

令和元年6月18日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08601

研究課題名(和文) 抗腫瘍血管新生能を持つPECAMアンタゴニストの探索と解析

研究課題名(英文) Screening of PECAM antagonist having anti-tumor angiogenesis

研究代表者

北爪 しのぶ (Kitazume, Shinobu)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・客員研究員

研究者番号：80301753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：2,6-シアル酸を欠損したマウスにルイス肺癌細胞細胞を皮下移植し、その後の腫瘍増殖について調べた。その結果、KOマウスでは腫瘍増殖が野生型マウスと比べて明らかに減退していること、さらにKOマウスでは腫瘍内部の血管内皮細胞の多くがアポトーシスマーカーを発現しており、死にやすくなっていることも分かった。2,6-シアル酸が欠損すると2,6-シアル酸依存的なPECAM同志のホフィリックな相互作用が失われる結果、細胞表面にとどまらず、結果的にPECAM-VEGFR2-インテグリン複合体が異常なシグナルを伝えることで、血管内皮細胞が死にやすくなることが明らかになった(Oncogene 2018)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管内皮細胞における2,6-シアル酸は、新規の抗血管新生阻害剤標的となり得ることが本研究から明らかになりました。2,6-シアル酸欠損マウスは免疫系の軽微な異常が見られるため、阻害剤は免疫系の副作用をもたらす可能性があります。現在、2,6-シアル酸を模倣した低分子化合物のスクリーニング中であり、将来的にPECAMの相互的結合を阻害するような選択的化合物を得られれば、新たな抗血管新生阻害剤の候補になると期待できます。

研究成果の概要(英文)：We found that ST6Gal I KO mice, which lack α 2,6-sialic acid, exhibit retarded tumor growth due to impaired tumor angiogenesis. Actually ST6Gal I KO endothelial cells exhibited a reduction in the cell surface residency of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM). In this study, we found that in ST6Gal I KO cells, cell surface PECAM-VEGFR2 complexes were lost, and both VEGFR2 internalization and the VEGFR-dependent signaling pathway were enhanced. Second, enhanced anoikis was observed, suggesting that the absence of 2,6-sialic acid leads to dysregulated integrin signaling. Taken together, acid, leading to abnormal signal transduction, resulting in enhanced endothelial apoptosis. Endothelial 2,6-sialylation could be a novel target for antiangiogenesis therapy.

研究分野：生化学、糖鎖生物学

キーワード：腫瘍血管新生 シアル酸 PECAM インテグリン VEGFR2 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞は糖タンパク質やプロテオグリカン由来の糖鎖、いわゆる糖衣で覆われている。この糖衣は、感染防御や血管内皮細胞の恒常性の維持に重要であると考えられてきたが、具体的な役割は未解明の点が多い。血管内皮細胞に見られる糖衣の中でも、タンパク質中の N-結合型糖鎖に存在する 2,6-シアル酸は IL-6 などの炎症性サイトカイン刺激で発現が上昇することなどから、私達は 2,6-シアル酸が血管内皮細胞を防御する役割を持つのではないかと推測し、研究を行ってきた。このため、2,6-シアル酸形成を担うシアル酸転移酵素 ST6Gal I の欠損(KO)マウス、または KO マウス由来の血管内皮細胞を用いた解析を行ってきた。そして、血管内皮細胞に特異的な接着分子 PECAM(CD31)は 2-6 シアル酸が欠損すると PECAM 同志の相互作用が失われて細胞表面に停留できなくなっていることを見出した(S. Kitazume et al J. Biol. Chem. 285, 6515, (2010))。PECAM は血管においてメカノセンサーの働きをすることが知られており、血流刺激に応じて血管内細胞に生存シグナルを送っていることが分かっている。2,6-シアル酸が欠損した血管内皮細胞は PECAM 依存的なシグナル不全となっておりアポトーシス刺激に脆弱になっていた。さらにこの分子的背景として、PECAM が 2,6-シアル酸特異的に結合するレクチン活性を持つことをはじめて明らかにした(図 1、S. Kitazume et al. J. Biol. Chem. 289, 27606 (2014), S. Kitazume et al. Glycobiology 24, 1260(2014))。このことから、ST6Gal I KO マウスは腫瘍血管新生に異常が見られるのではないかと予測を持った。

2. 研究の目的

私達は最近、血管内皮細胞に特異的な接着分子 PECAM が 2,6-シアル酸特異的に結合するレクチン活性を持つこと、2-6 シアリル化糖鎖を添加すると PECAM 同志の相互作用が失われて細胞表面に停留できなくなり、PECAM 依存的な生存シグナルを細胞に伝達できなくなることを明らかにした(S. Kitazume et al J. Biol. Chem. 285, 6515, (2010)、S. Kitazume et al. J. Biol. Chem. 289, 27606 (2014))。これらの結果から、本研究では 2-6 シアリル化糖鎖が抗腫瘍血管新生阻害剤の標的となり得るかどうか明らかにするための基礎的知見を得ることを第一の目的とした。標的薬としての可能性が明らかになった場合、PECAM リガンドをミミックするような PECAM アンタゴニストとなる化合物を探索することを第 2 の研究目的とした。

3. 研究の方法

本研究で 2,6-シアル酸付加が腫瘍血管新生を促す分子メカニズムを明らかにするために、

- 1) 2,6-シアル酸欠損マウスにおいて腫瘍内血管形成が有意に減退しているか否か明らかにする。
- 2) 腫瘍血管新生における要となっている VEGF-VEGFR2 伝達経路に変化が起きているか否か確認する。
- 3) 2,6-シアル酸が PECAM を含むメカノセンサー複合体にどのような影響を与えているのか解析することである。

続いて、PECAM に結合する化合物を探索するために、理研ケミカルバイオロジー研究グループが保有する 3 万種類ほどの化合物が搭載されているアレイを用いてスクリーニングすることを計画した。

4. 研究成果

α 2,6-シアル酸を欠損したマウスにルイス肺癌細胞細胞を皮下移植し、その後の腫瘍増殖について調べた。その結果、KOマウスでは腫瘍増殖が野生型マウスと比べて明らかに減退していること、さらにKOマウスでは腫瘍内部の血管内皮細胞の多くがアポトーシスマーカーを発現しており、死にやすくなっていることも分かった。 α 2,6-シアル酸が欠損すると α 2,6-シアル酸依存的なPECAM同志のホフィリックな相互作用が失われる結果、細胞表面にとどまらず、結果的にPECAM-VEGFR2-インテグリン複合体が異常なシグナルを伝えることで、血管内皮細胞が死にやすくなることが明らかになった(Oncogene 2018)。

また、PECAM同志の相互作用をブロックする効果を持つ化合物を5種類ほど同定することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 24件) 全て査読あり

- (1) Nakayama K, Wakamatsu K, Fujii H, Shinzaki S, Takamatsu S, Kitazume S, Kamada Y, Takehara T, Taniguchi N, Miyoshi E. (2019) Core fucose is essential glycosylation for CD14-dependent Toll-like receptor 4 and Toll-like receptor 2 signaling in macrophages. *J Biochem.* 165, 227-237. doi: 10.1093/jb/mvy098.
- (2) Imamaki R, Ogawa K, Kizuka Y, Komi Y, Kojima S, Kotani N, Honke K, Honda T, Taniguchi N, and Kitazume S*. Imamaki R, Ogawa K, Kizuka Y, Komi Y, Kojima S, Kotani N, Honke K, Honda T, Taniguchi N, and Kitazume S. (2018) Glycosylation controls cooperative PECAM-VEGFR2- β 3 integrin functions at the endothelial surface for tumor angiogenesis. *Oncogene* 37, 4287-4299.
- (3) Matsubara N, Imamura A, Yonemiz Tu, Akatsu C, Yang H, Ueki A, Watanabe N, Abdu-Allah H, Numoto N, Takematsu H, Kitazume S, Tedder FT, Marth JD, Ito N, Ando H, Ishida H, Kiso M, and Tsubata T. CD22-binding synthetic sialosides regulate B lymphocyte proliferation through CD22 ligand-dependent and independent pathways, and enhances antibody production in mice. *Frontiers in Immunology* in press. (DOI : 10.3389/fimmu.2018.00820)
- (4) Ota F, Hirayama T, Kizuka Y, Yamaguchi Y, Fujinawa R, Nagata M; Ismanto HS, Lepenies, Aretz J, Rademacher C, Seeberger PH; Angata T, Kitazume S, Yoshida K, Betsuyaku T, Kida K Yamasaki S, and Taniguchi N. High affinity sugar ligands of C-type lectin receptor langerin. *BBA - General Subjects.* 1862, 1592-1601. (2017)
- (5) Iijima J, Kobayashi S, Kitazume S*, Kizuka Y, Fujinawa R, Korekane H, Shibata T, Saitoh S, Akashi-Takamura S, Miyake K, Miyoshi E, and Taniguchi N* (2017) Core fucose is critical for CD14-dependent Toll-like receptor 4 signaling. *Glycobiology* 27, 1006-1015.
*corresponding authors
- (6) Ota F, Kizuka Y, Nakano M, Yamaguchi Y, Kitazume S, Ookawara T and Taniguchi N (2017) Sialylation of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) enhances furin-mediated cleavage and secretion. *Glycobiology* 27, 1081-1088
- (7) Tsutsui A, Pradipta AR, Kitazume S, Taniguchi N, Tanaka K. (2017) Effect of spermine-derived AGEs on oxidative stress and polyamine metabolism. *Org Biomol Chem.* 15, 6720-6724.
- (8) Vong KKH, Tsubokura K, Nakao Y, Tanei T, Noguchi S, Kitazume S, Taniguchi N, Tanaka

- K. (2017) Cancer cell targeting driven by selective polyamine reactivity with glycine propargyl esters. *Chem Commun.* in press.
- (9) Sakuda K, Kizuka Y, Yamaguchi Y, Tanaka K, Ogiwara K, Segawa T, Hagiwara Y, Matsuo I, Ogawa H, Taniguchi N, and Kitazume S (2017) Reactivity of anti-HNK-1 antibodies to branched O-mannose glycans associated with demyelination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 487, 450-456.
- (10) Kitazume S. (2017) PECAM, *Encyclopedia in Signaling Molecules*, 2nd edition
- (11) Kizuka Y, Kitazume S, and Taniguchi N. (2017) N-glycan and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861, 2447-2454.
- (12) Kaburagi T, Kizuka Y, Kitazume S, and Taniguchi N*. Inhibitory Role of α 2,6-Sialylation in Adipogenesis. *J. Biol. Chem* (2017) 292, 2278-2286.
- (13) Akasaka-Manyu K, Kawamura M, Tsumoto H, Saito Y, Tachida Y, Kitazume S, Hatsuta H, Miura Y, Hisanaga S, Murayama S, Hashimoto Y, Manyu H, Endo T. (2017) Excess APP O-glycosylation by GalNAc-T6 decreases A β production. *J. Biochem.* 161, 99-111.
- (14) Ishii T, Angata T, Wan, ES, Cho MH, Motegi T, Gao C, Ohtsubo K, Kitazume S, Gemma A, Pare PD, Lomas DA, Silverman EK, Taniguchi N, and Kida K. (2017) Influence of Siglec9 polymorphism on COPD phenotypes including exacerbation frequency *Respirology*, 22, 684-690.
- (15) Gao C, Fujinawa R, Yoshida T, Ueno M, Ota F, Kizuka Y, Hirayama T, Korekane H, Kitazume S, Maeno T, Ohtsubo K, Yoshida K, Yamaguchi Y, Lepenies B, Aretz J, Rademacher C, Kabata H, Hegab AE, Seeberger PH, Betsuyaku T, Kida K, Taniguchi N. (2016) A keratan sulfate disaccharide prevents inflammation and the progression of emphysema in murine models. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 312, L268-L276.
- (16) Takamatsu M, Fukase K, Oka R, Kitazume S, Taniguchi N, and Tanaka K. (2016) A Reduction-Based Sensor for Acrolein Conjugates with the Inexpensive Nitrobenzene as an Alternative to Monoclonal Antibody *Sci Rep* 6, 35782.
- (17) Ishii T, Angata T, Wan E. S, Cho M. H, Motegi T Gao C, Ohtsubo K, Kitazume S, Gemma A, Pare P. D, Lomas D. A, Silverman E. K, Taniguchi N, and Kida K. (2016) Influence of SIGLEC9 polymorphisms on COPD phenotypes including exacerbation frequency *Respirology* 22, 684-690.
- (18) Ota F, Kizuka Y, Kitazume S, Adachi T, and Taniguchi N. (2016) N-Glycosylation is essential for secretion of extracellular superoxide dismutase *FEBS Letters* 590, 3357-3367.
- (19) Kizuka Y, Funayama S, Shogomor H, Nakano M, Nakajima K, Oka R, Kitazume S, Yamaguchi Y, Sano M, Korekane H, Hsu T-L, Lee H-Y, Wong C-H and Taniguchi N. (2016) Novel Fucose Analog for the High-sensitive Detection of Glycans. *Cell Chem. Biol.* 23, 782-92.
- (20) Taniguchi N, Kizuka Y, Takamatsu S, Miyoshi E, Gao C, Suzuki K, Kitazume S, Ohtsubo K. (2016) Glyco-redox, a link between oxidative stress and changes of glycans: Lessons

from research on glutathione, reactive oxygen and nitrogen species to glycobiology. Arch. Biochem. Biophys. 595, 72-80. doi: 10.1016/j.abb.2015.11.024.

- (21) Kizuka Y., Kitazume S., Taniguchi N. N-glycan and Alzheimer's disease. Biochim. Biophys. Acta., 1861(10), 2447-2454 (2017)
- (22) Ogura A, Tahara S, Nozaki K, Morimoto Y, Kizuka Y, Kitazume S., Hara M, Kojima S, Onoe H, Kurbangalieva A, Taniguchi N, Watanabe Y, and Tanaka K. (2016) Visualizing Trimming Dependence of Biodistribution and Kinetics with Homo- and Heterogeneous N-Glycoclusters on Fluorescent Albumin. Scientific Reports. 6, 21797. DOI: 10.1038/srep21797
- (23) Pradipta A. R, Taichi M, Nakase I, Saigitbatalova E, Kurbangalieva A, Kitazume S., Taniguchi N, and Tanaka K. (2016) Uncatalyzed Click Reaction between Phenyl Azides and Acrolein: 4-Formyl-1,2,3-Triazolines as “Clicked” Markers for Visualizations of Extracellular Acrolein Released from Oxidatively Stressed Cells. ACS Sensors. 1, 623–632.
- (24) Taniguchi N*, Takahashi M*, Kizuka Y, and Kitazume S. (2016) Glycation vs. Glycosylation: a tale of two different chemistries and biology in Alzheimer's disease. Glycoconjugate J. 33, 487-497.

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) Kitazume S., Endothelial glycan is an attractive therapeutic target, RIKEN International symposium Systems Glycobiology and Beyond, Nov.17, 2017 Wako, Japan
- (2) Kitazume S., How glycosylation affects amyloid beta production? Glyconeuro 1st, Sep 3rd, 2017, Seoul, Korea
- (3) 北爪しのぶ、アルツハイマー病態をコントロールする糖鎖修飾、2017年12月6日口頭発表、2017年12月6日、(神戸)
- (4) 北爪しのぶ、脳に沈着するA β にO型糖鎖が果たす役割、第36回日本糖質学会口頭発表、2017年7月19日(旭川)
- (5) Kitazume S., Endothelial O-GalNAc glycosylation pathway determines APP processing for vascular A β deposition, Shinobu Kitazume, AD/PD2016, Apr.1st, Vienna, Austria

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：グリオーマ検出用バイオマーカー

発明者：北爪しのぶ、作田香子、谷口直之、橋本康弘、本多たかし、斎藤清

権利者：理化学研究所、福島県立医科大学

種類：用途特許/医薬特許

番号：特願 2018-125216

出願年：2018/6/28

国内外の別：国内特許

取得状況(計 1 件)

名称：急性冠症候群のマーカー及びその利用

発明者：北爪しのぶ、義久精臣、八巻尚洋、竹石恭知、橋本康弘、谷口直之、今牧理恵、
山本正雅、清藤 勉
権利者：理化学研究所、
種類：用途特許/医薬特許
番号：特許番号 6093943
取得年：2017/2/24
国内外の別： 国内特許

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者 なし
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。