

東北薬科大学

審査学位論文（博士）要旨

氏名（本籍）	タツ タケオ 立田 岳生（宮城県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	薬学 第 123 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条 2 項該当
学位論文題名	カエル卵由来シアル酸結合性レクチン（レクザイム） の抗腫瘍作用機構の解明
論文審査委員	主査 教授 仁田 一雄
	副査 教授 石川 正明
	副査 教授 顧 建国

カエル卵由来
シアル酸結合性レクチン (レクザイム) の
抗腫瘍作用機構の解明

— 論文内容要旨 —

東北薬科大学大学院薬学研究科
分子生体膜研究所 分子認識部門

立田 岳生

カエル卵由来シアル酸結合性レクチン (レクザイム) の 抗腫瘍作用機構の解明

東北薬科大学大学院薬学研究科
分子認識学教室 立田 岳生

現代では、ヒトゲノムをはじめとする各種生物のゲノム配列が明らかになり、バイオインフォマティクス技術により塩基配列から遺伝子の探索、さらに遺伝子からタンパク質の生産およびその機能解析と、生命科学研究が飛躍的に発展している。一方で、生体内のタンパク質や脂質の多くが糖鎖修飾されていることが見いだされており、糖鎖によりそれらの分子機能が制御されていることが明らかになっている。したがって、生体内におけるタンパク質などの機能性分子の性状を解析するためには、糖鎖機能を含めた機能解明が不可欠となっている。糖鎖を認識する分子の中でも、動植物から微生物まで普遍的に存在しているレクチンは、細胞生物界における糖鎖情報の理解に大きく貢献してきた。レクチンは、近年の生命科学の進歩において、生体における情報分子として位置づけられる糖鎖の受け手として注目され、ポストゲノム時代に入った今日では、レクチンアレイを用いた新規腫瘍マーカーの探索など、グライコーム解析と呼ばれる最先端の技術に応用されている。

当研究室では、レクチンの糖鎖生物学に関する研究を行ってきた。ウシガエル (*Rana catesbeiana*) 卵由来のレクチンは、種々のがん細胞を凝集し、その凝集がシアロ糖タンパク質やガングリオシドで阻害されることから、新規のシアル酸結合性レクチン (sialic acid-binding lectin ; SBL) として Kawauchi らにより発見された。SBL の凝集活性は、がん細胞に対しては認められるが、赤血球や他の正常細胞では認めらず、さらにその凝集阻害実験の結果から、その凝集は、細胞表面のシアル酸を含む複合糖質への結合に起因するものと考えられている。SBL はまた、そのアミノ酸配列分析からリボヌクレアーゼ A ファミリーメンバーに相同性があることが明らかになり、実際にピリミジン塩基特異的リボヌクレアーゼ活性を持つことが示されている。これらのことから、酵素活性をもつレクチンという意味でレクザイム (lectzyme ; lectin+enzyme) と呼ばれている。さらに、その抗腫瘍活性についても検討され、*in vitro* でマウス白血病細胞 P388 細胞や L1210 細胞の増殖を、*in vivo* で S-180, Ehrlich および Mep II 腹水がん細胞の増殖を抑制することが報告されている。この作用は、SBL の「細胞表面のシアル酸を含む糖鎖を認識して結合する」レクチン活性と「細胞の生存に必要な RNA を分解する」リボヌクレアーゼ活

性が協働することにより発揮されると考えられている。SBL は従来の DNA 複製を標的とする抗がん剤とは異なる，“RNA”を標的とした新しい抗がん剤としての応用が期待される。一方で，その抗腫瘍作用機序の解明が重要な課題となっている。本研究では，SBL の臨床応用を目標に，SBL の抗腫瘍作用機構の解明を試みた。

第一章では，数種のヒト白血病細胞株に対する SBL の有効性およびその作用機序について検討したところ，SBL が多剤耐性を含む種々のヒト白血病細胞に対して細胞毒性を示すことが明らかになった。SBL 誘導アポトーシスのシグナル解析から，その作用機序として，SBL はがん細胞表面に結合した後，取り込まれ，細胞内で RNA を分解し，その後，ミトコンドリアの障害を引き起こし，最終的に，カスパーゼカスケードを活性化する。これらのことから，アポトーシスシグナルが増強され，細胞死に至ると予想された。さらに，このプロセスには p38 や c-jun N-terminal kinase (JNK) の活性化が関与している可能性が示唆された。

第二章では，がん治療における標的として注目を集める小胞体ストレスの，SBL 誘導アポトーシスに対する関与について検討した。その結果，SBL は，小胞体ストレスによる unfolded protein response (UPR) を誘導することが示され，またカスパーゼ -4 の活性化による小胞体ストレス性アポトーシスを誘導することが示唆された。SBL 誘導アポトーシスに対する小胞体ストレスの関与について検討した結果，SBL が誘導するアポトーシスにおいて，ミトコンドリア障害と小胞体ストレスはそれぞれ独立して誘導されることが示された。また，アポトーシスのシグナル伝達において，ミトコンドリア障害によるカスパーゼ -9 の活性化が，一部カスパーゼ -4 の活性化に関与している可能性が示唆された。

第三章では，難治性腫瘍である悪性中皮腫細胞に対する SBL の有効性と，SBL および Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) における相乗的抗腫瘍効果ならびにその作用機序について検討した。悪性中皮腫および正常中皮由来細胞を用いた実験から，SBL が悪性細胞選択的にアポトーシスを誘導することが示された。さらに SBL と TRAIL の併用により相乗的アポトーシス誘導効果が認められた。この併用効果においては，ミトコンドリア異常，カスパーゼ-9 の活性化，カスパーゼ -3 の活性化を介し，さらにカスパーゼ -8 および Bid の活性化が増強されるという，一連の amplification loop の活性化によることが示唆された。また SBL により誘導されるアポトーシスシグナルに，Bik や Bim あるいは JNK や p38 が関与している可能性が示された。

第四章では，glycosphingolipid-enriched microdomain (GEM) に存在することが報告されている Hsp70 および Hsc70 が，SBL の抗腫瘍効果に及ぼす影

響について検討した。その結果、Hsp70 および Hsc70 が、SBL レセプター (SBLR) と同様にマウス白血病 P388 細胞膜上に発現していることが明らかになり、また SBL 誘導アポトーシスが実行期に入る直前に、細胞質の Hsp70 および Hsc70 が著しく増加するという興味深い知見を得た。また、quercetin による Hsp70 の発現減少は、SBL の P388 細胞に対する結合性に変化を与えないが、SBL 誘導アポトーシスの抑制を引き起こすことが明らかになり、Hsp70 が SBL の抗腫瘍効果に密接に関与している可能性が示唆された。

細胞膜上において、シアル酸は、通常、糖脂質や糖タンパク糖鎖の非還元末端に付加されており、分子のコンフォメーションや、認識・結合などに重要な役割を担っている。細胞表面の糖鎖変化はがんの特徴の一つであるが、特にシアル酸の変化は、転移や浸潤などの悪性形質に密接に関わっていると考えられている。近年でも、がん細胞表面のシアル酸高発現が、胃がんの転移と相関するという報告やまたシアル酸を標的とするイヌエンジュレクチンを、がん細胞の増殖や転移の抑制に応用する試みがなされている。SBL のレクチン活性に関しては、未だ不明な点も多いが、ムチンによる凝集阻害実験などの結果から、がん細胞への結合には、シアル酸を含む O- 結合型糖鎖の関与が示唆されており、これが SBL の悪性細胞選択性に関与している可能性がある。抗がん剤への応用が期待されているリボヌクレアーゼのがん細胞選択性に関しては、1) がん細胞表面では、シアル酸や硫酸基により陰性電荷が増加し、塩基性タンパク質であるリボヌクレアーゼの結合が促進されること、2) がん細胞内のゴルジ体の変異により、リボヌクレアーゼの細胞内輸送が正常細胞とは違うことなどがその選択性の要因となる可能性として報告されている。しかし、その詳細は明らかになっておらず、SBL のがん細胞選択性のメカニズムを明らかにすることが、リボヌクレアーゼによる細胞の認識・結合機構の解明に大きく役立つ可能性がある。

細胞毒性をもつリボヌクレアーゼは、その新しい機序による抗腫瘍効果から、がん治療への応用が期待され、近年でも新規リボヌクレアーゼを探索する研究が生物種を問わず行われており、ホンシメジ由来 LS リボヌクレアーゼ、ニガウリ由来リボヌクレアーゼ MC、ヒョウガエル由来 amphinase などに抗腫瘍活性が見いだされている。また、抗 CD 74 抗体や、抗 human EGFR-related 2 (HER2) 抗体とリボヌクレアーゼを融合させることで特定のがん細胞に対する選択性を高めようとする試みや、核移行シグナルを付加することにより リボヌクレアーゼの細胞内局在を変化させ、その作用を増強させる研究、さらにはヒト血清アルブミンと融合させ、特定

の臓器への蓄積を防ぐことで薬物動態学的に副作用を軽減させようとする研究など、最新の遺伝子工学・タンパク質工学技術を駆使し、がん細胞選択性あるいは抗腫瘍活性を増強するようなタンパク質変異体、融合タンパク質の作製を試みる研究も盛んに行われている。このように、リボヌクレアーゼは新規抗がん剤として期待される一方で、その作用機序、特にがん細胞選択性や、リボヌクレアーゼ活性による RNA 切断後、どのようにしてアポトーシスシグナルを伝達することになるのかについては、大きなブラックボックスとなっており、解決すべき課題である。

本研究において、レクチン活性およびリボヌクレアーゼ活性を併せもつ多機能性タンパク質である SBL は、多剤耐性細胞を含む種々のがん細胞に対し、悪性細胞選択的な抗腫瘍効果を示し、これまで用いられてきた DNA 傷害型薬剤に代わる、新しい抗がん剤として応用できる可能性が示唆された。また、作用機序を解析した研究から、Bcl-2 ファミリータンパク質や MAPK などのシグナル伝達分子、あるいは Hsp70 などの Hsp が SBL の抗腫瘍作用に対して密接に関与する可能性が示唆され、リボヌクレアーゼの抗腫瘍作用機序に関し、これまでに報告のない新しい知見を得た。さらに、特筆すべきことは、難治性がんとして社会的関心の高まっている悪性中皮腫に対して、SBL は選択的な抗腫瘍効果を示し、また TRAIL との相乗的な併用効果も確認されたことであり、本疾患に対する現行の非常に限られた薬物療法に、新たに効果的な選択肢を加えられる可能性が期待できる。

<参考文献> 主論文(原著論文)

1. Sialic acid-binding lectin (lecyzime) induces caspase-dependent apoptosis-mediated mitochondrial perturbation in Jurkat cells
Int. J. Oncol., 2013, **43**(5), 1402-1412.
2. Involvement of ER stress in apoptosis induced by sialic acid-binding lectin (lecyzime) from bullfrog eggs
Int. J. Oncol., 2013, **43**(6), 1799-1808.
3. Sialic acid-binding lectin (lecyzime) induces apoptosis to malignant mesothelioma and exerts synergistic anti-tumor effect with TRAIL
Int. J. Oncol., in press (DOI: 10.3892/ijo.2013.2192)
4. Down-regulation of Hsp70 inhibits apoptosis induced by sialic acid-binding lectin (lecyzime)
Oncol. Rep., in press (DOI: 10.3892/or.2013.2814)