

## 論文の内容の要旨

論文題目 ヒトヘパラーゼ：精製、クローニング、酵素学的性質、病態に関する研究

氏名 豊島 美菜子

がんの転移・再発は固形がんの患者が死に至る主な原因であり、その克服は癌治療において最も難しい問題である。癌転移には大きくわけて、臓器表面間接触や体腔内への遊離による播種性転移、リンパ行性転移とそして血行性転移の3つのルートがある。遠隔転移においては、血行性転移が重要なルートと考えられ、そのプロセスには、原発巣での血管新生、原発巣からの離脱、周辺組織への浸潤、血管内への侵入、血管内での生存と循環、標的臓器内の血管壁への接着または塞栓による定着、血管壁の破壊、組織内への浸潤、そして再び増殖の過程がある。

さて、ヘパラン硫酸プロテオグリカンは様々な組織の細胞表面と細胞外基質、とくに基底膜の重要な構成成分であり、細胞の増殖、分化、運動の制御に関与している。基底膜浸潤性の癌細胞や活性化された免疫担当細胞にはヘパラン硫酸特異的エンドグルコニダーゼ（ヘパラーゼ）の高い活性がみられ、転移性腫瘍をもつ実験動物や癌患者の血液中には高レベルのヘパラーゼが検出される。さらに、ヘパラーゼ阻害剤は悪性癌細胞の血行性転移を抑制する。ヘパラーゼ（HPSE）の生理的機能と転移性癌の診断と治療における標的分子としての可能性を考慮し、本研究ではヒトヘパラーゼを精製し、cDNAをクローニングして、その酵素学的性質を調べるとともに、癌細胞に強制発現させて癌病態との関わりを研究した。

まず、ヒトヘパラーゼを WI38/VA13 細胞から 4 種類のクロマトグラフィーの手法（ヘパリンセファロースカラム、ConA アガロースカラム、CM-セファロース陽イオンカラム、フェニル-セファロース疎水結合カラム）を用いて精製し、最終的には 3.6 % の回収率、740 倍の精製率で、880 mg の粗たんぱくから 500 ng のヘパラーゼ活性を有する精製たんぱくが得られた。精製たんぱくの分子量は 50 kDa であった。この精製たんぱくの N 末端配列と内部アミノ酸配列の解析、及びホモロジー検索を行った結果、新規のたんぱくである事が判明した。そこで、WI38/VA13 細胞の cDNA をライブラリーからヒトヘパラーゼ遺伝子のクローニングを行ったところ、長さの異なる 2 つのクローン、3726-bp (*HSPE 1a*)及び 1759-bp (*HSPE 1b*)が得られた。両方とも同じ 543 アミノ酸からなるたんぱくをコードしており、alternative splicing によるものと考えられる。翻訳始まりの Met から 158 番目の Lys から C 末端側が精製された活性ヘパラーゼたんぱくである。*HSPE 1a* の 5'端は GC リッチであり、いわゆるコザックの法則にはあてはまらない、house keeping gene のプロモターの性質を有していることが判明した。この *HSPE 1a* の cDNA を組み込んだ pBK-CMV ベクターを NIH3T3 細胞にトランスフェクションして強制的に発現させ、酵素活性の有無を調べた。NIH3T3 細胞とベクターのみ導入した細胞では酵素活性が検出されなかったのに対し、ヘパラーゼを導入した細胞では高い活性が検出された。さらに、*HSPE 1b* の cDNA でも同様の結果を得た。Cos-7 細胞等、他の哺乳動物細胞に導入しても、未導入細胞に比べて高いヘパラーゼ活性を検出した。したがって、クローニングした 2 つの cDNA は確かにヘパラーゼをコードする遺伝子であることが判明した。また、FISH の結果、ヘパラーゼ遺伝子は染色体 4q22 に存在していることが判明した。この locus にはパーキンソン病の原因遺伝子があるとされており、今後は神経細胞とヘパラーゼの関連についての研究も興味深いものになると考えられる。

次に、ヘパラーゼの生化学的性質と基質特異性に関する研究を行った。ヘパラン硫酸は N-グルコサミン(GlcN)とウロン酸(グルクロン酸 GlcA/イズロン酸 IdoA)が $\beta(1-4)$ 結合する繰り返し 2 糖の基本構造を有している。基本の繰り返し構造は単純だが、生合成途上で硫酸化など様々な修飾を受け、ヘパラン硫酸は多様な分子量、分子構造となり、不均一性を有する。このような不均一な分子をヘパラーゼはどのような性質をもって分解するのかを研究した。生化学的性質であるが、精製酵素の至適 pH は 4.2 であった。ヘパラーゼは、細胞外の炎症部位などの局所的な酸性条件下、若しくは細胞内でリソソームに運ばれたヘパラン硫酸が分解される際に働いていると考察される。次に、バキュロウィルスによる発現系を用いてリコンビナントたんぱくの発現、精製を行った。発現されたたんぱくはプロセスされずに 543 aa の大きさを持ち、分子量は 65 kDa で、等電点は pI 7.4-9 で

あった。昆虫細胞内で生成されるヘパラーゼ蛋白の N-結合糖鎖による修飾の度合いにより、蛋白の表面の電荷がペプチドとしてのみの電荷より実際は少し低くなって、等電点が幅広く検出されたものと推察する。このリコンビナントヒトヘパラーゼを用いて基質特異性を検討した。基質として用いたのは、ヘパラン硫酸/ヘパリンをヘパラーゼ処理して得られた分解産物をゲルろ過及びアミン結合シリカカラムによって分離精製した 4 糖～8 糖からなるオリゴ糖で、構造はすべて <sup>1</sup>H NMR 解析により決定されている。20 種の異なる配列をもつオリゴ糖とリコンビナントヒトヘパラーゼを至適 pH で反応させ、アミン結合シリカカラムにより反応産物を分離し、分解の有無を分析した。結果、リコンビナントヒトヘパラーゼが切るヘパラン硫酸/ヘパリン特異的な配列は、GlcN - GlcA - GlcN(NS,6S)で GlcA の還元末端側を切断し、6 糖の長さがあることが望ましいことが判明した。

最後にヘパラーゼ導入癌細胞の細胞学的性質及び転移性について研究した。培養細胞および臨床材料からの数々の研究報告から、転移巣を形成する時のヘパラーゼの働きは、基底膜のヘパラン硫酸分解により癌細胞の基底膜通過を容易にさせる事、ヘパラン硫酸に結合している増殖因子や血管新生因子を遊離させて転移巣での増殖および血管新生を促進させる事、等であると推察されている。さらに、抗血液凝固活性を持たない多数のヘパラーゼ阻害剤（例：suramin、calcium spirulan、2,3-O desulfated heparin、ペントosan硫酸等）が合成及び発見されて、それらがマウスメラノーマの肺への実験転移を強く抑制することが報告されている。本研究では、ヒトヘパラーゼ遺伝子を癌細胞に導入することによって、ヘパラーゼの癌転移への関与をより直接的に証明することを試みた。

まず、正常組織及び癌組織でのヘパラーゼの発現を PCR 法にて検討したところ、非常に高い発現が胎盤でみられ、低い発現が前立腺、膵臓、腎臓でみられた。ヌードマウス皮下に移植した癌組織では、肺癌、前立腺癌、大腸癌、卵巣癌、膵臓癌でヘパラーゼの発現が確認された。次にヒトヘパラーゼ遺伝子の翻訳開始 Met から stop codon までを発現ベクターに組み込み、悪性ヒトメラノーマ細胞 A375M に強制発現させて、細胞レベルでの浸潤能等の変化、転移能の変化を調べた。まず、ヘパラーゼ導入メラノーマ細胞は、コントロール及びベクターのみ導入した細胞に比べて有意に浸潤能が高まっていた。そこで、浸潤能の高まった理由として、接着能と基底膜分解能の変化が考えられたので、これらの違いを調べた。接着能であるが、基質としてコラーゲン I、コラーゲン II、フィブロネクチン、マトリゲルを用いたが、いずれの基質でも有意な差は認められなかった。一方、基底膜分解能をヒト臍体上皮膜細胞が生合成した基底膜を用いて調べたところ、48 時間後には 2 倍以上の分解能の向上がみられた。癌細胞が高いヘパラーゼ活性を有する

ことによって、基底膜のコラーゲンと非コラーゲン蛋白の結合に介在してマトリックスを構成・保護しているヘパラン硫酸を分解し、タイプ IV コラーゲンマトリックスを破壊して、血管外や周辺組織への浸潤を容易にすることが可能になると推察される。最後に実際にヘパラーゼ活性を付加された癌細胞の転移能を調べるために、A375M 細胞、ベクターのみ導入、そしてヘパラーゼ導入メラノーマ細胞をヌードマウスの尾静脈から移植し、肺への実験的転移能をみた。5 x 10<sup>5</sup> 個の細胞を尾静脈より移植して 42 日後に剖検し、肺にある結節の数を実体顕微鏡下で数えた結果、ヘパラーゼ導入細胞は約 10 倍に結節数が増えていた。

以上、本研究においてヒトヘパラーゼを精製し、ヒトヘパラーゼ遺伝子をクローニングして、その酵素学的性質を調べ、さらに癌細胞に強制発現させることにより癌細胞の転移能が高まることを示した。今後は、異なった癌組織におけるヘパラーゼの発現部位などを免疫組織染色などの方法を用いて研究していきたい。さらには、癌の悪性化に伴う、若しくは手術後の転移の有無をみる予後因子のマーカーとしての可能性を探っていきいたいと考えている。本研究により、ヘパラーゼが転移の診断や治療の標的分子として重要であることが改めて確認された。今後は、ヘパラーゼ阻害活性が高く、分子量の小さな化合物をドラッグデザインして全合成することにより、経口投与でも抗転移活性を発揮する化合物や薬剤を開発することが可能になるとともに、パーキンソン病など、癌以外での治療領域におけるヘパラーゼの機能についても解明されていくだろうと期待される。