

「がん抑制遺伝子 EXTL2 によるグリコサミノグリカン鎖の制御機構」

神戸薬科大学

北川 裕之

1 研究の背景と目的

グリコサミノグリカン鎖は、コアタンパク質に結合したプロテオグリカンとして、線虫からヒトに至る生物の細胞表面や細胞外マトリックスに発現している。グリコサミノグリカン鎖は、様々な細胞増殖因子や細胞外マトリックス成分と相互作用し、細胞接着、移動、増殖、分化、形態形成といった多彩な細胞活動を制御している。これらグリコサミノグリカン鎖の機能発現は、生合成によって厳密に調節されていると考えられている。実際、グリコサミノグリカン鎖の生合成に関与する酵素遺伝子の変異が、様々な疾患を引き起こすことも見いだされている。グリコサミノグリカン鎖の生合成はキシロースがコアタンパク質に転移されることにより開始され、四糖からなる結合領域が合成された後、最初のエキシサミンが転移されて二糖単位が繰り返される領域の合成が開始される。我々がクローニングした FAM20B による一過的なキシロースのリン酸化は、結合領域の合成を促進するが (Koike, T. *et al. Biochem. J.*, 421, 157-, 2009)、結合領域四糖の合成完了とともに速やかに脱リン酸化され、二糖単位が繰り返される領域の合成が開始される (Koike, T. *et al. J. Biol. Chem.*, 289, 6695-, 2014)。EXTL2 は、我々が見出した機能未知の糖転移酵素であり、がん抑制遺伝子 *EXT* 遺伝子ファミリーに属する (Kitagawa, H. *et al. J. Biol. Chem.*, 274, 13933-, 1999)。この *EXT* 遺伝子ファミリーは 5 つの遺伝子 (*EXT1*, *EXT2*, *EXTL1*, *EXTL2*, *EXTL3*) から構成されており、グリコサミノグリカン鎖の一つであるヘパラン硫酸の合成に関わる *EXT1* と *EXT2* に相同性を示す 3 つの EXTL は、それぞれグリコサミノグリカン鎖合成に関連する糖転移酵素活性をもつが、哺乳類におけるグリコサミノグリカン鎖の合成にどのように関与するのかについては不明な点が多い。中でも EXTL2 は、結合領域四糖に α 1-4 結合で *N*-アセチルヘキシサミンを転移する活性をもつ。我々は最近、脱リン酸化が起こらなかった結合領域四糖に、EXTL2 が α 1-4 結合で *N*-アセチルグルコサミンを転移し、糖鎖の伸長を停止させる新たな合成調節機構が存在することを見出した (Nadanaka, S. *et al. J. Biol. Chem.*, 288, 9321-, 2013)。EXTL2 遺伝子欠損マウスでは、この合成調節機構が働かないため、グリコサミノグリカン鎖の量が増加していた。この合成異常は、発生過程や正常時の生体の恒常性維持には大きな影響を示さなかったが、四塩化炭素を用いて急性肝炎を起こすと、病態が野生型マウスよりも重篤化することが判明した (Nadanaka, S. *et al. Biochem. J.*, 454, 133-, 2013)。本研究では、EXTL2 によるグリコサミノグリカン鎖の合成調節機構の破綻が、どのように急性肝炎の病態の重篤化と関わるのかを調べた結果を報告する。

2 研究方法・研究内容

まず、EXTL2 のグリコサミノグリカン鎖合成に対する影響を調べるため、EXTL2 遺伝子欠損マウスと野生型マウスから肝臓を摘出し、ホモジェナイズ、アセトン脱脂、プロナーゼ消化を行うことで肝臓からグリコサミノグリカン鎖を抽出した。さらに、ゲルろ過および陰イオン交換クロマトグラフィーを用いてグリコサミノグリカン鎖を精製した。その後、グリコサミノグリカン鎖をコンドロイチナーゼ (CSase) またはヘパリナーゼ (Hepase) /ヘパリチナーゼ (HSase) 消化し、生じた二糖を陰イオン交換クロマトグラフィーで解析し、コンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸の二糖組成を調べた。さらに、肝臓

における HGF (hepatocyte growth factor) に対する応答性を調べるために、マウスの肝臓から肝細胞の初代培養を行った。肝細胞の初代培養は、マウス肝臓よりコラゲナーゼ灌流法を用いて調製した。調製した肝細胞の二糖組成分析は、肝臓の二糖組成分析と同様の方法を用いて調べた。肝細胞の HGF の応答性の比較は、マウスから調製した肝細胞を血清飢餓状態で 24 時間培養後、HGF (50 ng/ml) で 10 分間あるいは 30 分間刺激し、細胞を回収し、HGF の受容体である c-Met の活性化状態を western blot 法により確認した。また、HGF の応答性にグリコサミノグリカン鎖が関与していることを調べるために、マウスから調製した肝細胞を血清飢餓状態で 24 時間培養後、グリコサミノグリカン鎖を CSase または Hepase/HSase を用いて 2 時間消化し、上記と同様の方法で HGF の応答性を調べた。

3 研究成果

野生型および *EXTL2* 遺伝子欠損マウスより抽出した肝組織中のコンドロイチン硫酸 (CS) 鎖およびヘパラン硫酸 (HS) 鎖について、二糖組成分析を行った。その結果、野生型と比較して *EXTL2* 遺伝子欠損マウスの肝組織中のグリコサミノグリカン鎖の各二糖あたりの組成には変化が見られなかったが、野生型と比較して *EXTL2* 遺伝子欠損マウスで CS 量が約 1.5 倍、HS 量が約 2.2 倍に増加していた (図 1)。さらに、様々な臓器の GAG を解析した結果、*EXTL2* の発現量によってグリコサミノグリカン鎖量が顕著に変化する臓器は、肝臓

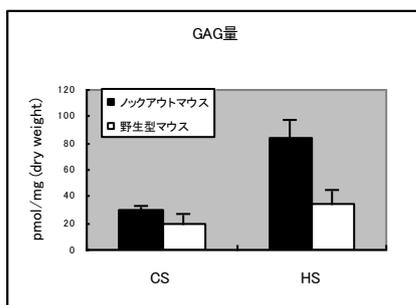


図 1 *EXTL2* 遺伝子欠損マウス肝臓由来グリコサミノグリカン鎖の二糖総量

EXTL2 遺伝子マウスおよび野生型マウスの肝臓から抽出したグリコサミノグリカン鎖 (GAG) を CSase または Hepase/HSase 消化し、得られた二糖について PA-03 カラムを用いた陰イオン交換 HPLC を行った。得られたピーク面積から用いた臓器の乾燥重量 1 mg あたりの二糖総量を求めた。

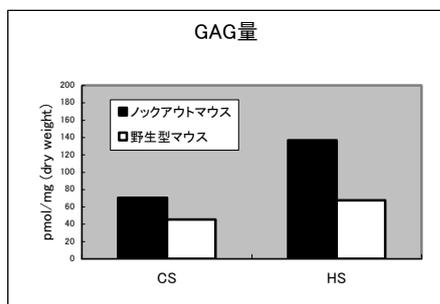


図 2 *EXTL2* 遺伝子欠損マウス肝細胞由来グリコサミノグリカン鎖の二糖総量

EXTL2 遺伝子マウスおよび野生型マウスの肝臓から肝細胞をコラゲナーゼ還流法を用いて調製した。肝細胞から抽出したグリコサミノグリカン鎖 (GAG) を CSase または Hepase/HSase 消化し、得られた二糖について PA-03 カラムを用いた陰イオン交換 HPLC を行った。得られたピーク面積から用いた臓器の乾燥重量 1 mg あたりの二糖総量を求めた。

と脳であり、腎臓や肺では大きな変化は見られないことがわかった。グリコサミノグリカン鎖は様々な細胞増殖因子と相互作用することが知られているため、*EXTL2* 遺伝子欠損マウス肝臓におけるグリコサミノグリカン鎖量の変化が、生体にどのような影響をおよぼす

か検討した。そこで、肝臓における HGF の応答性を比較しようと考えた。HGF の応答性を比較するために肝臓から肝細胞を調製し、肝臓でのグリコサミノグリカン鎖量の変化が肝細胞でも見られるかを確認した。その結果、肝細胞においても肝臓と同様に、野生型と比較して *EXTL2* 遺伝子欠損マウスで CS および HS 量が増加していた (図 2)。*EXTL2* 遺伝子欠損マウス由来肝細胞においても、グリコサミノグリカン鎖量が増加していることが明らかとなったため、HGF に対する応答性を比較した。その結果、野生型マウス (WT) と比べて、*EXTL2* 遺伝子欠損マウス (KO) で HGF の応答性が減少していた (図 3)。*EXTL2* 遺伝子欠損マウスにおける HGF の応答性の低下が、増加したグリコサミノグリカン鎖によることを確

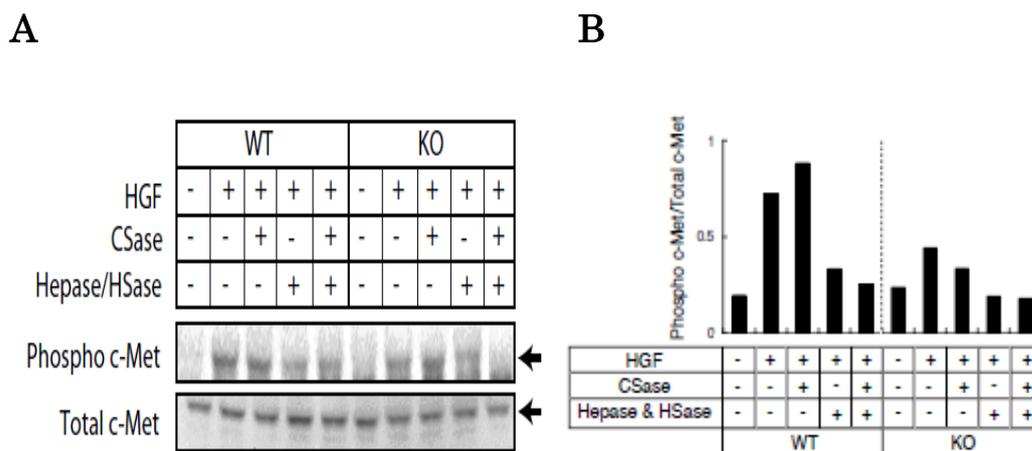


図 3. グリコサミノグリカン鎖分解酵素で処理した *EXTL2* 遺伝子欠損マウス由来肝細胞の HGF (50 ng/ml) に対する応答性

- (A) 野生型(WT)および *EXTL2* 遺伝子欠損(KO)マウス肝臓から調製した肝細胞を血清飢餓状態で 24 時間培養後、50 ng/ml の濃度の HGF で 10 分間刺激し、細胞を回収し、HGF の受容体である c-Met の活性化状態を western blot 法により確認した。
- (B) Western blot の結果を NIH Image ソフトウェアを用いて total c-Met に対する phospho c-Met のバンド量比を求めた。(Nadanaka, S. *et al. Biochem. J.*, 454, 133-, 2013)

認するため、肝細胞のグリコサミノグリカン鎖を酵素消化により除去し、HGF に対する応答性を調べた。CS 鎖を特異的に分解する CSase では HGF に対する応答性はほとんど変化がなかった。Hepase/HSase による消化で HS 鎖を分解した時、野生型および *EXTL2* 遺伝子欠損マウス由来の肝細胞の HGF に対する応答性が共に同じレベルにまで低下した (図 3)。このことから、肝細胞における HGF の応答性に寄与しているのは主に HS 鎖であること、*EXTL2* 遺伝子欠損マウス肝細胞における HGF の応答性の低下は、*EXTL2* の欠損によって増加した HS 鎖に起因する可能性が示唆された。HGF は HS 鎖と親和性を持っているため、細胞表面で c-Met 受容体と HGF と HS 鎖が安定な複合体を形成することで、HGF シグナルを活性化させることが知られている。しかし、今回の結果は、増加した HS 鎖が HGF シグナルを抑制するという一見矛盾した結果となった。ラット肝細胞に HGF と共に heparin を添加すると、濃度依存的に HGF シグナルが活性化されるが、ある濃度以上になると添加した heparin が HGF シグナルを抑制してしまうという報告がされている (Naka, D. *et al., Exp. Cell Res.*, 209, 317-, 1993)。したがって、*EXTL2* 遺伝子欠損マウス由来の肝細胞で HS 鎖が増加しているにも関わらず HGF シグナルが抑制されていたのは、*EXTL2* 遺伝子欠損マウス由来の肝細胞で HS 量が異常に増加したことに起因すると考えられる。

また、四塩化炭素を用いて急性肝炎を起こすと、*EXTL2* 遺伝子欠損マウスでは病態が野生型マウスよりも重篤化した。そこで、肝再生過程において、*EXTL2* 遺伝子欠損マウスの星細胞で、グリコサミノグリカン鎖の合成異常が起こっているのかどうかを調べたところ、*EXTL2* 遺伝子欠損マウスの星細胞では肝再生過程において、持続的にグリコサミノグリカン鎖の合成量が野生型マウスに比べ増加していることが判明した。したがって、*EXTL2* 遺伝子欠損マウスでは損傷後持続的にグリコサミノグリカン鎖の量が増加することにより、損傷後に構築される細胞外マトリックスの状態が変化し、HGF シグナルが野生型マウスに比べ抑制されるため肝再生が遅延するものと考えられた (Nadanaka, S. *et al. Biochem. J.*, 454, 133-, 2013)。以上のことにより、*EXTL2* によるグリコサミノグリカン鎖の合成調節機構は、グリコサミノグリカン鎖の合成が活発に起こる病態時などに重要な役割を果たすこと、そして、この調節機構の破綻が病態と密接に関連することが示唆された。

4 生活や産業への貢献および波及効果

HGF の臨床応用が期待されるいくつかの疾患において、それぞれの疾患が発症する臓器を構成する細胞の細胞死が疾患と関与することが明らかにされており、難治性の急性疾患では急激な細胞死の増加をいかにくい止めるかが初期治療の決め手となる。HGF は強力な抗細胞死作用や再生促進作用を示し、病気の治癒を促進する。また、慢性線維性疾患においても、HGF は強力な治療効果を示すことが知られている。このように、HGF は非常に優れた医薬品となる可能性が高いが、医薬品として利用する際の問題点の一つとして、生体内クリアランスが速いという点が挙げられる。したがって、*in vivo* で薬効を得るためには、高い投与量を必要とし、予期せぬ副作用をもたらすおそれや治療費が高くなる問題がある。今回の研究を基に、*EXTL2* の発現レベルや活性を調節することで、HGF に対する細胞の応答性を高めることができれば、より低い投与量で、高い治療効果が期待できる。また、*EXTL2* の発現量や活性の変化により引き起こされた HGF シグナル伝達の異常が、様々な疾患の背景になっている可能性もある。今後は、*EXTL2* が疾患のバイオマーカーとして利用できるかどうかについても検討していきたい。

5 謝辞

本研究にご協力頂きました神戸薬科大学生化学研究室の灘中里美講師ならびに鍵山正二氏に深謝致します。