

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：72690

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590345

研究課題名(和文) 生体の糖鎖認識レクチンを介した感染、疾患制御システムの解明及びその応用

研究課題名(英文) Study of the regulatory mechanism of lectin in infection and disease

## 研究代表者

井手尾 浩子 (Ideo, Hiroko)

公益財団法人野口研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：90180322

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)：生体防御システムにおける糖鎖機能の解明を目指し、消化器官に特異的に存在するガレクチン-4の感染、疾患制御への関与を研究した。不明であったガレクチン-4及びリガンドであるMUC1の細胞外への放出に、感染や癌疾患時に活性化されている細胞内のシグナル伝達分子が関与することを明らかにした。

さらにガレクチン-4を検出プローブとしてMUC1を測定するレクチンELISA系を構築し測定分析した結果、ガレクチン-4の認識する3'-sulfated core1糖鎖を持ったMUC1が再発転移した乳癌患者血清中に高率に見出された。これらの結果から、癌の悪性度へのガレクチン-4及びその認識糖鎖の強い関与が推測された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the biological function and mechanism of sugar chains in host defense system, we studied the regulatory roles of galectin-4 in infection and disease. Galectin-4 is abundantly expressed in the epithelium of the alimentary tract, however it's externalization mechanism is currently unknown. Our study showed that externalization of galectin-4 and its ligands (MUC1) can be regulated by signaling molecules, which are activated in cancer and infected cells.

Next, we developed a lectin-sandwich immunoassay using galectin-4 and a MUC1 antibody and found that galectin-4 preferred MUC1 possessing 3'-sulfated core1, which was profoundly expressed in the sera of patients with recurrent and/or metastatic breast cancer. Thus involvement of galectin-4 and its preferred sugar chain in cancer malignancy is strongly suggested.

研究分野：医歯薬学、基礎医学、医化学一般

キーワード：ガレクチン-4 MUC-1 細胞外放出 シグナル伝達分子 硫酸化糖鎖 がん レクチンELISA

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 消化管上皮細胞は各種物質の分泌、吸収のみならず、生体外からの様々な刺激や病原体などの攻撃にさらされ、多くの病原性細菌やウイルスなどは、宿主の上皮細胞を侵入経路とする。我々はモデル動物として線虫を用いて、線虫の消化管に特異的に発現する糖脂質認識ガレクチンが病原細菌毒素への生体防御機構に関わっていることを解明してきた。

ガレクチンファミリー蛋白質は、それぞれ糖結合特異性、発現組織が異なり、多様な生物学的機能を有している。その中でガレクチン-4は、2つの糖結合ドメインを有し、消化器官に強く発現している。細胞膜上のCEAや硫酸化糖脂質、コレステロール硫酸等にガレクチン-4は結合し、各種シグナル伝達分子群のプラットフォームであるラフト画分に存在している。この消化管ラフトの主要な構成成分であるガレクチン-4の解析を行うことは、哺乳動物においても感染、疾患における生体防御機構において糖鎖及びその認識分子の機能の解明につながるものと考えられる。

細胞外でのガレクチンの機能やその認識分子に関しては種々報告があるが、細胞質中に存在するガレクチン分子はシグナルペプチドをもたないため、どのような機構で細胞から分泌され、細胞外糖鎖リガンドに結合するか十分に解明されていなかった。病原性細菌やウイルスの感染によって、シグナル伝達系が活性化され、その後の様々な生体反応が引き起こされるのが知られているが、細胞内レクチンであるガレクチンが感染、炎症時に細胞外に放出される機構、それに続く炎症時に、どのように生体防御に関わるか不明であった。

また、GPI(glycosyl phosphatidylinositol)アンカーは様々なタンパク質の膜への結合様式の一つで、感染においてGPIアンカーは、病原体と宿主の両者において重要な役割を果たしている。GPIアンカー型タンパク質は、宿主細胞の細胞膜上では糖脂質、コレステロールなどと共に、ラフト画分に濃縮されている。このラフトは、多くの病原体の侵入門戸であり、シグナル伝達の起点となっているという多くの報告がある。ガレクチン-4のノックダウンでCEA、DPP-IVなどのGPIアンカー型糖蛋白質の細胞のアピカル側への輸送が阻害されることも報告されていることから、GPIアンカー型タンパク質を介したガレクチン-4の機能解明は重要な課題であった。

(2) 乳癌は女性に多い癌であり、30歳から65歳までの女性に限れば、女性の癌の第1位である。特に近年、日本人女性の乳癌が増えているが、乳癌の診断マーカーとしてCA15-3は予後の追跡に有用であるものの、感度が低く、全乳癌患者中陽性率が15%と低く、その用途が限られていた。我々は乳癌細胞産生MUC1の糖鎖構造解析の結果、約50%が硫酸化糖鎖である事を明らかにしたことが、

糖鎖の硫酸化と疾患の悪性度に着目する背景となった。糖鎖の癌性変化に関わる研究は殆ど中性糖鎖、シアル酸付加糖鎖に限られ、硫酸化糖鎖に着目した研究は殆どなされていなかったことから、硫酸化糖鎖を認識するガレクチン-4によるリガンド糖蛋白質の輸送制御、局在化機構、細胞内結合分子を同定することは、癌の診断、治療に役立つものと考えられた。

## 2. 研究の目的

(1)多くの病原性細菌等の侵入経路となる消化管に特異的に存在するガレクチンを研究しその防禦機構に果たす役割を解明することは、感染予防、治療薬として利用するために重要である。ガレクチン-4が、感染、癌の制御にどのように関与するかを調べる目的で、感染に付随しておこるシグナル伝達系の活性化において、細胞質内のガレクチンのリン酸化、細胞内局在、分泌機構を詳細に検討し、その果たす役割を解明することを目的とした。

さらにGPIアンカー糖鎖をレセプターとする毒素エアロリジンを用いて、感染における糖鎖やレクチンによる生体防御機構の解明を目的とした。

(2)MUC1は呼吸器、消化器、乳腺などの上皮に存在し、腫瘍などの疾患との関連が報告されている。我々は既に乳癌細胞に硫酸化糖鎖を持つMUC-1をガレクチン-4リガンドとして見出していることから、上皮細胞表面への輸送におけるガレクチン-4の関与、機能を明らかにすると共に、腫瘍の転移に関わる悪性度と、硫酸化糖鎖やガレクチン-4の発現との関係を明らかにすることを、本研究における重要な目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)ガレクチンの細胞外分泌機構を調べる為に、ガレクチン-4を高発現しているNUGC-4胃癌細胞を使用し、pervanadate(PV)処理でチロシンリン酸ホスファターゼ(PTP)を阻害する方法、或いは活性型のSrcキナーゼ(Act-Src)プラスミドの導入によって細胞のチロシンリン酸化レベルを亢進させた。抗ガレクチン-4抗体等による免疫沈降の後、チロシンリン酸化抗体を反応させることにより、ガレクチン-4のチロシンリン酸化の検出を行った。ガレクチン-4のリン酸化に関与するペプチド部位の探索の為に、N末にFLAGタグを付加した各種ガレクチン-4変異体を作成し、細胞に導入した。細胞内のガレクチン-4及びリン酸化タンパク質の局在は、細胞刺激後、固定操作を行い、蛍光抗体を使用し共焦点顕微鏡により観察を行った。

GPIアンカー結合性毒素エアロリジンはHis-tag配列をN末に持ったりコンビナント蛋白質を発現精製後、トリプシン処理し活性型に変換し実験に用いた。

(2) ガレクチン-4 結合性 MUC1 の検出方法は、ELISA プレートに MUC1 捕捉抗体を一晩コートした後、ブロッキング操作を行い、希釈したスタンダード及び血清と反応させ、洗浄後 HRP で標識したガレクチン-4 と反応させ結合したガレクチン-4 を HRP 基質である TMB と反応させ、スタンダードからユニットを算出した。

捕捉 MUC1 抗体は、western blotting で MUC1 と強く反応する何種類かの抗体の中から、患者及び健常者血清でアッセイを行い比較検討して選定した。

乳癌 MUC1 の糖鎖のシアル酸付加状態は、乳癌細胞由来あるいは乳癌患者血清由来の MUC1 をシアリダーゼ処理し、PNA レクチンを用いて分析した。CA15-3 の測定は “E test TOSOH II (CA15-3)” あるいは CA15-3 ELISA kit from Immunospec Corp. を用い添付プロトコルに沿って行った。MUC1 のレクチン反応性の比較の為に YMBS-MUC1 の濃度は EITEST® KL-6 ELISA kit を用い添付プロトコルに沿って行った。

患者の診断はマンモグラフィ、バイオプシー、CT などで行われ、組織型分類は病理学的所見から行われた。原発性乳癌患者は、治療目的上、遺伝子分類に基づいて、Estrogen receptor (ER)、Progesteron receptor (PgR)、HER2 (human EGFR-related 2) 蛋白発現が陽性が陰性かで Luminal A, Luminal B, Her2 rich, Triple negative(basal like) 乳癌の 4 つのサブタイプに分類、患者の癌の進行度は TNM 分類により表示した。

#### 4. 研究成果

(1) ガレクチン-4 とそのリガンドの細胞外分泌に關与するシグナル伝達分子の解明

我々は NUGC-4 細胞において、PV 処理による PTP の阻害によってガレクチン-4 がチロシンリン酸化されることを見出し、このリン酸化は、Src キナーゼファミリー (SKF) 阻害剤によって阻害されることから SKF がガレクチン-4 のリン酸化に關与することを見出した。これを確かめる為に FLAG 付加ガレクチン-4 と Act-Src のプラスミドを CHO 及び NUGC-4 細胞に導入した結果、ガレクチン-4 のリン酸化が確認された。その際、抗リン酸化 (Y416) 抗体で検出される活性型 SFK が、Act-Src 導入細胞及び、PV 処理 NUGC4 細胞の細胞画分及び、ガレクチン-4 免疫沈降物に検出された。ガレクチン-4C 端の YVQI を欠失した変異体の導入実験によって、この配列がガレクチン-4 のチロシンリン酸化に重要であることがわかった。さらにこの C 末端リン酸化ペプチドは、Src キナーゼの SH2 ドメインにより認識された。細胞を蛍光免疫染色した結果、ガレクチン-4 とチロシンリン酸化蛋白は、高リン酸化状態の NUGC4 細胞で、細胞膜近傍部位等に存在するのが観察された。一方、CHO 細胞に導入され細胞質に染色が見られた FLAG ガレクチン-4 は、Act-Src 導入

で、チロシンリン酸化蛋白と共に膜近傍部に局在が変化、ガレクチン-4 の膜への局在に、活性型、Src キナーゼの関与が示唆された。ガレクチン-4 は、高リン酸化状態で細胞外への分泌が亢進した。NUGC-4 細胞の MUC1 はガレクチン-4 に結合するが、その細胞外への分泌も高リン酸化状態で MUC1 の細胞外への分泌は亢進した。

Src キナーゼはがんの進行に伴ってその量や活性が増大し、がん悪性化形質の獲得に係わることから、ガレクチン-4 が Src キナーゼ分子と相互作用することにより、がん細胞の悪性度に関わる可能性が高い。ガレクチン-4 の結合する MUC1 もその発現が細胞接着や、転移に關与することから、ガレクチン-4 によるその局在の制御が、がん細胞の転移能に關与している可能性が示唆された。

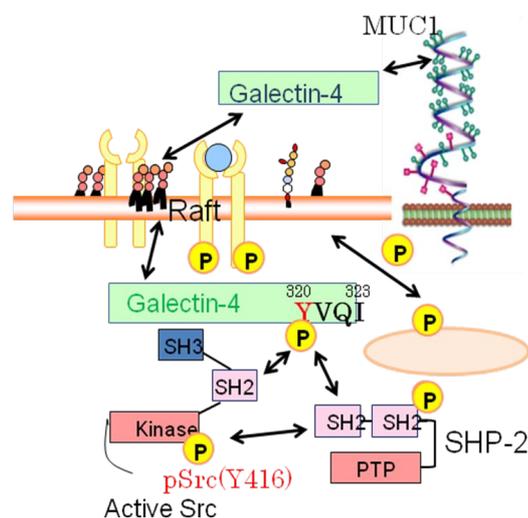


図 1. ガレクチン-4 の細胞外放出にシグナル分子が關与する

GPI アンカー糖鎖認識毒素エアロリジンを経験した様々な培養細胞に添加した所、ガレクチン-4 の発現が見られないマクロファージ様細胞がこの毒素に対し感受性が高かった。単球やマクロファージ等の細胞には CD14 蛋白質が GPI アンカーを介して膜に結合しており、TLR4 等と共に働き、細菌に由来するリポ多糖を認識して、感染において鍵となる役割を果たしている。これらの細胞を使用し、糖やレクチンの生体防御機構についてさらに研究を進めている。

(2) 乳癌患者血清中のガレクチン-4 結合性 MUC1 の分析

上記の研究成果によりガレクチン-4 が MUC1 の局在の制御に關与することが示唆されたことから、ガレクチン-4 を検出プローブとした MUC1 の測定への応用を考えた。Galβ1-3GalNAc (core1)-特異的レクチン PNA が、YMBS-MUC1 及び乳癌患者由来の MUC1 には殆ど結合せず、シアリダーゼ消化後に初めて結合したことから、これらの MUC1 は大部分がシアル酸あるいは硫酸で修飾されていると考えられた。

我々は以前ガレクチン-4が3-O-硫酸化 core1 糖鎖を特異的に認識することを SPR 法等で見だしていた。Core1 糖鎖の還元末端の GalNAc, GlcNAc, Galβ1-4GlcNAc への置換、C-6 部位へのシアル酸、硫酸付加、また、ラクトースあるいは N-アセチルラクタミンのガラクトースの C-6 部位へのシアル酸、硫酸付加された糖鎖は、3-O-硫酸化 core1 糖鎖に比べガレクチン-4 に対する結合を著しく弱いか結合がみられない。さらに3-O-硫酸化 core1 糖鎖は解離が遅いので ELISA によって定量に応用できると考えられた。

そこで抗 MUC1 抗体とガレクチン-4 をプローブとしたレクチンサンドイッチイムノアッセイを構築し、280 例の原発乳癌患者及び43 例の再発乳癌患者血清中のガレクチン-4 結合性の 3-O-硫酸化 core1 結合 MUC1 (3Score1-MUC1)を測定した。その結果、その陽性率は CA15-3 に比べて高く、特に再発転移患者の平均は  $839 \pm 618$  U/mL で 350 U/mL をカットオフ値とした陽性率は 86%と、47%の CA15-3 に比べて有意に高かった。原発乳癌患者 240 例での陽性率は再発転移患者に比べ低かったが、ステージ毎の陽性率は stages I, II, III, and IV ではそれぞれ 21.2%, 27.9%, 37.9%, 60.0%であり、CA15-3 の陽性率より高値であった。

浸潤性乳管癌は乳癌の中で最も一般的な組織型で乳頭腺管癌、充実腺管癌、硬癌(スキルス)の3つのサブタイプに分類される。これらのサブタイプと予後には密接な関係があり、硬癌はリンパ節転移の割合が高く、乳癌患者の50%の割合を占め、予後は一般的に悪い。3Score1-MUC1 の陽性率は CA15-3 比べ乳癌の全ての組織型で高かったが、硬癌とその他のタイプの複合例でその差が一番顕著であった。遺伝子分類に基づいた Luminal A, Luminal B, Her2 rich, basal like の4つのサブタイプの分類全てで 3Score1-MUC1 陽性率は CA15-3 に比べ高かったが、特に luminal A で CA15-3 の陽性率は 3Score1-MUC1 の 12.4%に過ぎなかった。

3Score1-MUC1 と CA15-3 の値を再発転移患者の術前と、術後5年の値を比較すると、3Score1-MUC1 は 25%から 88%へと上昇したが、CA15-3 は 12.5%にとどまっていた。このことから、3Score1-MUC1 は術後の乳癌患者のモニタリングに有用と考えられた。

本研究では 3-O-硫酸化 core1 に対するガレクチン-4 のユニークな糖結合特性を利用して、MUC1 の検出に使用しているのが他に例をみない。癌の悪性度にこの糖鎖が具体的にどう関与しているかが今後の研究課題である。スキルス性胃癌細胞(NUGC-4 細胞)由来の MUC1 もガレクチン-4 に結合することから、スキルス性胃癌においても 3Score1-MUC1 がスキルス性乳癌と同じように発現している可能性がある。予備的な実験でこのアッセイの臓器特異性を見た所、肝癌、胃癌、前立腺癌以外はあまり高くないことから、臓器特異性

はあることが示唆された。MUC1 分泌にシグナル分子が関与することをスキルス性胃癌細胞を用いた実験で明らかにしたが、多くのキナーゼが乳癌を含め各種のがん細胞において活性化していることから、3Score1-MUC1 の細胞外放出に乳癌細胞においても同様にシグナル分子が関与し、転移と関連するか今後の検討課題である。

#### 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4件)

Ideo H, Hoshi I, Yamashita K, Sakamoto M. Phosphorylation and externalization of galectin-4 is controlled by Src family kinases. *Glycobiology*. 2013, 23:1452-62. doi: 10.1093/glycob/cwt073. 査読あり

Ideo H, Hinoda Y, Sakai K, Hoshi I, Yamamoto S, Oka M, Maeda K, Maeda N, Hazama S, Amano J, Yamashita K. Expression of mucin 1 possessing a 3'-sulfated core1 in recurrent and metastatic breast cancer. *Int J Cancer*. 2015 Mar 18. doi: 10.1002/ijc.29520. 査読あり

Yamashita K, Ohkura T. Determination of glycan motifs using serial lectin affinity chromatography. *Methods Mol Biol*. 2014;1200:79-92. doi:10.1007/978-1-4939-1292-6\_7. PubMed PMID: 25117226.

Kaya T, Kaneko T, Kojima S, Nakamura Y, Ide Y, Ishida K, Suda Y, Yamashita K. High-sensitivity immunoassay with surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy using a plastic sensor chip: application to quantitative analysis of total prostate-specific antigen and GalNAcβ1-4GlcNAc-linked prostate-specific antigen for prostate cancer diagnosis. *Anal Chem*. 2015 3;87(3):1797-803. doi: 10.1021/ac503735e. 査読あり

〔学会発表〕(計5件)

井手尾浩子、「Functional roles of galectin-4 in malignant adenocarcinomas」第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月

井手尾浩子、「癌細胞の悪性度に関連したガレクチン-4及びそのリガンドの発現」第85回日本生化学会大会、福岡、2012年12月  
Intracellular Localization and Phosphorylation of Galectin-4 is Controlled by Src Family Kinases, 22nd International Symposium on Glycoconjugates(Glyco22), 大連(中国)、2013年6月

井手尾浩子、「ガレクチン-4の細胞外放出に Src family kinases が関与する」日本薬学会第134回年会(熊本)2014年3月

井手尾浩子, Detection of mucin 1 possessing a 3'-sulfated core1 in recurrent and metastatic breast cancer  
23rd International Symposium on Glycoconjugates (Glyco23), Split, Croatia, 2015  
年9月

〔図書〕(計1件)

山下克子、井手尾浩子 第2編 糖鎖の生命科学—機能 第2章 糖鎖と生命 5. 免疫 5. ガレクチン, 「糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック」 秋吉一成監修, (株)エヌ・ティー・エス, in press (2014).

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井手尾浩子 ( IDEO, Hiroko )

野口研究所・糖鎖生物学・研究員

研究者番号: 90180322

### (2) 研究分担者

山下克子 ( YAMASHITA Katsuko )

研究者番号: 70030905

横浜市立大学・医学研究科・その他