

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 27 日現在

機関番号：32413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590209

研究課題名(和文) Mタンパク糖鎖をターゲットとした多発性骨髄腫のバイオマーカー開発

研究課題名(英文) M-protein binding oligosaccharides as a candidate of biomarker for multiple myeloma

## 研究代表者

飯島 史朗 (IIJIMA, Shiro)

文京学院大学・保健医療技術学部・教授

研究者番号：30222798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫(MM)の新たな診断・治療マーカーとして患者血清中MタンパクのL鎖結合糖鎖が応用できるかを検討した。骨病変を有する患者血清由来のL鎖結合糖鎖はCon Aレクチンとの反応性が高かった。また、株化細胞ではL鎖結合糖鎖と細胞表面糖鎖のレクチン反応性は相関し、腫瘍の転移に関与する糖転移酵素GnT-Vが発現していた。MM細胞株の表面ではIL-6濃度依存的にシアル酸結合糖鎖が増加し、MMの増悪との関連を見出し、同様の変化はL鎖結合糖鎖でも見られた。以上より、MタンパクL鎖結合糖鎖が細胞表面糖鎖を反映する可能性を見出し、L鎖結合糖鎖がMMの病態を反映した新たなバイオマーカーとなる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：To develop a new biomarker for multiple myeloma (MM), the reactivity of L chain-binding oligosaccharides was determined using serum sample and MM cell lines. L chain-binding oligosaccharides derived from MM patients with complication showed high reactivity with Con A lectin. In MM cell lines, lectin reactivity of L chain-binding oligosaccharides was correlated with that of sugar chain on the cell surface, and sugar transferase GnT-V that is involved in tumor metastasis was expressed in the cell lines. Further, IL-6-dependent expression of sialic acid-binding oligosaccharide on cell surface was observed. These results suggested that L chain-binding oligosaccharides reflects sugar chain on MM cell surface, and can be a candidate as biomarker of MM pathological condition.

研究分野：病態生化学

キーワード：多発性骨髄腫 Mタンパク 糖鎖

### 1. 研究開始当初の背景

近年、多発性骨髄腫は、造血器幹細胞移植に加えサリドマイドおよびその誘導体であるボルテゾミブなどの薬剤が有効であるとの報告がなされ、一定の治療成果をあげているものの再発例が多く、いまだ予後不良の疾患である。また、多様な合併症を引き起こし、その中でも骨融解病変は、患者のQOLを著しく低下させ、薬剤耐性獲得、再発も多く、これらに関する新たなバイオマーカーや、新たな治療法の開発が望まれている。

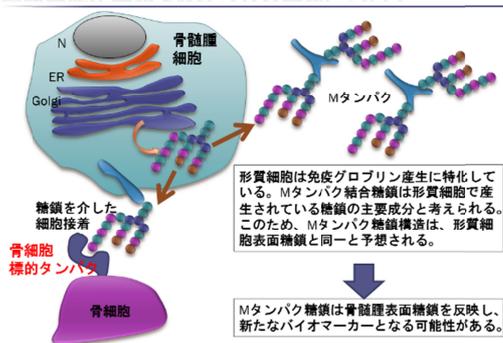
タンパク質に結合した糖鎖の異常は、腫瘍細胞の転移に深くかかわっており、臨床応用されている腫瘍マーカーの多くは、糖タンパク質糖鎖の異常を捉えている。しかし、多発性骨髄腫に関する糖鎖研究は、これまでほとんど行われておらず、未解明の領域である。多発性骨髄腫に関連するタンパク質のうち、タンパク質結合糖鎖に関する研究が進んでいるものとして免疫グロブリンがあげられるが、リウマチにおけるH鎖中のN-結合型糖鎖に関するもののみ

である。

これまでに我々は、Mタンパクの糖鎖構造に着目し、約20例の多発性骨髄腫患者のMタンパク糖鎖についてレクチン等を用いて解析し、糖鎖の存在を明らかとした。さらに、この糖鎖構造と合併症の関連について検討した結果、骨融解病変との関連を見出している。

細胞内での糖鎖合成は、主にゴルジ体で各種糖転移酵素により行われている。形質細胞は、免疫グロブリン産生に特化した細胞であり、産生されるタンパク質のほとんどが免疫グロブリンである。このため、骨髄腫細胞ゴルジ体での糖鎖転移酵素の局在も、これに特化していることが予想される。このため、Mタンパク糖鎖が骨髄腫細胞表面の糖鎖を表現している可能性が十分にあり、細胞接着を中心とした多発性骨髄腫の病態解析に有用な指標が得られると期待される。

#### 骨髄腫産生糖鎖とMタンパク糖鎖について



単クローン性ガンマグロブリン血症 (MGUS) はMタンパクが検出されるものの多発性骨髄腫の診断基準を満たさない疾患であり、MGUS患者のうち10年程度の経過のうちに多発性骨髄腫に移行する場合がある。本研究のさらなる意義として、MGUS患者のMタンパク糖鎖構造解析により病態の予後予測が可能となり、多発性骨髄腫の早期治療が可能となる点がある。また、ボルテゾミブなどの新規薬剤が多発性骨髄腫の

世界的な標準治療薬として認識され始めており、多発性骨髄腫に対する新規治療薬の有効性の評価が可能となる点も意義の一つである。さらに、新規治療薬等で治療を受けた患者のうち、再発・疾病の進行に合わせてMタンパク糖鎖分析を行うことにより、薬剤耐性獲得機序の解明へ研究が発展することも期待できる。

多発性骨髄腫では、合併症として骨融解病変が約70%の患者でみられ、この発症メカニズムとして骨髄腫細胞等に発現しているRANK, IL-6, MIP, VEGF, EGFなどの因子の関与が明らかとなっている。これらの因子またはその受容体は糖タンパク質であり、多発性骨髄腫における骨融解病変に関しても糖鎖が関与していることが強く示唆される。このため本研究は骨融解病変のメカニズム解明に大きく寄与できる。

以上のごとく、多発性骨髄腫に関するタンパク質や関連因子の糖鎖研究はこれまで行われていなかった領域である。さらに、本研究では、これまで行われてきたMタンパクの“量”を評価するものではなく、糖鎖付加によるMタンパクの機能および作用の増強や減弱をターゲットとしたMタンパクの“質”を評価するものであり、新たなアプローチである。これらのことより、本研究は、多発性骨髄腫患者の診断・治療に大きな進展をもたらすことが期待できる。

### 2. 研究の目的

(1)多発性骨髄腫患者の診断・治療に寄与する新たなバイオマーカー開発のため、関連が予想される骨融解病変を中心に、貧血、腎障害、髄外腫瘤形成、新規治療薬の反応性とMタンパク糖鎖と骨髄腫細胞表面タンパク糖鎖の関連を明らかにする。

(2)骨髄腫細胞において産生されるタンパクの糖鎖合成に関する糖転移酵素の発現を中心に解析し、病態により糖鎖構造が変化するメカニズムを明らかとし、診断法の意義を確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1)試料

試料には多発性骨髄腫患者血清32例を用いた。株化細胞は、ヒト骨髄腫細胞4株(KMM-1, RPMI 8226, IM9, KMS12)およびHL60を用いた。

#### (2)レクチン

糖鎖構造を解析するため、ABA, DBA, ECA, PHA-E4, PHA-L4, SBA, HAA, BPA, TL, Con A, LCA, AAL, Lotus, UEA-I, AAA, DSA, WGA, GS-II, LEA, MAM, SSAの22種類のレクチンを使用した。

#### (3)細胞培養

細胞培養は10%牛胎児血清および1% Penicillin / Streptomycinを含むRPMI-1640培地と無血清培地 (ASF 104N) を用い、37℃、6% CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。

#### (4)Lectin blot

SDS-PAGE後のゲルをWestern blot法と同様の方法でPVDF膜へ転写後、糖を含まないブロッキング液を用いてブロッキングした。レクチン

ンは、HRP 標識または Biotin 標識された計 22 種類のレクチンを使用し、ジアミノベンジンまたは化学発光を用いて検出した。

#### (5) 蛍光染色法

骨髄腫細胞を DPBS で洗浄後、ポリリジンコーティングされたスライドグラスに載せ、放置後、2% Paraformaldehyde で固定した。ブロッキングは 1% HSA を用いて行った。レクチンは FITC 標識された、ABA, ECA, PHA-E4, PHA-L4, SBA, BPA, ConA, LCA, AAL, Lotus, DSA, LEA, MAM, SSA レクチンの計 14 種類を用いた。また、FITC 標識レクチン反応前に 0.5% Triton X-100 で処理したものと合わせて観察した。

#### (6) 画像解析

M タンパク L 鎖結合糖鎖の定量は、Image J を用い、25 kDa のバンドの定量を行った。この際、CBB 染色も同時に行い、タンパク量の補正を行った。

#### (7) 細胞からのタンパク質抽出

骨髄腫細胞  $5 \times 10^6$  個を PBS で 2 回洗浄後、RIPA buffer 10mL にプロテアーゼ阻害剤を加えタンパクを抽出した。

#### (8) 質量分析法による糖鎖構造解析

CBB 染色後のゲルより、M タンパク L 鎖バンドを切り出しトリプシン消化した。トリプシンを失活後、PNGFase で N-結合型糖鎖を遊離させた。遊離した糖鎖は標識し、MALDI-TOF/MS 分析した。得られた質量を用いて、functional glycomics gateway を用いて質量より糖鎖構造を推定した。

### 4. 研究成果

多発性骨髄腫で産生される M タンパクの L 鎖には、健常人の免疫グロブリン L 鎖にはみられない糖鎖が結合している。この M タンパク結合糖鎖に着目して骨病変などの合併症との関連を明らかにし、多発性骨髄腫の合併症の予測を可能とする新たな診断・治療マーカーの開発を目的とし研究を遂行した。

#### (1) M タンパク L 鎖結合糖鎖の解析

M タンパク L 鎖結合糖鎖の構造

M タンパクの L 鎖結合糖鎖の基本構造は、32 例の患者血清を SDS-PAGE 法で分離後、22 種のレクチンを用いた Lectin blot 法により解析した。その結果、多くは高マンノース型糖鎖が結合しており、この他に混成型を結合したものと少数存在した。また、レクチンとの反応がほとんど見られない症例が 2 例存在した。

糖鎖と病態との関連検索

M タンパク結合糖鎖と病態との関連を解析するため、多発性骨髄腫患者 32 例の血清試料について、抗 L 鎖抗体を結合したカラムで M タンパクを精製した。M タンパクを SDS-PAGE により分離した後、レクチンプロットにて 22 種類のレクチンと反応させ、合併症(再発、骨融解病変、髄外形質細胞腫瘍、貧血、腎障害)との関連について統計解析した。その結果、骨融解病変を有する患者由来の M タンパク L 鎖結合糖鎖は、マンノースを特異的に認識する Con A レクチン

および N-アセチルグルコサミンを特異的に認識する BPA レクチンとの反応性が高いことが明らかとなった。このことから、骨融解病変とマンノースおよび N-アセチルグルコサミンとの関連が示唆された。一方、再発、骨融解病変、髄外形質細胞腫瘍、貧血、腎障害と関連するレクチンは認められなかった。

M タンパク糖鎖の結合位置の決定

M タンパク精製品をトリプシン消化し、トリプシン SDS-PAGE により糖鎖結合ペプチドを分離した。このペプチドについて MALDI-TOF/MS を用いて糖鎖結合位置を検討した。その結果、 $\kappa$  鎖のアミノ酸配列の 42~75 と 100~106 の間に糖鎖が付加していた。

M タンパク結合糖鎖構造の解析

病態との関連が認められた糖鎖の構造を明らかにするため、多発性骨髄腫患者由来の株化細胞、および、多発性骨髄腫患者血清を用いて M タンパクから L 鎖を精製後、MALDI-TOF/MS 分析により糖鎖の質量を求めた。この糖鎖質量をもとにデータベースを検索し、レクチンとの反応性も合わせて糖鎖構造を推定した。その結果、骨融解病変を有する患者 3 例で共通に得られた  $m/z$  2322、 $m/z$  2267 のピークは、データベースに登録されているヒトで発現する糖鎖構造と一致した。これらの糖鎖構造は、骨融解病変を有さない患者血清からは検出されなかった。骨融解病変を有する患者血清から、マンノースが多く発現している共通の L 鎖結合糖鎖構造が示唆された。

#### (2) M タンパク L 鎖糖鎖測定法の開発

本研究を臨床応用するため、この M タンパク L 鎖結合糖鎖の迅速な分析法としてレクチンと抗 L 鎖抗体を用いた ELISA 法を開発した。

#### (3) 細胞表面糖鎖と M タンパク糖鎖の比較

細胞培養条件の検討

M タンパク糖鎖と骨髄腫細胞株表面糖鎖の関連を解析する際に、細胞培養で用いる培地に含まれる FBS 中の免疫グロブリン L 鎖中の糖鎖が、細胞が分泌する M タンパク糖鎖分析に一部影響した。このため、細胞培養には無血清培地を選択し、その培養条件について細胞表面糖鎖を指標に検討を行った。その結果、細胞の増殖速度は血清を含む培地の方が早いものの、KMM-1、RPI-8226 細胞膜表面に発現する糖鎖パターンに差は見られなかった。

細胞表面と M タンパク糖鎖の比較

検討した条件を用いて培養した各細胞株より分泌される M タンパク L 鎖において、結合している糖鎖と反応したレクチンは、KMM-1 細胞で、SSA, ECA, GS-II, BPA, SBA, WGA, UEA-I レクチンであり、RPI-8226 細胞では SSA, GS-II, ABA, LEA, SBA, MAM, AAL, TL, Con A レクチンであった。また、各細胞表面に発現している糖鎖も検討した結果、同じレクチンとの反応が認められた。以上の結果より、細胞接着に關与する細胞表面糖鎖を M タンパク L 鎖糖鎖が反映していることを明らかとした。

#### (4) 多発性骨髄腫の病態と糖鎖構造変化

これまで明らかとなった糖鎖が MM の増悪に

伴って変化するが、多発性骨髄腫の増悪因子である IL-6 で骨髄腫細胞株を刺激し細胞表面糖鎖および L 鎖結合糖鎖の変化について解析を行った。IL-6 を 1, 10, 100 ng/mL となるように培地に添加し、 $1 \times 10^6$  個の KMM-1 および RPMI 8226 細胞を培養した。IL-6 刺激後、2 日目と 4 日目に培養上清と細胞をそれぞれ回収し、細胞は蛍光染色法を行った。使用した FITC 標識レクチンは、Con A, ECA, DSA, SSA を用い、培養上清中の M タンパクは、Lectin blot 法で解析した。その結果、細胞表面においては IL-6 濃度依存的に SSA レクチンとの反応性が增強したことから、細胞表面にシアル酸結合糖鎖が増加し、腫瘍の増悪と細胞表面糖鎖の関連を見出した。この変化を L 鎖結合糖鎖で検出できるか解析した結果、細胞表面と同様の変化が認められ、すなわち細胞表面糖鎖の変化が L 鎖結合糖鎖に反映した。

#### (4)糖転移酵素の解析

本研究で明らかとした糖鎖を合成する糖転移酵素発現を解析し、これらの糖鎖が生成するメカニズムを明らかとするため、レクチンとの反応より推定した糖鎖の合成に関与する糖転移酵素について、骨髄腫関連細胞株である KMM-1, RPMI 8226, IM9, KMS12 および HL60 で検討した。その結果、用いた全ての骨髄腫細胞株で GnT-V, GnT-IV の発現を認めた。一方、FuT-VIII と MaT-IV の発現は対照細胞も含め全ての細胞で認められなかった。これより、骨髄腫細胞の転移性獲得には他の腫瘍細胞と同様に GnT-V が関与することを明らかにした。

以上の結果より、細胞接着に関与する細胞表面糖鎖を M タンパク L 鎖糖鎖が反映していることを解明し、M タンパク L 鎖糖鎖分析は、新たな多発性骨髄腫のバイオマーカーとなる可能性を示した。

## 5. 主な発表論文等

(学会発表) (計 3 件)

飯島史朗, 松下麻衣子, 服部豊. M タンパク L 鎖に結合した糖鎖構造に基づく多発性骨髄腫の病態解析. 第 64 回日本電気泳動学会総会, 仙台, 総会抄録号 p23, 2013

荒木勇磨, 飯島史朗, 中山亜紀, 木明琢磨, 荒井勇輝, 御園生圭太. M タンパク糖鎖および骨髄腫細胞表面糖鎖による多発性骨髄腫の病態解析. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会 博多市, 補冊 p264, 2014.

飯島史朗, 荒木勇磨, 増川陽大, 相馬愛美, 小山深友, 中山亜紀. M 蛋白糖鎖および骨髄腫細胞表面に糖鎖による多発性骨髄腫の病態解析. 日本薬学会第 135 年会神戸, DVD 26BP-am194, 2015.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

飯島 史朗 (IIJIMA Shiro)

文京学院大学・保健医療技術学部・教授

研究者番号: 30222798

### (2)連携研究者

服部 豊 (HATTORI Yutaka)

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号: 20189575