

きのこ由来レクチンのがん診断への応用

株式会社 J-オイルミルズ 小林(袴田)夕香

はじめに

糖鎖研究は近年目をみはる進展を遂げてきました。基礎研究では多くの糖鎖の機能や役割が解明され、その知見や成果が医療分野に応用されるようになりつつあります^{1,2)}。現在、市販されているレクチンは約20~30種類であるが³⁾、2003年からのNEDOプロジェクトなどを経て、100種以上の有用なレクチンからなる「レクチンライブラリー」の構築した。その中の有用なレクチンは、癌診断への応用開発を進めた。

1. レクチンライブラリーの構築

2003-05年度には、NEDOプロジェクト「糖鎖エンジニアリング・糖鎖構造解析」に参画し、糖鎖とレクチンの相互作用を網羅的に調べる「ヘクト・バイ・ヘクト(100糖鎖×100レクチン)プロジェクト」への非市販レクチンの供給という役割を担った。その中で、必要とするレクチンをより選択的に探索する手法として、従来の赤血球凝集だけでなく、酵素で加工した赤血球を使う手法、水晶共振子マイクロバランス(QCM)などの機器を使う方法などを開発した。また実際に、それらの手法を組み合わせ、約1,000種の植物、動物、菌類の抽出液から新規レクチンの探索を試み、結果として3年間のNEDOプロジェクトの間に、59種類の新規レクチンを供給し、(独)産業技術総合研究所と共同でそれらの詳細な糖結合特異性の解析を行った。NEDOプロジェクト終了後も、さらに探索手法を開発・改良し、新たにキャピラリー電気泳動装置を使用して、糖鎖と結合する新規で有用なレクチンの探索をおこない、レクチンを精製し、特異性を評価し、レクチンライブラリーとして構築した。

2. 新規有用レクチンの発見

フコース糖鎖の修飾は、癌や炎症に関与していると言われており、 α 1-2, α 1-3, α 1-4, α 1-6など、その結合様式ごとに識別できるレクチンの需要は高い⁴⁾。現在、レンズマメレクチンを使った肝臓がんのマーカータンパク質である α -フェトプロテインの糖鎖変化を検出する手法が、肝臓癌の早期診断や予後判定に使用されている(AFP-L3%)^{5,6)}。

α 1-6フコース特異的レクチンとして有用なスギタケレクチン(*Pholiota squarrosa* lectin)を上記に記載したレクチンライブラリー構築の中で発見し、PhoSLと命名した。電気泳動、MALDI-TOF MS、N-末端アミノ酸配列分析の結果から、PhoSLはサブユニット分子量約4500、等電点pI 4.0の新規タンパク質であり、そのN末端アミノ酸配列はNH₂-APVPVTKLVCDGDTYKCTAYLDFGDGRWVAQWDTNVFHTG-OHであった。フロントアルフィニティークロマトグラフィー(FAC)による126種の糖鎖との糖結合性評価では、N型糖鎖の α 1-6フコース糖にのみ結合し、 α 1-2, 1-3, 1-4のような他のフコース糖鎖には結合しなかった(図1)。さらに、PhoSLは腫瘍マーカーである α -フェトプロテイン(AFP)のフコシル化されたAFP(AFP-L3)にのみ結合し、フコシル化されていないAFP(AFP-L1)には結合しなかった。レクチンのpH安定性はpH 2.0~11.0の間、温度安定性は0~100℃の間で安定であった(図2)⁷⁾。

3. 肝臓癌診断キットの開発と臨床応用

原発性肝臓癌(以下HCC)におけるAFP-L3分画の測定はAFPやPIVKA-IIなどと同様に、HCCの診断や治療効果の判定、再発の早期発見に役立っている。スギタケレクチン(PhoSL)

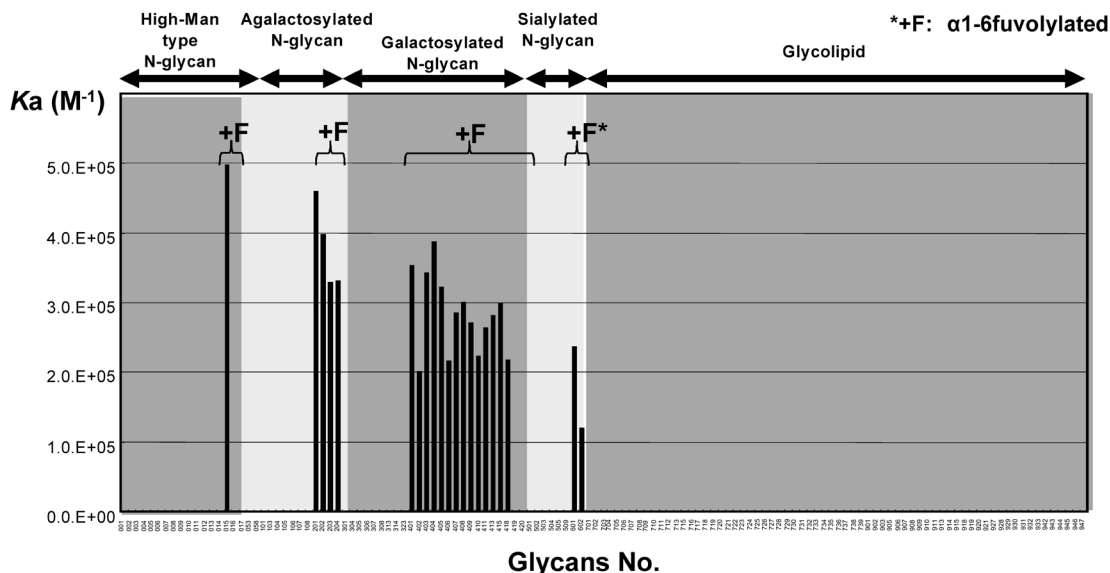


図1 PhoSLの糖鎖結合特異性

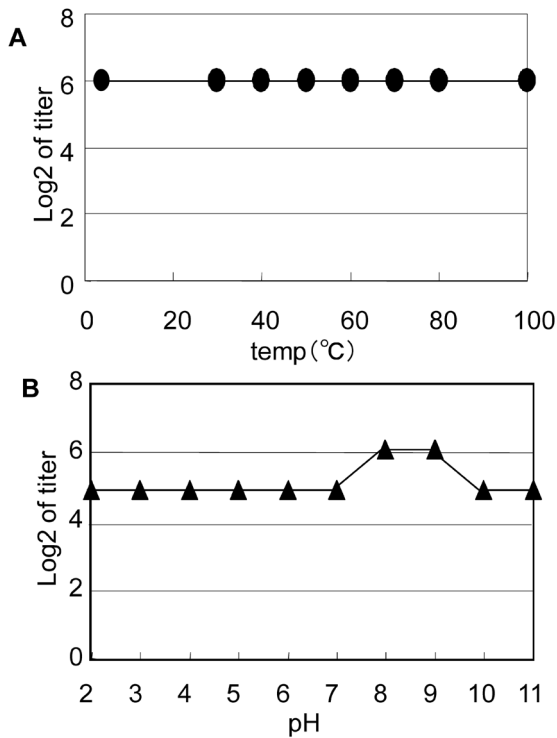


図2 PhoSLの安定性
(A. 温度安定性 B. pH安定性)

は上記に記載した通り、特異性・選択性が高く、安定性に優れていたことより、酵素免疫測定 (ELISA) 法に PhoSL を利用し、新しいフコシル化 AFP (AFP-L3) キットとして系を構築し、臨床的有用性を評価した。

対象は慢性肝疾患患者 50 例 (慢性肝炎・肝硬変 22 例, HCC 28 例) 並びに健常者 87 例を用いた。患者並びに健常者の血清中のフコシル化 AFP を新規に開発したフコシル化 AFP (AFP-L3) キットを用いて測定した。また、HCC 患者の癌組織部位を PhoSL 組織染色法を用いて癌細胞の発現を観察した。HCC 患者 28 例中担癌状態 14 例においては、AFP 陽性率 7 例 (50%)、PIVKA-II 陽性は 8 例 (57%)、通常の AFP-L3 は 6 例 (42%) であったのに比べ、フコシル化 AFP の陽性率は 9 例 (64%) で最も優れていた。またフコシル化 AFP はいずれの腫瘍マーカーとも相関は示さなかった。免疫組織染色では、HCC 患者由来の癌組織部位はレクチン染色されている症例があり、この患者の血清フコシル化 AFP 値は高かった。臨床試験の結果、PhoSL を利用したフコシル化 AFP の測定は、既知の腫瘍マーカーと異なった性能を示し HCC 患者の診断、治療効果の判定に有用なものになると考えられた⁸⁾。

4. 大腸癌診断への応用

大腸癌は多段階発癌の代表例であり、発癌から転移に至るそれぞれの過程において APC, K-ras, p53, DCC などの癌遺伝子/癌抑制遺伝子の異常が明らかとされており、様々な研究により悪性化を規定する分子の同定が進められている⁹⁾。

大腸癌組織におけるヒドロキサンタケレクチン (AAL) と PhoSL を用いた免疫染色を症例 139 例でおこなった。AAL は α 1-3/1-4/1-6 結合のフコースを認識し、PhoSL は α 1-6 結合のフコースをより特異的に認識する。この 2 種類のレクチンを使い、その染色レベルを比較することによりフコシル化の結合様式の違いを知ることができる。

正常組織の中の実質細胞は、AAL, PhoSL でわずかに褐色に染まる。その染色レベルを「弱陽性 (分類 1)」と定義した。この染色レベルを基準として、癌部が全体的に強く褐色に染まっているものを「強陽性」として「分類 3」に、強陽性よりも薄いが全体的に褐色に染まっているものを「陽性」として「分類 2」に、全く染まらなかったものを「陰性」として「分類 0」と評価した。染色結果を各組織の臨床背景に基づいて比較検討を行った。免疫組織学的検討の結果、正常に比べて原発癌では、全てのフコースが増加していたが、転移癌ではコアフコースのみが低下していた。このように、大腸癌の組織染色においては、原発癌と転移癌の組織表面上のフコシル化の違いを実証することができ、大腸癌診断の有用なツールであることが期待された。

おわりに

α 1-6 フコースの糖鎖変化は癌化に共通した糖鎖変化であることから、多くの種類のがん診断に応用できることを立証した。スギタケレクチン (PhoSL) はがんの基礎研究やがん化のメカニズム解明等の研究において有用なツールとなることが期待できる。レクチンの医療応用例はまだ多くはないが、今後、基礎研究が進展し「疾病マーカーとなる糖タンパク質」や「疾病に伴う糖鎖変化」が発見されるようになれば、それらを選択的に検出するレクチンを使った診断薬等が可能となるだろう。

謝辞 本研究は(株)J-オイルミルズにておこなわれたものです。本研究室において実験を一緒におこなっていただきました研究員の方々、終始ご指導いただきました研究所のみなさま、知財戦略部のみなさまに感謝致します。これまで適切にご指導を頂きました、静岡大学農学部河岸洋和教授、(独)産業技術総合研究所平林淳首席研究員、大阪大学医学部三善英知教授、石川町内科クリニック渡會伸治先生、並びに、ご指導いただきました多くの共同研究先の諸先生方に厚く御礼申し上げます。また、日々の研究を支えて頂きました(株)J-オイルミルズの数多くの方々に深く感謝いたします。

(引用文献)

- 1) 小林夕香, 河岸洋和, 糖鎖を認識する高分子: レクチン, BIO INDUSTRY, Vol. 27 (2): p 6-11 (2010).
- 2) 小林夕香, 日本農芸化学会中部支部主催 第163回若手シンポジウム, 糖鎖に着目した疾患に寄与できる「レクチンライブラリー」の開発 (2011).
- 3) Kobayashi Y, Tateno H, Ogawa H, Yamamoto K, Hirabayashi J., Comprehensive list of lectins: origins, natures, and carbohydrate specificities. Methods Mol Biol. 1200: p 555-77. (2014).
- 4) Miyoshi E, Moriwaki K, Nakagawa T, Biological function of fucosylation in cancer biology. J Biochem. Vol. 143(6): p 725-9 (2008).
- 5) Taketa K, Endo Y, et al.: Cancer Res., 53, 5419-5423 (1993).
- 6) 横山和則, 黒澤竜雄, 渡辺光雄, マイクロフリュイディスク技術を用いた全自動免疫蛍光測定装置 ミュータスワコー i30, 生物試料分析 Vol. 33, No 3 (2010).
- 7) Kobayashi Y, Tateno H, Dohra H, Moriwaki K, Miyoshi E, Hirabayashi J, Kawagishi H, A novel core fucose-specific lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa*. J Biol Chem. Vol. 287 (41): p 33973-82 (2012).
- 8) 渡會伸治, 松井弘斗, 小林夕香, 西藤桂子, 上野 泰, 癌治療学会原発性肝癌患者における新しいフコシル化 AFP の測定意義と臨床病理学的検討. 第69回日本消化器外科学会総会 (2013).
- 9) Voutsadakis IA. Pathogenesis of colorectal carcinoma and therapeutic implications: the roles of the ubiquitin-proteasome system and Cox-2. J Cell Mol Med. Vol. 11(2): p 252-85 (2007).