

論文の内容の要旨

論文題目 Development of Highly Specific Glycosaminoglycan-Recognizing Lectin as a Novel Cancer Probe  
(グリコサミノグリカン結合性改変レクチンを用いた細胞外微小環境解析手法の開発)

氏名 村上 果林

【背景】

グリコサミノグリカン(GAG)は、ウロン酸とアミノ糖の二糖単位の繰り返し構造を有する直鎖状の長鎖糖鎖の総称で、遊離またはコアタンパク質に付加したプロテオグリカンの形で細胞表面及び細胞外マトリックスに存在し、発生、炎症、がん化など様々な生命現象において重要な役割を担う。GAGは、その構成糖の種類によりヘパラン硫酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸などに分類され、さらにエピメリ化や硫酸化などの不均一な修飾により多様な構造を有する。GAGは細胞増殖などに関与する様々なタンパク質と結合し、それらを密集させることにより膜貫通型受容体を近接させ多量体化を促進することでシグナル伝達を媒介すると考えられており(図1)、GAGの発現パターンの変化は細胞接着や増殖などに重要な影響を及ぼす。しかし、GAGの分子レベルでの解析手法が確立されていないことからGAGシグナル伝達モジュールの分子機構は未だ不明な点が多く、その理解のためにはGAGの局在解析や結合因子の探索が必要である。特にGAGの硫酸化のがん悪性化への関与が多く報告から示唆されており、高硫酸化GAGの機能解明が求められている。しかし各GAGを識別するプローブは未だ実用化されていない。そこで本研究では、高硫酸化GAG検出プローブの作製と、がん悪性化における高硫酸化GAGの機能解明を目的とした。

当研究室の先行研究において、糖鎖認識タンパク質(レクチン)の網羅的な解析により、動物由来レクチンCochlinがヘパリン結合分子であることが初めて見出された。本研究ではCochlinのGAGに対する結合特異性と感度を評価し、細胞表面の高硫酸化GAGの検出に成功した。特に、乳がんや前立腺がんの悪性化機構の一つであるホルモン療法耐性獲得において細胞増殖シグナルの増強が知られていることから、ホルモン依存性がんにおけるGAGの機能に着目し、GAGの発現や機能に関与する因子の探索を行った。

【方法と結果】

1. CochlinのGAGへの結合性評価

マウス由来CochlinのN末端にシグナル配列と



図1 ヘパラン硫酸を介したFGFシグナル伝達の模式図

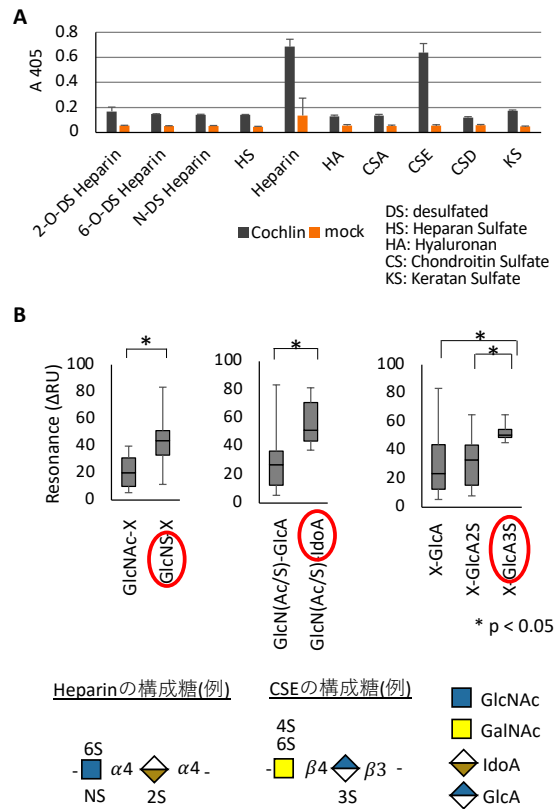


図2 Cochlinが認識する糖構造  
A. 各GAGへの結合試験(ELISA)  
B. GAG二糖アレイ解析(SPR)

Myc タグ, C 末端にヒト IgG Fc 領域を付加し, 哺乳細胞発現ベクターに組み込み, 発現宿主として CHO 細胞を用い発現を行った。続いて安定発現株を作製し, 培養上清から Protein A カラムによるアフィニティー精製により組換え体タンパク質を得, 結合評価に用いた。

まず, エバネッセント波励起型蛍光検出法を用いて 96 種類の糖鎖ライブラリとの結合性を測定した結果, Cochlin はライブラリ中で唯一ヘパリンのみに特異的に結合した。このことから, Cochlin は GAG 以外の主要な糖鎖には結合しないことが確かめられた。次に, 様々な GAG への Cochlin の結合性を ELISA 法にて調べた(図 2A)。N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)の 6 位, アミノ基及びイズロン酸(DoA)の 2 位にそれぞれ付加した硫酸基を選択的に脱硫酸したヘパリンや 4 種類の異なる硫酸化パターンを持ったコンドロイチン硫酸を用いて, Cochlin 及びその変異体の親和性を比較した。その結果, Cochlin がヘパリン及びコンドロイチン硫酸 E (CSE)へ顕著に結合することを見出した。さらに表面プラズモン共鳴(SPR)にて, 48 種類の化学合成 GAG 二糖単位に対する結合性を比較した結果, Cochlin は高硫酸化 GAG に特徴的な糖鎖構造(GlcNS, DoA, Glc3S など)を含むユニットへの親和性が高いことを見出した(図 2B)。以上の結果から, GAG は高硫酸化 GAG への結合特異性を有することが示された。さらに, SPR にてヘパリン, 2-O-脱硫酸ヘパリン, CSD, CSE に対する解離定数を測定したところ, それぞれ約 1.8, 44, 190, 14 nM となり, ヘパリンと CSE について, 一般的な抗体-抗原相互作用と同程度の強さで結合可能であることが示された。

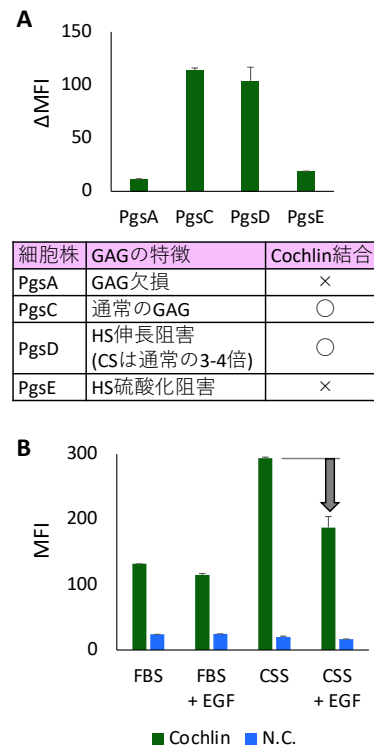


図 3 フローサイトメトリーによる結合解析  
A. GAG 改変細胞への Cochlin の結合  
B. 去勢抵抗性前立腺がん細胞 DU145 への Cochlin の結合

## 2. Cochlin を用いた細胞表面の高硫酸化 GAG 検出

GAG 合成酵素の変異細胞株(PgsA, B, C, D, E)を用いて, フローサイトメトリーにより Cochlin 細胞表面結合アッセイを行った(図 3A)。GAG 発現細胞と比較し GAG 欠損細胞への結合が顕著に減少したことから, Cochlin が細胞表面の高硫酸化 GAG 発現検出に利用可能であることを見出した。続いて, 複数の乳がん及び前立腺がん細胞株について Cochlin を用いた蛍光染色を行った結果, 斑点状の染色像が得られた(図 4A)。既報においても GAG を標的とした染色では斑点状の染色像が見られることから, 細胞膜上の高硫酸化 GAG を可視化できたと考えられる。

以上の結果から, Cochlin が高硫酸化 GAG 検出プローブとして利用可能であると示唆された。

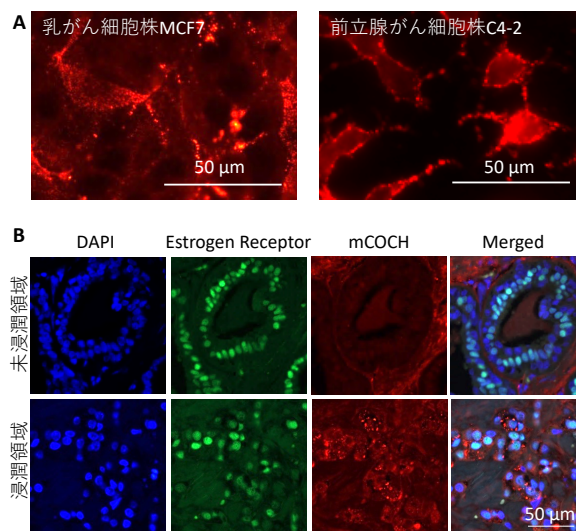


図 4 細胞染色および病理組織染色への利用  
A. がんモデル細胞株のレクチン染色像  
B. 乳がん病理組織切片のレクチン染色像

### 3. 高硫酸化 GAG 発現とがん悪性化との関連性の解析

去勢抵抗性前立腺がん細胞 DU145 について細胞表面 GAG を検出した(図 3B)。ホルモンや増殖因子が除去されたチャコール処理血清(CSS)での培養時と通常の血清(FBS)での培養時を比較すると、CSS 下培養時に Cochlin の結合が増加した。さらに、この培地に EGF を添加すると Cochlin の結合が減少した。この結果から、DU145 においてホルモンや増殖因子の欠乏下で高硫酸化 GAG が高発現することが示唆された。続いて FBS 培地、CSS 培地または EGF 添加 CSS 培地にて培養した DU145 の RNAseq と qPCR を行い、膜タンパク質 SUSD2, TRAM1 等の発現に顕著な発現量変化が見られ、これらの遺伝子が GAG 発現誘導を担う可能性が示唆された。

さらに、Cochlin を用いたヒト乳がん組織切片の染色により、がん細胞近傍に斑点状に局在する高硫酸化 GAG が検出された(図 4B)。またこの実験から、高硫酸化 GAG は小葉がんの浸潤領域特異的に発現するという興味深い結果を得た。

### 4. Cochlin の変異体の作製と GAG との相互作用様式の推測

Cochlin は、N 末端から LCCL, vWFA1, vWFA2 の 3 つのドメインで構成される。Cochlin の糖結合領域を探索するため、各ドメインのみを含む変異体やドメイン欠損体を作製し、GAG 結合能及び特異性を比較した(図 5)。その結果まず vWA1 ドメインが GAG との結合に必須であることが分かった。しかし、vWA2 ドメインを欠損させると高硫酸化 GAG (ヘパリン及びコンドロイチン硫酸 E)以外の GAG へも結合することが分かり、高硫酸化 GAG 特異的な認識のためには vWA1 だけでなく vWA2 との協調的な相互作用が必要であることが示唆された。一方 LCCL ドメインについては、N 末端を 129 残基欠損させても全長と同様の結合能及び特異性を示したことから、LCCL ドメインのみを含む変異体は GAG へ結合しなかったことから、LCCL ドメインは GAG との相互作用に関与しないことが示唆された。

実験の過程で、Cochlin 精製タンパク質は LCCL ドメインと vWA1 の間のループで切断を受けやすいという問題があった。分解された Cochlin の N 末端ペプチドシーケンス解析により切断箇所は LCCL ドメインと vWA1 ドメインの間のループ構造上の K152/K153 および K158/T159 の間であることを同定したため、これらの残基のアラニン置換体を作製した。その結果、切断が起きにくくなったものの、アラニン置換をしない全長体と比較してヘパリンへの結合親和性が減少することが分かった。そこで、アミノ酸残基番号 153-158 (KTPEKK)の領域が GAG との相互作用に関与すると考え、その領域を含む又は欠く変異体を作製し、GAG 結合特異性を比較した。その結果、N 末端を 157 残基欠損させた変異体について GAG 結合性が著しく減少することを見出した。また、LCCL ドメインの C 末端を残基番号 158

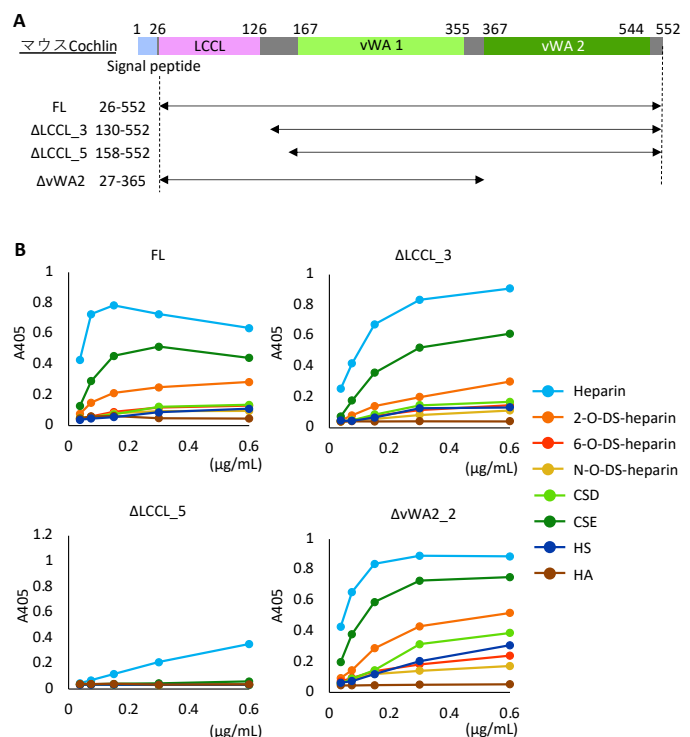


図 5 Cochlin 変異体の特異性の違い  
A. Cochlin 発現領域 B. ELISA による GAG 結合特異性解析



図 6 推測される Cochlin と GAG の相互作用様式

について GAG 結合性が著しく減少することを見出した。また、LCCL ドメインの C 末端を残基番号 158

まで伸長しても GAG へは結合しなかったことから、このループ構造のみでは GAG へ結合しないことが分かった。よって残基番号 153-158 の塩基性アミノ酸リッチな領域は、vWA1,2 による GAG への結合を補助する役割を担うと考えられる。また、この領域に含まれるリジンをアラニンに置換したところいずれの GAG についても結合が減少したこと、さらに、リジンと同様塩基性アミノ酸であるアルギニンに置換しても同様の GAG 結合特異性を示したことから、この領域は結合特異性には関与しないことが示唆された。

以上の結果から、LCCL ドメイン直後のループ構造と vWA1, vWA2 ドメインが協調的に GAG との相互作用を制御するという、Cochlin の GAG 認識機構が推測された(図 6)。

#### 【考察】

本研究では、Cochlin 組換え体タンパク質の発現・精製系を構築し、様々な結合解析手法によって高硫酸化 GAG へ特異的に結合することを示した。また、細胞や病理組織のレクチン染色により、Cochlin が細胞表面の高硫酸化 GAG の可視化に利用可能であることが示された。さらに変異導入によって様々な糖結合特異性を持ったプローブを作製した。以上の検討により、実用性の高い初の高硫酸化 GAG 検出プローブの作製を達成した。本プローブを用いて GAG クラスターの共局在分子の同定などを行うことにより、GAG を介したシグナル伝達の分子機構解明が可能になると期待される。

従来の研究から GAG 硫酸化の亢進はがん細胞の侵襲性の向上、細胞増殖シグナルの増強などを引き起こすことが知られており、高硫酸化 GAG はがん悪性度の指標と考えられる。DU145 において細胞増殖シグナルの減弱時に高硫酸化 GAG の発現が向上したことから、前立腺がんの去勢抵抗性獲得に際し GAG の発現を増強させて細胞増殖シグナルを補う機構の存在が示唆された。また乳がん検体において高硫酸化 GAG は浸潤領域のがん細胞近傍に特異的に存在していた。これらの結果から、Cochlin が悪性度の高いがん細胞に選択的に結合することが示唆され、今後ドラッグデリバリーシステムなどの臨床応用の可能性が期待される。

本研究は、従来困難だった GAG の機能解明に利用可能な新たな解析手法を構築しただけでなく、がんにおける高硫酸化 GAG の治療標的としての可能性を示唆するものであり、糖鎖を標的とした創薬への貢献が期待される。