

人工グリコポリマー 6S-GlcNAc-PGA による癌転移抑制および抗炎症作用

平成 24 年 4 月 7 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

P- および L- セレクチンに結合する人工グリコポリマー 6S-GlcNAc-PGA を合成し、本分子が実験動物モデルにおいて癌転移抑制効果および抗炎症効果をもつことをこれまでに明らかにした。本稿では、さらに低分子化した 6S-GlcNAc-PGA を新たに合成し、分子量および糖鎖置換度とセレクチンに対する結合性の相関性について検討した。その結果、これまでに使用していた 6S-GlcNAc-PGA よりも約 18 倍分子量が小さい 6S-GlcNAc-PGA でもヘパリンよりも高いセレクチン結合親和性をもつことが明らかとなった。

はじめに

生体内の炎症部位には白血球の顕著な集積、遊走がみられるが、これは炎症性細胞と血管内皮細胞との相互作用により引き起こされる。炎症は重要な免疫反応の 1 つである一方で、血管外への白血球の過剰な集積は様々な病態の発症や増悪化の原因でもある。この相互作用に関わる様々な分子が同定されているが、細胞間の接着に直接関わる分子としてセレクチン、インテグリンなどの分子が知られている。セレクチンは、C 型レクチンファミリーに属するレクチンで、L-セレクチン、P-セレクチン、E-セレクチンの 3 種が知られている。L-セレクチンは、好中球、単球、リンパ球など、白血球全般に広く発現している。P-セレクチンは、血小板を産生する巨核球および血管内皮細胞で合成され、血小板 α 顆粒および血管内皮細胞の Weibel-Palade 小体に貯蔵されている。炎症性サイトカインやヒスタミン等の刺激による活性化後数分のうち

に細胞表面上に発現するようになる。E-セレクトインは、サイトカイン等の刺激により活性化された血管内皮細胞に発現する。刺激後約4時間が発現のピークであり、12時間以内に発現が低下する。セレクトインのリガンドとしてシアリルルイス X がよく知られているが、同構造を持たないヘパリンも P-および L-セレクトインと結合することが古くから知られている [1]。また、ヘパリンは炎症部位への好中球の浸潤や癌の血行性転移を抑制することが知られているが、この効果は、癌細胞と血小板、あるいは血管内皮細胞とのセレクトインを介した相互作用をヘパリンが阻害することによるものであると考えられている [2]。このことから、セレクトインとそのリガンドの結合を阻害する分子は、癌の血行性転移や慢性炎症疾患に対して有用であると考えられ、いくつかの薬剤が開発されている [3-8]。

我々は、昨年度までにセレクトイン阻害薬として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 6S-GlcNAc-PGA (図 1) を合成し [9]、本分子が癌転移抑制効果および抗炎症効果をもつことを明らかにした。6S-GlcNAc-PGA は、ポリグルタミン酸骨格に 6-O-硫酸化 GlcNAc を多数結合させた構造を持つ。骨格としてポリグルタミン酸を使用していることから、合成時にポリグルタミン酸重合度 (DP: Degree of polymerization of glutamic acid residues) の低いものを使用することで容易に低分子にすることができる。

安定性や血中半減期を高めるためには、できるだけ低分子化することが必要である。6S-GlcNAc-PGA と同様に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を例にとると、ヘパリンは抗凝固薬の 1 つでもあり、血栓塞栓症や播種性血管内凝固症候群 (DIC) の治療、人工透析、体外循環での凝固防止などに用いられている。ヘパリンは牛や豚の腸粘膜から調製されるが、製剤中に含まれる分子量の違いによって、未分画ヘパリン (分子量 3,000 ~ 30,000) と低分子ヘパリン (分子量約 4000 ~ 6000) に分けられる。低分子量ヘパリンは皮下注射により投与され、未分画ヘパリンよりも長い半減期 (腎排泄のみ) を有する。その消失は一相性であり、血中濃度の予測が未分画ヘパリンよりも容易で、急速な消失がないため投与頻度も少なく済むことが知られている。

これまでは DP=467 のポリグルタミン酸を使用して合成した 6S-GlcNAc-PGA を使用していたが、本稿では新たに DP=86 および DP=26 のポリグルタミン酸を使用して 6S-GlcNAc-PGA を合成し (図 1)、セレクトインに対する結合性と分子量の相関について検討した。

人工グリコポリマー 6S-GlcNAc-PGA とセレクトインの結合

はじめに、合成した 3 種の 6S-GlcNAc-PGA についてプレートアッセイによりセレクトインとの結合親和性を比較した。ヘパリンを固相化した 96 ウェルプレートに 0 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{well}$ の 6S-GlcNAc-PGA またはヘパリン存在下でマウス P-または L-セレクトイン-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、6S-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、いずれの 6S-GlcNAc-PGA もセレクチンに結合することわかった。興味深いことに、DP=467 および DP=26 の 6S-GlcNAc-PGA は、P- 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のに対し、DP=86 はヘパリンよりも結合阻害効果が低かった。糖鎖置換度 (DS: Degree of substitution of sugar derivatives based on DP of PGA) は、DP467、DP26、DP86 の順に高いことから、この結果は少なくとも DP=26 以上では、セレクチンに対する結合親和性はポリグルタミン酸重合度に依存せず、DS に相関することを示唆している。

次に、図 2 において比較対照として用いたヘパリンよりもマウスセレクチン対して高い結合阻害効果を示した DP467 および DP26 について、同様の方法によりヒトセレクチンに対する結合親和性について検討した。その結果、どちらの 6S-GlcNAc-PGA もマウスセレクチンと同様にヒトセレクチン対してヘパリンよりも高い結合親和性を持つことがわかった (図 3)。

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、用いた 6S-GlcNAc-PGA の中で最も低分子である 6S-GlcNAc-PGA DP26 がヘパリンよりも強くセレクチンと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 6S-GlcNAc-PGA DP26 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 [10]。U 底の 96 ウェルプレートに可溶性マウス P-セレクチン-Fc キメラを固相化し、0 ~ 100 ng/ml の濃度の 6S-GlcNAc-PGA DP26、DP467 またはヘパリンを含む細胞懸濁液を各ウェルに加えて 400 × g で 2 分間遠心した。癌細胞と P-セレクチンが結合しない場合は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ため中心に集まらず、相対面積は大きくなる。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。その結果、6S-GlcNAc-PGA DP467 だけでなく 6S-GlcNAc-PGA DP26 でも濃度依存的に P-セレクチンと colon 26-LuM1 の結合が阻害された (図 4)。また、その阻害効果はいずれもヘパリンよりも高く、図 2 および図 3 の結果と一致していた。

S-GlcNAc-PGA DP10 のセレクチン結合親和性

6S-GlcNAc-PGA DP26 でもヘパリンより高いセレクチン結合親和性が見られたことから、ポ

リグルタミン酸が10個つながった合成ペプチドを用いてより低分子の6S-GlcNAc-PGA DP10を合成した。糖鎖置換度の影響を調べるため、DS=27%とDS=60%の2種類を合成した。これらの6S-GlcNAc-PGAをもちいて図1と同様の方法でセレクチン結合親和性を検討したところ、図5Aに示すようにどちらの6S-GlcNAc-PGA DP10もヘパリンとセレクチンの結合を阻害しなかった。そこで、次に6S-GlcNAc-PGA DP10のセレクチンに対する結合を調べた。6S-GlcNAc-PGA DP10/DS60%または6S-GlcNAc-PGA DP10/DS27%をプレートに固相化し、可溶性P-セレクチン-Fcキメラを0~10 µg/mlの濃度で加えた。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5Bに示すように、6S-GlcNAc-PGA DP10/DS27%では陰性対照として用いたGlcNAc-PGA DP10/DS60%と同様にP-セレクチンに対する結合がみられなかったのに対し、6S-GlcNAc-PGA DP10/DS60%ではP-セレクチン-Fcキメラの結合が見られた。

まとめ

これまで使用してきた6S-GlcNAc-PGA DP467よりも分子量が約18倍小さく、未分画ヘパリンの平均分子量よりも小さい6S-GlcNAc-PGA DP26でもヘパリンよりも高いセレクチン結合親和性がみられ、セレクチンと癌細胞の接着を阻害できることが明らかとなった。

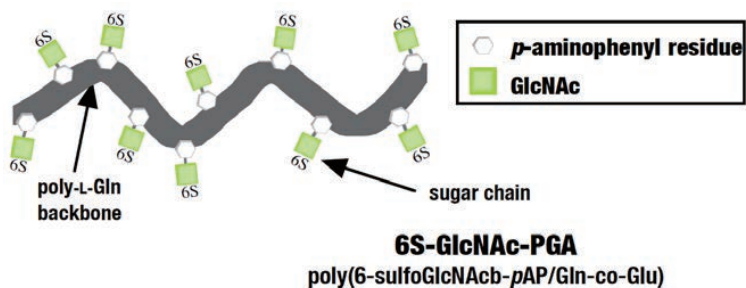
そこで、DP=10の合成ペプチドを用いてさらに低分子の6S-GlcNAc-PGA DP10を合成し、これまでと同様の方法で、セレクチンに対する結合親和性をヘパリンと比較したところ、結合がほとんどみられなかった。

ヘパリンにおいては、低分子ヘパリンよりは結合親和性が低いものの4糖のオリゴヘパリンでもセレクチンに対する結合がみられ、セレクチンと癌細胞の結合の阻害やチオグリコレート処理により誘導される腹腔内への好中球の浸潤を抑制できることが報告されている [11]。さらに未分画の4糖オリゴヘパリンに比べ、高硫酸化4糖オリゴヘパリンではより高いセレクチン結合親和性を持ち、2糖のオリゴヘパリンでは結合がみられない。6S-GlcNAc-PGAの場合でも、6S-GlcNAcが4個隣接しているような構造がセレクチンと結合に必要なものかもしれない。6S-GlcNAc-PGA DP10/DS60では、硫酸化糖鎖は1分子あたり平均6個結合していることになるが、4個隣接しているものは確率的に非常に少ないと思われる。以上のことから6S-GlcNAc-PGA DP10でもDSを上げることにより、高いセレクチン結合親和性を持つ可能性がある。

今後は、今回セレクチンに対して高い結合親和性が見られた従来よりも低分子の6S-GlcNAc-PGA DP26を用いて動物実験モデルによりその癌転移抑制および抗炎症効果を検討する。また、DSの高い6S-GlcNAc-PGA DP10を合成し、セレクチンに対する親和性検討する予定である。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Rainer, T. H., L-selectin in health and disease. *Resuscitation*, 2002. **52** (2): p. 127-41.
- [5] Casu, B., I. Vlodaysky, and R. D. Sanderson, Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, 2008. **36** (3-4): p. 195-203.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Todderud, G., *et al.*, BMS-190394, a selectin inhibitor, prevents rat cutaneous inflammatory reactions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997. **282** (3): p. 1298-304.
- [9] Murata, T., *et al.*, Enzymatic synthesis of sulfated disaccharides using beta-D-galactosidase-catalyzed transglycosylation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2001. **65** (11): p. 2456-64.
- [10] 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.
- [11] Nelson, R. M., *et al.*, Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood*, 1993. **82** (11): p. 3253-58.



	DP (α -PGA)	DS	Mw
6S-GlcNAc-PGA DP467	467	51%	165 kDa
6S-GlcNAc-PGA DP86	86	39%	25 kDa
6S-GlcNAc-PGA DP26	26	47%	9 kDa

図 1. 人工グリコポリマー 6S-GlcNAc-PGA の構造の模式図とポリグルタミン酸重合度 (DP)、糖鎖置換度 (DS) および分子量 (Mw)

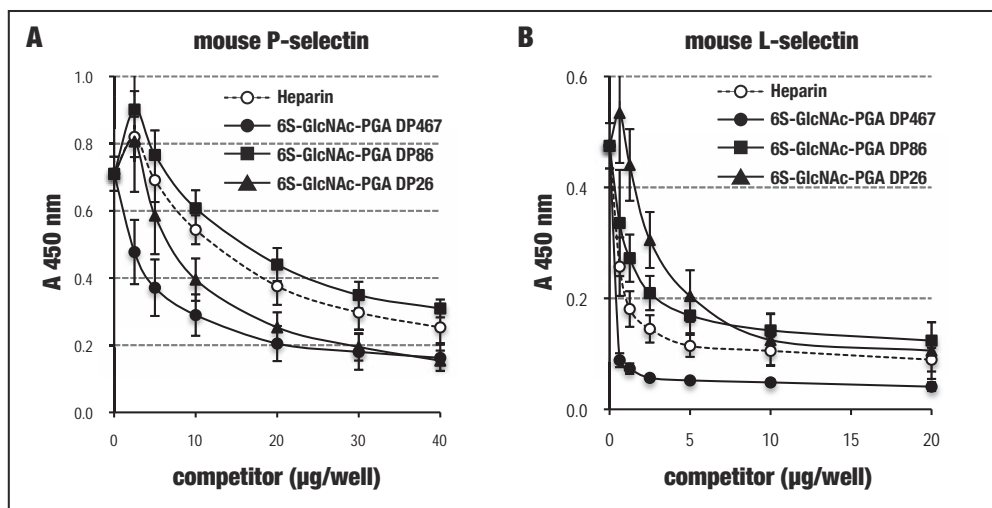


図 2. 6S-GlcNAc-PGA によるヘパリンとマウスセレクトインの結合の阻害

ヘパリンを固相化したプレートに 6S-GlcNAc-PGA またはヘパリンの存在下で Fc タグのついた可溶性マウスセレクトイン組換えタンパクを加え、セレクトイ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。

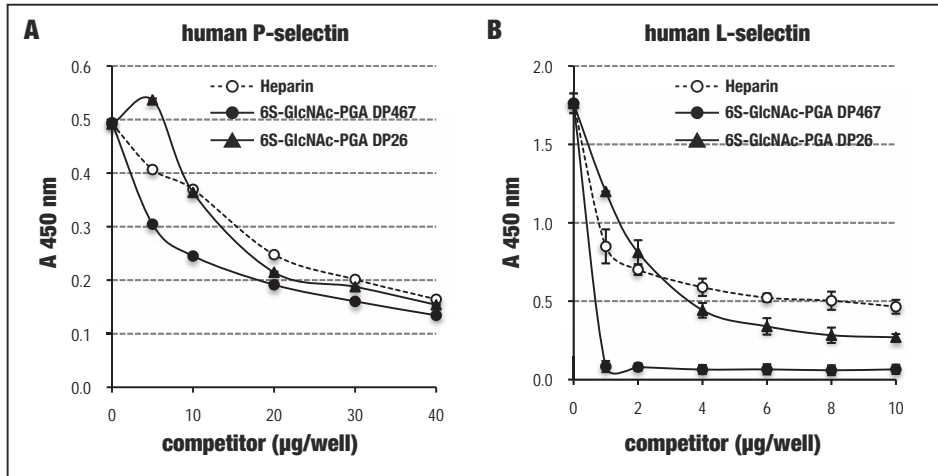


図 3. 6S-GlcNAc-PGA によるヘパリンとヒトセレクトインの結合の阻害

ヘパリンを固相化したプレートに 6S-GlcNAc-PGA またはヘパリンの存在下で Fc タグのついた可溶性マウスセレクトイン組換えタンパクを加え、セレクトイ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。

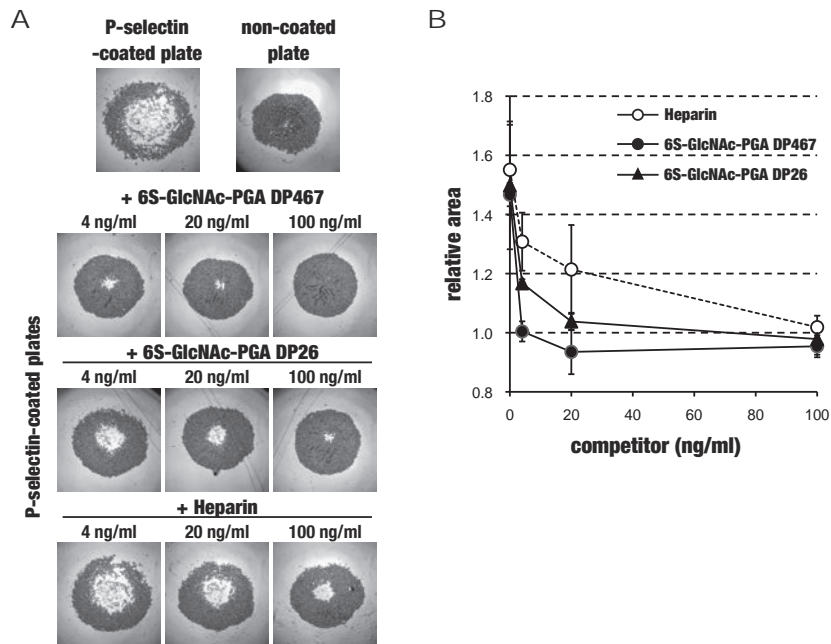


図 4. 癌細胞とセレクトインの結合に対する 6S-GlcNAc-PGA の阻害効果

(A) P-セレクトインを固相化した U 底プレートに 6S-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、 $400 \times g$ で 2 分間遠心した。陰性対照実験には P-セレクトインを固相化していない U 底プレートを用いた。(B) P-セレクトイ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。

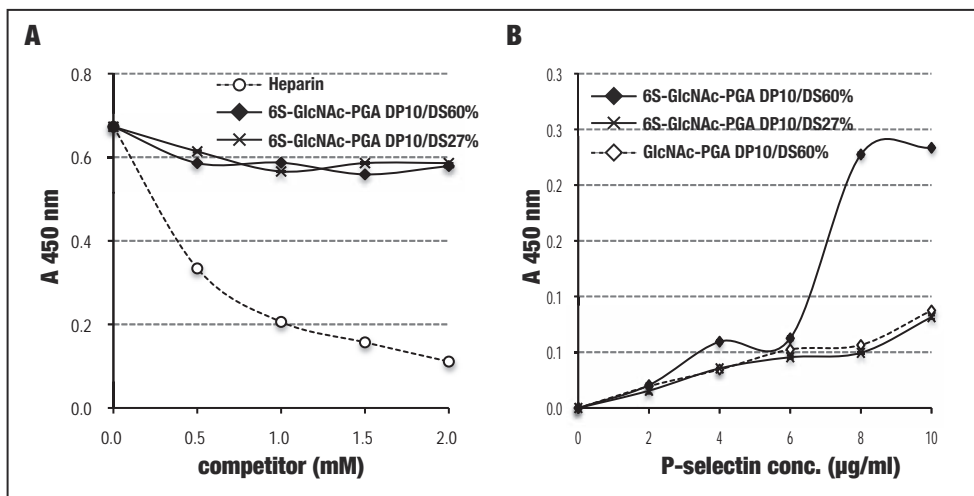


図 5. 6S-GlcNAc-PGA DP10 のセレクチンセレクチンに対する結合親和性

A. ヘパリンを固相化したプレートに 6S-GlcNAc-PGA DP10 またはヘパリンの存在下で Fc タグのついた可溶性マウス P-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。

B. 6S-GlcNAc-PGA DP10 を固相化したプレートに Fc タグのついた可溶性マウス P-セレクチン組換えタンパクを加え、セレクチンと固相化 6S-GlcNAc-PGA DP10 の結合を測定した。陰性対照には、硫酸基の結合していない GlcNAc-PGA DP10/DS60% を固相化した。