

がん治療薬開発への応用を目指した

天然物からのシアリダーゼ NEU3 阻害物質の探索

池田麻美・吉永綾奈・塩崎一弘

鹿児島大学 水産学部 食品・資源利用学分野

〒890-0056 鹿児島市下荒田 4-50-20

TEL: 099-286-4170

要旨

シアリダーゼは糖脂質や糖タンパクの非還元末端からシアル酸を遊離させる糖鎖分解酵素である。このうちヒト NEU3 シアリダーゼは、種々の癌で発現が亢進し、がんの悪性形質を助長することが知られている。そのため、NEU3 はがん治療の分子標的として注目されている。そこで NEU3 阻害剤の開発が期待されるが、これまで NEU3 特異的な阻害剤の報告はほとんど無い。そこで本研究では、*in vitro* にて NEU3 阻害を示す物質を天然物より探索するため、抽出物の作製およびスクリーニングを行った。さらに NEU3 に対する阻害が認められたものについては、がん細胞に曝露実験を行い、細胞増殖やシグナル伝達系に与える影響について検討した。スクリーニングの結果、カンキツ類の抽出物に共通して高い NEU3 阻害活性が認められた。またその阻害活性は NEU3 特異的であり、他のシアリダーゼには阻害を示さなかった。HeLa 細胞にカンキツ抽出物の曝露実験を行ったところ、細胞増殖の抑制を示し、NEU3 の基質である GM3 が細胞内で増加していた。さらに抽出物中の阻害物質の推定を行ったところ、複数の成分に NEU3 阻害活性が認められ、カンキツ抽出物の NEU3 阻害活性は複合的なものである事が明らかになった。

1. 諸言

シアリダーゼは糖脂質や糖タンパクなどの非還元末端のシアル酸を加水分解する酵素である。ヒトではこれまで NEU1、NEU2、NEU3 および NEU4 の 4 つのシアリダーゼがクローニングされ、それぞれの性状解析が行われている。このうち NEU3 はガングリオシドを基質とし、形質膜に局在しているシアリダーゼである。NEU3 はこのガングリオシドの水解を通じ、細胞のアポトーシスや分化など様々な生理的役割に関与していることが明らかとなっている¹⁾。

最近、この NEU3 ががんの悪性化と関係ある事が分かってきた。正常組織と比較してがん部位で NEU3 の mRNA の発現が亢進することが、脳腫瘍を除くほぼすべての癌で明らかとなった²⁾。そこで NEU3 が高発現しているがん細胞を調べたところ、アポトーシス抑制や細胞運動の上昇、がん転移の促進に NEU3 が関与していることが見出

された³⁾。また NEU3 のトランスジェニックマウスでは、発癌剤アゾキシメタン投与による前がん病変 ACF (Aberrant crypt foci) の発現が有意に上昇し、その一方で NEU3 のノックアウトマウスでは逆に ACF による腫瘍形成が抑制されていた⁴⁾⁵⁾。またがん患者の血清では NEU3 活性が有意に上昇することも報告されており、NEU3 が腫瘍マーカーやがん治療の標的分子として有効である可能性が示唆されている。

そこでがん治療薬としての NEU3 阻害薬が注目されている。NEU3 の阻害薬としてシアル酸やガングリオシドのアナログ合成が試みられているが、糖鎖関連物質は合成方法や収量の点で問題がある。また他のヒトシアリダーゼは NEU3 とは反対にがんの悪性度を抑制させるため⁶⁾、NEU3 阻害剤には特異性が非常に重要である。そこで我々はシアル酸アナログの合成とは異なる別の手法によるアプローチが必要であると考えた。

本研究では、シアル酸の類似化合物とは異なる阻害物質を探索するため、天然物からの阻害活性のスクリーニングを行った。特に鹿児島県に自生する動植物を主な材料とし、それらの抽出物の NEU3 阻害活性について評価を行った。

2. 実験方法

2.1. ヒト NEU3 活性阻害実験

ヒトシアリダーゼ粗酵素は、ヒト胎児腎臓細胞由来 HEK293T 細胞に各シアリダーゼ遺伝子(pcDNA3.1 にサブクローニング済み)を導入し、トランスフェクション 48 時間後に細胞ホモジネートを作製して調製した。NEU3 の酵素活性はガングリオシドを基質として pH4.5 にて 1 時間反応させ、遊離シアル酸量を測定することで評価した。阻害率は 1U の酵素活性に対する阻害の割合にて表した。本研究では十分な阻害を示す目安として、阻害率 35%を基準とした。

2.2. 供試試料の調製

NEU3 阻害活性を評価する供試試料として、陸上植物、海藻（緑藻、褐藻、紅藻および藍藻）、水棲生物からメタノール抽出物を作製した。また水棲動物の一部はプロテアーゼ分解を行い、ペプチドを作出した。これらの抽出物は固形物含量を揃えた後に、乾固後にメタノールに再溶解し、NEU3 阻害活性の評価系に添加した。

2.3. 培養細胞への曝露実験

子宮頸がん由来 HeLa 細胞に供試試料を 48 時間曝露し、細胞増殖および糖脂質の組成変化について評価した。細胞増殖の評価は WST-8 を用いて行った。曝露後の細胞はペレットを作成後、クロロホルム：メタノールにより抽出を行い、けん化によりリン脂質を除去した後に、Sep-Pak による脱塩を行い、糖脂質画分の調製を行った。糖脂質は薄層クロマトグラフィーにより展開を行い、オルシノール硫酸にて発色、定量を行った。

3. 結果と考察

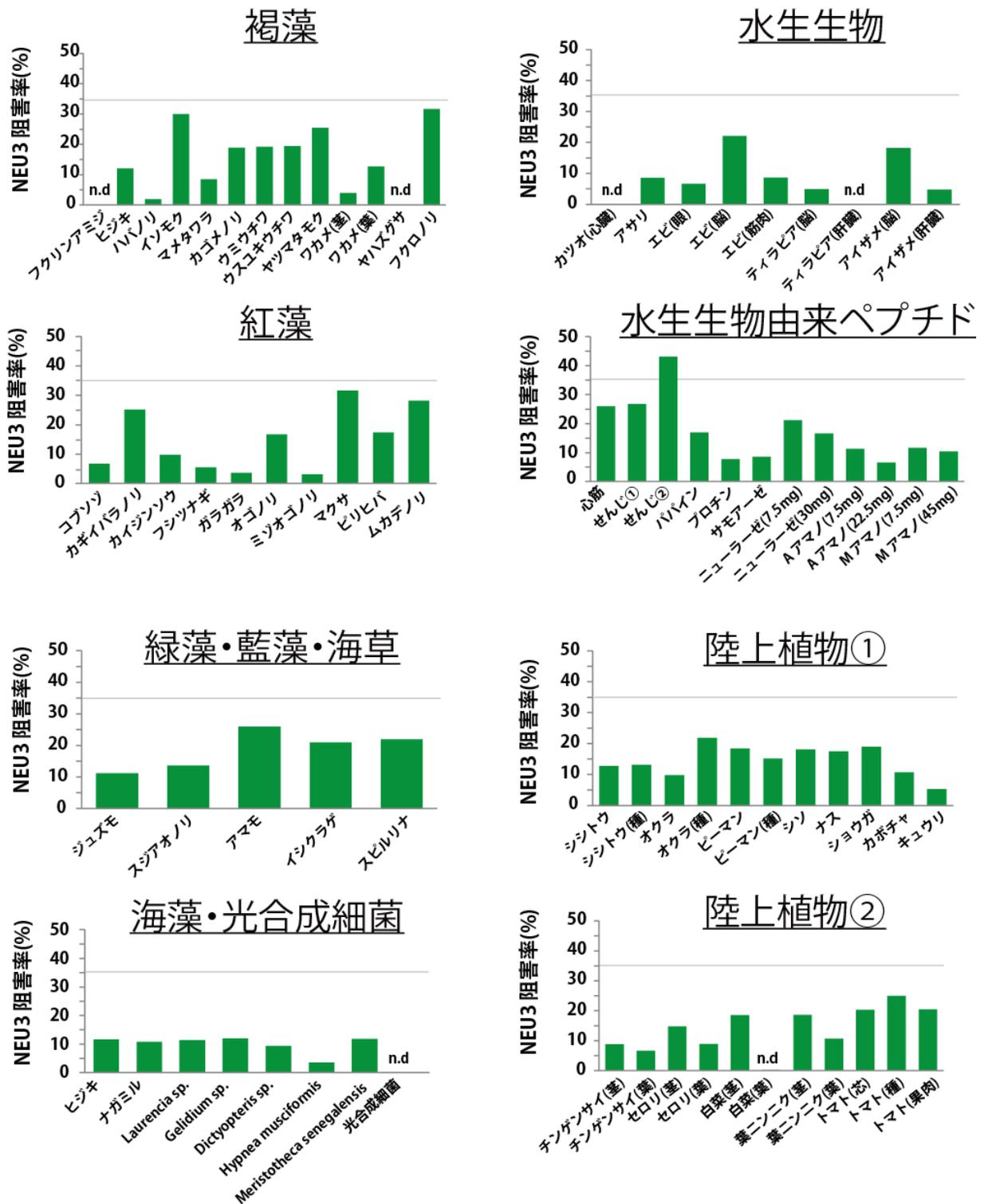


Fig.1 NEU3 inhibitory activity of natural extracts

各抽出物の NEU3 阻害活性を *in vitro* で評価したところ、褐藻のイソモクおよびイソモク、紅藻のマクサおよびイバラノリなどの複数の抽出物で、比較的高い阻害活性が

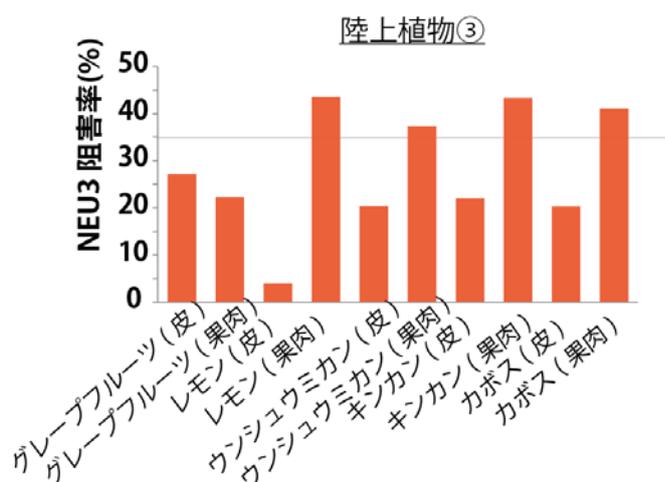


Fig.2 Inhibitory activity of citrus extracts towards NEU3 sialidase

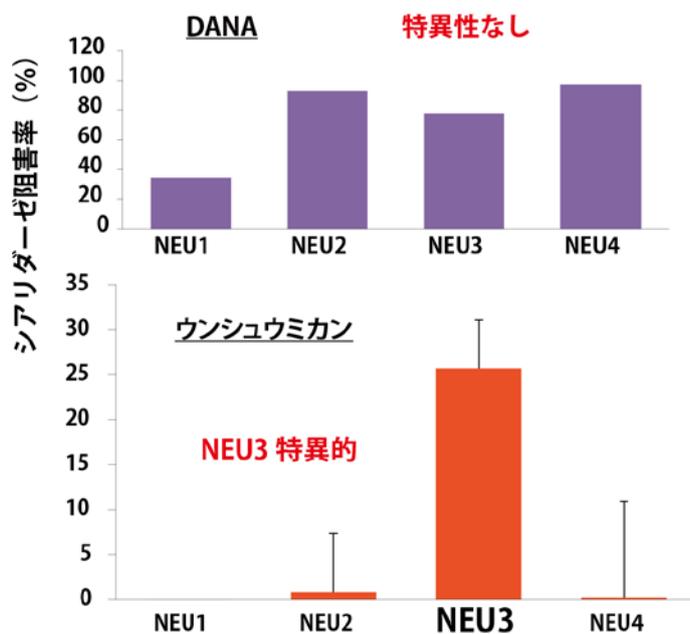


Fig.3 Inhibitory activity of citrus extracts towards human sialidases

ることが報告されている⁷⁾。そこで HeLa 細胞にウンシュウミカン抽出物を曝露し、細胞増殖への影響について検討した。ミカン抽出物 0.2 mg/ml 曝露で非曝露に比べ細胞数の減少が見られ、2 mg/ml では細胞数が 50%まで低下した(Fig. 4)。またこの際の細胞内糖脂質組成の変化を薄層クロマトグラフィーにて検討したところ、ウンシュウミカン抽出物曝露細胞では GM3 ガングリオシドが増加していた(Fig. 5)。GM3 ガングリオシドは NEU3 の良い基質であることから、この薄層クロマトグラフィーの結果は、ウ

認められたが (Fig. 1)、これら海藻間には特徴ある共通点は認められなかった。またカツオの煮汁を煎じた「せんじ」には、40%の阻害活性が認められた。一方、柑橘類の抽出物に共通して著しい NEU3 阻害活性が認められた(Fig. 2)。レモン、ウンシュウミカン、キンカン、かぼすとも皮よりも果肉に高い NEU3 阻害活性が存在し、これは他の陸上植物では見られない傾向であった。そこでこのカンキツ抽出物のうち、鹿児島県の特産の 1 つであるウンシュウミカンに着目し、この抽出物について解析を進めた。

NEU3 ががんの悪性度を助長するのに対し、他のシアリダーゼ (NEU1、NEU2 および NEU4) は癌の悪性形質を抑制することが知られている。そこで次に、ウンシュウミカン抽出物の各シアリダーゼに対する阻害特異性について検討した。その結果、一般的なシアリダーゼ阻害剤 DANA (2-deoxy-2,3-didehydro-N-acetylneuraminic acid) とは異なり、ウンシュウミカンの抽出物は他のシアリダーゼを阻害せず、NEU3 に特異的に阻害作用を示すことが明らかになった(Fig. 3)。

子宮頸がん HeLa 細胞において RNAi を用いて NEU3 の発現を抑制すると、がん細胞の増殖が抑制さ

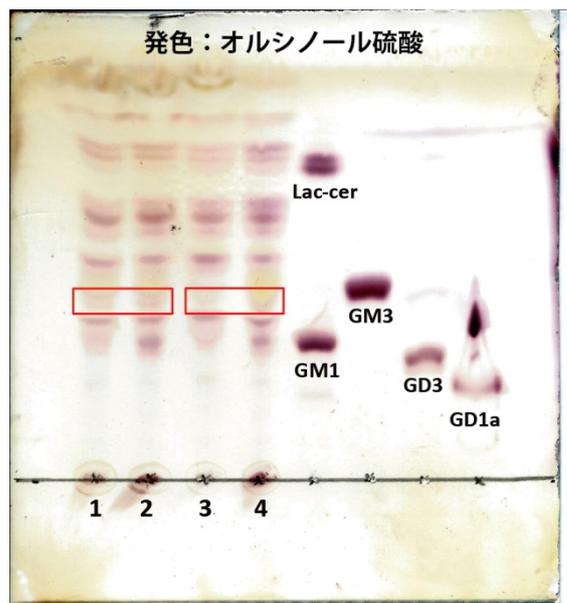
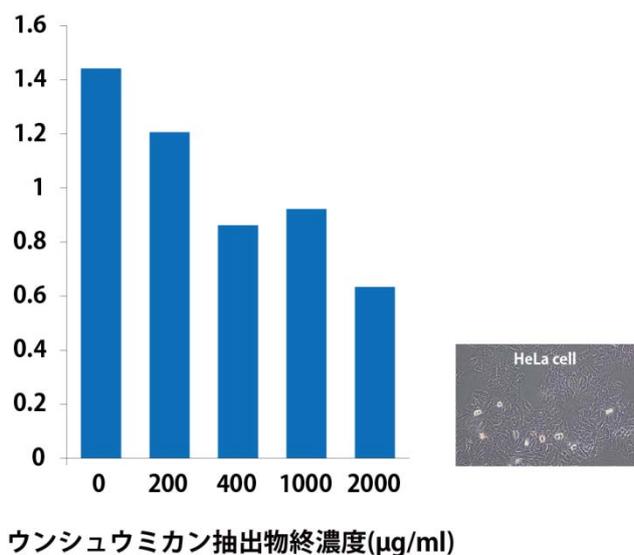


Fig.4 Effect of citrus extract on HeLa cell growth Fig.5 Alteration of ganglioside by citrus extract exposure. Lane 1&3:Control, 2&4 Citrus extract exposure. Citrus extract of Unshu-mikan inhibits NEU3, and as a result, GM3 increased.

以上の結果から、ウンスユウミカン抽出物に NEU3 阻害活性を示す物質が含まれ、そのシアリダーゼ阻害活性は NEU3 特異的であることが明らかとなった。さらにがん細胞に対してはウンスユウミカン抽出物が NEU3 による GM3 の分解を抑制し、細胞増殖を抑制することが見出された。GM3 ガングリオシドは増殖因子受容体 EGFR の二量体化を抑制し、EGFR の自己リン酸化を抑制することが知られている。EGFR のリン酸化は EGFR/Ras/ERK のシグナルを亢進し、癌細胞の増殖を促進することから、ウンス

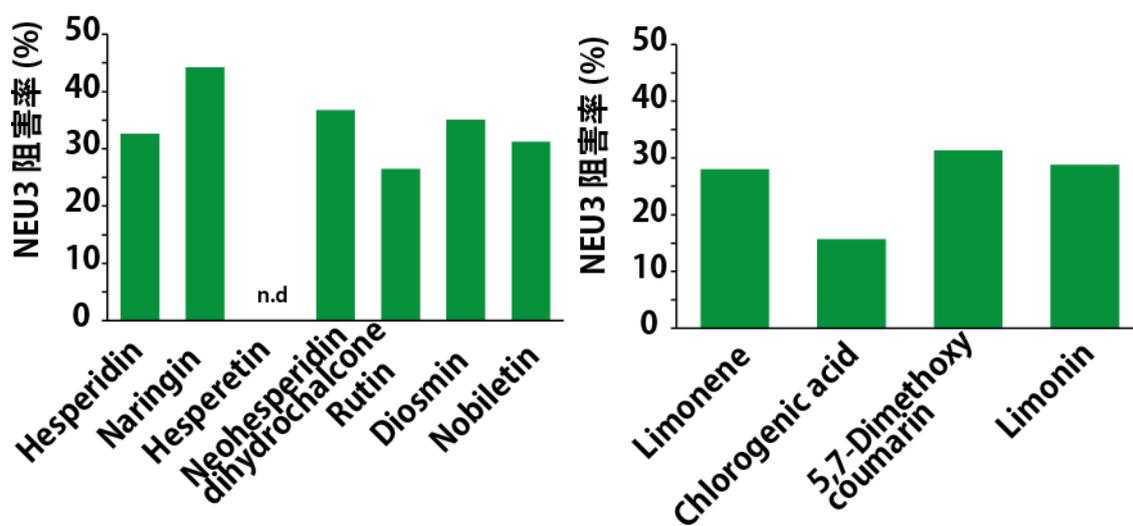


Fig.6 NEU3 inhibitory activity of citrus-derived substances

ユウミカン抽出物は GM3 含量を増加させることにより HeLa 細胞の増殖を抑制したと示唆された。NEU3 の RNAi においても同様に EGFR のリン酸化が抑制することが知られている⁷⁾。以上の事から、がんの増殖抑制にウンシュウミカン抽出物の NEU3 阻害活性が有効であることが強く示唆された。

そこでこのミカン抽出物に含まれる有効物質について詳細に検討した。カンキツ類に特徴的な化合物 11 種類についてスクリーニング時と同様に *in vitro* で NEU3 阻害活性を評価した。その結果、フラボノイド類やクマリン、テルペンなど多くの化合物に NEU3 阻害活性が認められたが、その中でもフラバン配糖体に高い阻害傾向が認められた(Fig. 6)。この結果より、ウンシュウミカン抽出物には NEU3 阻害活性を有する物質が複数含まれ、複合的に作用していることが予想された。フラボノイドの抗腫瘍活性は数多くの報告があり、その作用メカニズムとして抗酸化活性などが考えられている。本研究の結果により、カンキツ類フラボノイドの抗がん作用の新しいメカニズムとして、シアリダーゼ NEU3 阻害による細胞増殖抑制が明らかとなった。今後はがんモデル動物を用いた実験などにより、*in vivo* におけるカンキツ類の NEU3 阻害活性および抗がん効果について詳細に検討していく予定である。

4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただいたサンケイ科学振興財団に深く感謝申し上げます。

5. 参考文献

1. Shiozaki, K., Koseki, K., Yamaguchi, K., Shiozaki, M., Narimatsu, H., and Miyagi, T. (2009) Developmental change of sialidase neu4 expression in murine brain and its involvement in the regulation of neuronal cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **284**, 21157–21164
2. Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Shiozaki, K., Sato, I., Kakugawa, Y., Yamanami, H., and Fujiya, T. (2008) Human sialidase as a cancer marker. *Proteomics.* **8**, 3303–3311
3. Kato, K., Shiga, K., Yamaguchi, K., Hata, K., Kobayashi, T., Miyazaki, K., Saijo, S., and Miyagi, T. (2006) Plasma-membrane-associated sialidase (NEU3) differentially

regulates integrin-mediated cell proliferation through laminin- and fibronectin-derived signalling. *Biochem. J.* **394**, 647–656

4. Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Sato, I., and Miyagi, T. (2009) Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) promotes formation of colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-treated transgenic mice. *Cancer Sci.* **100**, 588–594
5. Yamaguchi, K., Shiozaki, K., Moriya, S., Koseki, K., Wada, T., Tateno, H., Sato, I., Asano, M., Iwakura, Y., and Miyagi, T. (2012) Reduced susceptibility to colitis-associated colon carcinogenesis in mice lacking plasma membrane-associated sialidase. *PLoS One*. 10.1371/journal.pone.0041132
6. Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Takahashi, K., Moriya, S., and Miyagi, T. (2011) Regulation of sialyl lewis antigen expression in colon cancer cells by sialidase NEU4. *J. Biol. Chem.* **286**, 21052–21061
7. Wada, T., Hata, K., Yamaguchi, K., Shiozaki, K., Koseki, K., Moriya, S., and Miyagi, T. (2007) A crucial role of plasma membrane-associated sialidase in the survival of human cancer cells. *Oncogene.* **26**, 2483–2490

NEU3 inhibitory and anti-proliferation activity of citrus extract

Asami Ikeda, Ayana Yoshinaga, Kazuhiro Shiozaki

Faculty of Fisheries, Kagoshima University

4-50-20 Shimoarata, Kagoshima, 890-0056, Japan. tel: +81 99 286 4170

Abstract

Sialidase catalyzes the removal of sialic acids from glycoconjugates. Until now, four human sialidases have been cloned and characterized. Among them, sialidase NEU3 is localized at plasma membrane and desialyzes from ganglioside, which regulates transmembrane signaling in cancer cells. Recently NEU3 is focused as the target molecule of cancer medicine. Here, we tried to find NEU3 inhibitory substance from the methanol extract of natural products. About 100 extracts were examined about NEU3 inhibition *in vitro*, and, finally, citrus extracts was found to possess the strong NEU3 inhibitory activity. Exposure of citrus extract toward HeLa cells showed the decrease of cell proliferation, accompanied with the accumulation of GM3 ganglioside. To understand the active molecule in citrus extract, characteristic molecules found in citrus were tested for NEU3 inhibitory assay. As a result, several molecules showed NEU3 inhibitory activity, suggesting the NEU3 inhibition by citrus extract could be derived from the multiple mechanisms.