

「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

【研究のねらい、概要】

上皮性癌細胞の産生するムチンと免疫系細胞上の受容体との相互作用の解析を通じて、担癌状態での免疫機能への影響及び癌の進展との関連性を明らかにする。受容体の同定、ムチン上の糖鎖の結合部位の解析及び合成糖鎖(合成グリコポリマー)による生物活性の誘導などについて検討する。加えて、作用機構の分子的背景に基づく抗腫瘍薬あるいは免疫制御薬の開発に結びつける。

【研究進捗状況、研究成果、今後の見通し】

単球/マクロファージ上のスカベンジャーリセプター及び各種免疫細胞上のシグレックファミリーとムチンが結合することを示し、その情報伝達を介して様々な生物活性を発揮することが明らかになりつつある。その中には、免疫抑制に加えて PGE2 などの生理活性物質の産生を通して腫瘍増殖に有利な環境をもたらすことが明らかになった。ムチンを起点としたカスケードの阻害やムチン除去方法の開発及びその効果の解析が今後の課題である。また、免疫制御剤としての人工ムチンの開発も視野に入れている。

2. 研究実施内容

上皮性癌細胞の産生するムチンが免疫系細胞に様々な生物学的作用をもたらす結果、宿主の免疫機能が低下することを明らかにしつつある。単球/マクロファージのスカベンジャーリセプター(SCR)を介した系、及びB細胞、樹状細胞、NK細胞においてシグレック2, 3, 7, 9を介した系についていくつかの知見を得た。

1) SCR を介した系について

ムチンを起点として SCR を介したマクロファージの過剰刺激が、PGE2 などの産生亢進をもたらし、腫瘍増殖に有利な微小環境をもたらすことを明らかにしてきた。さらに、可溶性 SCR を作成し、ムチンの結合をブロックすることによる抗腫瘍効果を検討した。ムチン産生腫瘍であるマウス乳癌細胞 TA3-Ha の腹腔内担癌マウスにおいて、可溶性 SCR を腹腔内投与することにより抗腫瘍効果を認

めた。また、TA3-Ha 細胞自体に可溶性 SCR cDNA を導入して得た安定発現株を用いてマウス皮下腫瘍形成について検討した。可溶性 SCR 発現 TA3-Ha 細胞の皮下腫瘍形成は、コントロール細胞に比して著しく遅れた。細胞内におけるムチンと SCR の相互作用による影響も想定されるので、SCR 発現 TA3-Ha 細胞と TA3-Ha 細胞を混合したもの、及び同数の TA3-Ha 細胞を単独で皮下注射したマウスと比較したところ、後者の方が著しく早く増殖した。これらの結果は、皮下腫瘍組織に分泌された可溶性 SCR が浸潤マクロファージの活性化を抑制しているものと考えられる(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% 導入した硫酸化グリコポリマーを固相化し、可溶性 SCR の結合を確認した。マウス腹腔マクロファージの培養液に同グリコポリマーを加えると VEGF の産生が増加することがわかった(中田/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

シグレック 2 へのムチンの結合は、BCR を介した活性化シグナルの伝達を抑制することを示すとともに、ムチン産生腫瘍担癌マウスにおいて脾臓マージナルゾーンの形成不全が見られることを明らかにしてきた。さらに、本現象を検証するために血中ムチンの動態について検討した。蛍光標識した牛顎下腺ムチンや MUC2 ムチンをマウスに静注したところ、大半のムチンは肝臓に取り込まれるものの、一部は脾臓マージナルゾーンにトラップされることがわかった。アシアロムチンでは同部位に取り込まれないことから、シアル酸が必須であることがわかり、シグレック 2 との相互作用の結果であることを示唆した。また、同ムチン(5 μ g/匹)を正常マウスに 1 日おきに静注した場合、コントロールマウスに比して脾臓マージナルゾーンの B 細胞が約 30% 減少することがわかった。さらに、ムチン産生腫瘍担癌マウスに抗ムチン抗体を投与すると、脾臓マージナルゾーン B 細胞の減少が阻害されることを示した(中田グループ)。

ヒト末梢血より調製した単球から、未熟樹状細胞を経て成熟樹状細胞への分化過程におけるムチンの影響を検討した。樹状細胞では、シグレック 3, 5, 7, 9 の発現が報告されているが、シグレック 9 の関与について検討した。シグレック 9 の発現は、単球では弱く、未熟樹状細胞で増加し、成熟樹状細胞では減少した。可溶性シグレック 9 を作成し、MUC2 ムチン、合成グリコポリマー; poly(SA α 2,3/2,6-LacNAc)への結合を調べた結果、 α 2,3 SA、 α 2,6 SA を問わず結合活性をもつことがわかった。樹状細胞へのムチンの結合は、蛍光標識したムチンを用いて FACS による解析で確認した。LPS の誘導による未熟樹状細胞から成熟樹状細胞への分化過程において、ムチンが共存した場合 IL-10 の産生は微増する一方、IL-12 の産生は著しく減少した。本効果は、合成グリコポリマーあるいは抗シグレック 9 抗体によっても同程度認められた。従って、本効果はシグレック 9 を介した系が大きく関与していることがわかった。また、ヒト癌患者血清を分画し、ムチン画分のシグレック 9 結合活性を見たところ、ほとんどの症例で結合活性を認め、担癌状態において本経路も Th2 バランスに偏る分子的背景になっていることが強く示唆された(中田/村田グループ)

糖鎖マイクロアレイでは、糖鎖を識別する抗体や細胞接着分子の ligand 糖鎖の検出には、nitrocellulose (NC) 膜への非特異的な結合を防止する目的で BSA や casein などを Blocker として用いた。しかしながら、糖鎖に対する結合が相対的に弱く、解離定数が 10^{-9} - 10^{-6} mol

程度である細胞増殖因子やサイトカイン、ケモカインの硫酸化ムコ多糖鎖への相互作用を比較した場合には、電気的な結合に加えて NGL に起因する非特異的な疎水結合が無視できなくなり、intrinsic な相互作用によるシグナルの検出が妨げられた。そこで、疎水結合による非特異的な結合は Tween-20 を加えることにより、静電的な非特異的な結合は PVP と overlay 時の NaCl 濃度を上げることにより除去することが可能となった。この分析条件を用いるとデルマタン硫酸 (DS) 鎖を識別するとされる HGF/SF、KGF (FGF-7)、Heparin cofactor II は 8mer 以上の DS 鎖に選択的に結合すること、RANTES は DS 鎖に限らず、その結合は鎖長 (負の電荷量) に依存した静電的な結合であることを明らかにした。

次に、糖鎖との解離定数が 10^{-6} - 10^{-3} mol 程度であり、シアル酸残基を認識する植物 lectins (SNA, MAA) やヒト siglecs (siglec-2, siglec-3) では、一般的に微量の糖鎖を用いた場合では糖鎖との結合シグナルの検出は困難とされている。しかし、数 pmol の NGL 化糖鎖であっても感度よく結合シグナルを検出できる糖鎖マイクロアレイならば blocker の種類や assay 系を工夫すれば結合シグナルを検出することが可能となると考え、現在、lacto-N-tetraose, Lacto-N-neotetraose などを core 糖鎖として、シアル酸が α 2,3, α 2,6 結合した様々な ADHP 化糖鎖を調製して、シグナル検出のための assay 系を検討している。研究途上であるが、改良した分析系では SNA, MAA や siglec-3 の結合する糖鎖を的確に single-out することができた。

そこで、Siglec(s) の結合するシアル酸含有糖鎖の構造を明らかにするために、シアル酸含有糖鎖を網羅した糖鎖マイクロアレイを作成するために、4 糖の LNT および LNNT を出発原料として、シアル酸が Gal に α 2,3 結合および α 2,6 結合した様々な糖鎖を調製している。この研究の過程で、シアル酸含有糖鎖に対しての特異的な結合シグナルを得るためには、Blocker としての BSA は阻害的に働くことが判明し、平均分子量 4 万の PVP が特に有効であることを確認した。現在用いている糖鎖の種類は限られているが、調べた限りでは、糖鎖との解離定数が $1 \sim 10 \mu\text{M}$ である植物レクチンの SNA や MAA のリガンドとなる糖鎖を識別でき、Siglec-3 ではこれまでの報告とよく一致した結合特異性を見ることができた。しかしながら、解離定数が数 $10 \mu\text{M} \sim 1 \text{mM}$ とされる Siglec-2 では結合シグナルを得ることは現在のところ困難であった。

また、preliminary な結果であるが、PVP を Blocker として用いるとこの糖鎖マイクロアレイはシアル酸を認識するタンパク質のリガンド糖鎖を的確に single-out できるのみならず、シグナルの強弱からシアル酸の結合する Gal が β 1,3 あるいは β 1,4 で GlcNAc に結合しているか、またはガングリオシド糖鎖に認められる GalNAc に結合しているのかを区別できることが分かった。そこで、Siglec の種類を更に増やすと共に、NGL との相互作用に関して立体障害による結合阻害の有無を検討するために天然糖鎖として、シアル酸が α 2,6 結合した、あるいは high-mannose 型の N-グリコシド型糖鎖を用いることにした。すなわち、卵黄および卵白に含まれるそれぞれ vitellogenin や ovalbumin の糖鎖の分離を行っている。また同時に、糖鎖内部の GlcNAc 残基に Fuc の結合した Lewis 型の血液型関連糖鎖にも広げ

るために、創価大学西原教授から提供を受ける糖転移酵素遺伝子を用いて recombinant の FucT-III や VI などを大量に調製して、LNT や LNNT などの 4 糖を出発原料として酵素的に Lewis 型 6 糖を調製しようとしているところである (福井グループ)。

3. 研究実施体制

(1)「京都産業大 中田博」グループ

①研究者名

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

(2)「京都産業大 福井成行」グループ

①研究者名

福井 成行(京都産業大学 教授)

②研究項目

- ・シアル酸含有オリゴ糖の調製とその糖鎖マイクロアレイを用いたシグレック 2 の結合する糖鎖構造の解析

(3)「静岡大」グループ

①研究者名

村田 健臣(静岡大学 准教授)

②研究項目

- ・シグレック及びスカベンジャーリセプターに結合するグリコポリマーの合成

(4)「京都府立医大」グループ

①研究者名

川人 豊(京都府立医科大学 准教授)

②研究項目

- ・ヒト消化器癌組織及び関節リウマチ組織におけるムチンあるいはムチン様物質による COX2 の誘導と病態との関連性

4. 研究成果の発表等

(1)論文発表(原著論文)

- S. Deepa, K. Kalayanamitra, Y. Ito, P. Kongtawelert, S. Fukui, S. Yamada, T. Mikami, K. Sugahara: Novel sulfated octa- and decasaccharides from squid cartilage chondroitin sulfate E: Sequencing and application for determination of the epitope structure of the monoclonal antibody

MO-225 Biochemistry in press (bi-2006-02374m)

- 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.*, 245: 149-155, 2007. [Jan 8, 2007]
- Ogata, M., Murata T., Murakami K., Suzuki T., Hidari KI., Suzuki Y., and Uusi T. Chemoenzymatic synthesis of artificial glycopolypeptides containing multivalent sialyloligosaccharides with a γ -polyglutamic acid backbone and their effect for inhibition of infection by influenza viruses. *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 1383-1393 (2007).
- Ohno, S., Ohno, Y., Nakada, H., Suzuki, N., Soma, G., and Inoue, M. Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in endometrial cancer: Its relationship with tumor-produced cyclooxygenase-2, tumor-infiltrated lymphocytes and patient prognosis. *Anticancer Res*, 26: 4047-4053, 2006. [Nov-Dec, 2006]
- Sugihara, I., Yoshida, M., Shigenobu, T., Takagi, H., Maruyama, K., Takeuchi, N., Toda, M., Inoue, M., and Nakada, H. Different progression of tumor xenografts between mucin-producing and -nonproducing mammary adenocarcinoma-bearing mice. *Cancer Res.*, 66: 6175-6182, 2006.
- K. Yamaguchi, H. Tamaki and S. Fukui; 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.*, 23(7-8), 513-523 (2006)
- Murata T. and Usui T. Enzymatic synthesis of oligosaccharides and neoglycoconjugates. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1049-1059 (2006).

(2) 特許出願

平成 18 年度特許出願: 2 件 (CREST 研究期間累積件数: 2 件)