

論文要旨

学位論文題目：レクチン ZG16p の大腸がん細胞増殖抑制活性の分子機構

氏名：水戸 晶子

[背景]

我が国の大腸がんによる死亡者数は増加の一途をたどっており、2016年には5万人以上が大腸がんによって死亡した。近年、大腸がん患者のがん組織において ZG16p (zymogen granule protein 16) の発現が低下していること、ZG16p 低発現群の患者の予後が不良であることが報告されている。しかし、ZG16p が大腸がんにおいて消失する意義は明らかになっていない。ZG16p はヒト膵臓や肝臓、腸管に高発現している 16 kDa の可溶性タンパク質であり、腸管では、杯細胞から粘液中に分泌されている。植物由来のジャカリン関連レクチン (JRLs) と類似した β -プリズムフォールド構造を持ち、JRLs 間で保存されている GG ループ、GXXXD ループを介してマンノースと結合する。さらに、塩基性のアミノ酸残基を介して負電荷性のヘパリン/ヘパラン硫酸とも相互作用する。本研究では、ZG16p が大腸がん抑制的にはたらくと仮説を立て、ヒト大腸がん細胞株及び大腸がん患者由来の腫瘍オルガノイドを用いて、ZG16p が大腸がん細胞の増殖性に与える影響を調べた。

[実験・結果]

ZG16p が大腸がん細胞に及ぼす作用を顕在化するため、ヒト大腸がん細胞株 Caco-2 に ZG16p 遺伝子を導入した結果、ZG16p 安定発現細胞株は、コントロールベクターを導入した細胞と比べて増殖性が低下した。細胞外に分泌された ZG16p が大腸がん細胞に作用すると考え、組み換えタンパク質 Strep-tagII-ZG16p をヒト大腸がん細胞株 Caco-2、LS174T、HCT116、HCT15 に添加して増殖性を調べたところ、ZG16p は全ての細胞株の増殖を抑制した。よって、ZG16p が大腸がん細胞増殖抑制活性を持つことが明らかになった。ZG16p に対する感受性は細胞株によって異なり、Caco-2 細胞の増殖が最も強く抑制された。さらに、大腸腫瘍オルガノイドを用いた三次元培養系で ZG16p が大腸がん細胞の増殖を抑制するかを調べた。ZG16p は、増殖に EGF が必要なオルガノイド株の増殖を抑制した一方、*BRAF* 変異を持ち、増殖にニッチ因子を必要としないオルガノイド株の増殖を抑制しなかった。よって、ZG16p が RAS/MAPK 経路を阻害することで大腸がん細胞の増殖を抑制する可能性が考えられた。

ZG16p の糖結合部位が大腸がん細胞の増殖抑制活性に関与するかを調べるため、マンノース結合部位変異体 ZG16p-D151A とヘパリン結合部位変異体 ZG16p-M5 (K36A、R37A、R53A、R55A、R79A) を用いて増殖試験を行った。ZG16p-D151A、ZG16p-M5 はともに Caco-2 細胞の増殖を抑制しなかった。免疫蛍光染色を行ったところ、ZG16p と ZG16p-D151A は Caco-2 細胞表面に結合した一方、ZG16p-M5 は結合しなかった。よって、ZG16p はヘパリン結合部位を介して Caco-2 細胞表面に結合し、マンノー

ス結合部位である Asp151 残基が増殖抑制活性に関与すると考えられた。

Caco-2、LS174T、HCT116、HCT15 細胞表面への ZG16p 結合性を調べたところ、ZG16p は Caco-2、HCT15 細胞表面に多く結合した。塩素酸ナトリウム処理によって硫酸基ドナーの合成を阻害したところ、Caco-2、HCT15 細胞への ZG16p 結合性が低下した。よって、ZG16p は硫酸基を介して細胞表面に結合すると考えられた。また、大腸がんを高発現し、腫瘍マーカーとして用いられている GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー型糖タンパク質 CEA (carcinoembryonic antigen) の細胞表面における局在を調べた結果、CEA は Caco-2、LS174T 細胞表面に豊富に局在していたが、CEA 局在位置と ZG16p リガンドの局在位置は一致しなかった。よって、CEA のマンノースを含む GPI アンカー構造に ZG16p は結合しないことが明らかになった。

さらに、ZG16p によって最も強く増殖が抑制された Caco-2 細胞を用いて、ZG16p による大腸がん細胞増殖抑制機構の解明を試みた。Annexin-V によってアポトーシス細胞を検出したところ、ZG16p は Caco-2 細胞のアポトーシスを誘導しないことがわかった。老化関連 β -ガラクトシダーゼ活性を示す細胞の数は ZG16p 添加の有無で違いがなかった。増殖マーカー Ki67 の発現を調べたところ、ZG16p 添加細胞でもコントロールと同等の発現が確認され、ZG16p は細胞周期の G0 期への移行を誘導しないことがわかった。EdU 取り込み試験では、ZG16p 添加細胞において DNA 合成期にある細胞の割合が著しく減少していることが明らかになった。PCR アレイを用いて細胞周期関連遺伝子の発現を解析した結果、ZG16p 添加によって G1 期進行に必要な *CDK6*、*CCND1*、M 期進行を阻害する *WEE1*、DNA 損傷に応答して活性化される *ATR*、*RAD1*、腫瘍抑制遺伝子 *TP53* の発現が上昇し、G1 期停止を媒介する *CDKN1A*、DNA 複製開始に必要な *MCM4*、微小管不安定化因子 *STMN1* の発現が減少した。Caco-2 細胞は *TP53* に変異を持ち、機能していないことに加え、*CDK6*、*CCND1* の発現が上昇し、*CDKN1A* の発現が減少していることから、G1/S 期が進行している可能性が考えられる。また、*WEE1*、*ATR*、*RAD1* の発現上昇、*MCM4*、*STMN1* の発現減少は、S 期もしくは G2/M 期において細胞周期が停止している可能性を示唆する。

[まとめ]

本研究では、ZG16p が大腸がん細胞株及び大腸腫瘍オルガノイドの増殖を抑制することを明らかにした。ZG16p のヘパリン結合部位が硫酸基を介して細胞表面へ結合し、マンノース結合部位が増殖抑制活性に鍵となる役割を果たすことが示唆された。また、ZG16p は RAS/MAPK 経路を阻害して大腸がん細胞の増殖を抑制する可能性が考えられた。本研究により、糖鎖を介した新たな大腸がん細胞の増殖制御機構の存在が示唆された。