

「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生物工学科・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】

上皮生癌細胞の産生するムチンと免疫細胞上の受容体との相互作用を通じて、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。

【これまでの研究の概要】

ムチンと結合する受容体として、スカベンジャーリセプターや数種のシグレックファミリーを見出し、免疫抑制作用について検討してきた。

【研究進捗状況】

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、情報伝達を通じて様々な生物活性をもたらすことがわかった。前者では、PGE2 の産生亢進により腫瘍増殖に有利な環境をつくること、後者では、シグレック 2 を介した脾臓マージナルゾーン B 細胞のアポトーシスなどが明らかとなった。

【今後の見通し】

腫瘍組織に浸潤した免疫系細胞は、腫瘍細胞上の膜結合型ムチンとも結合する。この場合、双方の細胞に情報が伝えられ、腫瘍の増殖に有利な状況がつくられていると予想される。また、様々なムチンの影響を排除すべくムチン除去方法を開発するためのヒト型単クローン抗体の作成を試みる。

2. 研究実施内容

1) シグレック 2 を介した系

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／維持不全が見られることを明らかにしてきた。マージナルゾーン B 細胞に特異的な現象であることを間接的に証明するために、T 細胞依存性抗原に対するムチン産生腫瘍と非産生腫瘍担癌マウスの抗体産生能力を調べた。T 細胞非依存性抗原では、前者において著しい抗体産生能の低下が認められたのに対し、T 細胞依存性抗原では両者に差は見られなかった。従って、ムチンによる B 細胞への影響は、マージナルゾーン B 細胞に特異的であることがわかった。(中田グループ)

2) シグレック 9 と MUC1 を介した系

腫瘍組織に浸潤したマクロファージや樹状細胞は、癌細胞上の膜結合型ムチンと相互作用し、免疫細胞への作用のみならず膜結合型ムチンを介して情報が伝達される可能性がある。MUC1 安定発現株へのシグレック 9 の結合に伴う情報伝達について検討した。可溶性シグレック 9 が MUC1 に結合することをプレートアッセイで確認するとともに、MUC1 発現細胞へのシグレック 9 の結合を、FACS を用いて確認した。MUC1 発現細胞にシグレック 9 を結合後、細胞のライセートより MUC1 免疫沈降物を電気泳動し、ウエスタンブロッティング後、 β -カテニンを検出した。MUC1 の細胞質側に結合する β -カテニンは、シグレック 9 の濃度依存的に増加し、時間的には 20 分がピークとなった。一方、リン酸化 β -カテニンはシグレック 9 の結合に伴い、漸減した。これらの結果は、シグレック 9 との相互作用の結果、MUC1 発現癌細胞では β -カテニンの分解が抑制され、増殖を促進することを示している。(中田グループ)

3) 巨核球へのムチンの結合

蛍光標識した BSM を正常マウスに静注すると、大半の BSM は肝臓に取り込まれるが、一部は脾臓や骨髄に検出された。骨髄中に検出された BSM は、抗 CD41 抗体を用いて染色した細胞と完全に一致した。また、マウスより骨髄細胞を調製し、蛍光標識したエピグリカニン (MUC16) の結合を観察すると、CD41 陽性細胞、すなわち巨核球に特異的に結合することがわかった。また、プレートアッセイによりエピグリカニンの P-セレクトリンへの結合を確認した。さらに、骨髄中の巨核球とムチンの結合を抗 P-セレクトリン抗体存在下で行うとムチンの結合は完全に阻害されることから、巨核球上の P-セレクトリンにムチンが結合することがわかった。ムチンの結合に伴う巨核球の変化について現在検討中である。(中田グループ)

4) 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

neoglycolipid (NGL) をニトロセルロース膜に固相化して作成する糖鎖マイクロアレイは、糖鎖識別抗体のエピトープ糖鎖の特異性のみならず細胞接着分子、ケモカイン、細胞増殖因子などの結合する糖鎖構造をも single out できる。しかしながら、固相化される糖鎖が pmol 単位と微量であり、かつ分析の過程に複数回の洗浄の工程が含まれるが故に、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、ケモカインの相互作用を調べる際に、電気的な結合・疎水結合による非特異的な結合が無視できなくなった。そこで、それらに起因する非特異的な結合を除去できる分析条件を探った結果、blocker としてポリビニルピロリドン (PVP) を用いることにより解決できることを、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、RANTESを用いて証明した。そこで、Siglecsのみならずシアル酸と相互作用する植物レクチンを用いてこの改良方法によるリガンド糖鎖の探索を行った。

ヒト siglecs (siglec-2, siglec-3)のみならず、糖鎖との解離定数が 10^{-6} - 10^{-3} mol 程度で、これまでの分析方法では結合シグナルの検出が困難とされたシアル酸残基を認識する植物 lectins (SNA, MAA)を含めた。また、糖鎖マイクロアレイに固相化するリガンド糖鎖として、入手できるシアル酸の結合様式を異にする糖鎖には限りがあるので、比較的安価で入手可能な糖鎖(4糖)として lacto-N-tetraose, Lacto-N-neotetraose、ウシ脳から分離したガングリオシド(GM1)を出発原料としてシアル酸が Gal 残基に α 2,3, α 2,6 結合した糖鎖を酵素合成した。また、recombinant の Fucose 転移酵素を用いて Lewis a や Lewis x 型の糖鎖をも酵素合成した。

その結果、改良した分析系では、解離しやすい siglec-2 を除いて、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、SNA では α 2,6 結合したシアル酸残基を有する糖鎖であってもシアル酸に結合した Gal が β 1,4 結合で GlcNAc に結合した糖鎖に特異性が高いこと、MAA では α 2,3 結合したシアル酸残基を有する糖鎖であってもシアル酸に結合した Gal が β 1,4 結合で GlcNAc に結合した糖鎖でないことと結合しないことを明らかにすることができた。すなわち、シグナルの強弱からこの糖鎖マイクロアレイは、シアル酸の結合する内部の糖である Gal が β 1,3 あるいは β 1,4 で GlcNAc に結合しているか、なども区別できることを示した。将来への発展として、このシアル酸含有糖鎖を識別できる糖鎖マイクロアレイは、シアル酸が関与するとされる病変の原因解明や診断への応用が考えられる。胃潰瘍や胃癌の原因菌とされるピロリ菌では、結合糖鎖の特異性の違いと病原性との関連性を調べ、診断・治療へ向けての糖鎖の重要性を明らかにしたい。また、A 型鳥インフルエンザウイルスでは、鳥型からヒト型への変異の過程で生じるとされる、HA タンパク質の認識するリガンド特異性が NeuAc α 2, 3Gal から NeuAc α 2, 6Gal へと変異する過程に関して、糖鎖の内部構造も含めて結合糖鎖特異性の変異の過程を追跡して A 型鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染防御へむけての一助としたい。(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)

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)

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)

② 研究項目

・シグレックおよびスカベンジャーレセプターに結合する人工ムチンの合成

(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)

② 研究項目

・1) 関節リウマチ関節液からの COX-2 誘導性糖鎖抗原の単離、2) ヒト消化器癌組織におけるムチンと COX-2 の誘導及び悪性度との関連性

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Ishida, A., Ohta, M., Toda, M., Murata, T., Usui, T., Akita, K., Inoue, M., Nakada, H. Mucin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells during maturation. *Proteomics*, in press.
- S. Deepa, S. Yamada, S. Fukui and K. Sugahara: Structural determination of novel sulfated octasaccharides isolated from chondroitin sulfate of shark cartilage and their application for characterizing monoclonal antibody epitopes. *Glycobiology*, 17(6), 631-645 (2007).
- S. Deepa, K. Kalayanamitra, Y. Ito, P. Kongtawelert, S. Fukui, S. Yamada, T. Mikami, K. Sugahara: Novel sulfated octa- and deca-saccharides from squid cartilage chondroitin sulfate E: Sequencing and application for determination of the epitope structure of the monoclonal antibody MO-225 *Biochemistry*, 46(9), 2453-2465 (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).
- T. Sasanami, T. Murata, M. Ohtsuki, K. Matsushima, G. Hiyama, N. Kansaku & M. Mori, Induction of Sperm Acrosome Reaction by Perivitelline Membrane Glycoprotein ZP1 in Japanese Quail (*Coturnix japonica*) Reproduction, 133 (1): 41-49. (2007).
- Misawa, Y., Akimoto, T., Amarure, S., Murata T., and Uusi T. Enzymatic synthesis of spacer-linked divalent glycosides carrying N- acetylglucosamine and N-acetylglucosamine:

Analysis cross-linked activity with WGA. J. Biochem. 143 21-30 (2008).

- Y. Misawa, R. Masaka, K. Maeda, M. Yano, T. Murata, H. Kawagishi and T. Usui: Efficient synthesis of spacer-N-linked double-headed glycosides carrying N-acetylglucosamine and N,N' - diacetylchitobiose and their cross-linking activities with wheat germ agglutinin. Carbohydr. Res. 343, 434-442 (2008).

(2) 特許出願

平成 19 年度 国内特許出願件数:1 件 (CREST 研究期間累積件数:3 件)