

200807006A-B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業【ヒトゲノムテーラーメイド研究】

糖鎖シグナルの異常による肺気腫の発生機構の解明と治療戦略

平成 20 年度 総括研究報告書
平成18年度～平成20年度 総合研究報告書

主任研究者 谷口 直之

平成 21(2009)年 4 月

目次

I. 総括研究報告書・総合研究報告書

糖鎖シグナルの異常による肺気腫の発生機構の解明と治療戦略 谷口直之	1
--------------------------------------	---

II. 分担研究報告

1. 糖鎖を用いた肺気腫治療薬開発の試み 松本明郎	8
2. 糖鎖シグナルの異常による肺気腫の発生機構の解明と治療戦略 へフコシル化のメカニズム解析について 三善英知	12
3. コアフコース欠損に伴う肺気腫の病態変化とその分子メカニズム 顧建国	17
4. エラスターゼ誘導肺気腫モデルにおける FUT8 ^{+/-} ♂マウスの検討 別役智子	21
5. マウスにおける環境因子曝露と Fut8 活性の肺気腫変化に及ぼす影響の解析 前野敏孝	25

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	31
-----------------	----

総括・総合研究報告書

糖鎖シグナルの異常による肺気腫の発生機構の解明と治療戦略

主任研究者 谷口直之 大阪大学微生物病研究所 寄附研究部門教授

研究要旨 本研究事業は肺気腫の病態とその成因を糖鎖異常によるシグナル伝達経路の変化を通して解析することにより、肺気腫に対する治療戦略を提供することを目的として平成18年度後半より開始した。Fut8 ノックアウトマウスから得られた肺気腫自然発症に関する知見をもとに、糖鎖異常を背景とする肺気腫の解明を新たな切り口として病態の解析と治療戦略の開発を行った。

平成20年度では、喫煙誘発型肺気腫モデル動物における早期肺泡破壊の進展機序の解明、MMP 活性阻害を標的とした新たな治療薬剤の開発ならびに MMP 阻害効果に関する生化学的基礎データの収集、さらにはエラスターゼ誘導型肺気腫モデルマウスと糖鎖異常の関連性に関する研究や、糖鎖異常による肺泡破壊の新たな分子メカニズムの発見など基礎的な面での検討も行われた。

本研究計画(3年)において、肺気腫形成に関してこれまで考慮されなかった糖鎖異常を背景因子として注目することにより、これまで特異的な治療手段がなかった主要疾患の一つである肺気腫について、病態形成に関する新たな知見と治療戦略を提案することができたと考えられる。今後は、本研究成果から得られた新規薬剤の肺気腫治療薬としての評価を行っていくことが必要である。

分担研究者

松本明郎 大阪大学微生物病研究所 准教授

三善英知 大阪大学大学院医学系研究科 教授

顧 建国 東北薬科大学薬学部 教授

別役智子 北海道大学 准教授

前野敏孝 群馬大学医学部附属病院 助教

A. 研究目的

肺気腫を主要な病態とする COPD(慢性閉塞性肺疾患)は、WHO の統計によると、全世界で2億1000万人が罹患しており、2005年だけで300万人が死亡している。2

030年までには死因の第4位になると予想されている主要な疾患である。我が国では 570 万人の潜在的 COPD があり、そのうち実際に治療を受けているのはわずか 23 万人にすぎない。COPD の社会的影響は、患者に対する医療費のみならず労働力人口の減少ならびに労働生産性の減弱にもつながる。また COPD を引き起こす主要な原因の一つである喫煙がもたらす社会的な損失は、年間5兆6千億円と試算されている。しかし、いまだ有効な治療法が開発されておらず、現在の治療方針は対症療法に限られている。そのため、肺気腫の治癒をめざすのみならず、病態の進行を遅らせ肺気腫患者本人の社会活動能力を維持することのできる治療法の開発が急務となっている。我々は、糖鎖の機能解析に関した研究にお

いて、N結合型糖タンパク質にコアフコースが付加(α 1,6フコシル化)されると、そのターゲットタンパク質の機能が変化すること、コアフコシル化を触媒する Fut8 (α 1,6 fucosyltransferase) の遺伝子欠損マウス(ノックアウトマウス)は、著明な成長障害と肺気腫様病変を示すことを明らかにしてきた。この肺気腫様病変は、TGF- β 受容体に対するコアフコースの付加がなされないため、TGF- β 受容体の下流のシグナルが減弱し、抑制系に働く Smad のリン酸化が十分に起こらなくなることから細胞外マトリックスの分解を主につかさどるマトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)の遺伝子発現の亢進と活性増大がおこり、肺胞壁の合成と分解のバランスが崩れることにより肺気腫様の病態が進行することを明らかにしている。この研究により、糖鎖異常が肺気腫の背景因子となる可能性を示したことから、この Fut8 ノックアウトマウスを肺気腫モデルマウスとして用い、肺気腫の病因ならびに病態の解明に糖鎖生物学・グリコームを適用し、より高度な解析さらには治療戦略の提案を行うことを本研究の目的とした。

これまで肺気腫に対する特異的な治療方法の開発は、多くの試みがなされてきたが、依然として有効な治療手段の提供には結びついてはいない。病因・病態に関する有効な知見を今後得るためには、これまでとは異なった分野・方向性による解析とそこから得られた知見をもとにした研究開発体制が必要であろうと考えられる。

喫煙を代表とした多因子が複合して肺気腫の形成に関与することから、本研究課題ではコアフコース異常(糖鎖異常)を背景とした肺気腫の形成に焦点を当てて検討を行ってきた。糖鎖異常を背景とした肺気腫病態の解析を行うことから、これまで見いだすことのできなかつた発症・増悪機構の解明、さらには特異的な治療戦略の提案を行うことを本研究課題の目的とした。

B. 研究方法

糖鎖修飾の異常であるコアフコースの欠損(FUT8 活性の低下または欠損)が受容体シグナルを減弱させ、結果として肺気腫を発症させることを明らかにしてきたことから、糖鎖異常を加味した肺気腫病態の解明を行うこととした。とりわけコアフコース修飾の低下と肺気腫病態形成の相関性、肺胞破壊を直接引き起こすマトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)活性の制御方法の開発、糖鎖異常と肺気腫形成の分子機構の探索について検討を行ってきた。

平成20年度では前年度までの成果をもとに、以下の4点について検討を行った。

1. 喫煙誘導型肺気腫モデルマウスにおける肺胞破壊発症機序の検討、2. 新規の肺気腫治療薬開発を目指した MMP 活性阻害薬の探索とその作用に関する分子機構の検討、3. エラスターゼ誘導型肺気腫モデルマウスにおける糖鎖異常の関与に関する検討、4. フコシル化異常と肺気腫化に関する新たなメカニズムの検討。

1. 喫煙誘導型肺気腫モデルマウスにおける肺胞破壊発症機序の検討: 肺気腫の代表的な成因とされている喫煙と糖鎖異常の関連を検討するため、Fut8 ヘテロノックアウトマウスに喫煙暴露を行い、肺の気腫化程度ならびに FUT8 活性を検討した。Fut8 のホモ接合型ノックアウトマウスは生後間もなく死亡してしまうため、安定して喫煙実験に使用することができないが、ヘテロ型のノックアウトマウスは、野生型とほぼ同じ生存を示し、さらに Fut8 活性が野生型に比較して約半分まで減弱していることが知られている。このヘテロ型ノックアウトマウスを用いて喫煙実験を行った。ヘテロ型ノックアウトマウスは、同世代にて繁殖を行う必要があるが、自然交配では安定した妊娠・出生数を得ることができなかつたため、ヘテロノックアウトマウスから得られた精子を用いた体外受精により繁殖を行なう必要があつた。出生後、体細胞より得た染色体

DNA を PCR にて解析し、ヘテロノックアウト・野生型を識別し、実験に供した。一般にマウスに対する喫煙実験は雌マウスに対して行うことが常法となっているため、本実験系でも雌マウスに対する喫煙実験を行った。喫煙実験には、世界的な実験用標準タバコとなっているアメリカケンタッキー大学タバコ健康研究所製の研究用タバコを用い、世界的な標準化基準に適合する様にした。

2. 新規の肺気腫治療薬開発を目指した MMP 活性阻害薬の探索とその作用に関する分子機構の検討: Fut8 ノックアウトマウスにおける MMP の産生亢進は細胞外基質の合成と分解のバランスを破綻させることにより肺胞壁を破壊し、気腫化に関わっていることを示した。MMP の活性化がヒト肺気腫においても認められることが知られている。そのため、MMP 活性を阻害することは肺気腫の進展を阻害する効果があるものと考えられている。MMP は主にマクロファージより放出され、肺胞壁を分解する。そこで、肺胞壁構成成分と同様の物質より、MMP の基質と競合し阻害活性を示すものを *in vitro* の系で検索した。活性測定に用いる MMP 酵素は、RAW264.7 細胞より培養上清中に産生されたものを用いた。活性測定用基質として、
{DNP-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH₂ [Cha = β -cyclohexylalanyl; Abz = 2-aminobenzoyl (anthraniloyl)] を主に用いた。さらに、既存の MMP 阻害薬の代表として、GM-6001 と比較し、同等の阻害活性を有するものを見いだすことを目標とした。HT1080 細胞において観察される MMP 活性依存性の細胞遊走能を指標として、スクリーニングから得られた MMP 活性阻害薬の培養細胞レベルにおける効果も検討した。

3. エラスターゼ誘導型肺気腫モデルマウスにおける糖鎖異常の関与に関する検討: 糖鎖異常が肺気腫に関係していることを示すために、喫煙暴露以外にエラスターゼ誘発型肺気腫モデルについて検討を行った。エラスター

ゼ誘発型モデルには、週齢 10~11 週の Fut8 ヘテロノックアウトマウスならびに野生型の雄マウスを用いた。ヒト膵エラスターゼを気管内噴霧投与する。一定期間経過後、屠殺し、気管支肺胞洗浄と凍結肺標本作成を行い、細胞分画、Myeloperoxidase (MPO) 活性の測定、Real-time RT-PCR 法にて各種遺伝子の発現レベルについて検討した。エラスターゼ投与後 21 日目で病理学的に肺気腫形成の程度を定量的に比較した。

4. フコシル化異常と肺気腫化に関する新たなメカニズムの検討: これまで知られてきた TGF- β 受容体に対する糖鎖修飾異常に起因するシグナル伝達異常だけではなく、他の受容体を介したフコシル化異常の成因に関する分子レベルでの解析を行った。肺気腫の患者においては、VEGFR の発現が抑制され、その結果としてアポトーシスが誘導されることが報告されている。Fut8 ノックアウトマウスの肺組織における VEGFR の遺伝子・タンパク質発現を検討した。さらに、Fut8 と VEGFR との直接的関係を確認するため、培養細胞を用い RNA 干渉を用いた Fut8 のノックダウンを行い検討した。

(倫理面への配慮)

ヒトの肺組織を用いた実験については、「喫煙者、非喫煙者における肺の加齢現象の差異に関する比較検討」として北海道大学「医の倫理委員会」に審査を申請し、既に平成 13 年 4 月 20 日付けで承認されている。

また、動物実験に関しては「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」ならびに「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守して作成された実験計画により実施中である。

C. 研究結果

平成 20 年度の研究成果を以下にまとめる。

1. 通常の喫煙暴露による肺気腫モデルマウスには、6ヶ月間程度の連続した喫煙暴露が必要であるため、2週・1・2・3ヶ月の喫煙暴露実験をそれぞれ行った。Fut8ヘテロノックアウトマウスは、2ヶ月以上の暴露によりFUT8活性の低下が認められ、3ヶ月暴露により肺胞腔の拡大（気腫化）が生じた。これらの成果は、喫煙によりFUT8活性の低下が起きること、それに続いて気腫化が生じることの2点について新たな知見を与えることとなった。また、Fut8ヘテロノックアウトマウスを用いた喫煙暴露モデルは、これまで用いられてきたモデル動物（6ヶ月暴露が必要）と比較して、喫煙暴露期間が半分以下で統計学的に有意な肺の気腫化を示すことより、今後の薬物開発を効率的に進めるために有効なモデル動物を開発できたと考えられる。

さらに、本モデル動物における肺胞の気腫化の分子機構を検討するため、各喫煙暴露期間毎の肺組織における MMP 活性を測定した。野生型・ヘテロノックアウトマウス、喫煙・非喫煙間に MMP 活性に関して有意な差を認めないものが多かったが、ヘテロノックアウトマウスに喫煙暴露を行ったものにおいてのみ、喫煙暴露後2週間において MMP-9,12 活性が特異的に上昇していることを見いだした。これは、特異的な時期における MMP 活性の上昇が肺気腫の発症・進展に関与していることを示すものとして重要である。これまでも MMP の一過性の上昇を示した報告があったが、糖鎖異常を背景としても同様の一過性の上昇が早期に現れ、気腫化へと繋がっていくことは糖鎖異常が肺気腫の発症に関して明らかな関与を示すものとして重要と考えられる。

2. MMP阻害薬はこれまで多種合成されてきたが、その多くは Musculoskeletal Syndromeによる強い副作用を伴い、臨床適用されてはいない。これらは、低分子化合物による全身作用によるものであり、局所においてのみ作用させることができれば、肺気腫の治療薬ともなり得るで

あろう。そこで、生体内高分子物質をターゲットとして MMP阻害活性を有するものを見いだすことを目標とした。今回検討した物質は、分子量が大きく血管壁の透過性は低いと考えられる。そのため、経気道的な投与により局所のみ作用させ、全身的な副作用を回避することも可能と予想される。生体内物質は糖鎖に関連したものを優先的に検討し、既知の合成MMP阻害薬（GM6001）と同程度の阻害活性を有する物質を4種見いだすことができた。これらの物質に関して、分子量や側鎖への修飾の違いによるMMP阻害活性の違いを検討した。これらの物質の作用機序は、基質との競合またはMMPに対する拮抗阻害と考えられた。これらの物質の、MMP阻害機序や生体内での作用を今回開発したモデル動物を用いてさらに検討することが望ましいであろう。経気管支的に投与することにより肺胞腔局所における作用を目指している。

3. 糖鎖異常と肺気腫の関連性について、さらに理解を深めるため、喫煙暴露以外にエラスターゼ誘発型肺気腫モデルに対するFUT8活性の影響を検討した。エラスターゼモデルにおいてもFUT8活性の低下は、気腫化の進展をより早期から促進することがわかり、肺気腫における糖鎖異常の関与を明らかにすることとなった。

4. フコシル化異常と肺気腫の関連をより高度に理解することを目的とした研究から、FUT8活性の低下にともない VEGF受容体発現が低下し気腫化を引き起こす経路も存在などを明らかとし、基礎的な理解を深めることとなった。

平成18年度後期より開始された本研究課題においては、肺気腫に関して以下の新たな知見を得た。

A. 喫煙により誘発される肺気腫は、糖鎖異常（特にコアフコシル化異常）を伴う場合、気腫化の進行が早く進むこと。

B. 喫煙により Fut8 活性が低下し、その後気腫化が進行する一連の連鎖があること。

C. エラストラーゼ誘導型の肺気腫においても、コアフコシル化異常は感受性の亢進を引き起こすこと。

D. MMP 阻害活性を有する生体由来の化合物を新規に見いだした。

E. この化合物は、既知の合成 MMP 阻害薬と同等の活性阻害効果を示した。

F. 動物に投与した場合も、炎症性細胞の遊走を促進するなどの反応性は認めなかった。

G. コアフコース異常に伴う気腫化には、TGF 受容体以外にも VGF 受容体が関与する新たな系を見いだした。

H. 糖鎖修飾には、糖転移酵素活性のみならずトランスポーター等の活性も重要であることを見いだした。

D. 考察

本研究課題の目標は、社会的にも重要な肺気腫に対して、糖鎖異常という新たな観点をを用いて病態の理解をすすめる、新たな治療戦略を提案することである。糖鎖修飾(コアフコース)の欠損が肺気腫を引き起こすことは Fut8 ノックアウトマウスにより示されたが、FUT8 活性の低下が喫煙などの因子と複合的に作用し肺気腫へとつながることについて、これまで検討されたことはなかった。

Fut8 ヘテロノックアウトマウスに喫煙暴露を行うと、野生型マウスに喫煙暴露を行った場合に比べて、約半分の期間で肺胞組織の気腫化が生じる。野生型でこれまで確立されていた喫煙暴露型肺気腫モデルでは、約6ヶ月間の連続した喫煙暴露が必要であったが、Fut8 ヘテロノックアウトマウスを用いて我々が開発したモデルマウスでは、半分以下の2-3ヶ月間の喫煙暴露により肺胞壁の破壊と統計学的にも有意な気腫化(肺胞腔の拡大)が生じる。このモデルマウスは、喫煙暴露というヒトと同様の肺気腫発症因子によるものであり、生理的にも類似した病態モ

デル動物と考えられる。発症期間が短くなったため、薬効評価への適用も容易になるとともに、費用削減にも貢献するであろう。

肺気腫モデルとして喫煙誘発型以外にエラストラーゼの気管内投与によるモデルマウスも汎用されている。同様に Fut8 ヘテロノックアウトマウスに対してエラストラーゼ処理を行うと、野生型に比較して有意に早期から気腫化が進行することも示された。これらの結果から、Fut8 ヘテロノックアウトマウスにおいては、肺胞の気腫化が生じやすくなっていると言える。

Fut8 ヘテロノックアウトマウスを用いた喫煙誘発型モデルでは、なぜ早期から気腫化が進行するのかについて検討を行った。喫煙と糖転移酵素活性の変化については知られていなかったが、喫煙暴露を行ったマウス肺における Fut8 活性を測定したところ、まず FUT8 活性の低下が認められた後、肺胞径の拡大が進行していくことを明らかとした。さらに、一過性の MMP 活性の上昇もコアフコシル化異常により早期から認められた。これらのことから、糖鎖異常(コアフコシル化異常)が背景に存在する場合、FUT8 活性の低下、MMP 活性の上昇がおこり、野生型よりも早期に肺気腫化が進展することが示唆された。

本研究成果により、肺気腫の発症に関する第一原因として考えられている喫煙が単因子として作用しているのみならず、糖鎖異常という背景因子とともに協同して肺胞破壊・気腫化に関与しているという、あらたな知見を得ることができた。

肺気腫の病態を解明するために、これまで考慮されたことのなかった糖鎖修飾を背景因子として取り入れることの必要性が示されたと考えられる。肺気腫の病態が単一ではないことは明らかであろうが、糖鎖異常という新たな因子を勘案し肺気腫の成因を明らかにすることは、あらたな病態解明への戦略を提案が出来たものと考えられる。

E. 結論

1. 喫煙暴露により効率的に肺気腫を発症するモデル動物を確立し、糖鎖異常にともない MMP 活性の一過性の上昇が認められることを示した。
2. 肺気腫治療薬を目指した MMP 阻害剤を発見し、その生化学的性質を検討した。これまでの阻害剤とは異なった作用が期待され、今後モデル動物等での実証が必要であろう。
3. エラスターゼ暴露による肺気腫モデルにおいても FUT8 活性が肺気腫の進展に関与していることが示され、糖鎖異常の肺気腫における重要性を示唆することとなった。
4. 肺気腫形成に関わる新たな糖鎖異常のメカニズムを明らかにし、将来的な発展につながる基礎的な理解も深めた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. S. Kitazume, R. Oka, K. Ogawa, S. Futakawa, Y. Hagiwara, H. Takigawa, M. Kato, A. Kasahara, E. Miyoshi, **N. Taniguchi**, and Y. Hashimoto. Molecular insights into β -galactoside α 2,6-sialyltransferase secretion in vivo (2009) *Glycobiology* 19, 479-487.
2. M. Nakano, D. Higo, E. Arai, T. Nakagawa, K. Kakehi, **N. Taniguchi**, and A. Kondo. Capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry for rapid and sensitive *N*-glycan analysis of glycoproteins as 9-fluorenylmethyl derivatives (2009) *Glycobiology* 19, 135-143.
3. T. Okada, H. Ihara, R. Ito, **N. Taniguchi**, and Y. Ikeda. Bidirectional *N*-acetylglucosamine transfer mediated by β -1,4-*N*-acetylglucosaminyltransferase III (2009) *Glycobiology* 19, 368-374.
4. X. Wang, T. Fukuda, W. Li, C. X. Gao, A. Kondo, A. Matsumoto, E. Miyoshi, **N. Taniguchi**, and J. Gu. Requirement of Fut8 for the expression of vascular endothelial growth factor receptor-2: a new mechanism for the emphysema-like changes observed in Fut8-deficient mice (2009) *J. Biochem.*, In Press
5. J. Gu, Y. Sato, Y. Kariya, T. Isaji, **N. Taniguchi**, and T. Fukuda. A mutual regulation between cell-cell adhesion and *N*-glycosylation: implication of the bisecting GlcNAc for biological functions (2009) *J. Proteome Res.* 8, 431-435.
6. **N. Taniguchi**, W. Hancock, D. M. Lubman, and P. M. Rudd. The second golden age of glycomics: from functional glycomics to clinical applications (2009) *J. Proteome Res.* 8, 425-426.
7. T. Suzuki, I. Matsuo, K. Totani, S. Funayama, J. Seino, **N. Taniguchi**, Y. Ito, and S. Hase. Dual-gradient high-performance liquid chromatography for identification of cytosolic high-mannose-type free glycans (2008) *Anal. Biochem.*, 381, 242-232.
8. H. Inohara, T. Segawa, A. Miyauchi, T. Yoshii, S. Nakahara, A. Raz, M. Maeda, E. Miyoshi, N. Kinoshita, H. Yoshida, M. Furukawa, Y. Takenaka, Y.

- Takamura, Y. Ito, and **N. Taniguchi**. Cytoplasmic and serum galectin-3 in diagnosis of thyroid malignancies (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376, 605-610.
9. J. Gu, and **N. Taniguchi**. Potential of *N*-glycan in cell adhesion and migration as either a positive or negative regulator (2008) *Cell Adh. Migr.* 2, 243-245.
 10. W. Li, K. Ishihara, T. Yokota, T. Nakagawa, N. Koyama, J. Jin, Y. Mizuno-Horikawa, X. Wang, E. Miyoshi, **N. Taniguchi**, and A. Kondo. Reduced alpha4beta1 integrin/VCAM-1 interactions lead to impaired pre-B cell repopulation in alpha 1,6-fucosyltransferase deficient mice (2008) *Glycobiology* 18, 114-124.
 11. T. Kizaki, T. Izawa, T. Sakurai, S. Haga, **N. Taniguchi**, H. Tajiri, K. Watanabe, N. K. Day, K. Toba, and H. Ohno. beta(2)-Adrenergic receptor regulates Toll-like receptor-4-induced nuclear factor-kappaB activation through beta-arrestin 2. (2008) *Immunology* 124, 348-356.
 12. T. Nakagawa, E. Miyoshi, T. Yakushijin, N. Hiramatsu, T. Igura, N. Hayashi, **N. Taniguchi**, and A. Kondo. Glycomic analysis of alpha-fetoprotein L3 in hepatoma cell lines and hepatocellular carcinoma patients (2008) *J. Proteome Res.* 7, 2222-2233.
 13. Y. S. Kim, S. Y. Hwang, H. Y. Kang, H. Sohn, S. Oh, J. Y. Kim, J. S. Yoo, Y. H. Kim, C. H. Kim, J. H. Jeon, J. M. Lee, H. A. Kang, E. Miyoshi, **N. Taniguchi**, H. S. Yoo, and J. H. Ko. Functional proteomics study reveals that *N*-Acetylglucosaminyltransferase V reinforces the invasive/metastatic potential of colon cancer through aberrant glycosylation on tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (2008) *Mol. Cell Proteomics* 7, 1-14.
 14. H. Tian, E. Miyoshi, N. Kawaguchi, M. Shaker, Y. Ito, **N. Taniguchi**, M. Tsujimoto, and N. Matsuura. The implication of *N*-acetylglucosaminyltransferase V expression in gastric cancer (2008) *Pathobiology* 75, 288-294.
 15. R. Akama, Y. Sato, Y. Kariya, T. Isaji, T. Fukuda, L. Lu, **N. Taniguchi**, M. Ozawa, and J. Gu. Ω *N*-acetylglucosaminyltransferase III expression is regulated by cell-cell adhesion via the *E*-cadherin-catenin-actin complex (2008) *Proteomics* 8, 3221-3228.
 16. Y. S. Kim, O. L. Son, J. Y. Lee, S. H. Kim, S. Oh, Y. S. Lee, C. H. Kim, J. S. Yoo, J. H. Lee, E. Miyoshi, **N. Taniguchi**, S. M. Hanash, H. S. Yoo, and J. H. Ko. Lectin precipitation using phytohemagglutinin-L(4) coupled to avidin-agarose for serological biomarker discovery in colorectal cancer (2008) *Proteomics* 8, 3229-3235.
 17. **N. Taniguchi**. Toward cancer biomarker discovery using the glycomics approach (2008) *Proteomics* 8, 3205-3208.

糖鎖を用いた肺気腫治療薬開発の試み

分担研究者 松本 明郎 大阪大学微生物病研究所 寄附研究部門准教授

研究要旨 コアフコースを付加する唯一の糖転移酵素である α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ(Fut8)の欠損マウスは、肺気腫を自然発症する。その分子機構は、主に膜表面の受容体タンパク質が糖鎖修飾により機能制御されている点にあると考えられている。すなわち、受容体から下流へ伝わるシグナルがコアフコースの欠損により減弱し、MMP(マトリックスメタロプロテアーゼ)の活性が上昇する。これにより、肺胞における細胞外マトリクスの破壊が亢進し、気腫化が進行すると考えられている。そこで、肺胞破壊の直接的因子として作用するMMPの活性を制御することにより、肺気腫の治療へ結びつく治療戦略を提供できないか検討した。特に、これまで副作用の面で実用化されなかったMMP阻害薬を全く新たな観点から開発し、薬剤としての有効性の検討を行った。肺気腫の進展抑制剤としての使用を念頭に置いて開発された本薬剤は、生体物質由来であり生体適合性が高いと考えられる。さらに、現在用いられている合成MMP阻害剤の効果と比較しても、ほぼ同程度までの阻害活性を発揮することを認めた。本化合物をモデル動物へ適用したところ、炎症性反応等は示唆されず、生体適合性が高いと考えられた。今後、投与方法等に関する検討の後、肺気腫の進展抑制効果をモデル動物等を用いて検討していく必要がある。これらの物質は、これまで試みられたことのない新たな肺気腫の治療薬となる可能性を持つと考えられる。

A. 研究目的

肺気腫と慢性気管支炎を総称して慢性閉塞性肺疾患(COPD)と分類され、日本国内だけでも500万人以上が罹患していると言われる主要疾患の一つである。その患者数は世界的にも増加の一途をたどり、今後死因の第4位になると予測されている。しかし、現在のところ特異的な治療法は開発されておらず、対症療法に頼らざるをえないのが現実である。肺気腫の患者では、肺の間質の主成分であるプロテオグリカンが分解され間質の機能を失い、肺胞破壊が進展すると考えられている。しかし、その

発症原因や増悪機構などについては、新たな治療方法の開発のため詳細な解明が望まれているところである。我々はコアフコースを付加する唯一の糖転移酵素である α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ(Fut8)の欠損マウスが肺気腫を自然発症することを見出した。このマウスではTGF- β 受容体のフコシル化度が低下していること、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の遺伝子発現が亢進し、MMP-9,12,13などの発現・活性が亢進していることなどが報告されて来た。それに関連して、肺胞の間質成分であるプロテオグリカンや、コラーゲン、エラスチンなどが

MMPにより破壊され、肺胞間質の合成と分解のバランスが破綻し、肺胞破壊が進展すると考えられている。

ヒト肺気腫においても、MMPの活性化が原因であると報告も数多い。現在、肺気腫を含む慢性閉塞性肺疾患(COPD)の治療は、禁煙・気管支拡張剤の投与などの対症療法が中心である。依然として特異的な治療法は確立されておらず、分解酵素をターゲットとした治療法も確立されていない。そのため、新たな機序でCOPDの病態を制御できる治療手段の開発が急務となっている。これまで、MMP阻害剤の開発は幅広く進められ阻害効果の十分に高いものも見いだされてきた。しかし、いずれも生体に投与した場合には強い副作用等のため継続した適用を行うことが難しく、治療法として用いられるところまではいっていない。そこで、我々は生体親和性の高い生体物質に着目し、MMP阻害活性を持つ化合物を見出した。本化合物のMMP阻害活性の検討を通して、新たな肺気腫の治療戦略を提供することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

MMPは主にマクロファージより放出され、肺胞壁を分解する。肺胞壁構成成分と同様の物質より、MMP基質と競合し阻害活性を示すものを *in vitro* の系で検索した。まず、MMP活性の測定系ならびにスクリーニング系を確立した。RAW264.7細胞はMMPを分泌するため、無血清培地中に産生されたMMPを酵素源として用いた活性測定系を確立した。RAW264.7細胞から得られた無血清培地を分子量三万カットの遠心式フィルターユニット(限外濾過)を用いて濃縮することにより、Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) や小さい分子量の細胞外マトリ

クス成分などを除去した。除去された分画には、細胞由来のMMP阻害剤が含まれていると考えられる。タンパク質濃度をおよそ20 mg/mlまで濃縮した溶液をMMP酵素原液としてもちいた。活性測定はMMPに汎用性のある合成基質として、 $\{DNP-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH_2$ [Cha = B-cyclohexylalanyl; Abz = 2-aminobenzoyl (anthraniloyl)]を最終濃度4mMにて用いた。この基質はMMPにより分解されると蛍光(Ex. 365nm, Em.450 nm)を発するようになるため、分解産物量を経時的に測定することができる特徴を有する。MMP阻害剤の代表としては、広範なMMP阻害活性を有するGM-6001を用い、同等のMMP活性阻害効果を有するものを見いだすことを目標として、各種生体物質をスクリーニングした。この結果、4種類の化合物がGM-6001と同等のMMP阻害活性を有していることを見出した。

続いて、これらの物質の生化学的な阻害活性を検討した。精製MMPタンパク質への結合定数を求めた。また、類似した構造を持つ物質のMMP阻害活性を比較し、構造と阻害活性の関連性に付いて検討した。さらに、実際に生体内においてMMPの基質として分解される物質を *in vitro* で用いての阻害活性の検討や、MMP活性に由来した高浸潤性を示す培養細胞を用いての浸潤能の阻害効果も検討し、MMP阻害活性の評価を行った。

C. 研究結果

昨年度から開始した細胞外基質に含まれる糖鎖関連物質に対するスクリーニングを継続した。マクロファージ培養上清より得られたMMPのみによる活性測定値を100%とし、各種物質を添加したことによる活性測定値の

低下度を指標として比較検討した。阻害活性の指標としては、既知の合成汎 MMP 阻害剤である GM-6001 を用いた。スクリーニングは基本構造の異なる十種類の糖鎖関連物質グループに対して実施した。それぞれのグループは分子量が 900 kDa から 1 kDa までのものを含み、さらには側鎖の修飾基、修飾部位も異なるものの組み合わせで構成された。計 33 種類の代表的な糖鎖関連物質のうち、4 種類が GM-6001 と同等の MMP 活性抑制効果を示した。さらに、MMP 酵素を活性測定系に個別に用い、これらの化合物の MMP アイソザイムに対する特異性を検討した。MMP-9 活性の抑制作用は濃度依存的であり、 K_m は約 0.8 mM であった。さまざまな分子量の糖鎖、構造や側鎖修飾に違いを持つ物質を用いて、MMP 阻害活性とこれらの物質の構造相関を比較した結果、分子量が小さい化合物の方がより高い阻害活性を有することが示された。側鎖に対する修飾と阻害活性との相関性についても知見が得られ、今後より詳細に検討していくことが必要である。さらに、生体内で MMP の酵素分解作用を受ける Osteonectin を用いた検討では、この化合物存在下においては、MMP による分解が著しく減弱した。これらの化合物の MMP 阻害機構については未だ不明であるが、生体内基質との競合阻害あるいは MMP に対する拮抗阻害であろうと考えられている。また、MMP 活性に依存した細胞の走化性は免疫応答や組織修復及び再生などの様々な段階に関与していることが知られており、がんや関節炎などの疾患の進行に極めて重要な役割を持つ。ヒト線維肉腫由来細胞である HT1080 細胞は、MMP 活性依存性に遊走性を示す。この遊走性を指標として、HT1080 細胞における MMP 活性の阻害効果を検討した。無血清培地で培養した HT1080 細胞を collagen コートした transwell に播き、10%

FCS 培地へ向かったの走化性を検討した。GM-6001 は有意に HT1080 細胞の遊走性を抑制した。そこで、同様の系に対して本化合物を添加したところ、HT1080 細胞の遊走性の減少が観察された。さらに、この化合物の生体親和性を検討するため、マウスの気道内へ粉霧投与した際に、気管支肺胞洗浄液における白血球や炎症細胞の浸出を検討したが、有意な変化は認められなかった。これより、少なくとも投与局所における炎症惹起作用は少ないと考えられた。

なお、本化合物に関しては特許出願のため、具体的な物質データ並びに活性測定値データの収録を割愛した。

D. 考察

肺気腫に対する新たな治療戦略として、MMP 活性阻害能を有する新規化合物を提供した。本化合物は、既知の合成汎 MMP 阻害薬である GM-6001 と同程度に MMP 活性の阻害効果を有することを見出した。中でも、肺気腫の発症に強く関わっていると報告された MMP-9 ならびに MMP-12 に対する特異的阻害活性を有していることも明らかとなった。これまで、MMP 阻害薬は抗がん剤などとして多くの物質が開発されてきたが、その多くは MMP アイソザイムに対する選択性が低く、多くの MMP を抑制してしまう。これらの薬剤を全身投与した場合、継続した投与を断念させてしまうほどの Musculoskeletal Syndrome などの副作用を生じる。そのため、いずれも臨床適用される所までは至っていない。

本年度成果として見いだしたような糖鎖関連物質は、実際の肺胞壁にも生理的に存在する物質である。さらに、分子量からも血管壁の透過性が低く、局所投与により重篤な副作用が仮にあったとして回避できるであろうとも考

えられる。従来の合成 MMP 阻害薬と比較して、副作用の回避にもつながるであろうと予測される。

現在のところ、今回発見した糖鎖関連物質がどのようにして MMP 活性を阻害しているのかについては不明である。糖鎖関連物質のスクリーニング結果を総合してみると、側鎖の電荷と母骨格構造が相互に関連して MMP との結合力に差が生じ、それにより MMP 活性の阻害効果に差が生じるものと考えられている。より高性能の阻害物質の開発を行うためにも、側鎖の改変や翻訳後修飾による MMP 酵素の阻害効果の分子機構を明らかにすることは、大いに期待されているであろう。

疾患形成に関わる糖鎖異常を学術的背景に持ち、そこから派生した薬剤を、これまで有効な特異的治療法がなかった肺気腫の治療薬として実用化して用いることはもちろんのこと、MMP が関与している各種疾患、がん・線維症・炎症性疾患などに対しても適用することも考えられる。本化合物の発見は、将来的に幅広い適応が期待されるといえるであろう。

E. 結論

本年度の研究より検討した MMP 阻害活性を持つ糖鎖関連物質は、肺気腫に対する治療戦略を提供する手段となりうると考える。また、この糖鎖分子の構造特異性を生かしたさらなる治療薬の開発に繋がる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Zhao Y, Takahashi M, Gu J, Miyoshi E, Matsumoto

A, Kitazume S, Taniguchi N. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer (2008) *Cancer Sci*, **99**, 1304-10

2. Wang X, Fukuda T, Li W, Gao CX, Kondo A, Matsumoto A, Miyoshi E, Taniguchi N, Gu J. Requirement of Fut8 for the expression of vascular endothelial growth factor receptor-2: a new mechanism for the emphysema-like changes observed in Fut8-deficient mice (2009) *J Biochem*. In Press.

2. 学会発表

(国内学会)

1. α 1,6 フコース転移酵素(Fut8) 遺伝子ヘテロ欠損マウスは喫煙により肺気腫をきたしやすい。高叢笑、前野敏孝、松本明郎、是金宏昭、太田美美、別役智子、顧建国、谷口直之 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 神戸 2008 年 12 月 9~13 日

研究協力者

高 叢笑 (ヒューマンサイエンス振興財団)

是金 宏昭 (大阪大学微生物病研究所)

太田美美 (大阪大学微生物病研究所)

分担研究報告書

糖鎖シグナルの異常による肺気腫の発生機構の解明と治療戦略

～フコシル化のメカニズム解析について～

（分担研究者） 三善 英知 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 糖転移酵素 Fut8 ノックアウトマウスにおいて、肺気腫様の変化が見られた。その分子機構としては、主として膜表面に存在する様々な糖タンパク質のフコース欠損が、細胞内シグナル伝達を変化させ、細胞外マトリクスの破壊を亢進させるものと考えられる。私達のグループでは、フコースによる糖鎖付加（フコシル化）反応に関わる分子群の糖鎖修飾への関わりについて検討している。平成 19 年度には、ドナー基質ならびにゴルジに存在するトランスポーターがフコシル化反応に重要であることを報告した。本年度は、フコシル化糖鎖が血清マーカーとして有用である一例として IgG の糖鎖解析による炎症性腸疾患の鑑別法を発表し、他の分担研究者の参考にしていただいた。また最終年度としては、動物実験や臨床薬剤の効果判定が中心となるため、大阪大学医学部附属実験施設で、引き続き Fut8 ノックアウトマウスの系統維持を行なった。

A. 研究目的

フコースによる糖鎖付加（フコシル化）反応の欠損によって、マウスの肺気腫様病変が認められることが明らかになった。私達の研究室では、10 年以上にわたりフコシル化の生物学的な意味とフコシル化制御機構の研究を続けて来た。最終年度としては、動物実験や臨床薬剤の効果判定が中心となるため、大阪大学医学部附属実験施設で、引き続き Fut8 ノックアウトマウスの系統維持を行い、研究の補助を行なった。また、フコシル化糖鎖の疾患マーカーとしての有用性を紹介するため、IgG の糖鎖解析による炎症

性腸疾患の鑑別法の実例を分担研究者の前で紹介した。

B. 研究方法

インフォームドコンセントを得た炎症性腸疾患の患者血清から、IgG を精製し、その糖鎖構造を既報に従って HPLC で解析した。コントロールとしては、aged-match の健康人に加えて、急性腸炎などの disease control を用いた。各疾患患者由来の IgG の糖鎖のパターンを、臨床的パラメータと比較検討した。Fut8 KO マウスのについては、Balb/c と Black 6 の 2 系統を、従来の PCR による方法でスクリーニングし、

ヘテロマウスとして系統維持した。また、他の実験で作成中のガラクトース転移酵素ノックアウトマウス(Gal-T KO マウス)と交配実験を行ない、肺病変を観察した。

C. 研究結果

年間、約150匹のマウスをスクリーニングした。ヘテロマウスは、ホモに較べるとほとんど死亡することなく、系統維持が行なえた。同じくGal-T KO マウスもホモマウスは死亡するケースが多かったが、ヘテロマウスに関しては wild とよく似た成育状況を示した。Fut8 KO マウスとGal-T KO マウスとのヘテロ同士の交配では、肺気腫様病変が少し悪化している傾向にあった。一方、炎症性腸疾患のIgG糖鎖解析では、IgGのガラクトース欠損率がクローン病>>潰瘍性大腸炎>健常人=疾患コントロールと有意差を認めた。しかも、この傾向を認めた糖鎖は、フコシル化されたIgGにのみ認められ、非フコシル化IgGでは有意差を認めなかった。クローン病、潰瘍性大腸炎ともにフコシル化糖鎖のガラクトース欠損率は、それぞれの臨床的重症度に相関した。また、炎症性腸疾患の血清マーカーとして従来から知られているASCAに較べて、IgGの糖鎖解析は感度、特異性において優れていることがわかった。

D. 考察

Fut8 KO マウスとGal-T KO マウスとのヘテロ同士の交配から、糖鎖の変化は肺胞の形成や肺気腫の発生に、重要であることがわかった。ガラクトース欠損IgGは、慢性関節リウマチなどの自己免疫性疾患で上昇することが、古くか

ら知られて来た。しかし、炎症性疾患では、何故フコシル化糖鎖のガラクトース欠損率にのみ差を認めたのか、興味深い点である。肺気腫は全身性の炎症疾患という説もあり、こうした慢性炎症疾患とフコシル化糖鎖の関係は、今後追究すべき課題と言える。なお本年度は、こうした研究補助的な役割しか担わなかったため、分担研究費は0円で、研究のアドバイスのみを行なった。

E. 結論

Fut8 KO マウスの系統維持を行なった。Gal-T KO マウスとの交配によって、肺気腫様病変の悪化傾向を認めた。炎症性腸疾患の血清IgGの糖鎖解析によって、フコシル化ガラクトース欠損IgGが、新しい鑑別診断法となる可能性が示された。

F. 研究発表(今年は、直接厚生科研に関与した論文は、ありませんが、以下に糖鎖研究として公表した内容を示します。)

1. 論文発表

英文原著

1. Kim YS, Hwang SY, Kang HY, Sohn H, Oh S, Kim JY, Yoo JS, Kim YH, Kim CH, Jeon JH, Lee JM, Kang HA, Miyoshi E, Taniguchi N, Yoo HS, Ko JH. Functional proteomic study reveals that *N*-acetylglucosaminyltransferase V reinforces the invasive/metastatic potential of colon cancer through

- aberrant glycosylation on TIMP-1 (2008) *Mol Cell Proteomics* 7(1), 1-14.
2. Nakano M, Nakagawa T, Ito T, Kitada T, Hijioka T, Kasahara A, Tajiri M, Wada Y, Taniguchi N, **Miyoshi E**. Site-specific analysis of *N*-glycans on haptoglobin in sera of patients with pancreatic cancer: A novel approach for the development of tumor markers (2008) *Int J Cancer*, 122(10), 2301-09.
 3. Nakagawa T, **Miyoshi E**, Yakushijin T, Ikura H, Hiramatsu N, Hayashi N, Taniguchi N, Kondo A. Structural and enzymatic bases of *N*-glycans of alpha-fetoprotein L2 and L3 from hepatoma cell lines and hepatocellular carcinoma patients (2008) *J. Proteome Research* 7(6), 2222-2233.
 4. Kim YS, Son OL, Lee JY, Kim SH, Oh S, Lee YS, Kim CH, Yoo JS, Lee JH, **Miyoshi E**, Taniguchi N, Hanash SM, Yoo HS, Ko JH. Lectin precipitation using phytohemagglutinin-L(4) coupled to avidin-agarose for serological biomarker discovery in colorectal cancer (2008) *Proteomics* 8(16), 3229-3235.
 5. Tian H, **Miyoshi E**, Kawaguchi N, Shaker M, Ito Y, Taniguchi N, Tsujimoto M, Matsuura N. The implication of N-acetylglucosaminyltransferase V expression in gastric cancer (2008) *Pathobiology* 75(5), 288-94.

英文総説

1. Takahashi M, Yokoe S, Asahi M, Lee S, Li W, Osumi D, **Miyoshi E**, Taniguchi N. *N*-glycan of ErbB family plays a crucial role in dimer formation and tumor promotion (2008) *Biochimica et Biophysica Acta* 1780(3), 520-524.
2. **Miyoshi E**, Moriwaki K, Nakagawa T. Biological Function of Fucosylation in Cancer Biology (2008) *J. Biochem.* 143(6), 725-729.
3. Zhao Y, Sato Y, Isaji T, Fukuda T, Matsumoto A, **Miyoshi E**, Gu J, Taniguchi N. Branched *N*-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins (2008) *FEBS J.* 275 (9), 1939-1948.
4. Zhao Y, Takahashi M, Gu J, **Miyoshi E**, Matsumoto A, Kitazume S, Taniguchi N. Functional roles of *N*-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer (2008) *Cancer Sci.* 99(7), 1304-1310.

2. 学会発表

(国際学会)

1. 2008 AACR Annual Meeting, San Diego April 12-16
Moriwaki K, Noda K, Nakagawa T, Taniguchi N, **Miyoshi E**. A high expression of GDP-fucose transporter in hepatocellular carcinoma is a key factor for increases in fucosylation.
2. 2008 HGPI meeting, Fort Worth November 13,
Moriwaki K, Sasaki N, Uozumi N, Takeishi S,

Taniguchi N, Miyoshi E. Oligosaccharide is a novel marker for the isolation of hepatic progenitor cells.

3. 2008 Annual Conference of the Society for Glycobiology, Fort Worth, November 12-15 Takeishi S, Nakagawa T, Moriwaki K, Ogawa T, Fujita H, Taniguchi N, Yamada M, Miyoshi E. Glycomic analysis of glycoproteins in bile and serum during rat hepatocarcinogenesis, using lectin microarray.
4. 2008 Annual Conference of the Society for Glycobiology, Fort Worth, November 12-15 Nakajima K, Kitazume S, Fujinawa R, Miyoshi E. Taniguchi N. Simultaneous determination of nucleotide sugars in glycosylation with ion-pair reversed-phase HPLC.

(国内学会)

一般演題

1. 肝臓、慢性肝疾患における糖鎖異常を血清診断で評価するストラテジーの開発 三善英知、北爪しのぶ、橋本康弘、森脇健太、松本 仁、加藤道夫、笠原彰紀、谷口直之、林 紀夫 第 45 回日本肝臓学会総会 愛媛 平成 20 年 6 月 5-6 日
2. 糖鎖修飾に関わる糖ヌクレオチドの一斉定量法 中嶋和紀、北爪しのぶ、藤縄玲子、三善英知、谷口直之 日本ヒトプロテオーム機構第 6 回大会 平成 20 年 7 月 29-30 日 大阪
3. 肝がん培養細胞由来および肝細胞がん患者由来の

- AFP-L3 の糖鎖構造解析 中川孝俊、三善英知、薬師神嵩行、平松直樹、井倉 枝、林 紀夫、谷口直之、近藤昭宏 第 28 回日本糖質学会年会 平成 20 年 8 月 18-20 日 筑波
4. 疾患マーカーとしての α 2,6-シアロ糖タンパク質 橋本康弘、奈良清光、二川了次、亀高 愛、遠山ゆり子、星 京香、杉本一路、今牧理恵、岡 律子、小川加寿子、三善英知、谷口直之、北爪しのぶ 第 28 回日本糖質学会年会 平成 20 年 8 月 18-20 日 筑波
 5. 生体内での ST6GalII 分泌の分子的機序 北爪しのぶ、小川加寿子、二川了次、立田由里子、萩原良明、滝川 一、加藤道夫、笠原彰紀、三善英知、橋本康弘、谷口直之 第 28 回日本糖質学会年会 平成 20 年 8 月 18-20 日 筑波
 6. 肝臓における GDP-fucose transporter によるフコシル化制御について 森脇健太、野田勝久、谷口直之、三善英知 第 28 回日本分子腫瘍マーカー研究会 平成 20 年 10 月 27 日 名古屋
 7. 新しい膵癌の腫瘍マーカー、フコシル化ハプトグロビンの産生機序と簡易アッセイの確立 三善英知、成定 愛、奥山紀子、桑本佳奈、森脇健太、中川 勉、松本 仁、中の三弥子、谷口直之、小山信人 第 67 回日本癌学会総会 平成 20 年 10 月 28-30 日 名古屋
 8. HepG2 細胞において糖蛋白質のフコシル化は、微小胆管様構造内への分泌を制御する 中川 勉、津田沙織、桑本佳奈、森脇健太、中川 勉、松本 仁、谷

口直之、三善英知 第 67 回日本癌学会総会 平成

20 年 10 月 28～30 日 名古屋

シンポジウム／ワークショップ

1. ハプトグロビンの部位特異的糖鎖解析による新規腫瘍マーカーの開発と応用 三善英知、中の三弥子、谷口直之、成定 愛、河本早百合、森脇健太、中川勉、松本 仁、野田勝久 日本ヒトプロテオーム機構
第 6 回大会 平成 20 年 7 月 29-30 日 大阪

受賞歴：

1. 第 28 回日本分子腫瘍マーカー研究会 学術奨励賞受賞 肝癌における GDP-fucose transporter によるフコシル化制御について 森脇健太、野田勝久、谷口直之、三善英知

G 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録
3. その他

コアコース欠損に伴う肺気腫の病態変化とその分子メカニズム

分担研究者 願 建国 東北薬科大学 薬学部 教授

研究要旨 Fut8 欠損マウスにおいて、TGF- β 1 受容体 II 型のコアコースの欠失が TGF- β 1 への結合能を低下させることによって、Smad2 へのシグナル伝達が障害され、細胞外マトリックス(ECM)合成系の低下分解系の亢進が、肺気腫を引き起こす要因と考えられてきた。一方、最近 Fut8 欠損マウスの肺気腫の原因は、TGF- β 受容体の機能低下だけでなく、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)受容体の発現低下とその結果生じるセラミドの生合成亢進により、肺胞アポトーシスが誘導されるためであるという新たな肺気腫発症メカニズムを明らかにした。

A. 研究目的

Fut8欠損マウスの肺において認められる肺気腫発症の分子メカニズムの一つとして、細胞増殖抑制作用を有す TGF- β 受容体を介するシグナル伝達が受容体のコアコース欠損により抑制されるためであることを明らかにしている。しかし、生体内でコアコースの修飾を受けるタンパク質は他にも数多く存在する。さらに、ヒトでは、タバコや大気汚染など有害な粒子やガスを吸い込み続けることによって、肺に炎症が持続的に起こった状態になることが肺気腫の原因と考えられているが、その発症メカニズムについては未解明である。このため本研究では、詳細なヒトの肺気腫発症のメカニズムを明らかにするため、コアコース欠損に起因する新たな発症メカニズムの存在を証明することを目的として、最近、肺形成

に重要と言われている VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor; 血管内皮細胞増殖因子)を介するシグナル伝達系について解析を行った。

B. 研究方法

最近、肺気腫の患者においては、VEGFRの発現が抑制され、その結果、セラミドの生合成が亢進し、アポトーシスが誘導されることが報告された。そこで、VEGFR と Fut8 欠損による肺気腫発症との関係を調べるため、まず Fut8 欠損マウスの肺組織における VEGFR の発現を RT-PCR およびウエスタンブロットによって調べた。また、その発現は免疫組織染色によって確認した。また、Fut8とVEGFRとの直接的関係を確認するため、小細胞肺癌細胞 A549 に RNAi (RNA 干渉) 手法を用いて、

Fut8 をターゲットにしたノックダウンを行った。Fut8 に対する siRNA 発現プラスミドの導入はウイルスベクターを用いた。薬剤による恒常的発現株を選択したのち、Fut8 の発現低下は RT-PCR および活性測定を用いて確認した。対照には、野生型の細胞とベクターのみを導入したものを用いた。それぞれの細胞における VEGFR の発現量は Real-time PCR およびウエスタンブロットにより確認した。

(倫理面への配慮)

動物実験は「東北薬科大学動物実験指針」に基づいて行った。

C. 研究結果

VEGFR の発現量は、7、18日齢および2ヶ月のFut8ノックアウトの肺組織を用いてウエスタンブロットにて調べた。野生型に比べ、ノックアウト肺組織でのVEGFRの発現量が低下しているのが認められた。一方、EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor; 上皮成長因子受容体) やTGF- β 1受容体II型など他の受容体の発現に変化は認められなかった。その発現低下は免疫組織染色によって確認された。さらに、A549細胞にFut8遺伝子をノックダウンすることにより、VEGFR の発現量がmRNA およびタンパク質レベルにおいて減少することが認められた(Wang, X., et al. JB in press)。以上のことから、Fut8は VEGFRの発現に必須であることが強く示唆されました。

次に、肺気腫の患者の肺組織に見られるセラミドの生

合成の亢進およびアポトーシスの増加について、Fut8欠損マウスの肺組織を用いて免疫組織染色によって調べた。その結果、野生型マウスに比べ、18日齢および4ヶ月のFut8欠損マウスの肺組織において、アポトーシスを誘導するセラミドの発現亢進が見られた。従って、アポトーシス病理像の増加も観察された。一方、肝臓、脾臓、心臓および腎臓においては、野生型とノックアウトマウスと間に顕著の差が認められなかった。以上の結果は、Fut8は VEGFR の発現に重要であり、肺組織の正常な形成に必須であることを強く示している。

D. 結論および考察

本研究により、Fut8欠損マウスにおいてVEGF受容体を介した新たな肺気腫発症の分子メカニズムを明らかとなった。細胞レベルでの Fut8のノックダウンによるアプローチにより、VEGFR の発現量が著しく減少したことから、Fut8欠損マウスに見られる肺気腫は従来報告してきたTGF- β 1受容体II型とリガンドの結合が弱くなることで、下流のシグナルが阻害され、MMPの発現が誘導されることに加え、VEGFのシグナルが低下することで、セラミドが増加し、その結果アポトーシスが誘導されることによるものが推測される。

いずれにせよ、コアフコースの欠失がヒトの肺気腫の一因になっている可能性は高いと考えられる。今後は Fut8がどのように VEGF 受容体の発現を調節するか解析する。また、肺気腫に関わる要因のすべてスペクトルを明らかにすると同時に、糖鎖による予防および治療薬の開発を目