

人工グリコポリマーによる癌転移抑制および抗炎症作用

平成 23 年 5 月 17 日受付

戸 田 宗 豊
京都産業大学工学部

村 田 健 臣
静岡大学農学部応用生物化学科

笹 野 昂 太
京都産業大学大学院工学研究科生物工学専攻

中 田 博
京都産業大学総合生命科学部生命システム学科

要 旨

セレクトインをターゲットとした癌転移抑制剤および抗炎症剤を開発する目的でポリグルタミン酸骨格に 6-O- 硫酸化 GlcNAc を多数結合させた人工グリコポリマー S-GlcNAc-PGA を合成した。セレクトインに対する結合性を検討したところ、S-GlcNAc-PGA は、癌の転移抑制効果があることが従来より知られているヘパリンよりも高いセレクトイン親和性を持つことが明らかとなった。さらに実験動物モデルを用いてその癌転移抑制効果および抗炎症効果を検討したところ、本分子はヘパリンよりも高い効果を持つことが明らかとなった。

はじめに

炎症や感染などに対する免疫応答には主に好中球やリンパ球、単球 / マクロファージなどの白血球が関与する。しかし、これらの白血球の過剰な血管外への集積は様々な病態の発症や増悪化と密接に関わっている。白血球の炎症部位への集積は、ローリング現象、活性化、接着、遊走の各段階を経るが、セレクトインは最初のステップであるローリングに関与している。このことから、セレクトインを阻害する薬剤によりローリング現象以降に生じる一連の炎症反応を制御できる可能性が考えられる。また、癌の血行性転移は、(a) 癌細胞の原発巣からの遊離、(b) 間質への浸潤、血管内への侵入、(c) 血流中の移行、(d) 血管内皮細胞への接着、(e) 血管外への離脱、(f) 転移臓器での増殖、という多くの複雑なステップを経るが、(d) の現象にもセレクトインとその糖鎖リガンドを介した細胞接着が関与している [1]。以上のことから、セレクト

ンとそのリガンドの結合を阻害する薬剤は、乾せんやリウマチ性関節炎などの慢性炎症疾患に対する治療薬、ならびに癌の血行性転移の抑制にも有用であると考えられている [2-4]。

セレクチンは、膜結合型の C 型レクチンファミリーに属する分子で細胞接着に関わる。現在まで、白血球に発現する L-セレクチン、活性化内皮細胞に発現する E-セレクチン、血小板および活性化血管内皮細胞に発現する P-セレクチンの 3 つが同定されている。セレクチンのリガンドとしてはシアリルルイス X が最も有名であるが、同構造を持たないヘパリンも P-および L-セレクチンと結合することが知られている [5]。ヘパリンは癌の血行性転移を抑制することが古くから知られているが、これはヘパリンの血液凝固阻害作用によるものではなく、P-セレクチンを介した癌細胞と血小板、あるいは活性化血管内皮細胞との相互作用の阻害によるものであると考えられている [3]。また、ヘパリンに比べて出血の副作用が少なく抗凝固薬として使用されている低分子ヘパリンが癌の治療に有効であることが近年報告されているが、その抗血液凝固作用が問題であり、臨床応用には課題がある。そのため、抗凝固活性を無くしたヘパリンが作成され、その効果が研究されている [6, 7]。その他、セレクチンとそのリガンドの結合の阻害薬としては、抗セレクチン抗体やシアリルルイス X 誘導体などの薬剤が開発されてきた [8, 9]。

本研究では、上述のセレクチン阻害薬とは全く異なるセレクチン阻害薬を開発する目的で、ポリグルタミン酸骨格に糖鎖を多数結合させた人工グリコポリマー [10] を合成した。薬剤開発の観点からは、化学構造の単純化、安定化、製造コストの低価格化などが望まれることから、結合させる糖鎖としてはシアリルルイス X を用いるのではなく、ヘパリンとシアリルルイス X を構成する糖のうち唯一共通する GlcNAc に着目した。また、ヘパリンとセレクチンの結合には GlcNAc の 6-O-硫酸化が必要であることが報告されており、さらに、シアリルルイス X の 6-O-硫酸化により、同糖鎖抗原とセレクチンとの結合親和性が高くなること [11] から、セレクチン結合親和性には 6-O-硫酸化 GlcNAc が最も重要であると考えられた。そこで、ヘパリンと同じく P-および L-セレクチンへの結合が期待されるポリグルタミン酸骨格に 6-O-硫酸化 GlcNAc を多数結合させた人工グリコポリマー S-GlcNAc-PGA (図 1) を合成した。

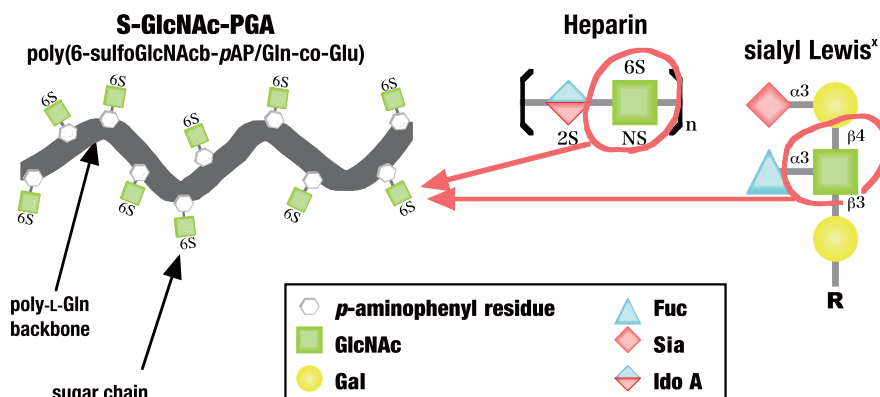


図 1. 人工グリコポリマー S-GlcNAc-PGA の模式図

人工グリコポリマー S-GlcNAc-PGA とセレクチンの結合

まず、S-GlcNAc-PGA がセレクチンと結合することを確認するためにプレートアッセイを行った。S-GlcNAc-PGA を固相化した 96 ウェルプレートに塩化カルシウム存在下で可溶型 E-、P-、または L-セレクチン-Fc キメラを 0～20 nM の濃度で加えた。セレクチンは C 型セレクチンであることから、陰性対照実験には 20 mM の EDTA 存在下でセレクチン-Fc キメラを加えた。室温で 2 時間インキュベーション後、塩化カルシウムおよび Tween-20 を含む HEPES 緩衝液で洗浄し、結合したセレクチン-Fc キメラをペルオキシダーゼを結合させたプロテイン A と TMB 発色基質を用いて検出した。その結果、図 2 に示すように、濃度依存的に P-および L-セレクチン-Fc キメラが S-GlcNAc-PGA に結合した。一方、E-セレクチン-Fc についてはほとんど結合が見られなかった。これは、ヘパリンのセレクチン結合特異性と類似している。また、EDTA 存在下ではセレクチンの結合が低下したことから、両者の結合が特異的であることが確かめられた。

次に、S-GlcNAc-PGA とヘパリンのセレクチンに対する結合親和性を比較するために、ヘパリンを固相化したプレートを用いて競合阻害アッセイを行った。ヘパリンを固相化した 96 ウェルプレートに 0～20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の S-GlcNAc-PGA またはヘパリン存在下で P-または L-セレクチン-Fc キメラを加えた。室温で 2 時間インキュベーション後、塩化カルシウムおよび Tween-20 を含む HEPES 緩衝液で洗浄し、結合したセレクチン-Fc キメラをペルオキシダーゼを結合させたプロテイン A と TMB 発色基質を用いて検出した。その結果、図 3 に示すように、S-GlcNAc-PGA の濃度依存的にセレクチンとヘパリンの結合が阻害された。また、S-GlcNAc-PGA は、P-

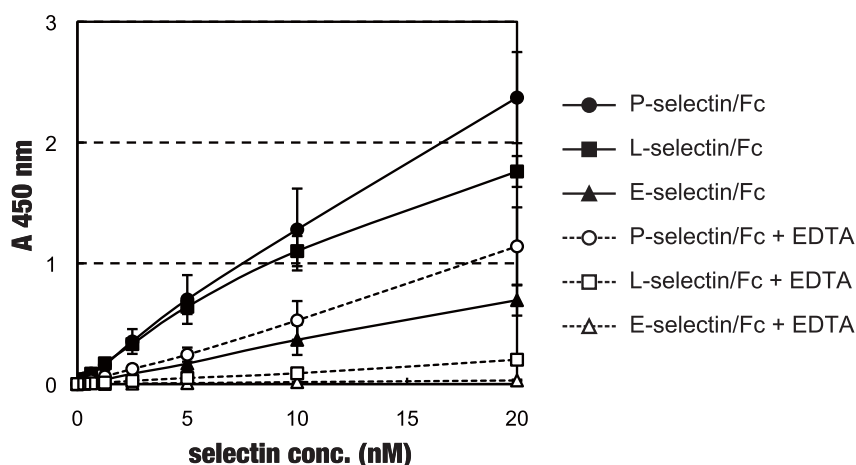


図 2. S-GlcNAc-PGA とセレクチンの結合

S-GlcNAc-PGA を固相化したプレートに Fc タグのついた可溶型セレクチン組換えタンパクを加え、結合活性を測定した

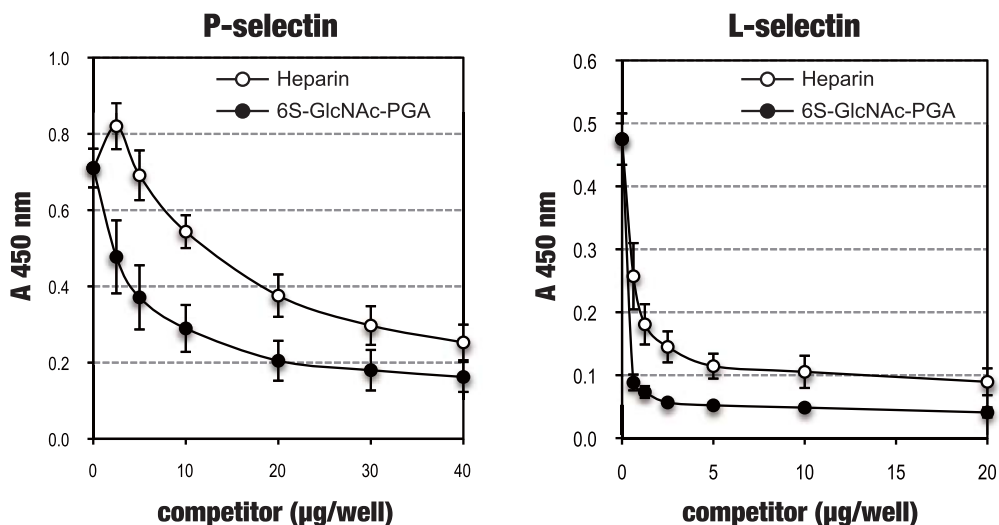


図 3. S-GlcNAc-PGA によるヘパリンとセレクチンの結合の阻害

ヘパリンを固相化したプレートに S-GlcNAc-PGA またはヘパリンの存在下で Fc タグのついた可溶性セレクチン組換えタンパクを加え、セレクチンと固相化ヘパリンの結合に対する阻害活性を測定した。

と L-セレクチンの両方で比較対照として用いたヘパリンよりも高い結合阻害効果を示した。以上のことから、S-GlcNAc-PGA は P- および L- セレクチンのどちらに対してもヘパリンよりも高い結合親和性を持つことが明らかとなった。

癌細胞と P- セレクチンの結合に対する S-GlcNAc-PGA の阻害効果

以上のように、セレクチンと S-GlcNAc-PGA が結合することが明らかになったことから、次に癌細胞と P- セレクチンの結合が S-GlcNAc-PGA により阻害されるかを検討した。癌細胞は、高転移性のマウス腸癌細胞株である colon 26-LuM1 を用いた [12]。U 底の 96 ウェルプレートに可溶性 P- セレクチン-Fc キメラを固相化し、0 ~ 100 ng/ml の濃度の S-GlcNAc-PGA またはヘパリンの存在下で細胞懸濁液を各ウェルに加えて 400 × g で 2 分間遠心した。コントロールは、P- セレクチン-Fc キメラを固相化していないプレートで同様の操作を行った。遠心によりプレートの底に集まった細胞塊を顕微鏡で観察し、コントロール実験における細胞塊の面積を 1 としたときの相対面積をグラフ化した。本法では、癌細胞と P- セレクチンが結合しない場合、遠心力により細胞はプレートの中心に集まるが、結合する場合は癌細胞が P- セレクチンによりプレートの底に接着するので中心に集まらず、相対面積は大きくなる。図 4 に示したように、S-GlcNAc-PGA の濃度依存的に P- セレクチンと colon 26-LuM1 の結合が阻害された。また、その阻害効果はヘパリンよりも高かった。

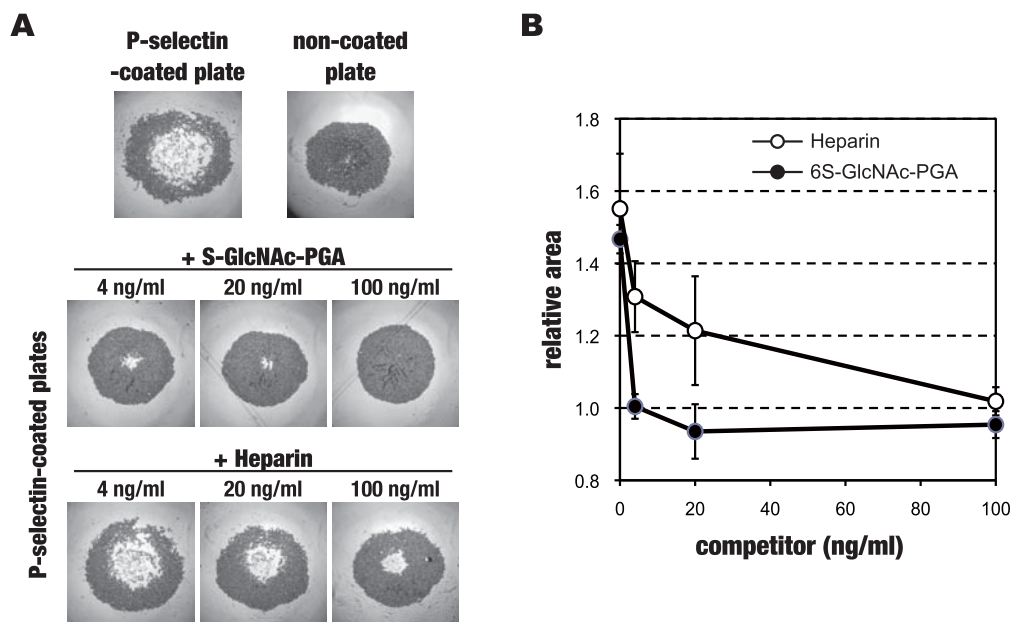


図 4. 癌細胞とセレクチンの結合に対する S-GlcNAc-PGA の阻害効果

(A) P-セレクチンを固相化した U 底プレートに S-GlcNAc-PGA またはヘパリンの存在下でマウス腸癌細胞由来株 colon 26-LuM1 を加え、400 × g で 2 分間遠心した。陰性対照実験には P-セレクチンを固相化していない U 底プレートを用いた。(B) P-セレクチンを固相化していないプレートの細胞塊の面積を 1 としたときの相対面積を測定し、グラフ化した。

S-GlcNAc-PGA の血行性転移抑制効果

次に、癌の血行性転移が S-GlcNAc-PGA により抑制されるかをマウス転移実験モデルにより検討した。Balb/c マウスに S-GlcNAc-PGA またはヘパリンに続き、15 分後に colon 26-LuM1 を尾静脈より静注した。3 週間後にマウスから肺を摘出し (図 5A)、その湿重量および転移結節数を測定した (図 5B および C)。その結果、コントロールとして PBS を投与したマウスに比べて、S-GlcNAc-PGA またはヘパリンを投与したマウスでは、有意に癌細胞の肺転移が減少していた。また、S-GlcNAc-PGA による転移抑制はヘパリンよりも効果的であった。この結果は、*In vitro* での結果と一致していた。

S-GlcNAc-PGA の抗炎症効果

急性炎症における好中球の浸潤には P-セレクチンと L-セレクチンが関わっていることから [13-15]、両者に結合する S-GlcNAc-PGA は炎症部位への好中球の浸潤を抑制する可能性が考え

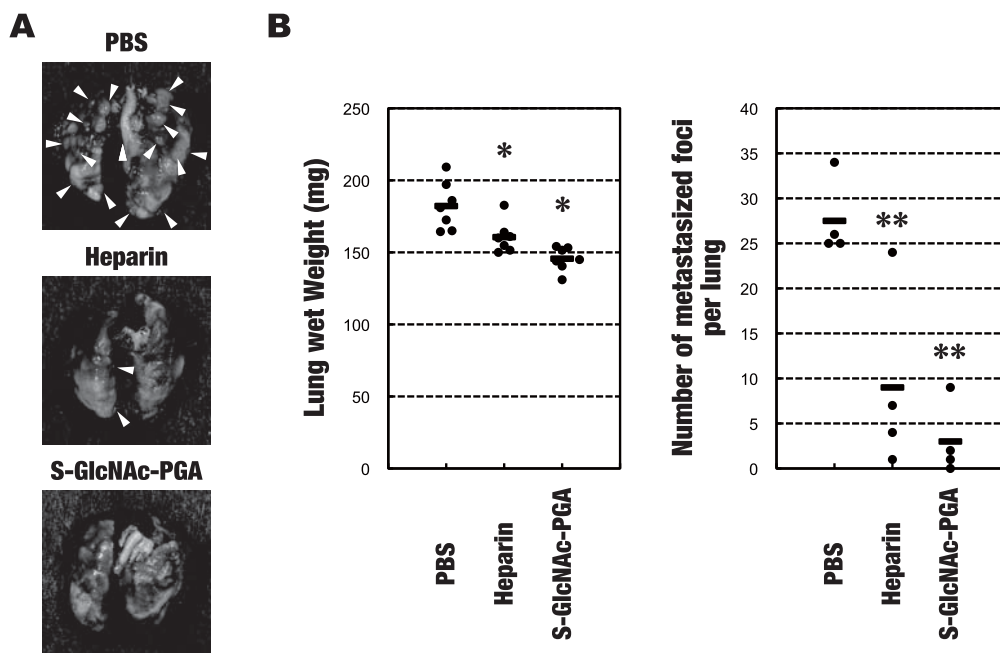


図 5. 血行性肺転移に対する S-GlcNAc-PGA の阻害効果

(A) マウスに S-GlcNAc-PGA またはヘパリンを静脈より投与後、colon 26-LuM1 を尾静脈より移植した。3 週間後、肺を摘出した。矢頭は転移結節を示す。(B) 摘出した肺の湿重量および転移結節数を測定した。●は各個体の値。—は平均値。*、 $P \leq 0.05$ 。**、 $P \leq 0.01$ 。

られる。そこで動物実験モデルを用いて、S-GlcNAc-PGA による抗炎症効果を検討した。C57/BL6 マウスの腹腔内に 2 ml の 3% チオグリコール酸培地を投与し、5 分後に S-GlcNAc-PGA またはヘパリンを尾静脈より投与した。3 時間後、腹腔内に浸潤した細胞を回収し、FITC 標識抗 Gr-1 抗体で染色後、フローサイトメーターで解析することにより細胞回収液に含まれる好中球数を測定した。その結果、S-GlcNAc-PGA を静脈より投与したマウスにおいて、チオグリコール酸培地により腹腔内に誘導された好中球数は PBS を静脈に投与したマウスに比べて有意に減少していた (図 6)。また、その効果はヘパリンよりも高かった。

まとめ

合成した人工グリコポリマー S-GlcNAc-PG についてセレクチンとの結合性などについて検討したところ、本分子が P-および L-セレクチンとヘパリンよりも強く結合すること、動物実験モデルにおいて癌細胞の肺転移を抑制すること、および好中球の炎症部位への浸潤を阻害することが明らかとなった。

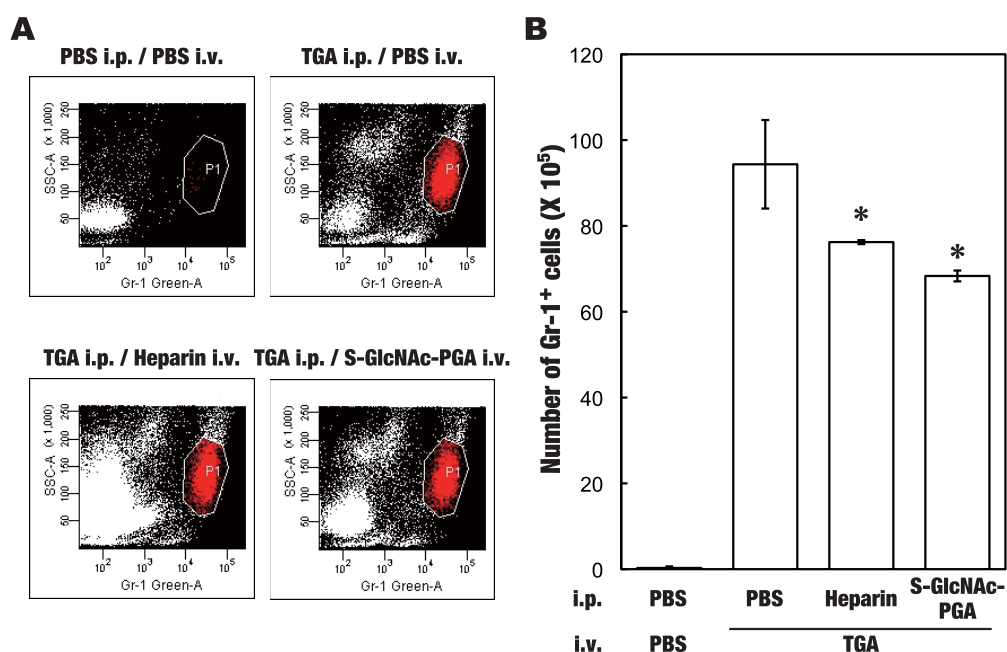


図 6. S-GlcNAc-PGA による抗炎症作用

(A) マウスの腹腔内に 2 ml の PBS または 3% チオグリコール酸培地を投与した。5 分後に S-GlcNAc-PGA またはヘパリンを静脈より投与し、3 時間後に腹腔内の細胞を回収した。得られた細胞を FITC 標識抗 Gr-1 抗体で染色後、FACSArray を用いて解析した。赤色の P1 画分が好中球。

(B) A の結果をもとに各マウス 1 匹あたりの腹腔内浸潤好中球数を計算し、グラフ化した。*、 $P \leq 0.05$ 。

展望

セレクトインの阻害薬としては、ヘパリンやその化学修飾物、シアリルルイス X 類似体、ブロック抗体などのほかに海洋生物由来硫酸化多糖 [16]、セレクトイン結合性ペプチド [17] などが報告されている。これらの分子に比べ、本分子が優れている点は、

- (a) 天然物と異なり、構造が均一である。大量の原料を必要としない。また、複雑な精製過程が不要である。
- (b) ポリグルタミン酸骨格に 6-O-硫酸化 GlcNAc を結合させた非常に単純な構造であり、製造コストも比較的安価である。
- (c) 多価であり、結合親和性が高い。
- (d) 結合させる糖鎖の量、種類をコントロールでき、一分子に複数種の糖鎖をつけることができる。
- (e) 使用するポリグルタミン酸骨格の長さを変えることにより、分子量を必要最低限の大きさにまで小さくできる。

(f) 細胞毒性および免疫原性がない [18]。

などが挙げられる。

今回の実験では、ポリグルタミン酸重合度が 467、糖鎖置換度が 51% の S-GlcNAc-PGA を用いた。今後は、(d) および (e) の利点を生かしてより低分子の S-GlcNAc-PGA を合成し、本分子の癌転移抑制作用および抗炎症作用に最低限必要なポリグルタミン酸骨格の長さおよび結合糖鎖量を検討する。

参考文献

1. Laubli, H. and L. Borsig, Selectins promote tumor metastasis. *Semin. Cancer Biol.*, 2010. **20** (3): p. 169-77.
2. Kaneider, N. C., A.J. Leger, and A. Kuliopulos, Therapeutic targeting of molecules involved in leukocyte-endothelial cell interactions. *FEBS J.*, 2006. **273** (19): p. 4416-24.
3. Varki, A. and N. M. Varki, P-selectin, carcinoma metastasis and heparin: novel mechanistic connections with therapeutic implications. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2001. **34** (6): p. 711-7.
4. Rainer, T. H., L-selectin in health and disease. *Resuscitation*, 2002. **52** (2): p. 127-41.
5. Koenig, A., *et al.*, Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J. Clin. Invest.*, 1998. **101** (4): p. 877-89.
6. Casu, B., I. Vlodavsky, and R. D. Sanderson, Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, 2008. **36** (3-4): p. 195-203.
7. Mousa, S. A. and L. J. Petersen, Anti-cancer properties of low-molecular-weight heparin: preclinical evidence. *Thromb. Haemost.*, 2009. **102** (2): p. 258-67.
8. Norman, K. E., *et al.*, Sialyl Lewis (x) (sLe(x)) and an sLe(x) mimetic, CGP69669A, disrupt E-selectin-dependent leukocyte rolling in vivo. *Blood*, 1998. **91** (2): p. 475-83.
9. Todderud, G., *et al.*, BMS-190394, a selectin inhibitor, prevents rat cutaneous inflammatory reactions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997. **282** (3): p. 1298-304.
10. Murata, T., *et al.*, Enzymatic synthesis of sulfated disaccharides using beta-D-galactosidase-catalyzed transglycosylation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2001. **65** (11): p. 2456-64.
11. Galustian, C., *et al.*, Sialyl-Lewis (x) sequence 6-O-sulfated at N-acetylglucosamine rather than at galactose is the preferred ligand for L-selectin and de-N-acetylation of the sialic acid enhances the binding strength. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997. **240** (3): p. 748-51.
12. Sakata, K., *et al.*, Establishment and characterization of high- and low-lung-metastatic cell lines derived from murine colon adenocarcinoma 26 tumor line. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1996. **87** (1): p. 78-85.
13. Frenette, P. S., *et al.*, Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell*, 1996. **84** (4): p. 563-74.
14. Tedder, T. F., D. A. Steeber, and P. Pizcueta, L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J. Exp. Med.*, 1995. **181** (6): p. 2259-64.
15. Khan, A. I., R. C. Landis, and R. Malhotra, L-Selectin ligands in lymphoid tissues and models of inflammation. *Inflammation*, 2003. **27** (5): p. 265-80.

16. Borsig, L., *et al.*, Selectin blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber. Effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment. *J. Biol. Chem.*, 2007. **282** (20): p. 14984-91.
17. Fukuda, M. N., *et al.*, A peptide mimic of E-selectin ligand inhibits sialyl Lewis X-dependent lung colonization of tumor cells. *Cancer Res.*, 2000. **60** (2): p. 450-6.
18. Totani, K., *et al.*, Chemoenzymatic synthesis and application of glycopolymers containing multivalent sialyloligosaccharides with a poly (L-glutamic acid) backbone for inhibition of infection by influenza viruses. *Glycobiology*, 2003. **13** (5): p. 315-26.

