

1. 動物細胞を用いた糖脂質類似体の効率的な合成

生体内において多岐にわたって重要な役割を担っているオリゴ糖の機能を把握するために、生体内の糖鎖を網羅した糖鎖ライブラリーの構築の必要性が叫ばれてきた。バイオコンビナトリアル合成法は、動物細胞を糖鎖生産工場と見立てたユニークな方法で、building blockである糖鎖プライマーや細胞の種類を選択することにより、組み合わせ論的に効率的に多種の糖脂質を生産することが可能であるため、精力的に研究がなされてきた。

糖鎖プライマーは糖脂質生合成過程の中間体に似た糖誘導体で、細胞の糖転移酵素の基質として働く。これまでの研究により、糖鎖プライマーの一種であるラクトシルセラミド類似体を B16 マウスメラノーマ細胞に添加すると、正常な糖脂質の生合成を阻害するのみならず、B16 細胞が過剰に発現している酸性糖脂質 GM3 と同じ糖鎖構造へと糖鎖伸長されて細胞外へ放出されることが分かっている。まずは脂質部位にアジド基を導入した糖鎖プライマーを二種類、コントロールとしてアジド基を持たない糖鎖プライマーを一種類合成した。

これを B16 細胞に投与し、官能基の位置の違いが糖鎖伸長反応にどう影響するのかを調べた。B16 細胞は糖鎖プライマーを 50 μM となるように添加した無血清培地で 48 時間培養した。細胞及び培地から糖脂質の抽出作業を行い、HPTLC で検出・定量を行ったところ、アルキル鎖の根元にアジド基を導入した糖鎖プライマー(2-azidododecyl β -lactoside: primer II)は末端にアジド基を導入した糖鎖プライマー(12-azidododecyl β -lactoside: primer I)やアジド基を導入していない糖鎖プライマー(n-dodecyl β -lactoside: lac primer)と比べて約二倍糖鎖伸長を受けやすいことが分かった。そこで三種類の糖鎖プライマーの界面活性を測定したところ、臨界ミセル濃度にはほぼ差は見られないにも関わらず、primer II の界面活性が他の二種類と比べて高いことが判明した。これは、primer II ではアジド基が親水性の糖の近くに存在することで界面に並んだ時により効率よく界面エネルギーを下げるためだと考えられる。糖鎖プライマーは両親媒性であるため、まず細胞膜に挿入してからエンドサイトーシスで細胞内へと取り込まれると考えられている。そのため、より膜に刺さりやすい primer II が多くの糖鎖伸長物を与えたと推定される。

また、播種細胞数依存性、プライマー濃度依存性、培養時間依存性も同様に調べたところ、明確な依存性が見られた。さらに、糖鎖伸長した生成物を細胞に投与し、培養時間が長引くことによって生じた生産性の低下の解明も試みた。

上で検討した最適条件を用いて GM3 類似体の大量合成に着手した。一方、生成物の分離精製方法も検討、簡便に大量の生成物を単離することに成功した。

2. リゾGM3 オリゴマーの合成とEGF受容体キナーゼ活性の阻害能の測定

Epidermal growth factor receptor (EGFR)が細胞の増殖や癌の転移などに深く関わっていることは広く知られている。これまでの研究より、酸性糖脂質 GM3 やその代謝中間体である lyso-GM3 が EGFR のチロシンリン酸化を阻害することが示されてきた。しかし、GM3 のリン酸化阻害能は医薬品として臨床に応用できるレベルではない。また、lyso-GM3 はその界面活性剤様の形状ゆえに細胞毒性が非常に高いことが知られている。

一般的に糖鎖とタンパク質間の相互作用は非常に弱いことが知られている。しかし生物はリガンドや受容体を多価にすることによってその相互作用を増幅させる「クラスター効果」によって高い親和性を獲得してきた。

そこで、GM3 をオリゴマー化すれば、天然の多価のリガンドと同様に、クラスター効果を発揮し、阻害能を向上させることができるのではないかと考えた。さらに、オリゴマー化することによって脂質部位が細胞膜に刺さりにくくなると考えられるため、細胞毒性の軽減も期待される。

まずは、EGFR のチロシンリン酸化を阻害することが示されている天然の lyso-GM3 を原料とし、グルタミン酸オリゴマーを骨格とした lyso-GM3 の dimer、trimer、tetramer を合成、そのキナーゼ活性への阻害効果や細胞毒性を評価した。

EGFR を高発現している A431 細胞に各化合物を様々な濃度で添加したところ、GM3 と比較して、lyso-GM3 及び lyso-GM3 dimer に高いチロシンキナーゼ活性阻害能が見出されたが、trimer、tetramer では EGFR に対する影響が見られず、クラスター効果は確認できなかった。一方、lyso-GM3 の細胞毒性が非常に強いのにに対し、dimer では細胞毒性がほぼ見られず、多価にすることによる細胞毒性の低減は達成された。

3. 糖を含む新規な機能性分子の構築とその活性の評価

天然型の lyso-GM3 をダイマーにすることで、EGFR のリン酸化に対する高い阻害能と、細胞毒性の低減を得られることが明らかとなったが、lyso-GM3、もしくは GM3 はその複雑な構造と天然における存在量の少なさから、有機合成の原料として用いるのは難しい。

そこで、一章で生産した糖鎖伸長プライマー(lyso-GM3 mimetic)を利用し、同様な機能性糖鎖含有分子の合成を試みた。

A431 細胞にこれらの各々の化合物を様々な濃度で投与し、リガンドである EGF によって誘導される EGFR のチロシンリン酸化阻害能を測定した。GM3 と比較して、lyso-GM3 dimer および mimetic dimer に高いチロシンキナーゼ活性阻害能が見出された。

四種の化合物の A431 細胞に対する毒性も調べたところ、脂質部位が天然物と異なる mimetic GM3 の細胞毒性は、天然型の GM3 よりも高かった。一方、lyso-GM3 dimer および mimetic dimer は細胞毒性がほぼ見られず、有効な阻害剤となり得る可能性が示唆された。

糖鎖伸長したプライマーを応用した新規化合物である mimetic dimer に、天然型である lyso-GM3 dimer と同様の活性があることが明らかになったため、さらにシグナリングや細胞増殖への影響を評価した。

A431 細胞に GM3、及び LM-dimer を投与し、24 時間培養した。EGF を添加して stimulate し、EGFR のチロシンリン酸化、EGFR の post-receptor signaling として知られる Akt、及び MAPK のリン酸化を測定した。

MAPK のリン酸化においては有為な阻害は見られなかったものの、mimetic dimer は EGFR シグナリングの下流にあたる Akt のリン酸化も阻害することが示された。

【まとめ】

本研究において、有機合成と生化学という異なる分野を融合させたユニークな糖鎖生産法を用い、その手法の向上と、その結果得られる糖脂質類似体の応用を検討した。

まず、培養条件や糖鎖プライマーの物理的性質を徹底的に検討することにより、収率を大幅に上昇させ、大量合成への可能性を提示した。これによって、オリゴ糖をマテリアルとして使用できる量を入手することが現実味を帯び、現在も精力的に研究が進められている。

EGFR をターゲットとした抗癌剤としては ATP 結合阻害剤のイレッサやレセプター・リガンドに対する抗体などが開発されてきたが、副作用などが問題となり、未だ十分な効果が得られていない。一方、糖鎖伸長プライマーを原料として合成した **mimetic dimer** は活性化レセプターの高い阻害能力と低い毒性が特徴である。本研究で得られた知見より、これらのオリゴ糖を含む機能性分子は EGF によって誘導される細胞増殖、その中でも特に癌に対して有効な阻害剤となり得る可能性が示唆された。