

「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

担癌状態における危険因子としてのムチンの生物学的機能を明らかにし、その分子的背景をもとに臨床的応用に結びつけることを目的とする。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予想された。受容体としては、レクチンであるシグレックファミリーに加えて、単球／マクロファージ上のスカベンジャーリセプター（SCR）が見出された。SCR にムチンが結合すると、シクロオキシゲナーゼ 2（COX2）の誘導に伴い、PGE2 の産生が亢進し、血管新生の亢進、免疫バランスの変化が惹起されることがわかった。シグレックを介した系では、B 細胞上のシグレック 2 にムチンが結合すると、BCR を介した情報伝達の抑制や、ムチン産生腫瘍の担癌マウスにおいて脾臓マージナルゾーン B 細胞の形成不全などが見出された。また、シグレック 3、9 にムチンが結合すると、それぞれ単球から樹状細胞への分化過程におけるアポトーシスの誘導、未熟樹状細胞から成熟樹状細胞の分化過程におけるサイトカイン（IL-12、10）の産生の変化がもたらされることがわかった。これらのムチンを起点としたカスケードの抑制方法の開発あるいは担癌状態における血中ムチン除去とその効果の解析が今後の課題である。

2. 研究実施内容

上皮性癌細胞の産生するムチンは、様々な免疫担当細胞上の受容体を介して相互作用することを明らかにしてきたが、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、3、9 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

ムチンを起点としたカスケードをブロックすることによる抗腫瘍効果について検討した。まず、マウス乳癌由来細胞株でムチン産生細胞である TA3-Ha と非産生細胞の TA3-St を用いて、選択的 COX2 阻害剤の Etodolac の効果を検討した。それぞれの細胞の皮下腫瘍の増殖に対して、Etodolac は TA3-Ha の増殖を著しく抑制したが、TA3-St のそれに対してはほとんど効果を示さなかった。ムチンによる COX2 誘導を Etodolac が抑制することによるもの

と考えられる。続いて、可溶性 SCR の抗腫瘍効果について検討した。可溶性 SCR は、SCR のエクストドメインからなる組換えタンパク質で、ムチンに結合することが確認されている。上記の細胞株の腹腔内担癌マウスに可溶性 SCR (5 μ g タンパク質) を 1 日おきに投与したところ、TA3-Ha (1 x 10⁴ 細胞を腹腔内注射) 担癌マウスにおいて、コントロールのマウスは 18 日で全て (n=10) 死亡したが、可溶性 SCR 処理マウスではその時点で 70% のマウスが生存し、著しい延命効果が認められた。なお、TA3-St 細胞担癌マウスについても同様の処理を試みたところ、予想に反して TA3-Ha 細胞以上の延命効果を示した。この分子的背景については現在検討中である。

Tn 抗原やシアリル Tn 抗原が関節リウマチ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示してきた。関節リウマチ患者においても、ムチンを起点としたカスケードが存在する可能性について検討した。患者関節液を分画し、各画分をヒト正常末梢血単核球に添加したところ、PGE2 や TNF- α の産生を増強する活性が高分子画分に存在することがわかった。さらに、過塩素酸沈殿やショ糖密度勾配遠心で精製した結果、MUC1 ムチンであることがわかった。なお、変形性膝関節症患者の関節液には同ムチンは認められず、単核球に同等の画分を加えても活性はなかった (川人／中田グループ)。

α -ポリ-L-グルタミン酸 (α -PGA) にモノ硫酸化糖を 10～15% 程度導入した人工ムチンを合成した。さらに、異なる重合度の α -PGA を用いることにより、分子サイズの異なる人工ムチンを合成することが出来た。いずれも SCR に対して高い親和性を有していた。一方、さらに多様な硫酸化人工ムチンを合成するために、モノ及びジ硫酸化二糖配糖体を合成した。これらの硫酸化人工ムチンの生物活性について検討中である (村田グループ)。

2) シグレックファミリーを介した系について

B 細胞のシグレック 2 にムチンが結合すると、BCR を介したシグナル伝達が抑制されることを明らかにしてきた。BCR に抗原が結合すると BCR のラフトへの移行が見られるが、ムチン存在下では 30% 程度の BCR のラフトへの移行が阻害されることがわかった。BCR 周辺に存在する多数のシグレック 2 分子がムチンにより架橋されることにより、BCR のラフトへの移行が阻害されたためと考えている。マウスシグレック 2 発現細胞 K46 μ m²細胞においても、上記したマウス乳癌細胞株 TA3-Ha 細胞の産生するムチン (エピグリカニン) により BCR を介した情報伝達が抑制されることを示すとともに、BCR のラフトへの移行についても同様の結果を得た。次に、ムチン産生細胞 TA3-Ha あるいは非産生細胞 TA3-St の担癌マウスにおける B 細胞の挙動について検討した。脾臓における T、B 細胞の細胞数を比較したところ、TA3-Ha 担癌マウスにおいて B 細胞の減少が見られた。FACS 解析の結果、B 細胞の中で CD1d、CD21 のサブポピュレーションが特異的に減少していることがわかった。組織化学的検討により、マージナルゾーンの B 細胞の消失していることが確認された。T 細胞非依存性抗原を担癌マウスに注射し、抗体産生を測定したところ、TA3-Ha 担癌マウスで有意に低下していることがわかった。これらの結果は、脾臓マージナルゾーンの B 細胞は、T 細胞非依存性抗原に対する抗体を産生するポピュレーションであることとよく一

致した。なお、B 細胞の消失については、アポトーシスの誘導によることが組織化学的な検証で明らかになった。

単球から樹状細胞 (DC) への分化過程においてもムチンが作用し、正常な機能を抑制していることがわかった。すなわち、単球から未熟樹状細胞への分化過程において MUC2 ムチンにより濃度依存的にアポトーシスが誘導されることがわかった。また、この作用はシグレック 3 を介した反応であることが示唆された。さらに、未熟樹状細胞から成熟細胞への分化過程でムチンが存在した場合、産生されるサイトカインのバランスが変化することがわかった。この場合、シグレック 9 を介した作用であることが示唆された (中田グループ)。

N-アセチルラクトサミン繰り返し構造を有するシアル酸糖鎖を導入した各種人工ムチンを合成した。間接競合 ELISA 法により、人工ムチンとシグレック 2 との相互作用解析を行ったところ、 α -PGA の重合度が高く、N-アセチルラクトサミン繰り返し構造をもたない人工ムチンが最も高い親和性を有していた。この親和性の強さは、天然ムチンであるウシ顎下腺ムチン (BSM) やヒト結腸癌細胞株 LS180 より調製したムチンの約 50 倍以上高い値を示した。これらの人工ムチンについて、生物活性を測定中である (村田グループ)。

シグレック 2 の結合する糖鎖構造を明らかにするために、シグレック 2 と結合する BSM を用いて、糖鎖マイクロアレイを作製してきた。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。酸性糖鎖はカラムからの溶出パターンからシアル酸を 1 個持つものがほとんどで、シアル酸を複数個もつ糖鎖の含量は著しく低いことが分かった。緩和な過ヨウ素酸処理をほどこし糖鎖還元末端の GalNAcol の 4 位と 5 位の炭素間を酸化して開裂させ、還元アミノ化によって ADHP を結合した NGL を得た。酸性糖鎖のすべてが 2 種類の ADHP 化 NGL を与え、BSM の酸性糖鎖は還元末端の GalNAc の 3 位と 6 位の両方に糖鎖を有するものであった。HPTLC による移動度と質量分析の結果から、酸性糖鎖のすべてが GalNAc の 6 位にシアル酸を結合するものであり、3 位に伸張した糖鎖にはシアル酸残基を持たないことが分かった。HPTLC で分離した NGL を固相化して糖鎖マイクロアレイを作製し、シグレック 2 との結合シグナルの有無を調べた。ところが、GalNAc の 6 位に結合したシアル酸に由来する NeuAc-CC-ADHP、NeuGc-CC-ADHP とともにシグレック 2 に対して結合シグナルを与えなかった。また、還元末端の GalNAc (GalNAcol) の 3 位に伸張した糖鎖には化学定量からもシアル酸を有しないことを認め、シグレック 2 とも結合しなかった。シグレック 2 は BSM と結合する事実から、シグレック 2 は BSM 酸性糖鎖に普遍的に存在する GalNAc が pyranose 環構造でその 6 位にシアル酸の結合した NeuAc-GalNAc あるいは NeuGc-GalNAc に結合するものと推定された。しかしながら、ごく微量ながら 3 位に伸張した糖鎖でシアル酸を 2 個もつ糖鎖の存在も考えられ、更なる検討が必要である (福井グループ)。

3. 研究実施体制

「京都産業大 中田博」グループ

- ①研究分担グループ長：中田 博（京都産業大学、教授）
- ②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

「京都産業大 福井成行」グループ

- ①研究分担グループ長：福井 成行（京都産業大学、教授）
- ②研究項目：BSM 及び LS180 細胞の産生するムチン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, 3, 9 及び SCR の結合する糖鎖の検索

「静岡大 村田健臣」グループ

- ①研究分担グループ長：村田 健臣（静岡大学、助教授）
- ②研究項目：
 - ・ SCR に結合する人工ムチンの分子設計と合成及びその機能評価
 - ・ シグレックファミリーに結合する人工ムチンの分子設計と合成及びその機能評価

「京都府立医大 川人豊」グループ

- ①研究分担グループ長：川人 豊（京都府立医科大学、講師）
- ②研究項目：
 - ・ 関節リウマチ関節液からの COX2 誘導性糖鎖抗原の単離
 - ・ ヒト消化器癌組織におけるムチンと COX2 の誘導及び悪性度との関連性

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- Yokoigawa, N., Takeuchi, N., Toda, M., Inoue, M., Kaibori, M., Yanagida, H., Inaba, T., Tanaka, H., Ogura, T., Takada, H., Okumura, T., Kwon, A-H., Kamiyama, Y., and Nakada, H. Overproduction of PGE2 in peripheral blood monocytes of gastrointestinal cancer patients with mucins in their bloodstream. *Cancer Lett.*, 17: 2006. in press.
- Yamaguchi, K., Tamaki, H., and Fukui, S. Detection of oligosaccharide ligands for Hepatocyte growth factor/Scatter factor (HGF/SF), Keratinocyte growth factor (KGF/FGF-7), RANTES and Heparin cofactor II by neoglycolipid microarrays of glycosaminoglycan-derived oligosaccharide fragments. *Glycoconjugate J.*, in press (GLYC110)
- Yokoigawa, N., Takeuchi, N., Toda, M., Inoue, M., Kaibori, M., Yanagida, H., Tanaka, H., Ogura, T., Takada, H., Okumura, T., Kwon, A-H., Kamiyama, Y., and Nakada, H. Enhanced production of IL-6 in peripheral blood monocytes stimulated with mucins secreted into the bloodstream. *Clin. Cancer Res.*, 11: 6127-6132, 2005.

- Y. Ito, M. Hikino, Y. Yajima, T. Mikami, S. Sirko, A. Holst, A. Faissner, S. Fukui, and K. Sugahara. 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*, 15, 593-603 (2005)
- Murata, T., Amarume, S., Hattori, T. Tokuyama, S., Tokuyasu, K., Kawagishi, H., and Usui, T. Purification and characterization of a chitinase from *Amycolatopsis orientalis* with *N*-acetylglucosamine-releasing unit releasing activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 336: 514-520, 2005.
- Kato, T., Suzuiki, M., Murata, T., and Park, E. Y. The effects of *N*-glycosylation sites and the *N*-terminal region on the biological function of β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase 2 and its secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 329: 699-705, 2005.
- Hidari, I.-P. J. K., Horie, N., Murata, T., Miyamoto, D., Suzuki, T., Usui, T., and Suzuki, Y. Purification and characterization of a soluble recombinant human ST6Gal I functionally expressed in *Escherichia coli*. *Glycoconj J.*, 22: 1-11 2005.