

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成15年度採択研究代表者

中田 博

(京都産業大学工学部 教授)

「担癌状態におけるムチンを介した免疫能の変化の解析と応用」

1. 研究実施の概要

上皮性癌細胞の産生するムチンは、癌組織や癌患者血液中に分泌され、免疫担当細胞上のレクチンなどとの相互作用を介して免疫機能に影響を与えていると考えられる。単球/マクロファージ上のスカベンジャーリセプター (SCR) にムチンが結合し、シクロオキシゲナーゼ2 (COX2) の誘導に伴うPGE2の産生亢進を明らかにしてきた。PGE2は血管新生の促進や免疫抑制作用をもつことが知られており、ムチンを起点としたカスケードの腫瘍組織形成に対する影響を明らかにする。また、可溶性SCRや人工ムチンを本カスケードの阻害剤として用い、その効果を調べる。さらに、このような単球/マクロファージの過剰刺激に伴う病態は、他の疾患にも見られ、その例として関節リウマチにおいても同様のアプローチを試みる。また、ムチンはシグレックファミリーにも結合することを明らかにしてきたが、結合に伴う各免疫担当細胞での活性化シグナルに対する抑制効果、あるいは各々の細胞の生物活性に対する影響を検討する。これらの研究を通じて、担癌状態におけるムチンの生物学的意義を明らかにするとともに臨床的応用に結びつける。

2. 研究実施内容

上皮性癌細胞の産生するムチンは、様々な免疫系細胞と相互作用することがわかった。その中で、単球/マクロファージ上のSCRを介した系及びシグレックファミリーの中でシグレック2と7を介した系についていくつかの知見を得た。

1) SCRを介した系について

マウス乳癌由来細胞株で、ムチン産生株TA3-Haと非産生株TA3-Stを用いて、ムチンと腫瘍組織形成について検討した。2つの亜株のin vitroにおける増殖速度はほぼ同じであったが、皮下腫瘍はHa株の方が著しく早く形成された。それぞれの腫瘍組織より、RNA、タンパク質を抽出し、COX2 mRNA、COX2酵素タンパク質、VEFG mRNA、活性型MMP-2の発現を比較したところ、いずれもHa株の方が高い値を示した。このことは、免疫組織化学的にも証明され、抗CD31抗体を用いた免疫組織染色でHa腫瘍組織に著しい血管新生を認めた。続いて、TA3-Ha細胞の産生するムチン (エピグリカニン) を精製し、マクロファージを活性化することを確認した上で、in vitro、in vivoによるTh1、Th2サイトカイン産生に対す

るムチンの影響を調べた。マクロファージ及び脾臓CD4⁺T細胞からのそれぞれIL-12 (p70)、IFN- γ の産生は、ムチンにより有意に減少することがわかった。また、TA3-Ha、Stの担癌マウスより脾細胞を調製し、CD4陽性T細胞中のIL-4あるいはIFN- γ 産生細胞数を比較した。HaあるいはSt腫瘍担癌マウスにおいて、IL-4産生細胞数は同等であったが、IFN- γ 産生細胞は前者において有意に減少していた。これらの結果は、ムチンを起点としてPGE₂の産生亢進をもたらすものと考えられる。次に、SCRノックアウトマウスを用いて、腫瘍形成への影響を検討したが、一定の傾向は認められるものの、redundancyによる代償作用の結果、注目すべき結果は得られなかった。この点を克服するために、可溶性SCRを作製し、腫瘍組織形成に対する影響を調べた。可溶性SCRがムチンに結合することを確認した上で、可溶性SCR cDNAをTA3-Ha細胞に導入し、安定発現株を得た。同細胞による皮下腫瘍形成は、Mock細胞に比して生着率は低く、増殖速度は遅いことがわかった。また、未処理のTA3-Ha細胞と可溶性SCR発現細胞と混合して皮下に注射した場合も、TA3-Ha細胞単独の場合に比して効果が認められた。

次に、血中ムチンの生物学的意義についても検討した。血中ムチンについても、ヒト末梢血単球を活性化、PGE₂の産生亢進を確認した。同時に、IL-6の産生も亢進することを示した。IL-6は大腸癌細胞に働き、IL-10の産生を促進することが報告されており、このカスケードにおいても免疫バランスに影響を与えているものと考えられる。(中田グループ)

α -ポリグルタミン酸の側鎖に硫酸基が高密度に含有する人工ムチンの合成法を確立した。ELISA法により、硫酸化人工ムチンは可溶性SCRと強い親和性を有することがわかった。本人工ムチンの抗腫瘍効果については今後の課題である。(村田グループ)

抗Tn、シアリルTnモノクローナル抗体を用いた免疫染色により、大腸癌組織と同様に、ヒト胃癌の間質組織において、Tn、シアリルTn抗原が発現し、これらの癌関連糖鎖抗原の周囲にCOX2発現マクロファージが存在していることを明らかにした。さらに、同様の抗原が関節リウマチ(RA)患者関節組織滑膜細胞やマクロファージ様の単核球に発現していることを免疫染色により明らかにした。ヒアルロニダーゼ処理したRA患者関節液をゲルろ過し、分画した。高分子画分にDot blot法によりムチンが存在することを示すとともに、健康者ヒト単核球への添加実験で、この画分が非常に高いPGE₂とTNF- α の産生誘導能を有していることがわかった。これらの結果は、RA患者関節液中に正常ヒトリンパ球を刺激し、PGE₂やTNF- α の産生を促すムチンが存在することを示唆している。今後、RAの病因に関連すると考えられる関節液中のムチンを精製し、生化学的性質を明らかにするとともに、RA治療への応用を模索する。(川人グループ)

2) シグレックファミリーを介した系について

シグレック2にムチンが結合することは、同分子のムチン-セファロースへの結合、同分子の発現株への標識ムチンの結合及び可溶性シグレック2分子のムチンの結合などで示してきた。ヒトバーキットリンパ腫Daudi細胞及びシグレック2強制発現株K46 μ m λ 細胞(鏑田博士との共同研究)を用いて、ムチン存在下におけるB細胞リセプターを介した情報伝

達に対する影響について検討した。いずれの細胞を用いても、ムチン存在下で情報伝達の抑制、すなわち、ムチン存在下では、シグレック2のリン酸化、SHP-1のリクルート及びMAPKのリン酸化の減少がムチンの濃度依存的に認められた。SHP-1のリクルート及びMAPKのリン酸化がいずれも減少するという結果は、従来の抗シグレック2抗体を用いた知見とは矛盾し、ムチンに特有の現象と考えられる。B細胞表面のラフトの形成との関連で検討している。シグレック7に関しても、強制発現株などを用いてムチンの結合を確認するとともに、NK細胞活性に対するムチンの影響を検討した。ムチンの濃度依存的にNK細胞活性の減少を示すとともに、NK細胞からのIFN- γ の産生についても抑制されることを見いだした。（中田グループ）

糖転移酵素によって合成した(Gal β 1-4GlcNAc) $_n$ β -pNP $_{(n=1-3)}$ のp-ニトロフェニルを還元、アミノ化した配糖体を α -ポリグルタミン酸に導入し、置換度および糖鎖の長さが異なる種々の人工ムチンを合成した。これをアクセプターに用い、CMP-Neu5Ac, 2Naをドナーとして、市販の α 2,6シアルトランスフェラーゼによりシアルル化を試みたところ、ほぼすべての糖鎖に対してシアル酸を転移することが可能であった。ELISA法を用いた解析により、合成した α 2,6シアル酸含有人工ムチンは、糖鎖の鎖長にかかわらずシグレック2と特異的に結合することが示された。（村田グループ）

蛍光で検出できるADHPを用いて、アルカリ還元処理によりBSMから遊離させた糖鎖を、イオン交換クロマトにより酸性糖鎖と中性糖鎖に分け、HPLCで糖鎖を分離した。分離した糖鎖の末端に還元性を持たせるために緩和な条件下で過ヨウ素酸酸化処理を行いADHP化NGLを得た。酸性糖鎖に焦点を絞り、ADHP化NGLをHPTLCで分析した。その結果、BSMにはシアル酸としてN-アセチル型とN-グリコリル型の存在が報告されているが、還元末端のGalNAc α 1の6位の炭素にN-アセチルノイラミン酸あるいはN-グリコリルノイラミン酸が結合して、さらにGalNAc α 1の3位の炭素にGalNAc, GlcNAc, あるいはGal、および、推定であるが、GalNAc α 1の3位の炭素に結合したGalNAcにN-アセチルノイラミン酸あるいはN-グリコリルノイラミン酸が結合した糖鎖の存在を確認することができた。

糖鎖マイクロアレイの有用性と糖鎖マイクロアレイの改良に関して、デルマトン硫酸の糖鎖に焦点を絞り細胞増殖因子やサイトカインと相互作用する糖鎖の検索を行った。実験材料として、コンドロイチン硫酸A, Cに結合するがDS鎖により強く結合すると報告されているHGFとFGF-7/KGFなどをモデルタンパク質として選択した。その結果、HGFはCSA, CSC由来の同じ鎖長の糖鎖に比較してDS鎖に強く結合し、最小の鎖長は8-merであった。また、FGF-7/KGFもDS鎖の8-mer以上に結合することを認め、細胞増殖を活性化させるDS鎖の大きさとよく一致するものであった。（福井グループ）

3. 研究実施体制

中田グループ

研究分担グループ長：中田 博（京都産業大学工学部、教授）

研究項目：担癌状態におけるムチンを介した免疫能の変化と腫瘍組織形成

福井グループ

研究分担グループ長：福井 成行（京都産業大学工学部、教授）

研究項目：ウシ顎下腺ムチン（BSM）の糖鎖を網羅した糖鎖マイクロアレイを用いたシグレック2及びSCRの結合する糖鎖の検索

村田グループ

研究分担グループ長：村田 健臣（静岡大学農学部、助教授）

研究項目：可溶性シグレック及びスカベンジャーリセプターと人工ムチンの結合解析

川人グループ

研究分担グループ長：川人 豊（京都府立医科大学、助手）

研究項目：ヒト消化器癌、関節リウマチ組織におけるムチン発現及びムチンによるCOX2誘導とその病因との関連性

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Akita, K., Toda, M., Hosoki, Y., Inoue, M., Fushiki, S., Oohira, A., Okayama, M., Yamashina, I. and Nakada, H. Heparan sulphate proteoglycans interact with Neurocan and promote neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *Biochem. J.*, 383: 129-138, 2004.
- Nishikawa, A., Uotsu, N., Arimitsu, H., Lee, J-C., Miura, Y., Fujinaga, Y., Nakada, H., Watanabe, T., Ohyama, T., Sakano, Y. and Oguma, K. The receptor and transporter for internalization of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin into HT-29 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 319: 327-333, 2004.
- Sakuraba, H., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Doi, H., Kotani, M., Nakada, H., Fukushige, T. and Kanzaki, T. Structural and immunocytochemical studies on α -N-acetylgalactosaminidase deficiency (Schindler/Kanzaki disease). *J. Hum. Genet.*, 49: 1-8, 2004.
- Ito, Y., Hikino, M., Yajima, Y., Mikami, T., Sirko, S., Holst, A., Faissner, A., Fukui, S. and Sugahara, K. Structural characterization of the epitopes of the monoclonal antibodies 473HD, CS-56 and MO-225 specific for chondroitin sulfate D-type using the oligosaccharide library. *Glycobiology*, Advance Access published on December 29, 2004; doi: 10.1093/glycob/cwi036 (2005)
- 玉置広寿、福井成行. コンドロイチン硫酸由来のオリゴ糖ネオグリコリピドを用いてのサイトカイン、ケモカイン、HGF、FGF-7の結合解析. 京都産業大学先端技術研究所報 3: 161-172, 2004.

- Murata, T., Honda, H., Hattori, T. and Usui, T. Enzymatic synthesis of poly-*N*-acetylactosamines as potential substrates for endo- β -galactosidase-catalyzed hydrolytic and transglycosylation reactions. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1722: 60-68, 2005.
- Harada, Y., Murata, T., Totani, K., Kajimoto, T., Masum, S. M., Tamba, Y., Yamazaki, M. and Usui, T. Design and facile synthesis of neoglycolipids as lactosylceramide mimetics and their transformation into glycoliposomes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69: 166-178, 2005.
- Kobasa, D., Takada, A., Shinya, K., Hatta, M., Halfman, P., Theriault, S., Suzuki, H., Nishimura, H., Mitamura, K., Sugaya, N., Usui, T., Murata, T., Maeda, Y., Watanabe, S., Suresh, M., Suzuki, T., Suzuki, Y., Feldmann, H. and Kawaoka, Y. Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature*, 431: 703-707, 2004.
- Kato, T., Murata, T., Usui, T. and Park Enoch Y. Comparative analysis of GFPUV- β -1,3-*N*-acetylglucosaminyl-transferase 2 production in two insect-cell-based expression system. *Protein Expres. Purif.*, 35: 54-61, 2004.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）