

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 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：2013～2015

課題番号：25430122

研究課題名(和文)腫瘍血管新生にシアル酸修飾が果たす役割の解析

研究課題名(英文)A role of sialic acid for 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・疾患糖鎖研究チーム・副チームリーダー

研究者番号：80301753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、N型糖鎖の末端に付加している 2,6シアル酸を欠損したマウスでは腫瘍内血管新生が著しく減退している現象の分子機構を明らかにするための研究を行った。まず、2,6-シアリル化糖鎖をクラスター化させたプローブに特異的に接着分子PECAMが結合することを明らかにし、予想通りPECAMのレクチン活性を示すことが出来た。また、2,6シアル酸欠損下で細胞表面の膜タンパク質の局在が異なっていること、VEGFに対する反応性が異なることなどを明らかにした。まずマウス肺からPECAMを精製して糖鎖解析を行ったところ、PECAM自身に 2,6-シアル酸を持つN形糖鎖を持つことも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We expected that platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) would possess lectin-like activity toward 2,6-sialic acid to ensure its homophilic interaction. We found that a longer 2,6-sialylated oligosaccharide exhibited strong inhibitory activity against homophilic PECAM interaction in vitro. Furthermore, we found that a cluster-type 2,6-sialyl N-glycan probe specifically bound to PECAM-immobilized beads. Moreover, addition of the 2,6-sialylated oligosaccharide to endothelial cells enhanced the internalization of PECAM as well as the sensitivity to apoptotic stimuli. Collectively, these findings suggest that PECAM is a sialic acid-binding lectin and that this binding property supports endothelial cell survival. Notably, our findings that 2,6-sialylated glycans influenced the susceptibility to endothelial cell apoptosis shed light on the possibility of using a glycan-based method to modulate angiogenesis.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：血管内皮細胞 細胞接着 PECAM シアル酸 レクチン アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

癌が大きく成長するためには、栄養や酸素を運ぶ血管を増やしていく必要がある。そのため癌細胞は血管内皮細胞増殖因子(VEGF)などの血管新生因子を分泌して増殖を促している。癌を兵糧攻めにするための血管新生阻害剤は大腸癌などの抗癌治療薬として現在患者に用いられているが、最近の動物モデル実験では、がんの原発巣の増殖は抑制しても転移が逆に促進するといったデータも報告され、阻害剤の持つ問題点などが浮き彫りになってきている。このような観点から、腫瘍血管新生に対する基礎的な理解を深めることが重要であると考えられている。

脂質やタンパク質に結合して細胞表面を覆っている糖鎖は、発生や分化、免疫現象の際の細胞認識に重要な役割を果たすことが次第に明らかになっている。血管内皮細胞は糖衣で覆われていることが電子顕微鏡観察からも明らかにされているが、この糖鎖が血管新生で果たす役割は不明の点が多い。本申請者は、糖タンパク質糖鎖の末端に結合してタンパク質の機能を調節することが知られているシアル酸に着目して長年研究を行ってきた (S. Kitazume *et al.* **Proc. Natl. Acad. Sci.** (2001) **98**, 3650, S. Kitazume *et al.* **J. Biol. Chem.** (2003) **278**, 14865, S. Kitazume *et al.* **J. Biol. Chem.** (2005) **280**, 8589)。そして最近では、血管内皮細胞を用いた研究をすすめてきた (S. Kitazume *et al.* **J. Biol. Chem.** (2010) **285**, 40097) (featured by Research Highlight in Functional Glycomics Gateway)。糖タンパク質のアスパラギン結合型(N型)糖鎖の末端に位置する α 2,6-シアル酸が血管内皮細胞に高発現していることに着目し、 α 2,6-シアル酸の付加に関わる転移酵素、ST6Gal Iを欠損したマウスと野生型マウスを比較解析した結果、ST6Gal Iノックアウトマウスでは、血管内

皮細胞上の主要な接着分子である PECAM(platelet endothelial cell adhesion molecule)の細胞表面の発現が失われているため、SHP2などの脱リン酸化酵素が PECAM近傍にリクルートされず、PECAM依存的な生存シグナルが弱まり、血管内皮細胞のアポトーシスが昂進していることを明らかにした。S. Kitazume *et al.* **J. Biol. Chem.** (2010) **285**, 6515 (featured by Research Highlight in Functional Glycomics Gateway)。このような結果を鑑みると、 α 2,6-シアル酸欠損下では血管新生に異常が見られることが予想される。 α 2,6-シアル酸欠損マウスは正常に発育することから生理的血管新生に障害はない。そのため、 α 2,6-シアル酸は腫瘍血管新生に影響を与えるのではないかと予想して解析を行った結果、 α 2,6-シアル酸欠損マウス内の腫瘍サイズはコントロールマウスのものに比べて小さく、腫瘍内の血管新生が大きく減退しているという予備的な実験結果を得た。

2. 研究の目的

本研究で α 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、

- i) α 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。
- ii) 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。
- iii) α 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。

3. 研究の方法

- 1) α 2,6-シアル酸欠損マウスにおける腫瘍内血管形成
- 2) α 2,6-シアル酸が VEGF-VEGFR2 伝

達経路に与える影響の解析

3) α 2,6-シアル酸依存的なメカノセンサー複合体の解析

4. 研究成果

本申請者らは最近、N型糖鎖の末端に付加している α 2,6 シアル酸を欠損したマウス (ST6Gal I ノックアウトマウス) では腫瘍内血管新生がコントロールマウスに比べて著しく減退していることを見出した。この結果を受けて、本研究課題「腫瘍血管新生にシアル酸修飾が果たす役割の解析」では、血管内皮細胞の α 2,6-シアル酸修飾が腫瘍内血管形成にどのような影響を与えるのか、血管内皮細胞の増殖や増殖因子に対する反応性にどのような影響を与えるか明らかにし、その変化の背景にある分子メカニズムの詳細を明らかにすることを目的として、研究を行っている。

平成26年度は、 α 2,6 シアル酸欠損下で細胞表面にとどまらずに生存シグナルを送ることの出来なくなった接着分子 PECAM の性状解析を行った。まずマウス肺から PECAM を精製して糖鎖解析を行ったところ、PECAM 自身に α 2,6-シアル酸を持つ N-型糖鎖が多く見出された。また、構造的にはレクチン分子であるシグレックとホモロジーが高いことから、PECAM は α 2,6-シアル酸を持つ糖鎖に結合するレクチン活性があるのでないか、と予想した。糖鎖をクラスター化させたプローブを用いた結果、 α 2,6-シアル酸を持つクラスタープローブに特異的に PECAM が結合することを明らかにし、予想通り PECAM のレクチン活性を示すことが出来た (S. Kitazume *et al.* **J. Biol. Chem.** (2014) 289, 27606、S. Kitazume *et al.* **Glycobiology** (2014) 24, 1260)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. **S. Kitazume***, R. Imamaki, A. Kurimoto, K. Ogawa, M. Kato, Y. Yamaguchi, K. Tanaka, H. Ishida, H. Ando, M. Kiso, N. Hashii, N. Kawasaki, and N. Taniguchi (2014) Interaction of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) with α 2,6-sialylated glycan regulates its cell surface residency and anti-apoptotic role. **J. Biol. Chem.** 289, 27606-27613.
*corresponding author. 査読あり
2. **S. Kitazume***, R. Imamaki, K. Ogawa, and N. Taniguchi* (2014) Sweet role of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) in understanding angiogenesis. **Glycobiology** 24, 1260-1264.
*corresponding authors. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

1. **S. Kitazume**, Interaction of PECAM with α 2,6-sialylated glycan regulates its cell surface residency and anti-apoptotic role, RIKEN – Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology (3rd Annual Symposium) 23 May, 2014 Kreuth, Germany

[図書] (計 1 件)

1. **S. Kitazume** (2014) ST6Gal-I. *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes. 2nd Edition.* Springer 社 693-703.

〔その他〕

ホームページ等

がん研究分野の特性などを踏まえた支援活動

<http://ganshien.umin.jp/research/spotlight/kitadume/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

国立研究開発法人理化学研究所・

疾患糖鎖研究チーム・副チームリーダー

北爪しのぶ

Shinobu Kitazume

研究者番号：80301753