

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ~ 2008
 課題番号：19790398
 研究課題名 (和文) 血清中シアリルルイス X の合成制御機構および生体内免疫応答への関与
 研究課題名 (英文) biosynthesis regulation of sialyl lewis X in sera and its participation in immune response
 研究代表者
 梶 孝慈 (HIGAI KOJI)
 東邦大学・薬学部・講師
 研究者番号：70297711

研究成果の概要：

初めに、sLeX 合成関連糖転移酵素群の *FUT VI* の遺伝子発現制御機構を転写レベルで解析し、転写開始点および HNF-4 α が *FUT VI* の発現に重要であることを明らかにした。つぎに、sLeX の生体内免疫応答への関与を、NK 細胞上の CD94 および NKG2D に着目し、その糖鎖リガンドを明らかにした。

本研究により、NK 細胞上の CD94 および NKG2D が sLeX 様の糖鎖を認識し、がん細胞の増殖を抑制することが考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床化学

1. 研究開始当初の背景

炎症は、炎症部位への白血球の遊走には、白血球上の Sialyl Lewis X (sLeX : Neu α 2-3(Fuc α 1-3)Gal β 1-4GlcNAc) と血管内皮細胞上の sLeX 結合レクチンである E-セレクトインとの接着が重要であることが知られている。sLeX は白血球のみならず、癌細胞の分泌するムチンや細胞膜上などにも発現し、癌の転移や免疫系からの防御に関与すると考えられている。また、血清タンパク

質にも sLeX が発現しており、炎症や癌などの病態により量的・質的に変化することから、私は、血清中 sLeX に注目し、その合成機構と構造変化などを明らかにすべく研究を行ってきた。

糖鎖である sLeX は、糖転移酵素により合成されるが、従来その発現制御機構については明らかにされていなかった。そこで、ST3Gal VI および ST6Gal I について転写制御を明らかにした。

さらに、さまざまな病態下において、血清

タンパク質などの分泌タンパク質上に sLeX が発現し、さらに糖鎖構造も変化することを明らかにしてきた。

病態下においてこれら糖タンパク質上 sLeX 発現の変化が、どのような生体応答を引き起こすのかは重要な課題である。その可能性の一つとして、Immunosuppressive acidic protein(IAP)による NK 細胞の活性抑制が考えられる。IAP は癌悪液質患者血清中で増加する免疫抑制物質として同定され、タンパク質の抗原性では AGP と区別できないが、分子量、等電点、特に糖鎖含量や単糖組成が異なると報告されている。健康人血清中の AGP には NK 細胞の細胞傷害抑制がほとんど見られないことから、AGP 上の糖鎖を介して NK 細胞に抑制シグナルを送っているものと考えられる。しかし、IAP の詳細な糖鎖構造やレセプターはいまだ明らかとなっていない。そこで私は、sLeX の生体内における役割を明らかにするため、NK 細胞について注目した。NK 細胞は、癌細胞を異物として認識し排除する細胞であるが、近年糖鎖を認識するレクチンレセプターの発現が報告されている。そこで、NK 細胞の細胞傷害性に及ぼす sLeX の影響を検討した結果、NK 細胞は、sLeX 高発現細胞を強く認識し、その傷害性は sLeX を発現した分泌タンパク質で抑制された。また、NK 細胞上の sLeX 認識タンパクの解析を行った結果、CD94 や NKG2D などの KLRs (Killer lectin receptors) と呼ばれるレクチン様ドメインを持つ NK 受容体の関与することを明らかにした。

しかしながら、血清 sLeX の合成を主に行う肝臓における、hST3Gal IV や FUT VI といった sLeX 合成関連糖転移酵素群の発現メカニズムや制御機構については、明らかにされておらず、不明な点が多い。また、血清中 sLeX の機能として、NK 細胞による細胞傷害活性抑制が見出されているが、NK 細胞上のどのような分子に結合して NK 活性を抑制するのかは、明らかとなっていない。

そこで、sLeX を高発現している肝癌細胞株 HepG2 細胞の sLeX 生合成メカニズムおよび糖転移酵素遺伝子発現制御機構を明らかにすることで、肝細胞における糖鎖合成の制御機構を明らかにする。また、IL-1 β による FUT VI mRNA 発現調節機構を、転写調節と mRNA 安定化の二つの方向から解析する。また、現在、ヒト肝臓において、IL-6 や TNF- α による糖鎖合成の変化は明らかにされていない。そこで、他の肝細胞 (HuH-6/Cl5, HLE, HLF, Li-7) の IL-6 や TNF- α による応答を、転写活性化を指標としてレポータージーンアッセイにて、構築し、糖鎖合成制御や糖転移酵素発現変化を解析する。

さらに、生体内免疫応答への関与を NK 細

胞上の KLRs(CD94,NKG2D など)に着目して、KLRs と糖鎖の結合やその基質特異性などを明らかにする。

これらの研究と、病態における血清中 sLeX の生合成機構、発現調節機構、キャリア分子、糖鎖構造の変化および生体内における役割といった、今までに明らかにしてきた知見などがから、血清中 sLeX の病態生化学的な意義が明らかになることが期待される。また、sLeX を認識する NKR の糖鎖結合特性を解析することにより、NK 細胞の細胞傷害活性を修飾する糖鎖候補をスクリーニングでき、癌の免疫賦活化療法だけでなく、炎症の制御、自己免疫疾患の制御、感染症の制御など広範な臨床応用に対する新しい戦略の構築が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、血清中 sLeX に注目し、その病態下での制御機構と、生体内における役割を明らかにすることを目的とする。

sLeX を高発現している肝癌細胞株 HepG2 細胞の sLeX 生合成メカニズムおよび糖転移酵素遺伝子発現制御機構をレポータージーンアッセイなどにより明らかにすることで、肝細胞における糖鎖合成の制御機構を明らかにする。また、炎症性サイトカインによる FUT VI mRNA 発現調節機構を、転写調節と mRNA 安定化の二つの方向から解析する。また、他の肝細胞 (HuH-6/Cl5, HLE, HLF, Li-7) の IL-6 や TNF- α による応答モデルを、C/EBP の転写活性化を指標としてレポータージーンアッセイにて構築し、糖鎖合成制御や糖転移酵素発現変化を解析する。

そして、血清中 sLeX の自然免疫における役割を明らかにするため、その NK 細胞上リガンドを同定する。CD94 や NKG2D などの KLRs のレクチンドメインとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)の融合タンパク質を大腸菌に発現させ、精製後、EIA 法により糖鎖との結合アッセイを行う。また sLeX などの Lewis 型糖鎖 N 結合型糖鎖および糖鎖改変糖タンパク質などを用いて糖鎖結合特性を解析する。

3. 研究の方法

(1) HepG2 細胞中 Fucosyltransferase VI の発現調節機構の解析

以前の研究により、肝癌細胞株 HuH-7 および IL-1 β を用いた炎症モデルにおける分泌型 sLeX の発現は、sLeX 合成に関与する sialyltransferase IV (hST3Gal IV) および fucosyltransferase VI(FUT VI)の発現上昇によることを見出されている。そこで、sLeX を細胞膜上や分泌タンパク質上に高発現している肝癌細胞株 HepG2 細胞を用いて、

hST3Gal IV および FUT VI の遺伝子発現制御機構を転写レベルで解析した。

はじめに、HepG2 由来 mRNA について FUTVI の mRNA の 5'非翻訳領域に DNA 合成プローブを作成し、5'-RACE 法により hST3Gal IV および FUT VI 転写開始点を同定した。同定された転写開始点から上流-2000bp までを HepG2 細胞由来 genomic DNA よりクローニングし、ルシフェラーゼアッセイを行った。同時に、その転写因子のコンセンサスシーケンスに mutation を入れた mutant construct を作製し、その転写活性の変化および同定した転写因子の発現ベクターを作製し、同じ肝癌細胞株であるが sLeX を発現していない HuH-7 細胞にトランスフェクションすることにより、FUT VI mRNA 発現を RT-PCR や real-time PCR で解析した。

(2) 肝癌細胞株 HuH-7 および IL-1 β を用いた炎症モデルにおける FUT VI の発現上昇機構の解析

炎症誘発性サイトカインである IL-1 β による FUT VI mRNA 発現調節機構を、転写調節と mRNA 安定化の二つの方向から解析する。FUT VI の 5' deletion construct を流用し、IL-1 β での転写活性の増加が認められるかをレポータージーンアッセイで解析した。また、mRNA の安定性の増加が引き起こされている可能性を考え、転写阻害剤存在下、Fucosyltransferase VI mRNA の半減期を real-time PCR にて測定した。

(3) 肝癌細胞株 (HuH-6/C15, HLF, HLE, Li-7) および IL-6、TNF- α を用いた炎症モデルの構築と、糖鎖合成制御機構の解析

IL-6 や TNF- α などのサイトカインに応答する肝癌細胞株を探索し、単独および併用刺激による糖転移酵素発現変化、sLeX 発現およびその制御機構を解析した。

また、サイトカイン刺激による糖転移酵素発現変化は、直接作用による早期応答と二次的な遅延応答が予想されるので、時間経過とともに遺伝子発現量を解析した。

(4) リコンビナント KLRs の作製と rKLRs の各種糖鎖との結合性の解析

NK 細胞株由来 KHYG 細胞の cDNA から、活性化受容体である NKG2D, および抑制性受容体である CD94 のレクチンドメインを PCR でクローニングし、pGEX4-T1 ベクターに組み込み、ampicillin によるセレクションから、pGEX/KLRs ベクターを得た。IPTG 誘導後、グルタチオンカラムにて、目的の KLRs-GST 融合タンパク質を得、脱塩後、精製度を SDS-PAGE にて確認した。

そして、96-well plate に糖タンパク質を固

相化し、次いで上記 4 で作製した rKLRs を結合させ、洗浄後 POD 標識抗 GST 抗体を添加して、結合量を EAI 法にて測定した。候補となる糖鎖に関しては、sLeX を多価で発現している HepG2 細胞由来トランスフェリンを基本として、糖鎖リモデリングを行い、rKLR の糖鎖エピトープの解析を行った。

4. 研究成果

(1) HepG2 細胞中 Fucosyltransferase VI の発現調節機構の解析

HepG2 細胞は恒常的に FUT VI を発現しており、その結果 sLeX を発現していることが明らかとなっている。そこで、HepG2 細胞における恒常的発現のメカニズムを解析するために、FUT VI mRNA の転写開始点を 5'-Rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) を行い、その PCR 産物のシーケンス解析から、650 bp は Oligo capping により報告されている転写開始点から 3'側に +65、450 bp は +278 であることが判明した。

ここで、本文中では、転写開始点+65 を +1、+278 を +213 とする。見出された転写開始点から 5'上流-2067 nt.までを Genomic DNA から PCR により増幅後、pGL4.11 にクローニングし、さらに、Deletion constructs を作成して、Luciferase assay を行った。その結果、5'上流-186 から-156 および-56 から-19 nt までの領域が FUT VI の転写活性に必要であることが示唆された (Fig.1)。

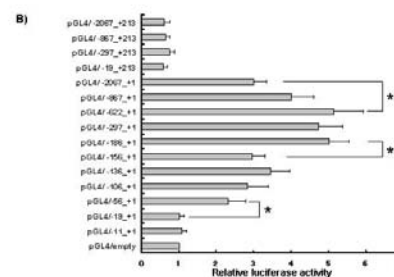


Fig.1 HepG2 細胞における FUT VI mutant vector の転写活性の解析

そこで、この領域に結合する転写因子を MATCH program (Gene regulation: <http://www.gene-regulation.com/index.html>) により検索した結果、Oct-1 (Octamer-binding transcriptional factor 1) および HNF-4 α (Hepatocyte nuclear factor-4 α) の認識配列が存在することが明らかとなった。次に、HNF-4 α のコンセンサス配列の Mutant を作製し、Luciferase assay を行った結果、-119 から-89 および-56 から

-19 までの領域において、FUT VI の転写活性に必要である転写因子は、HNF-4 α であることが示唆された。

(2) 肝癌細胞株 HuH-7 および IL-1 β を用いた炎症モデルにおける FUT VI の発現上昇機構の解析

HuH-7 細胞の IL-1 β 刺激による sLeX 発現に直接関与すると考えられる FUT VI の mRNA 発現の変化を real-time PCR を用いて定量的に測定した。その結果、FUT VI は 12 時間後から発現が増加し、48 時間で 2.3 倍に増加した。この FUT VI の上昇メカニズムの解明を目標として、転写および安定性に着目した。

HuH-7 細胞に HNF-4-Luc もしくはそのコントロールである cont-Luc と、SV-40-Luc をトランスフェクションし、1 日間培養した。その後、IL-1 β を 100U/mL となるように添加し、37°C、5% CO₂ 存在下で 0~24 時間インキュベート後、レポーターアッセイをおこなった。その結果、IL-1 β 刺激により、HuH-7 細胞中 HNF-4 依存的転写活性は、3-5 時間で上昇が認められた。次に、HNF-4 α の転写活性を制御する COUP-TF1,2 の mRNA 発現を RT-PCR にて解析した結果、COUP-TF1 は、発現が認められなかった。また、COUP-TF2 は、発現は認められたものの、IL-1 刺激による増加は認められなかった。

次に、FUT VI の 5' 非翻訳領域を組み込んだ pGL4.11 の deletion constructs によるプロモーター活性を解析した。その結果、IL-1 β 刺激によるプロモーター活性の増加は認められなかった。また、IL-1 β 刺激によるエンハンサー活性の増加は認められなかった。そこで、HuH-7 細胞の IL-1 β 刺激による FUT VI mRNA の安定性への影響を明らかにするため、HuH-7 細胞を 6-dichloro-1- β -ribofuranosylbenzimidazole (DRB) で前処理した後、IL-1 β 刺激による FUT VI mRNA 発現量の変化を、real-time PCR を用いて定量的に測定した。半減期を算出した結果、IL-1 β 刺激なしでは、4.1 時間、IL-1 β 刺激時には 4.0 時間となり、IL-1 β 刺激による FUT VI mRNA 半減期の変化は認められなかった。

これらの結果から、炎症モデルである IL-1 β 刺激による FUT VI mRNA 発現の上昇は、安定性によるものではないことが明らかとなった。

(3) 肝癌細胞株を用いた炎症モデルの構築と、糖鎖合成制御機構の解析

現在入手可能な肝癌細胞株において、様々な糖転移酵素や急性期蛋白質が恒常的に発現していると思われる。そこで、各種肝細胞株 (HuH-7, HepG2, HLE, HLF, HuH-6/CL5,

Li-7) 中に発現している糖転移酵素遺伝子発現量を RT-PCR 法により定量的に解析した。その結果、FUT II, IV, GalT I, iGnT II, C2GnT は各細胞間で有意な発現量の差は認められず、FUT III および VII はどの細胞でも発現は認められなかった。一方、FUT VI は、HepG2 細胞で高発現しており、iGnT I は、HLE で発現が認められた。次に、各種肝細胞での IL-6 応答性を解析するため、C/EBP 応答性のルシフェラーゼベクターである C/EBP-Luc を用いて、レポータージーンアッセイを行った。

その結果、HepG2 および HLF 細胞は、1000 U/ml の IL-6 刺激により、C/EBP の転写活性が、無刺激と比較して約二倍の増加が認められた。また、HuH-7 および Li-7 細胞は約 1.5 倍の差が認められた。一方、HLE および HuH-6/CL5 細胞は IL-6 刺激に対する、C/EBP による転写活性の上昇は認められなかった。この結果から、IL-6 の刺激モデルとしては、HepG2 および HLF が有用であると考えられる。しかし、HepG2 細胞は、他の細胞と比較して FUT VI および sLeX を高発現しており、炎症モデルにおける sLeX 合成機構を解析するには、高バックグラウンドとなり、不適である。そこで、sLeX を発現していない HLF に焦点を絞り、IL-6 刺激による急性期タンパク質および糖転移酵素遺伝子発現を解析することにした。

HLF 細胞を 0, 100, 300 U/mL の IL-6 で刺激し、6, 24 時間後回収し、急性期蛋白質の mRNA 発現を RT-PCR により解析した。その結果、HLF 細胞は、IL-6 刺激により、CRP および haptoglobin mRNA 発現の増加が認められた。この結果より、HLF 細胞は、IL-6 による細胞内シグナルが伝達されていることから、*in vitro* 炎症モデルとして有用であることが示唆された。

(4) コンビナント KLRs の作製と rKLRs の各種糖鎖との結合性の解析

さらに、可溶性 sLeX の生体内免疫応答への関与を NK 細胞上の KLRs (CD94, NKG2D など) に着目して、KLRs と糖鎖の結合やその基質特異性の解析を行った。

分子レベルでの NKG2D および CD94 と sLeX の結合を解析するため、NKG2D および CD94 のリコンビナントタンパク質を大腸菌により作成し、HepTf との結合性を EIA 法で解析した。

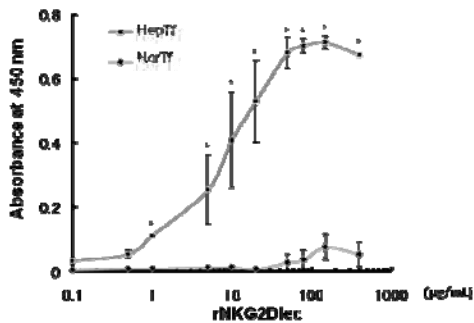
肝がん細胞 HepG2 細胞由来のトランスフェリン (HepTf) の糖鎖は、sLeX を多く発現していることが知られている。そこで、HepTf を 96 穴プレートに結合させ、HepTf 固相化プレートを作成した。

作成した rNKG2Dlec または rCD94lec をプローブとして反応させ、洗浄後 anti

GST-HRP により、HepTf に結合した rNKG2Dlec および rCD94lec の結合量を測定した(Fig.2)。その結果、rNKG2Dlec は、NorTf にはわずかな結合しか見られなかったのに対し、HepTf には高い結合が見られた。rCD94lec も同様の結果が得られた。

以上の結果から、rNKG2Dlec および rCD94lec は、HepTf に結合することが明らかになった。そこで、どの糖がレクチンの認識に関わっているのか明らかにするため、糖鎖を構成する単糖での共存による影響を解析した。同様の方法で、rNKG2Dlec および rCD94lec を結合させる際に、各単糖を共存させ rNKG2Dlec および rCD94lec の結合量を解析した。

A) rNKG2Dlec



B) rCD94lec

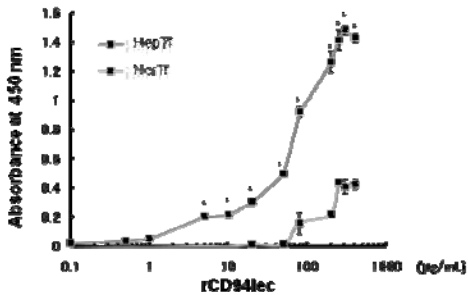


Fig.2 rNKG2Dlec および rCD94lec に対する HepTf の結合性

その結果、N-Acetylneuraminic acid (NeuAc) の共存により、rNKG2Dlec および rCD94lec の HepTf に対する結合は有意に抑制された。また、Fucose (Fuc)を始め、Galactose (Gal)、N-Acetylglucosamine (GlcNAc)、Mannose (Man)による結合の阻害は見られなかった。

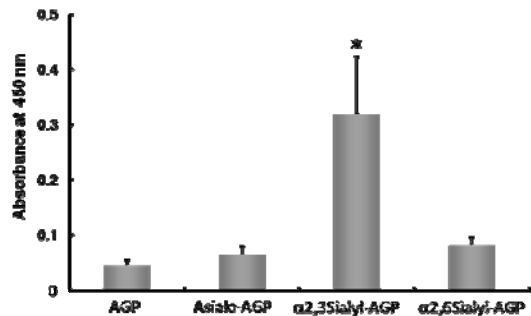
次に、NeuAc の関与を直接明らかにするため、シアル酸を切断する α 2,3/6/8-Neuraminidase で HepTf を消化した Asialo-HepTf に対する rNKG2Dlec および rCD94lec の結合を解析した結果、rNKG2Dlec の HepTf に対する高い結合が、Asialo-HepTf では有意に低下した。(Fig.21) また、rCD94lec も同様に Asialo-HepTf に対する結合も HepTf と比較して低下が認めら

れた。

次に、シアル酸の結合様式と N 結合型糖鎖の基幹構造をより詳細に検討するため、 α 2,6 結合シアル酸を含有し N 結合型 2 本鎖基幹構造を持つ Tf および α 2,6 結合シアル酸と 2~4 本鎖の多分岐 N 結合型基幹構造を持つ α 1-Acid glycoprotein (AGP) に対する結合性を解析した。その結果、HepTf と比較して、NorTf および AGP に対して、わずかな結合しか見られなかった。NorTf および AGP は、NeuAc が α 2,6 で Gal に結合していることが知られている)。また、HepTf の NeuAc は、 α 1,3Fuc を持つことから、 α 2,3 で Gal に結合しているものと考えられる。

これらのことから、rNKG2Dlec および rCD94lec の糖認識には、 α 2,3 結合の NeuAc が重要であることが示唆された。そこで、糖タンパク質を Neuraminidase 処理後、Sialyltransferase により NeuAc を α 2,3 で転移させることで、人工的に糖鎖のリモデリングを行い、rNKG2Dlec および rCD94lec の結合性を解析した。NorTf および AGP を Neuraminidase 処理して作成した Asialo-NorTf および Asialo-AGP を 96well に固相化後、Sialyltransferase により NeuAc を結合特異的に転移させ、これらに対する rNKG2Dlec および rCD94lec の結合を EIA 法により解析した (Fig.3)。

A) rNKG2Dlec



B) rCD94lec

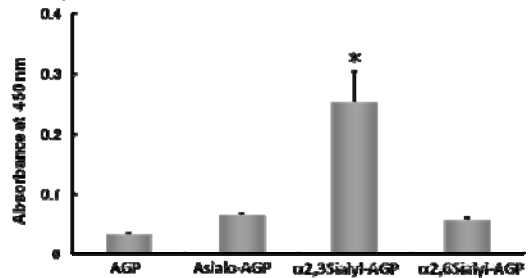


Fig.3 rNKG2Dlec および rCD94lec の糖鎖修飾 AGP に対する結合性

その結果、 α 2,3sialyl-AGP は有意に rNKG2Dlec および rCD94lec の結合の増加が認められた。一方、この結合の増加は α 2,6 NeuAc 修飾では見られなかった。また、

NorTf では、糖鎖修飾による有意な変化は見られなかった。以上の結果から、rNKG2Dlec および rCD94lec は NorTf には見られないような 3~4 本鎖の糖鎖で、その非還元末端が α 2,3 NeuAc で修飾されている糖鎖構造を認識することが明らかとなった。

次に、NKG2D および CD94 がこれらの糖をどの部位で認識するのかを明らかにするため、1 アミノ酸置換体の Mutant lectin を作成し、HepTf および Heparin との結合を解析した。Mutant lectin と、HepTf および Heparin との結合を EIA 法により解析した。その結果、rNKG2Dlec(Y152A) で HepTf に対する結合が有意に減少し、rCD94lec (F114A) および rCD94lec(N160A) で HepTf に対する結合が有意に低下した。したがって、これらのアミノ酸残基とその周辺で HepTf に含まれる多分岐 α 2,3-シアル酸部分を認識していることが示唆された。これらの結果から、NKG2D および CD94 の糖認識に重要なアミノ酸が同定された。

本研究により、肝臓における免疫応答に対する糖転移酵素の発現やその制御機構についての病態生化学的知見が得られたものと考えられる。そして、CD94 および NKG2D の糖鎖リガンドを同定することに成功した。そして、NK 細胞機能に及ぼす sLeX の関与を明らかにすることが出来た。これらの結果から、生体内では、NK 細胞上の CD94 および NKG2D がこれらの異常な糖鎖を認識し、がん細胞の増殖を抑制することが考えられる。

本研究と、病態における血清中 sLeX の合成機構、発現調節機構、キャリア分子、糖鎖構造の変化および生体内における役割といった、今までに明らかにしてきた知見などから、血清中 sLeX の病態生化学的意義が明らかにされた。また、sLeX を認識する NKR のとして CD94 および NKG2D の糖鎖結合特性を解析出来たことは、癌の免疫賦活化療法だけでなく、炎症の制御、自己免疫疾患の制御、感染症の制御など広範な臨床応用に対する新しい戦略の構築が期待される。

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. Imaizumi Y., Higai K., Suzuki C, Azuma Y, Matsumoto K. : NKG2D and CD94 bind to multimeric α 2,3-linked N-acetyl neuraminic acid. Biochem, Biophys. Res. Commun. 382:604-608 2009. (査読あり)

2. Higai K., Miyazaki N., Azuma Y. and Matsumoto K.: Transcriptional regulation of the fucosyltransferase VI gene in hepatocellular carcinoma cells. Glycoconj. J. (3):225-35 2008. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

1. 今泉 雄三、桧貝 孝慈、東 祐太郎、松本 宏治郎 : NKG2D リガンドの解析 (第 129 回日本薬学会年会, 京都, 2009)

2. Higai K., Imaizumi Y., Azuma Y, Matsumoto K. : NKG2D mediates cytotoxicity against high sialyl Lewis X-expressing cells. (Biochemistry and Molecular Biology, Kobe, 2008)

3. 今泉 雄三、楠原 彬子、桧貝 孝慈、東 祐太郎、松本 宏治郎 : NKG2D 糖鎖リガンドの解析 (第 128 回日本薬学会年会、横浜、2008)

4. Higai K., Miyazaki N, Matsumoto K : Transcriptional regulation of FUT VI in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. (Biochemistry and Molecular biology 2007, Yokohama, 2007)

[その他]

ホームページ等

http://www.phar.toho-u.ac.jp/facilities/open_research/15208/theme2.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桧貝 孝慈 (HIGAI KOJI)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号 : 70297711

(2) 研究分担者:

なし

(3) 連携研究者:

なし