 細胞株を採用することとした. 各細胞株は JCRB (Japanese Cancer Research Resource Bank) 細胞バンクより供給された. 細胞は 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum) (Equitech-Bio Inc., TX, USA) と 1% (v/v) の penicillin/streptomycin (Gibco, NY, USA) を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco, Tokyo, Japan) をもちいて 5%CO₂ 濃度で 37°C の環境下の培養器で維持した.

2. uPA ノックアウト細胞の樹立

uPA ノックアウトに伴う浸潤能低下による *N* 型糖鎖発現の変化を検討するために高浸潤能株であり uPA 高発現している HLE の uPA をノックアウトすることとした. CRISPER-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – Associated Proteins 9) システムにより uPA ノックアウト HLE 細胞を樹立した. uPA 過剰発現株樹立の際に使用した Whole uPA primer を用いてプラスミド pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Watertown, Massachusetts, USA) に Ligation した. シークエンスで uPA 配列が正しく導入されていることを確認した. プラスミドを大腸菌 DH5 α (Takara Bio, Shiga, Japan) へトランスフェクションした. ゲノムを抽出し, PCR (polymerase chain reaction) にて増幅させ HLE 細胞にトランスフェクションさせた. フローサイトメトリーを 2 回行うことで安定したクローンを選別した.

3. uPA, GnT-V ノックダウン HLE 細胞の樹立

uPA ノックダウンに伴う浸潤能低下による *N* 型糖鎖発現の変化を検討するために高浸潤能株であり uPA 高発現している HLE の uPA をノックダウンすることとした. また, GnT-V ノックダウンに伴う uPA 発現, 浸潤能の変化と糖鎖発現の変化を検討するため HLE の GnT-V をノックダウンすることとした. Stealth siRNA (small interfering RNA) は Life Technologies (Tokyo, Japan) より, uPA (PLAUHSS10807, PLAUHSS108078), GnT-V

(MGAT5HSS106510), ネガティブコントロール (Stealth™ RNAi Negative Control Duplex) をそれぞれ購入した. Stealth siRNA の塩基配列は下記表 1 に示した. トランスフェクション試薬としてリポフェクタミン RNAiMAX 試薬 (Life Technologies, Tokyo, Japan) を使用し, それぞれの siRNA を HLE 細胞株にトランスフェクションした. トランスフェクションの際には 10%FBS 添加培地中に 30×10^4 個の細胞を 10cm ディッシュに播種し, 24 時間のインキュベーション後, Stealth siRNA を添加し, さらに 48 時間かけてトランスフェクションした.

表 1 Stealth siRNA 塩基配列

		Forward	Reverse
uPA	PLAUHSS108076	5'-GCCCUCCUCUCCUCCAGAAGAAUUA-3'	5'-UAAUUCUUCUGGAGGAGAGGAGGGC-3'
	PLAUHSS108078	5'-CCAUCCCGGACUAUACAGACCAUCU-3'	5'-AGAUGGUCUGUAUAGUCCGGGAUGG-3'
GnT-V	MGAT5HSS106510	5'-GAAAGCGGAAGAAAGUCCUCGUUCA-3'	5'-UGAACGAGGACUUUCUCCGCUUUC-3'

4. uPA 過剰発現細胞の樹立

uPA 過剰発現に伴う浸潤能亢進による *N* 型糖鎖発現の変化を検討するために低浸潤能株であり uPA 低発現している HepG2 において uPA を過剰発現することとした. ヒト uPA を増幅させる Whole uPA primer を uPA 遺伝子配列 (1296bp) に基づいて設計し Life Technologies より購入した. Whole uPA primer の塩基配列は下記表 2 に示した. uPA の cDNA (complementary DNA) を HLF 細胞の cDNA をテンプレートとして, QIAquick Spin (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いた rt-PCR (reverse transcription- polymerase chain reaction) によって増幅した. uPA の cDNA をレンチウイルスの pLVSIN-IRES-ZsGreen1 ベクター (Takara Bio, Shiga, Japan) にクローニングした. レンチウイルス上清は, Lenti-X 293T パッケージングシステム (Takara Bio, Shiga, Japan) を使用して作製し, HepG2 細胞への形質導入に使用した. 対照群として空ベクターを含む上清を HepG2 細胞へと同様に形質導入した. ベクターのインサートは, Big Dye Termination Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) を使用してシーケンスすることにより確認した. フローサイトメトリーを 2 回行うことで安定したクローンを選択した.

表 2 Whole uPA primer の塩基配列

	Forward	Reverse
Whole uPA primer	5'-TCGACTCGAGATGAGAGCCCTGCTGGC-3'	5'-TCGACTCGAGTCAGAGGGCCAGGCCATTC-3'

5. uPA 変異 HepG2 細胞の樹立

uPA 活性における糖鎖修飾の有無の影響を検討するため、糖鎖修飾のない uPA を発現する変異株を樹立することとした。uPA の糖鎖修飾は 302 番目のアスパラギン残基を含む部位に行われる。このアスパラギン残基を uPA 変異 primer (Life Technologies, Tokyo, Japan) と QIAprep Spin Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いた点置換によりグルタミン残基に置換した uPA 変異 HepG2 細胞を樹立した。uPA 変異 primer の塩基配列は下記表 3 に示した。変異体のプラスミドを HepG2 細胞にトランスフェクションすることにより、uPA 変異 HepG2 細胞は N 型糖鎖の修飾を受けない uPA を産生する。

表 3 uPA 変異 primer の塩基配列

uPA mutation primer	5'-CCGGATAGAGATAGTCGGTAGATTGCTCTTTTCC-3',
---------------------	---

6. ウェスタンブロット

細胞タンパク質は、培養細胞用の Subcellular Protein Fractionation Kit (Pierce Biotechnology, Waltham, MA, USA) を使用して抽出した。サンプルをドデシル硫酸ナトリウム試薬 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) と混合し、95°C で 5 分間沸騰させ、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ポリフッ化ビニリデン膜 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) に転写した。一次抗体には uPA はヤギモノクローナル抗ヒト抗体 (sc-19088, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) を 1 : 750 倍希釈、GnT-V はウサギポリクローナル抗ヒト抗体 (EP6274, abcam, Tokyo, Japan) を 1 : 200 希釈、GAPDH はウサギモノクローナル抗ヒト抗体 (D16H11, Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan) を 2000 希釈で反応させた。抗体は 0.1% Tween 20 を含む 1×Tris 緩衝生理食塩水で希釈した。二次抗体は uPA, GAPDH では 1 : 5000, GnT-V では 1 : 2000 に希釈し反応させた。GAPDH と β アクチンが肝癌細胞株すべてで均一に発現していることを確認し、コントロールとして GAPDH を用いることとし、各細胞での uPA と GnT-V のタンパク発現を比較した。

7. 浸潤能解析

24 ウェルマトリゲルインベーションチャンバー (Corning, New York, NY, USA) を用いて各細胞株の浸潤能解析を行った. 10%FBS を含む培地を下部チャンバーに添加し, 約 3×10^4 個の HLE 細胞または 15×10^4 個の HepG2 細胞を FBS を含まない培地で上部チャンバーに播種した. 48 時間後, 上部チャンバーの細胞を綿棒で取り除いた. Diff-Quik 染色キット (Sysmex, Hyogo, Japan) を使用して膜を染色し, マトリゲルを越えて浸潤した細胞数を光学顕微鏡を用いて 20 倍でカウントした.

8. 細胞株からの糖タンパク質の抽出

N 型糖鎖解析のために, 各細胞株から糖タンパク質を抽出した (Fujitani et al., 2013). 1×10^6 個の細胞からなる細胞ペレットを, 超音波ホモジナイザー (Taitec Corp., Saitama, Japan) を使用して, 2%ナトリウムを含む 100 mM 酢酸トリスバッファー (100 μ L, pH 7.4) で粉碎した. 細胞タンパク質の還元的アルキル化は, 500 mM トリスホスフィン塩酸 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を室温で 60 分間添加し, その後 200 mM ヨードアセトアミド (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を室温で 30 分間反応させた. 還元的アルキル化後, エタノールを加え, -30°C で 3 時間インキュベートすることにより, エタノール沈殿を行った. 上清および沈殿したタンパク質を 4°C 環境下で $20,000 \times g$ で 10 分間遠心分離することにより分離し, 沈殿物を再びエタノールで洗浄した. 糖タンパク質と *N* 型糖鎖を含む沈殿物を収集し, 37°C で 10 分間乾燥した.

9. ヒト uPA の前処理

糖タンパク質である uPA に結合する *N* 型糖鎖の解析のために uPA の糖鎖解析を計画した. 癌細胞の産生する uPA の抽出, 精製は困難であると判断したこと, 癌細胞が産生する uPA に限らず, ヒト uPA に一般的に結合する *N* 型糖鎖の検討が目的であるため, ヒト尿中の uPA を用いて検討することとした. 酵素コエンザイム薬として一般市販されているヒト尿から精製したウロキナーゼ (PN: U0633-25UG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を購入し使用した. 120 mM 1,4-ジチオスレイトール, 重炭酸アンモニウム, 1%ナトリウムドデシルを含む 0.1% Triton X-100 に溶解した. 60°C で 30 分間インキュベートした後, 123 mM ヨードアセトアミド (10 μ L) を混合物に加え, 室温でインキュベート

した．60 分後，混合物をトリプシン（Wako, Osaka, Japan）を用いて 37℃で overnight 処理した．続いて 90℃で 10 分間処理し酵素を失活させた．室温に冷却した後，混合物を 100 U の *Flavobacterium meningosepticum* (New England BioLabs Japan Inc, Tokyo, Japan) からの PNGase F (Peptide-N-Glycosidase F) を用いて 37℃で overnight 処理した．次に，SpeedVac でサンプル混合物を乾燥させた．

10. 糖鎖解析

細胞培養のサンプルからの *N*型糖鎖とヒト尿由来ウロキナーゼは，合成ポリマービーズである BlotGlyco H ビーズ（Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan）を使用したグライコブロットティング法によって精製した．すべての手順で，96 ウェルプレートプラットフォームを含む SweetBlot 自動糖鎖精製システム（System Instruments, Hachioji, Japan）を使用した．

10.1 グライコブロットティング法による *N*型糖鎖の精製と修飾

10mg/mL の BlotGlyco H ビーズ 250 μ L を，マルチスクリーンソルビナート親水性 PTFE (Polytetrafluoroethylene) 96 ウェルフィルタープレート（EMD Millipore, Billerica, MA, USA）のウェルに等分した．真空ポンプを使用して水を除去した後，PNGase F で処理したサンプルをウェルに添加した．続いて 20 μ L の Internal standard（シアリル化グリカン 2.5 μ M）と 180 μ L のアセトニトリル 2%酢酸を加えた．次に，フィルタープレートを 80℃で 45 分間インキュベートし，安定で可逆的なヒドラジン結合によって *N*型糖鎖をビーズに捕捉しさせた．つづいて 10mM 重炭酸アンモニウムに 200 μ L の 2 M グアニジン塩酸を添加しビーズを洗浄し，同量の水と 1% トリエチルアミンメタノール溶液で洗浄した．各洗浄工程は 2 回行った．次に，*N*型糖鎖結合ビーズを，メタノール中の 10%無水酢酸と共に室温で 30 分間インキュベートして，未反応のヒドラジド基がアセチル化によってキャッピングされるようにした．キャッピングした後，反応溶液を真空下で除去した．シアル酸修飾の前処理としてビーズを塩酸，メタノール，およびジオキサンで連続的に洗浄した．20mM 3-メチル-1-*p*-トリルトリアゼン（Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan）100 μ L をジオキサンに添加し，60℃で 90 分間乾燥することでビーズ上のシアル酸のカルボキシル基のメチルエステル化を行った．メチルエステル化した後，ビーズを 200 μ L のジオキサン，

水, メタノール, 水で連続的に洗浄した. ビーズに捕捉された糖鎖は, 180 μ L の 2%AcOH 溶液中に 20 μ L の aoWR (aminooxy-functionalized peptide reagent) (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) を添加し, 80°C で 45 分間 イミノ転移反応させた. この反応後, 糖鎖を 100 μ L の水で溶出し, Mass PREPTM HILIC μ Eluent プレート (Waters, Milford, MA, USA) で精製し, 回収したサンプルを真空下で乾燥させた.

10.2 MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) 質量分析

グライコブロットティング法により精製された *N*型糖鎖は, 5%ACN 水に溶かした 5 μ L の 1%AcOH で希釈した. 1 μ L のサンプルを 1 μ L の 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) とイオン化液体マトリックスとして混合し, MALDI ターゲットプレートに添加した. 次に, 分析物を, Ultraflex time-of-flight mass spectrometer III (Brucker Daltonics, Billerica, MA, USA) を使用して MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) 分析を行った. MALDI-TOF MS スペクトルの *N*型糖鎖ピークは FlexAnalysis v.3 (Brucker Daltonics, Bremen, Germany) を使用して選択した. 糖鎖構造は GlycoMod ツールを使用して推定した.

11 統計分析

3 群間解析には Tukey 検定による一元配置分散分析, 2 群間解析には Student の *t* 検定を用いて行った. 統計学的解析ソフト JMP Pro 12.0.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用して統計分析を行った. 有意性は, *P* 値 0.05 未満として定義した.

結果

1. HLE 細胞と HepG2 細胞における uPA 発現, 浸潤能, *N*型糖鎖解析

HLE 細胞と HepG2 細胞を比較すると HLE 細胞において浸潤能が高かった (図 1-1, 図 1-2). ウェスタンブロットによりそれぞれの肝癌細胞株における uPA の発現を測定したところ, 高侵襲性細胞株である HLE における uPA の発現は, 低侵襲性細胞株である HepG2 細胞における発現より高かった (図 1-3). HLE 細胞および HepG2 細胞でグライコプロッティング法により糖鎖解析を行い浸潤能と *N*型糖鎖発現の相関を解析した. 75 種類の *N*型糖鎖が同定された. ハイマンノース型, 複合・混合型, その他の糖鎖の割合を比較したところ, HLE では HepG2 細胞より糖鎖発現が少なかった (図 1-4). フコシル化, シアル酸付加している糖鎖の割合については, HLE ではフコシル化していない糖鎖の割合の低下とシアル酸付加している糖鎖の割合の低下がみられた (図 1-5). 糖鎖別では, 10 種類の *N*型糖鎖 (m/z 1851, 1892, 2029, 2054, 2070, 2216, 2521, 2887, 3192, 3252) の発現が HepG2 細胞よりも HLE 細胞で高かった (図 1-6).

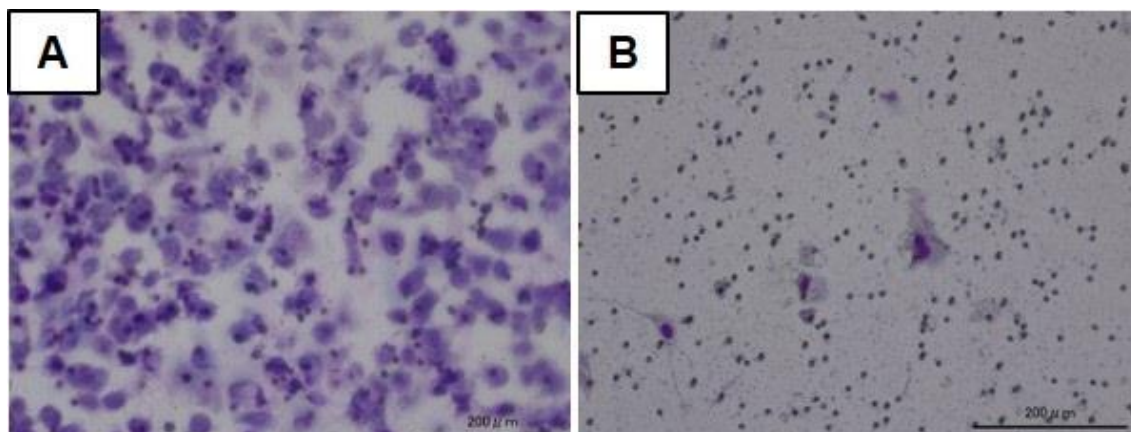


図 1-1 HLE 細胞, HepG2 細胞における浸潤能解析
(A) HLE 細胞, (B) HepG2 細胞

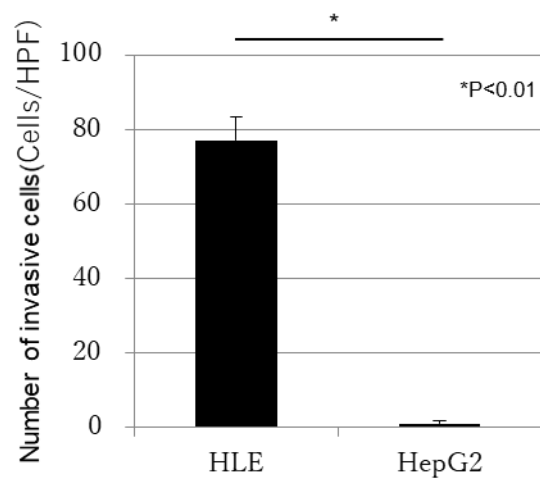


図 1-2 HLE 細胞と HepG2 細胞の浸潤能の比較

HepG2 細胞と比較して HLE 細胞において浸潤能は高かった. * $p<0.01$

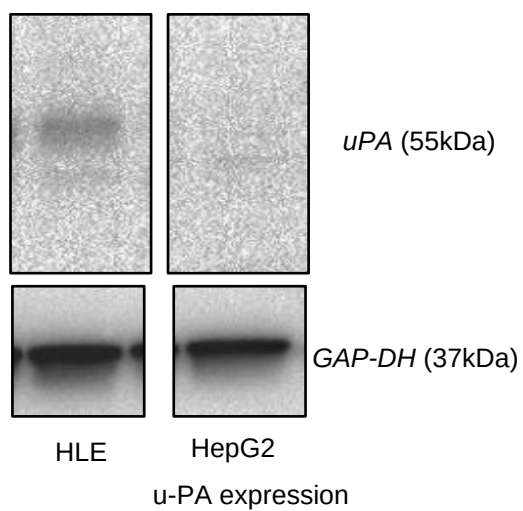


図 1-3 HLE 細胞と HepG2 細胞における uPA 発現

uPA 発現は HLE ではみられたが HepG2 では見られなかった.

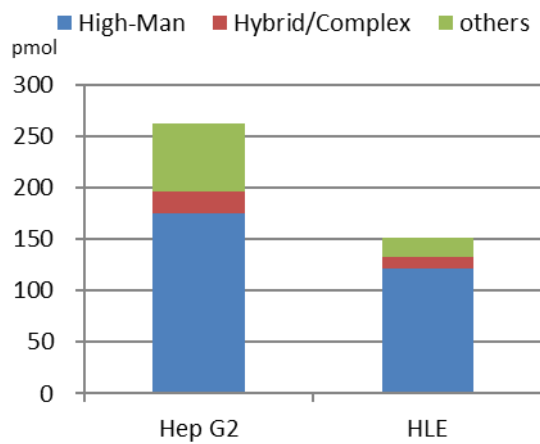


図 1-4 HLE, HepG2 におけるハイマンノース型, 複合・混合型の糖鎖の割合
HLE では HepG2 細胞よりそれぞれの型の糖鎖発現が少ない

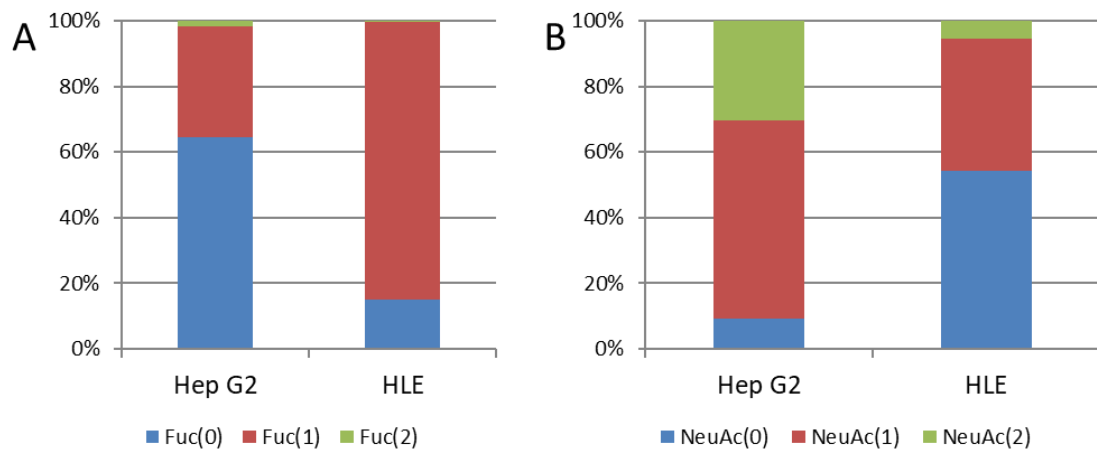


図 1-5 フコシル化, シアル酸付加している糖鎖の割合
(A) フコシル化している糖鎖の割合は HLE で高かった.
(B) シアル酸付加している糖鎖の割合は HLE で低かった.
Fuc, Fucose; NeuAc, *N*-Acetylneuraminic acid

	m/z	Glycan structure	Presumptive composition	HepG2 (pmol)	HLE (pmol)
Hybrid /Complex	1851		(Hex)1 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.190	0.259
	1892		(HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.315	0.723
	2029		(Hex)3 (HexNAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.074	0.098
	2054		(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.019	0.028
	2070		(Hex)2 (HexNAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.021	0.540
	2216		(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.051	2.798
	2521		(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	1.815	3.276
	2887		(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.135	0.204
	3192		(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.015	0.046
	3252		(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.018	0.023
Internal standard	2478		(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAcAm)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	10.000	10.000

図 1-6 HLE 細胞と HepG2 細胞における *N*型糖鎖解析

10 種類の *N*型糖鎖の発現が HepG2 細胞よりも HLE 細胞で高値であった。

● Hex, Hexose; ■ HexNAc, N-acetylhexosamine, GlcNAc, *N*-acetylglucosamine
● Man, Mannose; ◆ NeuAc, *N*-Acetylneuraminic acid; ▲ Deoxyhexose

2. uPA ノックアウト HLE 細胞における uPA 発現，浸潤能

uPA に対する CRISPER-Cas9 システムによる HLE uPA ノックアウト細胞 (HLE uPA KO(knockout)細胞) と HLE コントロール細胞を作成した。ウエス

タンブロットにより uPA のノックアウトの検証を複数回行ったが、uPA バンドが描出されており、uPA の完全なノックアウトが得られなかった (図 2)。CRISPER-Cas9 システムにおける手技的な問題などから有効なノックアウトができなかったものと考えられた。そのため、Stealth siRNA を用いたノックダウンで検証することとした。



図 2 uPA ノックアウト HLE 細胞における uPA 発現

uPA に対する CRISPER-Cas9 システムによるノックアウトで HLE 細胞における uPA 発現は低下した。

3. uPA ノックダウン HLE 細胞における uPA 発現, 浸潤能, *N*型糖鎖解析

uPA に対する 2 つの Stealth siRNA とコントロールを用いて HLE uPA siRNA1 細胞, HLE uPA siRNA2 細胞, HLE コントロール細胞を樹立した。ウェスタンブロットにより, HLE uPA siRNA1 細胞および HLE uPA siRNA2 細胞では, HLE コントロール細胞と比較して uPA の発現が低下していた (図 3-1)。浸潤能解析では, HLE uPA siRNA1 細胞および HLE uPA siRNA2 細胞において HLE コントロール細胞よりも有意に浸潤能が低かった (図 3-2, 図 3-3)。グライコプロッティング法による解析では 86 種類の *N*型糖鎖が同定された。ハイマンノース型, 複合・混合型, その他の糖鎖の割合を比較したところ, HLE uPA siRNA1 細胞および HLE uPA siRNA2 細胞では HLE コントロール細胞より糖鎖発現が少ない傾向にあった (図 3-4)。フコシル化の割合は各細胞間で差がみられなかった。シアル酸付加している糖鎖の割合については, HLE uPA siRNA1 細胞でシアル酸付加している糖鎖の割合が高かったが, HLE uPA siRNA2 細胞ではコントロールと差が見られなかった (図 3-5)。13 種類の *N*型糖鎖 (m/z 1502, 1664, 1826, 1988, 2150, 2312, 2474, 1810, 1542, 1689, 1705, 1851, 1892, 2095) の濃度が HLE コントロール細胞と比較して HLE uPA siRNA1 細胞および HLE uPA siRNA2 細胞で 20%以上低かった (図 3-6)。

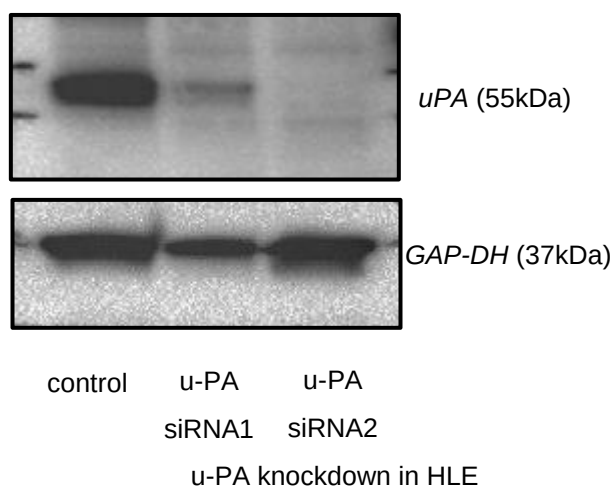


図 3-1 HLE 細胞における Stealth siRNA による uPA ノックダウン
u-PA に対する 2 つの siRNA は HLE 細胞の u-PA タンパク質発現を低下させた。

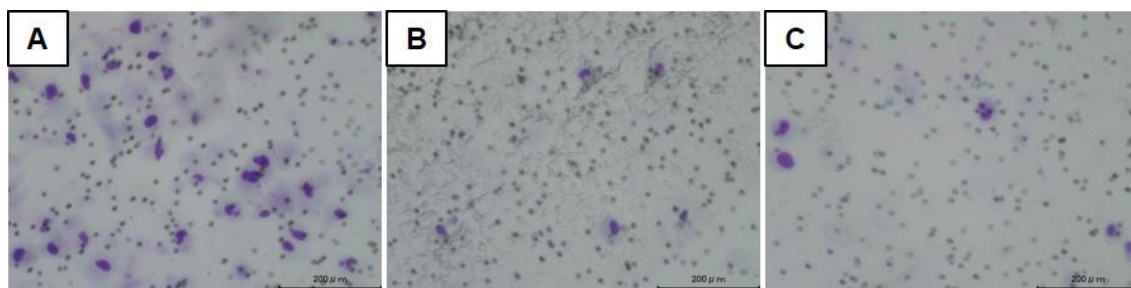


図 3-2 uPA ノックダウン HLE 細胞における浸潤能解析
(A) HLE コントロール細胞, (B) HLE uPA siRNA1 細胞, (C) HLE uPA siRNA2 細胞

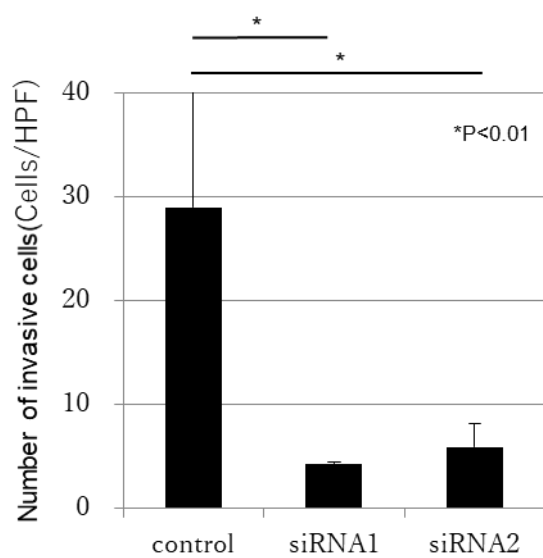


図 3-3 uPA ノックダウン HLE 細胞における浸潤能解析

HLE コントロール細胞と比較して HLE uPA siRNA1 細胞, HLE uPA siRNA2 細胞共に有意に浸潤能が低下していた. *p<0.01

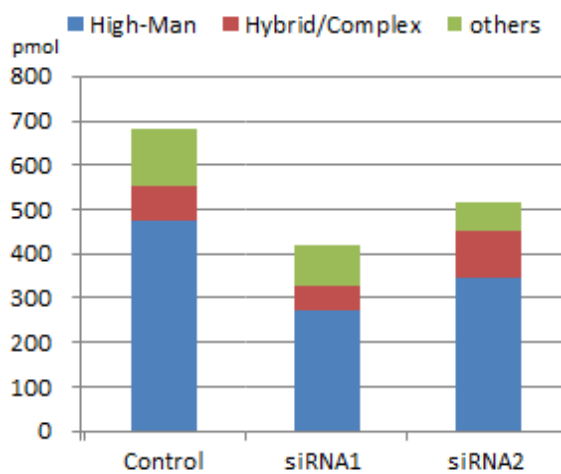


図 3-4 HLE ノックダウン細胞におけるハイマンノース型, 複合・混合型の糖鎖の割合

HLE HLE uPA siRNA1 細胞および HLE uPA siRNA2 細胞では HLE コントロール細胞より糖鎖発現が少ない傾向にあった

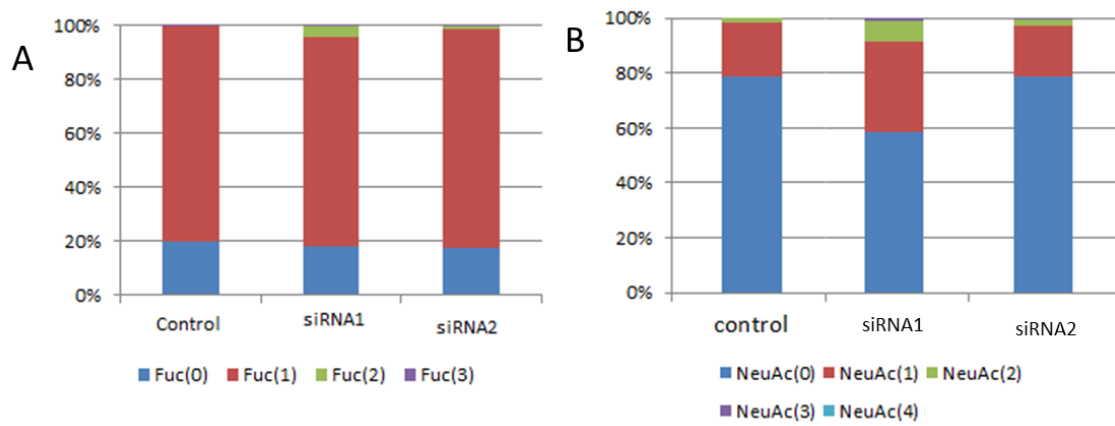


図 3-5 フコシル化, シアル酸付加している糖鎖の割合

(A) フコシル化している糖鎖の割合には差がみられなかった.

(B) シアル酸付加している糖鎖の割合は HLE uPA siRNA1 細胞で高かったが, HLE uPA siRNA2 細胞ではコントロールと差が見られなかった.

	m/z	Glycan structure	Presumptive composition	Control (pmol)	u-PA siRNA1 (pmol)	u-PA siRNA2 (pmol)
High-Man	1502		(Hex)1 + (Man)3 (GlcNac)2	1.852	1.333	1.340
	1664		(Hex)2 + (Man)3 (GlcNac)2	19.517	11.834	8.318
	1826		(Hex)3 + (Man)3 (GlcNac)2	77.666	49.953	39.162
	1988		(Hex)4 + (Man)3 (GlcNac)2	86.449	69.903	49.005
	2150		(Hex)5 + (Man)3 (GlcNac)2	177.160	142.312	104.646
	2312		(Hex)6 + (Man)3 (GlcNac)2	106.915	67.117	67.992
	2474		(Hex)7 + (Man)3 (GlcNac)2	3.885	2.697	2.532
	1810		(Hex)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	0.101	0.068	0.032
Hybrid /Complex	1543		(HexNac)1 + (Man)3 (GlcNac)2	0.351	0.271	0.160
	1689		(HexNac)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	4.476	3.885	1.966
	1705		(Hex)1 (HexNac)1 + (Man)3 (GlcNac)2	0.836	0.647	0.381
	1851		(Hex)1 (HexNac)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	5.584	4.116	2.590
	1892		(HexNac)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	4.445	2.467	0.706
	2095		(HexNac)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	0.586	0.298	0.118
Internal standard	2478		(Hex)2 (HexNac)2 (NeuAcAm)2 + (Man)3 (GlcNac)2	20.000	20.000	20.000

図 3-6 uPA ノックダウン HLE 細胞における *N*型糖鎖解析
13 種類の *N*型糖鎖の発現が HLE uPA siRNA1 細胞, HLE uPA siRNA2 細胞において浸潤能と相関して低かった.

4. uPA 過剰発現 HepG2 細胞における uPA 発現, 浸潤能, *N*型糖鎖解析

レンチウイルスベクターを使用して uPA を過剰発現する HepG2 uPA 過剰発現細胞株 (HepG2 uPA WT(wild type)細胞) と空のベクターを使用して HepG2 コントロール細胞株 (HepG2 コントロール細胞) を樹立した. また, 変異型 uPA タンパク質を過剰発現させることで *N* 型糖鎖修飾を持たない変異型 uPA を発現する HepG2 uPA 変異細胞株 (HepG2 uPA MUT(mutation)細胞) も樹立した. ウェスタンブロットにより, HepG2 uPA WT 細胞と HepG2 uPA MUT 細胞では, HepG2 コントロール細胞と比較して uPA の発現が亢進することが示された (図 4-1). HepG2 uPA WT 細胞では HepG2 uPA MUT 細胞よりも uPA が高発現していた. HepG2 uPA WT の浸潤能は, HepG2 コントロール細胞の浸潤能と比較して大幅に亢進していたが, uPA の 302 番目のアスパラギン残基がグルタミン残基に点置換されることにより *N* 型糖鎖を欠く uPA を産生する HepG2 uPA MUT の浸潤能は亢進していなかった (図 4-2, 図 4-3). グライコブロットイング法による糖鎖解析では 72 種類の *N* 型糖鎖が同定された. ハイマンノース型, 複合・混合型, その他の糖鎖の割合を比較したところ, uPA 過剰発現しても糖鎖発現の明らかな変化は見られなかった (図 4-4). フコシル化, シアル酸付加した糖鎖の割合は各細胞間で差がみられなかった (図 4-5). 22 種類の *N* 型糖鎖 (m/z 1502, 2312, 2474, 1543, 1689, 1705, 1851, 1982, 2010, 2095, 2156, 2172, 2334, 2375, 2512, 2668, 2681, 2741, 2827, 2887, 3192, 3497) の濃度が HepG2 コントロール細胞と比較して HepG2 uPA WT で 20%以上高かった (図 4-6). これらの 22 種類の *N* 型糖鎖は, HepG2 uPA MUT においても高かった.

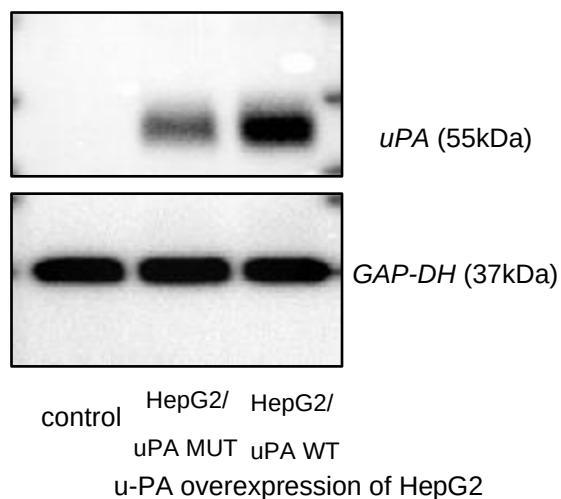


図 4-1 HepG2 細胞における uPA 過剰発現

レンチウイルスによる uPA 過剰発現により HepG2 uPA WT 細胞と HepG2 uPA MUT 細胞において uPA 発現が亢進した。HepG2 uPA WT 細胞と HepG2 uPA MUT 細胞間で比較すると HepG2 uPA WT 細胞においてより uPA 発現が亢進していた。

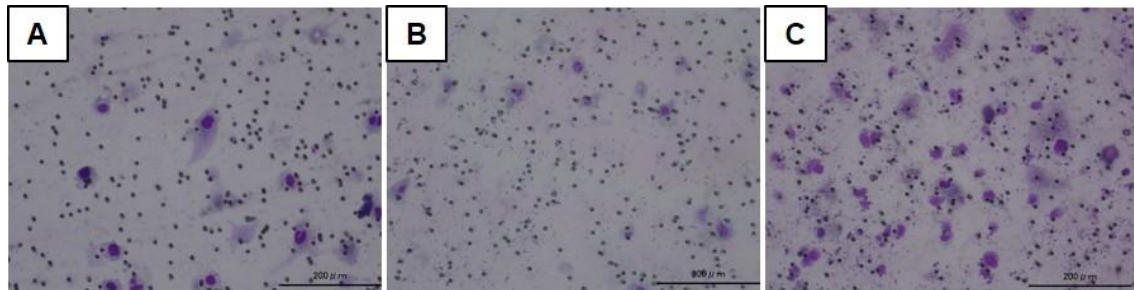


図 4-2 uPA 過剰発現 HepG2 細胞における浸潤能解析
(A) HepG2 コントロール細胞, (B) HepG2 uPA MUT 細胞, (C) HepG2 uPA WT 細胞

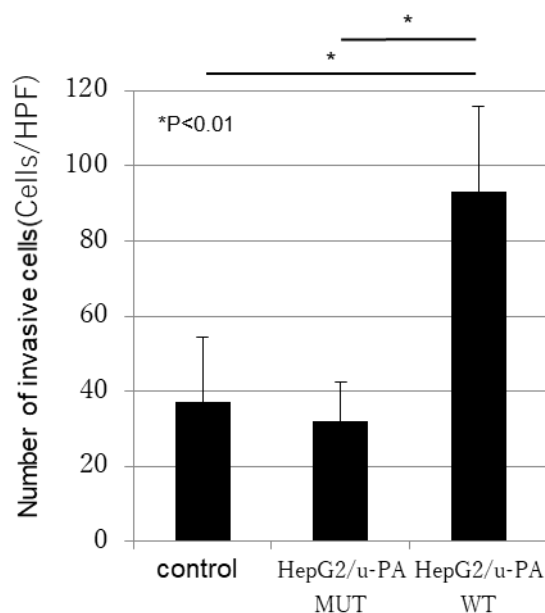


図 4-3 uPA 過剰発現 HepG2 細胞における浸潤能解析
HepG2 uPA WT 細胞の浸潤能は HepG2 コントロール細胞の浸潤能と比較して有意に亢進していた。HepG2 uPA MUT 細胞の浸潤能は HepG2 コントロール細胞の浸潤能と比較して亢進していなかった。
*p<0.01

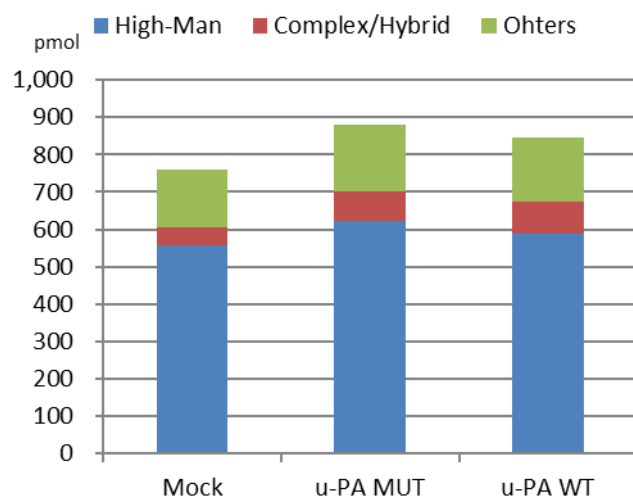


図 4-4 HepG2 uPA ノックダウン細胞におけるハイマンノース型，複合・混合型の糖鎖の割合

uPA 過剰発現しても糖鎖発現の明らかな変化は見られなかった。

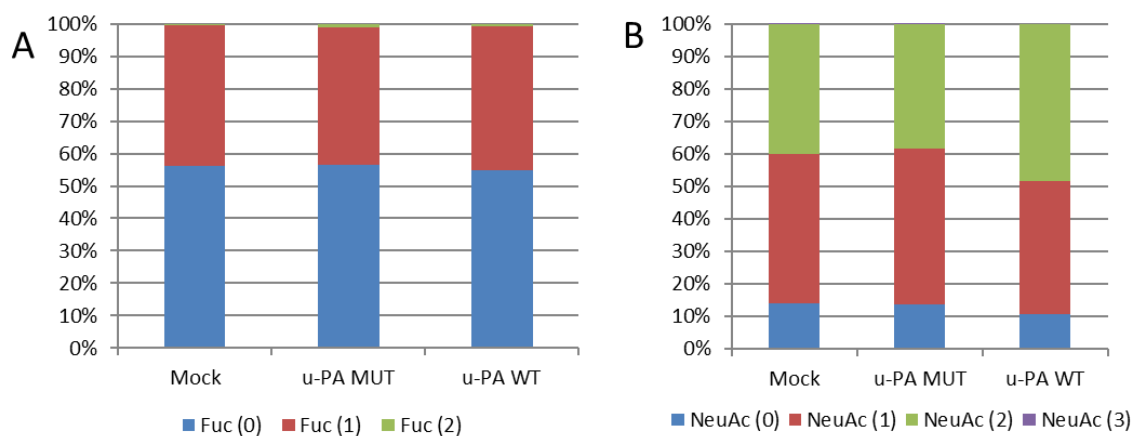


図 4-5 フコシル化，シアル酸付加している糖鎖の割合

各細胞間で差がみられなかった。

	m/z	Glycan structure	Presumptive composition	Control (pmol)	HepG2 u-PAMUT (pmol)	HepG2 u-PAWT (pmol)
High-Man	1502		(Hex)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	11.518	15.581	13.951
	2312		(Hex)6 + (Man)3 (GlcNAc)2	102.799	120.531	118.537
	2474		(Hex)7 + (Man)3 (GlcNAc)2	5.957	12.364	10.266
Complex /Hybrid	1543		(HexNAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.843	1.223	1.217
	1689		(HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	2.169	2.879	2.871
	1705		(Hex)1 (HexNAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.340	0.598	0.521
	1851		(Hex)1 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.563	0.878	0.672
	1892		(HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	1.857	2.834	2.447
	2010		(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	1.155	1.590	1.636
	2095		(HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.566	0.902	0.668
	2156		(Hex)1 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	1.492	2.598	1.910
	2172		(Hex)2 (HexNAc)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	6.862	10.112	9.320
	2334		(Hex)3 (HexNAc)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	7.156	10.703	10.358
	2375		(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	2.735	5.087	5.271
	2521		(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	2.905	4.702	5.064
	2668		(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.255	0.781	0.463
	2681		(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	6.859	11.583	15.713
	2741		(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.105	0.201	0.216
	2827		(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	12.814	18.095	25.088
	2887		(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.192	0.428	0.508
	3192		(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.046	0.110	0.161
	3497		(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.035	0.092	0.181
Internal standard	2478		(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAcAm)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	20.000	20.000	20.000

図 4-6 uPA 過剰発現 HepG2 細胞における *N* 型糖鎖解析

22 種類の *N* 型糖鎖の発現が HepG2 コントロール細胞と比較して HepG2 uPA WT 細胞において浸潤能と相関して高かった。これらの *N* 型糖鎖は、HepG2 uPA MUT においても高かった。

5. GnT-V ノックダウン HLE 細胞における uPA 発現, 浸潤能, *N*型糖鎖解析

GnT-V に対する Stealth siRNA とコントロールを用いて HLE GnT-V ノックダウン細胞 (HLE GnT-V KD(knockdown)細胞) と HLE コントロール細胞を樹立した. ウェスタンブロットにより GnT-V がノックダウンされたことを検証し, 同時に uPA 発現が HLE GnT-V KD 細胞と HLE コントロール細胞において変化しないことを確認した (図 5-1). 浸潤能解析では, GnT-V をノックダウンさせることにより, uPA 発現には変化がないにもかかわらず HLE 細胞の浸潤能を有意に低下させることが示された (図 5-2, 図 5-3). グライコプロッティング法による糖鎖解析では 97 種類の *N*型糖鎖が同定された. 18 種類の *N*型糖鎖 (m/z 1892, 2403, 2563, 2681, 2827, 2887, 2928, 3030, 3192, 3351, 3395, 3411, 3497, 3557, 3656, 3716, 3862, 3922) の発現が HLE GnT-V KD 細胞において HLE コントロール細胞と比較して 20%以上低かった (図 5-4).

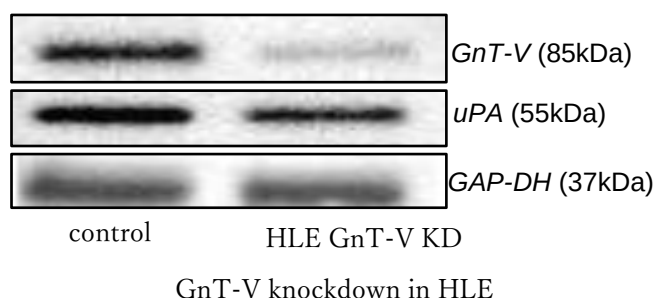


図 5-1 GnT-V ノックダウン HLE 細胞における GnT-V, uPA 発現

GnT-V に対する siRNA は HLE 細胞の GnT-V タンパク質発現を低下させたが, uPA タンパクの発現には変化がなかった.

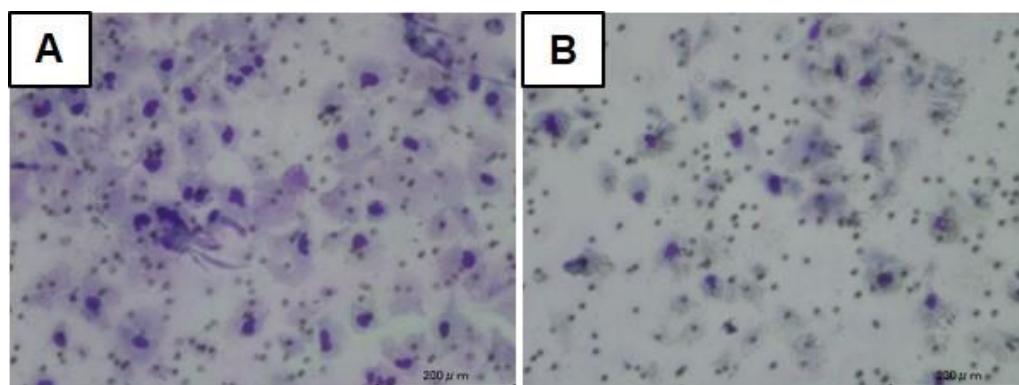


図 5-2 GnT-V ノックダウン HLE 細胞における浸潤能解析

(A) HLE コントロール細胞, (B) HLE GnT-V KD 細胞

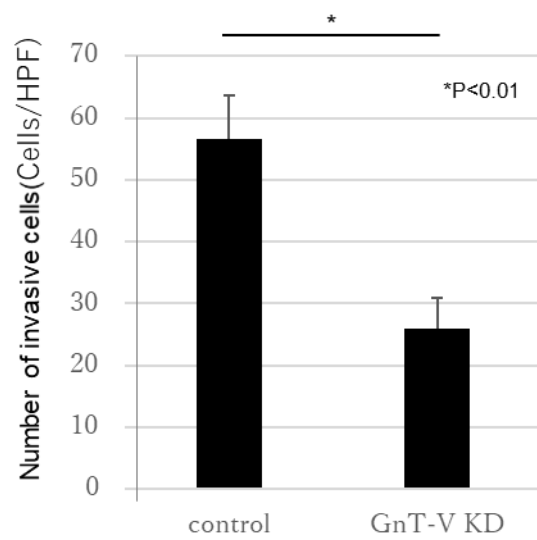


図 5-3 GnT-V ノックダウン HLE 細胞における浸潤能解析

HLE GnT-V KD 細胞では uPA 発現は低下していないにもかかわらず浸潤能が HLE コントロール細胞と比較して有意に低下した. * $p < 0.01$

	m/z	Glycan structure	Presumptive composition	Control (pmol)	GnTV KD (pmol)
Complex /Hybrid	1892		(HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	14.382	11.697
	2403		(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.479	0.360
	2563		(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	1.112	0.801
	2681		(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	13.017	9.958
	2827		(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	19.330	12.676
	2887		(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	7.590	6.304
	2928		(Hex)2 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.338	0.254
	3030		(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.724	0.521
	3192		(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	10.032	6.292
	3351		(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)3 + (Man)3 (GlcNAc)2	2.537	2.145
	3395		(Hex)3 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.333	0.229
	3411		(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.524	0.407
	3497		(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3 (GlcNAc)2	6.439	3.124
	3557		(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	2.557	1.716
	3656		(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)4 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.434	0.255
	3716		(Hex)4 (HexNAc)4 (NeuAc)3 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.249	0.155
	3862		(Hex)4 (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3 (GlcNAc)2	1.502	0.928
	3922		(Hex)5 (HexNAc)5 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.383	0.255
Internal standard	2478		(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAcAm)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	20.000	20.000

図 5-4 GnT-V ノックダウン HLE 細胞における *N* 型糖鎖解析

18 種類の *N* 型糖鎖の発現が HLE コントロール細胞と比較して HLE GnT-V KD 細胞において浸潤能と相関して低下していた。

6. ヒト尿由来 uPA における *N*型糖鎖解析

ヒト尿から精製された uPA におけるグライコブロットティング法による糖鎖解析で 16 種類の *N*型糖鎖 (m/z 1746, 1892, 1908, 2038, 2054, 2070, 2095, 2152, 2172, 2299, 2445, 2459, 2501, 2563, 2604, 2705) が検出された (図 6, 図 7). これらの 16 種類の *N*型糖鎖は uPA を修飾する *N*型糖鎖の一部と考えられる.

	m/z	Glycan structure	Presumptive composition	(pmol)
High man	2459		(Hex)6 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	1.282
Complex /Hybrid	1746		(HexNAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	1.118
	1892		(HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	8.118
	1908		(Hex)1 (HexNAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.696
	2038		(HexNAc)2 (Deoxyhexose)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	2.330
	2054		(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	2.274
	2070		(Hex)2 (HexNAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.682
	2095		(HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	1.815
	2152		(HexNAc)4 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.702
	2172		(Hex)2 (HexNAc)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.700
	2299		(HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	55.235
	2445		(HexNAc)4 (Deoxyhexose)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	57.014
	2501		(HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (Sulph)2 + (Man)3 (GlcNAc)2	0.635
	2563		(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	2.150
	2604		(HexNAc)4 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	15.870
	2705		(HexNAc)6 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2	3.109
Internal standard	2478		(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)1	50.000

図 6 ヒト尿由来 uPA における *N*型糖鎖解析

16 種類の *N*型糖鎖が同定された。

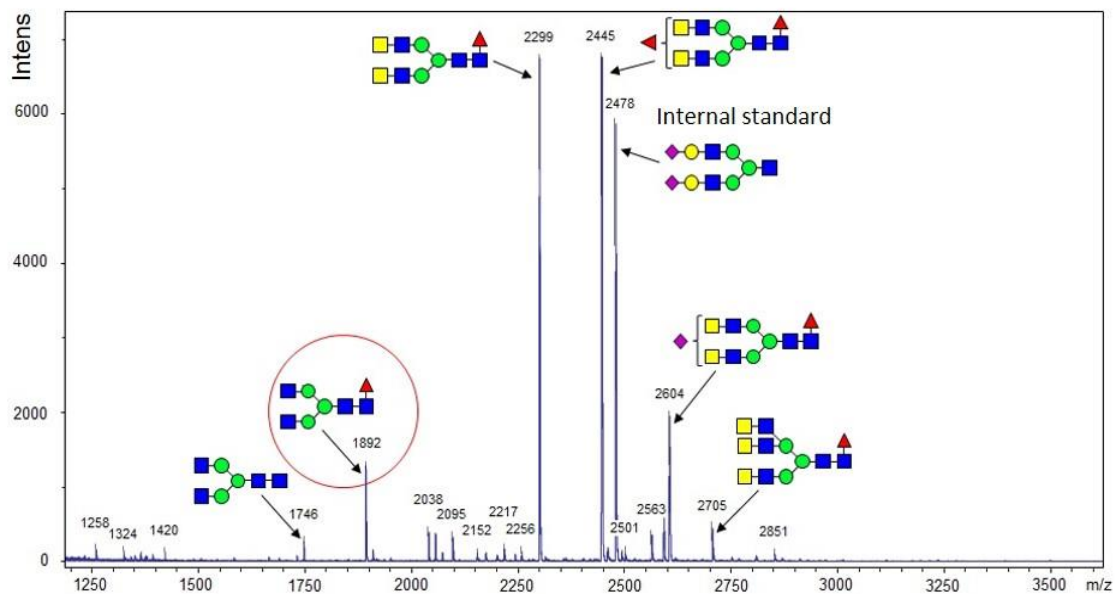


図 7 ヒト尿由来 uPA における *N*型糖鎖スペクトラム

7. 各細胞株とヒト uPA における浸潤能と *N*型糖鎖発現変化の比較 (表 1)

HLE 細胞株と HepG2 細胞株の分析で *N*型糖鎖発現を比較することにより, 10 種類の *N*型糖鎖発現が HepG2 細胞よりも HLE 細胞で高かった. HLE uPA siRNA1 細胞と HLE uPA siRNA2 細胞において, HLE コントロール細胞と比較して, 13 種類の *N*型糖鎖の発現が 20%以上低下していた. HepG2 uPA WT 細胞において, HepG2 コントロール細胞と比較して, 22 種類の *N*型糖鎖の発現が高かった. これらの 22 種類の *N*型糖鎖の発現は HepG2 uPA MUT 細胞においても高かった. HLE GnT-V KD 細胞では 18 種類の *N*型糖鎖の発現が HLE コントロール細胞と比較して低下していた. ヒト尿由来 uPA においては 16 種類の *N*型糖鎖が同定された. 以上の浸潤能と相関する *N*型糖鎖発現変化の解析の中で, 1 つの *N*型糖鎖 (m/z 1892) が共通していた.

表 1. 各実験群において浸潤能変化と相関して発現変化した *N*型糖鎖 m/z 1892 がすべての糖鎖解析で共通していた.

(n)	Result 1-4 (m/z)	Result 2-4 (m/z)	Result 3-3 (m/z)	Result 4-3 (m/z)	Result5 (m/z)
1	1851	1502	1502	1892	1746
2	1892	1543	1543	2403	1892
3	2029	1664	1689	2563	1906
4	2054	1689	1705	2681	2036
5	2070	1705	1851	2827	2054
6	2216	1810	1892	2887	2070
7	2521	1826	2010	2928	2095
8	2887	1851	2095	3030	2152
9	3192	1892	2156	3192	2172
10	3252	1988	2172	3351	2299
11		2095	2312	3395	2445
12		2150	2334	3411	2459
13		2312	2375	3497	2501
14		2474	2474	3557	2563
15			2521	3656	2604
16			2668	3716	2705
17			2681	3862	
18			2741	3922	
19			2827		
20			2887		
21			3192		
22			3497		

考察

グライコプロッティング法を用いた MALDI-TOF 質量分析により肝癌細胞株の浸潤能変化と相関する *N*型糖鎖の発現変化を検証した。*N*型糖鎖発現は、高浸潤能を持つ HLE 細胞株と低浸潤能を持つ HepG2 細胞株の間で異なっていた。uPA ノックダウン HLE 細胞の浸潤能は低下し、*N*型糖鎖発現はコントロール HLE 細胞と uPA ノックダウン HLE 細胞で異なっていた。uPA 過剰発現 HepG2 細胞の浸潤能は亢進し、*N*型糖鎖発現もコントロール HepG2 細胞と uPA 過剰発現 HepG2 細胞の間で異なっていた。また、GnT-V のノックダウンによって uPA 発現には変化が見られなかったが、浸潤能は GnT-V のノックダウン HLE 細胞ではコントロール HLE 細胞より有意に低下し、*N*型糖鎖発現はコントロール HLE 細胞と GnT-V ノックダウン HLE 細胞で異なっていた。これらの浸潤能を変化させた細胞株間での *N*型糖鎖発現の比較検討により、浸潤能と相関して発現変化する特異的な *N*型糖鎖 (m/z 1892) が糖鎖解析を行ったすべての細胞株の実験系で共通して同定された。また、特異的 *N*型糖鎖 (m/z 1892) はヒト尿由来 uPA の糖鎖解析でも検出され、uPA を修飾する糖鎖のひとつと考えられる。これらのデータから、肝臓癌細胞株において uPA の糖鎖修飾の変化が浸潤能に寄与しており、この特異的 *N*型糖鎖 (m/z 1892) 発現の変化は肝癌細胞の悪性度の評価に役立つ可能性があることが示唆された。

これまでに、がん原遺伝子やがん抑制遺伝子の段階的な変異に伴うがんの進展の過程で、多数のダイナミックな糖鎖の発現変動が認められ、糖鎖修飾パターンと悪性度の相関関係が報告されている (Furukawa et al., 2015)。しかし、本研究において糖鎖発現パターンについて図 1-4 (HLE 細胞と HepG2 細胞の比較)、図 3-4 (uPA ノックダウン HLE 細胞とコントロール HLE 細胞の比較)、図 4-4 (uPA 過剰発現 HepG2 細胞と uPA 突然変異細胞と HepG2 コントロール細胞との比較) で検討したが、ハイマンノース型、複合型、混合型の糖鎖修飾パターンの割合に浸潤能の変化と相関して変化するものは見られなかった。また同様に、図 1-5 (HLE 細胞と HepG2 細胞の比較)、図 3-5 (uPA ノックダウン HLE 細胞とコントロール HLE 細胞の比較)、図 4-5 (uPA 過剰発現 HepG2 細胞と uPA 突然変異細胞と HepG2 コントロール細胞との比較) の結果から *N*型糖鎖へのフコシル化、シアル酸付加と浸潤能変化の相関関係について検討したが、関連性は見いだせなかった。一方で、invasive intraductal papillary

mucinous neoplasms で特定のフコシル化多分枝糖鎖 (m/z 3195 糖鎖) の発現が有意に高いことが報告されていることから (Akimoto et al., 2015), 本実験においては糖鎖修飾パターンやフコシル化, シアル酸付加の有無についての検討ではなく, 個別の *N*型糖鎖の発現変化に着目し浸潤能変化との相関関係を検証することとした.

uPA はクリングルドメインを含む COOH 末端領域と, uPA の酵素活性を発揮する触媒ドメインを含む NH₂ 末端領域で構成される 2 本鎖糖タンパク質である (Henkin et al., 1991). uPA のクリングルドメインには EGF (epidermal growth factor) 様モジュールとクリングルモジュールが含まれ, 前者は uPA の細胞結合に関与する (Appella et al., 1987). これまでに uPA の糖鎖修飾について分析され (Buko et al., 1991; Bergwerff et al., 1995), Pro-uPA は, 24 個のシステイン, 22 個のアルギニン, および 27 個のリジン残基を持つ 411 アミノ酸を含む糖タンパク質である (Buko et al., 1991). ヒト uPA の *N*型糖鎖修飾は, 302 番目のアスパラギン残基に対して行われ (Kasai et al., 1985), uPA の *N*型糖鎖には, マンノース, ガラクトース, フコース, *N*アセチルグルコサミン, *N*アセチルノイラミン, *N*アセチルガラクトサミンが含まれている (McLellan et al., 1980). 本研究において, 302 番目のアスパラギン残基をグルタミン残基に点置換させ, *N*型糖鎖修飾の欠損した変異型 uPA を過剰発現させた際に, uPA の発現があるにもかかわらず肝癌細胞の浸潤能低下がみられた. このことから uPA の 302 番目のアスパラギン残基に対する糖鎖修飾は uPA 活性や浸潤能に関与する重要な因子と考えられた. 一方で, 線溶活性においては糖鎖修飾されていない組み換え一本鎖 uPA は糖鎖修飾された尿由来および組み換え uPA と同等であることが報告されている (Li et al., 1992).

MGAT5 遺伝子によってコードされる GnT-V (Saito et al., 1994) は, 複合型 *N*型糖鎖の β 1,6 結合の分岐鎖伸展に関与する. GnT-V は, *N*型糖鎖の分岐鎖伸展に関与する糖転移酵素の中で, 癌の進行と転移に最も強く関連していることが報告されている (Miyoshi et al., 2012; Taniguchi et al., 1999; Cui et al., 2018). また, GnT-V の発現は結腸直腸癌の切除例における転移との相関が報告されている (Murata et al., 2000). 肝癌切除組織においては, *N*型糖鎖の GnT-V による分岐鎖伸展が観察されており (Mehta et al., 2012), 肝臓癌組織において正常肝組織と比較して GnT-V 発現の上昇が観察されている (Ito et al., 2001). その他にも GnT-V 発現の上昇は, 胃癌 (Tian et al., 2008), 子宮内膜癌

(Yamamoto et al., 2007), 粘液性卵巣癌 (Takahashi et al., 2009) の転移能との相関が報告されている。

マトリプターゼは、細胞遊走能、細胞外マトリックス分解能、uPA と HGF (Hepatocyte growth factor) の活性化に重要な役割を果たすセリンプロテアーゼの一種である (Lee et al., 2000 ; Takeuchi et al., 2000)。GnT-V は β 1-6GluNAc 分岐を追加することにより、マトリプターゼの発現亢進と安定化を促し転移を促進することが報告されている (Ihara et al., 2002 ; Ihara et al., 2004)。本研究では、GnT-V ノックダウンにより uPA に結合すると考えられる m/z 1892 を含む *N* 型糖鎖発現が変化し、uPA 発現に変化がみられないにもかかわらず HLE 細胞の浸潤能が低下した。このことは、GnT-V が *N* 型糖鎖の uPA への結合を修飾することで直接的に uPA を介した浸潤能制御をコントロールしていること示唆する。また、これまでの報告から、GnT-V のノックダウンによって GnT-V が発現亢進、安定化させるマトリプターゼの活性が低下し、結果として間接的に uPA 活性が低下した可能性も考えられるが、本研究の結果からは uPA, GnT-V による浸潤能の制御に特異的 *N* 型糖鎖 (m/z 1892) が深く関与していることが示唆され、この糖鎖発現の変化は新規バイオマーカーや標的分子治療などといった癌細胞の診断、治療に役立つ可能性がある。

本研究の limitation として HepG2 細胞における GnT-V 発現および HepG2 における GnT-V 過剰発現についての評価がなされていないことがあげられる。HepG2 細胞での GnT-V 発現が低い場合、HepG2 細胞において GnT-V を過剰発現させ浸潤能や *N* 型糖鎖発現を検討することで本研究の結論をさらに支持する結果が得られる可能性がある。この点については今後の研究課題と考えられる。

結論

肝癌細胞株において、uPA、GnT-V の発現を変化させ、浸潤能を変化させることにより、*N* 型糖鎖の発現が変化した。*N* 型糖鎖の発現変化のうち発現パターン変化では浸潤能の変化と相関するものは認めなかったが、糖鎖単位の検討では浸潤能と相関して発現変化する特異的な *N* 型糖鎖 (m/z 1892) が同定された。この特異的 *N* 型糖鎖 (m/z 1892) はヒト尿由来 uPA の糖鎖解析でも検出され、uPA を修飾する糖鎖のひとつと考えられる。また、HepG2 uPA 変異細胞株における検討では、uPA 発現があっても糖鎖修飾がされない場合は浸潤能が低下しており、uPA に対する糖鎖修飾は uPA 活性や浸潤能に関与する重要な因子と考えられた。以上から、肝臓癌細胞株において uPA の糖鎖修飾の変化が浸潤能に寄与しており、この特異的 *N* 型糖鎖 (m/z 1892) 発現の変化は肝癌細胞の悪性度の評価に役立つ可能性があることが示唆された。

一方で、GnT-V ノックダウン HLE における検討では、uPA を修飾する *N* 型糖鎖発現が変化し、uPA 発現に変化がみられないにもかかわらず浸潤能が低下した。GnT-V が uPA に結合する *N* 型糖鎖を修飾することで直接的に uPA を介した浸潤能制御をコントロールしていることが示唆された。

糖鎖発現の変化は癌細胞の診断、治療に役立つ可能性があり、肝癌細胞株において浸潤能と相関する特異的 *N* 型糖鎖 (m/z 1892) は、新規バイオマーカーや標的分子治療の候補となりうる。

謝辞

稿を終えるにあたり，研究の御指導や糖鎖解析を賜りました北海道大学大学院先端生命科学研究院 西村紳一郎教授および同教室の皆様，糖鎖解析を賜りました医科学創薬株式会社の皆様，研究の御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅰ 武富紹信教授に深く謝意を表します．また，計画の立案，実験結果のディスカッション，論文作成などで御助言，御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅰ 神山俊哉准教授に厚く御礼申し上げます．加えて，本研究における御助言や技術的指導を賜りました同教室の先生方や学術研究員の皆様に深く御礼申し上げます．

利益相反

本研究に関して著者全員に開示すべき利益相反はありません.

引用文献

Ahmed, HM., Pourgholami, MH., Morris, DL. (2014). Involvement of Urokinase - Type Plasminogen Activator System in Cancer: An Overview. *Med Res Rev*.

Akimoto, Y., Nouse, K., Kato, H., Miyahara, K., Dohi, C., Morimoto, Y., Kinugasa, H., Tomoda, T., Yamamoto, N., Tsutsumi, K., Kuwaki, K., Onishi, H., Ikeda, F., Nakamura, S., Shiraha, H., Takaki, A., Okada, H., Amano, M., Nishimura, S., Yamamoto, K. (2015). Serum N-glycan profiles in patients with intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Pancreatology* *15*, 32-38.

Alley, WRJr., Vasseur, JA., Goetz, JA., Svoboda, M., Mann, BF., Matei, DE., Menning, N., Hussein, A., Mechref, Y., Novotny, MV. (2012). *N*-linked glycan structures and their expressions change in the blood sera of ovarian cancer patients. *J Proteome Res* *11*, 2282-2300.

Appella, E., Robinson, EA., Ullrich, SJ., Stoppelli, MP., Corti, A., Cassani, G., Blasi, F. (1987). The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases. *J Biol Chem* *262*, 4437-4440.

Bergwerff, AA., Van, OJ., Kamerling, JP., Vliegenthart, JF. (1995). The major *N*-linked carbohydrate chains from human urokinase. The occurrence of 4-O-sulfated, (alpha 2-6)-sialylated or (alpha 1-3)-fucosylated *N*-acetylgalactosamine (beta 1-4)-*N*-acetylglucosamine elements. *Eur J Biochem* *228*, 1009-1019

Betesh, L., Comunale, MA., Wang, M., Liang, H., Hafner, J., Karabudak, A., Giana, NH., Moser, CD., Miyoshi, E., Mehta, A., et al. (2017). Identification of fucosylated Fetuin-A as a potential biomarker for cholangiocarcinoma.

Buko, AM., Kentzer, EJ., Petros, A., Menon, G., Zuiderweg, ER., Sarin, VK. (1991). Characterization of a posttranslational fucosylation in the growth factor domain of urinary plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3992-3996.

Chakraborty, AK., Pawelek, JM. (2005). GnT-V, macrophage and cancer metastasis: a common link. *Clin Exp Metastasis* 20, 365-373.

Comunale, MA., Wang, M., Hafner, J., Krakover, J., Rodemich, L., Kopenhaver, B., Long, RE., Junaidi, O., Block, TM., Mehta, AS., et al. (2009). Identification and development of fucosylated glycoproteins as biomarkers of primary hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res* 8, 595-602.

Cui, J., Jin, J., Jing, L., Shi, WP., Liu, ZY., Yuan, L., Luo, D., Li, L., Chen, ZN., Jiang, JL., et al. (2018). *N*-glycosylation by N-acetylglucosaminyltransferase V enhances the interaction of CD147/basigin with integrin $\beta 1$ and promotes HCC metastasis. *J Pathol* May 245, 41-52.

Fujitani, N., Furukawa, J., Araki, K., Fujioka, T., Takegawa, Y., Piao, J., Nishioka, T., Tamura, T., Nikaido, T., Ito, M., Nakamura, Y., Shinohara, Y. (2013). Total cellular glycomics allows characterizing cells and streamlining the discovery process for cellular biomarkers. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 2105-2110.

Furukawa, J., Tsuda, M., Okada, K., Kimura, T., Piao, J., Tanaka, S., Shinohara, Y. (2015). Comprehensive Glycomics of a Multistep Human Brain Tumor Model Reveals Specific Glycosylation Patterns Related to Malignancy. *PLoS One* 10, e0128300.

Handerson, T., Camp, R., Harigopal, M., Rimm, D., Pawelek, J. (2005).

Beta1,6-branched oligosaccharides are increased in lymph node metastases and predict poor outcome in breast carcinoma. *Clin Cancer Res* *11*, 2969-2973.

Handerson, T., Pawelek, JM. (2003). Beta1,6-branched oligosaccharides and coarse vesicles: a common, pervasive phenotype in melanoma and other human cancers. *Cancer Res* *63*, 5363-5369.

Helenius, A., Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* *291*, 2364-2369.

Henkin, J., Marcotte, P., Yang, HC. (1991). The plasminogen-plasmin system. *Prog Cardiovasc Dis* *34*, 135-164.

Holst, S., Wilding, JL., Koprowska, K., Rombouts, Y., Wuhrer, M. (2019). *N*-Glycomic and Transcriptomic Changes Associated with CDX1 mRNA Expression in Colorectal Cancer Cell Lines. *Cells* *8*, 273.

Itoh, T., Kanamaru, T., Morita, Y., Suzuki, S., Wang, W., Zhou, L., Rui, JA., Yamamoto, M., Kuroda, Y., Itoh, H. (2000). Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator activity in hepatocellular carcinoma. *J of Gastroenterol Hepatol* *15*, 422-430.

Ihara, S., Miyoshi, E., Ko, JH., Murata, K., Nakahara, S., Honke, K., Dickson, RB., Lin, CY., Taniguchi, N. (2002). Prometastatic effect of *N*-acetylglucosaminyltransferase V is due to modification and stabilization of active matriptase by adding beta 1-6 GlcNAc branching. *J Biol Chem* *277*, 16960-16967.

Ihara, S., Miyoshi, E., Nakahara, S., Sakiyama, H., Ihara, H., Akinaga, A., Honke, K., Dickson, RB., Lin, CY., Taniguchi, N. (2004). Addition of beta1-6 GlcNAc branching to the oligosaccharide attached to Asn 772 in the serine protease domain of matriptase plays a pivotal role in its stability and

resistance against trypsin. *Glycobiology* 14, 139-146.

Ito, Y., Akinaga, A., Yamanaka, K., Nakagawa, T., Kondo, A., Dickson, RB., Lin, CY., Miyauchi, A., Taniguchi, N., Miyoshi, E. (2006). Co-expression of matriptase and *N*-acetylglucosaminyltransferase V in thyroid cancer tissues-its possible role in prolonged stability in vivo by aberrant glycosylation. *Glycobiology* 16, 368-374.

Ito, Y., Miyoshi, E., Tsujimoto, M., Ito, S., Honda, H., Takemura, F., Wakasa, K., Monden, M., Matsuura, N., Taniguchi, N., et al. (2001). Elevated expression of UDP-*N*-acetylglucosamine: α -mannoside β 1,6 *N*-acetylglucosaminyltransferase is an early event in hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 91, 631-637.

Kamiyama, T., Une, Y., Uchino, J., Hamada, J. (1998). Hepatocyte growth factor enhances the invasion activity of human hepatocellular carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 12, 655-659.

Kamiyama, T., Yokoo, H., Nakanishi, K., Kamachi, H., Kakisaka, T., Tsuruga, Y., Fujiyoshi, M., Taketomi, A., Nishimura, S., Todo, S., et al. (2013). Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis. *Hepatology* 57, 2314-2325.

Kang, P., Madera, M., Alley, WRJr., Goldman, R., Mechref, Y., Novotny, MV. (2011). Glycomic Alterations in the Highly abundant and Lesser-abundant Blood Serum Protein Fractions for Patients Diagnosed with Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mass Spectrom* 305, 185-198.

Kasai, S., Arimura, H., Nishida, M., Suyama, T. (1985). Primary structure of single-chain pro-urokinase. *J Biol Chem* 260, 12382-12389.

Kirmiz, C., Clowers, BH., Chew, HK., Lam, KS., Ferrige, A., Alecio, R.,

Borowsky, AD., Sulaimon, S., Lebrilla, CB., Miyamoto, S., et al. (2007). A serum glycomics approach to breast cancer biomarkers. *Mol Cell Proteomics* *6*, 43-55.

Lee, SB., Chung, IY., Kim, J., Lee, W., Ko, MS., Lee, K., Chang, S., Park, HS., Lee, JW., Kim, DC., et al. (2020). Breast cancer diagnosis by analysis of serum *N*-glycans using MALDI-TOF mass spectroscopy. *PLoS One* *9* 15.

Lee, SL., Dickson, RB., Lin, CY. (2000). Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *J Biol Chem* *275*, 36720-36725.

Li, XK., Lijnen, HR., Nelles, L., Hu, MH., Collen, D. (1992). Biochemical properties of recombinant mutants of nonglycosylated single chain urokinase-type plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta* *1159*, 37-43.

Lin, G., Zhao, R., Wang, W., Han, J., Gu, Y., Pan, Y., Ren, C., Ren, C., Xu, R. (2020). Dynamic analysis of *N*-glycomic and transcriptomic changes in the development of ovarian cancer cell line A2780 to its three cisplatin-resistant variants. *Ann Transl Med.* *8*, 289, 2020.

McLellan, WL., Vetterlein, D., Roblin, R. (1980). The glycoprotein nature of human plasminogen activators. *FEBS Lett* *115*, 181-184.

Mehta, A., Norton, P., Liang, H., Comunale, MA., Wang, M., Rodemich-Betesh, L., Koszycki, A., Noda, K., Miyoshi, E., Block, T. (2012). Increased levels of tetra-antennary *N*-linked glycan but not core fucosylation are associated with hepatocellular carcinoma tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *21*, 925-933.

Miura, Y., Hato, M., Furukawa, J., Kurogochi, M., Shimaoka, H., Tada, M., Nakanishi, K., Ozaki, M., Todo, S., Nishimura, S., et al. (2008).

BlotGlycoABC™, an integrated glycoblotting technique for rapid and large scale clinical glycomics. *Mol Cell Proteomics* 7, 370-377.

Miyoshi, E., Terao, M., Kamada, Y. (2012). Physiological roles of *N*-acetylglucosaminyltransferase V(GnT-V) in mice. *BMB Rep* 45, 554-559.

Mondal, G., Chatterjee, U., Chawla, YK., Chatterjee, BP. (2011). Alterations of glycan branching and differential expression of sialic acid on alpha fetoprotein among hepatitis patients. *Glycoconj J* 28, 1-9

Murata, K., Miyoshi, E., Hiratsuka, M., Ohigashi, H., Ishiguro, S., Ito, S., Honda, H., Takemura, F., Taniguchi, N., Imaoka, S. (2000). Expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in colorectal cancer correlates with metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res* 6, 1772-1777.

Ohtsubo, K., Marth, JD. (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126, 855-867.

Pilobello, KT., Mahal, LK. (2007). Deciphering the glycode: the complexity and analytical challenge of glycomics. *Curr Opin Chem Biol.* 11, 300-305.

Sarubbi, E., Nolli, ML., Robbiati, F., Soffientini, A., Parenti, F., Cassani, G. (1989). The differential glycosylation of human pro-urokinase from various recombinant mammalian cell lines does not affect activity and binding to PAI-1. *Thromb Haemost* 62, 927-933.

Saito, H., Nishikawa, A., Gu, J., Ihara, Y., Soejima, H., Wada, Y., Sekiya, C., Niikawa, N., Taniguchi, N. (1994). cDNA cloning and chromosomal mapping of human *N*-acetylglucosaminyltransferase V+. *Biochem Biophys Res Commun* 198, 318-327.

Takahashi, N., Yamamoto, E., Ino, K., Miyoshi, E., Nagasaka, T., Kajiyama,

H., Shibata, K., Nawa, A., Kikkawa, F. (2009). High expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in mucinous tumors of the ovary. *Oncol Rep* *22*, 1027-1032.

Takeuchi, T., Harris, J.L., Huang, W., Yan, K.W., Coughlin, S.R., Craik, C.S. (2000). Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J Biol Chem* *275*, 26333-26342.

Taniguchi, N., Miyoshi, E., Ko, J.H., Ikeda, Y., Ihara, Y. (1999). Implication of *N*-acetylglucosaminyltransferases III and V in cancer: gene regulation and signaling mechanism. *Biochim Biophys Acta* *1455*, 287-300.

Tian, H., Miyoshi, E., Kawaguchi, N., Shaker, M., Ito, Y., Taniguchi, N., Tsujimoto, M., Matsuura, N. (2008). The implication of *N*-acetylglucosaminyltransferase V expression in gastric cancer. *Pathobiology* *75*, 288-294.

Vanhooren, V., Liu, X.E., Franceschi, C., Gao, C.F., Libert, C., Contreras, R., Chen, C. (2009). N-glycan profiles as tools in diagnosis of hepatocellular carcinoma and prediction of healthy human ageing. *Mech Ageing Dev* *130*, 92-97.

Wang, Y., Xu, F., Chen, Y., Tian, Z. (2020). A quantitative *N*-glycoproteomics study of cell-surface N-glycoprotein markers of MCF-7/ADR cancer stem cells. *Anal Bioanal Chem*. *412*,2423-2432.

Yamamoto, E., Ino, K., Miyoshi, E., Shibata, K., Takahashi, N., Kajiyama, H., Nawa, A., Nomura, S., Nagasaka, T., Kikkawa, F. (2007). Expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in endometrial cancer correlates with poor prognosis. *Br J Cancer* *97*, 1538-1544.

Zhou, QLL., Peng, BG., Zhen, YY. (2006). Expression and clinical significance of coagulate and fibrolysis factors in tissue and plasma from hepatocellular carcinoma patients. *Ai Zheng* 25, 1433-1438.