

非三重らせん状の VI 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖, NTH $\alpha 1(VI)$, の研究

Studies of type VI collagen $\alpha 1$ chain in non-triple helical form, NTH $\alpha 1(VI)$

日本化薬株式会社
医薬研究所 創薬グループ
主幹研究員 佐藤 学道

はじめに

2019 年の厚生労働省の人口動態統計では、死亡原因の第一位が悪性新生物（がん）であり、日本国民の約 3.7 人に一人ががんで死亡している。すなわち、がんに対する有効な治療薬や治療法を開発することが急務である。

一般的にコラーゲン分子は三重らせん構造を形成することが知られているが、三重らせん構造を形成しない非三重らせん状のコラーゲン分子の存在も報告されている。我々は、非三重らせん状の IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖である NTH $\alpha 1(IV)$ の研究の過程で、抗 NTH $\alpha 1(IV)$ 抗体である抗体#141 が、NTH $\alpha 1(IV)$ とは異なる分子 (140K) を認識することを明らかにした。

本論文では、抗体#141 が認識する 140K の同定及びその作用について報告した。本論文の第 1 章では、序論として既存の治療薬の問題点に触れるとともに、IV 型コラーゲン及び NTH $\alpha 1(IV)$ と癌との関係を概括し、140K 同定の意義及び同定された新たな非三重らせん状コラーゲン分子である NTH $\alpha 1(VI)$ の機能解析の重要性を述べた。

第 2 章では、140K が NTH $\alpha 1(VI)$ として同定されたことを示した。さらに、NTH $\alpha 1(VI)$ が VI 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖とは異なる糖鎖構造を有することも示した。

第 3 章では、NTH $\alpha 1(VI)$ 由来の 10 kDa 未満のペプチドが癌細胞株の増殖を促進する作用を有することを示した。

第 4 章では、今後の研究課題として、NTH $\alpha 1(VI)$ 由来ペプチドの配列決定、作用機序、産生機構の解明及び臨床検体での発現確認を挙げ、これらについて考察し、今後の研究の方向性を示した。

以下に各章の要約を記す。

第 1 章 序論

がんに対する有効な治療薬や治療法開発の必要性から、プレシジョンメディシンや免疫チェックポイント阻害剤に対する期待は高い。しかしながら、これらの治療法に効果を示さない患者さんも一定数存在することから、さらなる治療薬の開発が望まれている。

先行研究によると、非三重らせん状の IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖である NTH $\alpha 1(IV)$ が、ヒト培養細胞やヒト組織中に存在すること及びウサギ血管新生モデルにおいて血管内皮細胞の neovascular tip 領域に存在することが明らかとなっている。さらに、我々は、いくつかのヒ

ト癌細胞株のコンディションメディウムにおいて NTH $\alpha 1(\text{IV})$ の発現を確認している。そこで、我々は、NTH $\alpha 1(\text{IV})$ はがん血管新生及び増殖に重要である、と仮説を立て、NTH $\alpha 1(\text{IV})$ を認識する抗体#141 を用いて NTH $\alpha 1(\text{IV})$ の研究を実施した。研究の過程で、抗体#141 が NTH $\alpha 1(\text{IV})$ とは異なる分子である 140K を認識することが明らかとなった。そこで、我々は 140K の同定及び生物学的作用を解明することにより新たな創薬につながると考えた。

第 1 章では序論として、非三重らせん状コラーゲンの研究について概括し、本研究で実施した 140K の同定及びその機能解析の必要性について述べた。なお、140K が NTH $\alpha 1(\text{VI})$ として同定された経緯は第 2 章、NTH $\alpha 1(\text{VI})$ や NTH $\alpha 1(\text{VI})$ 由来ペプチドの機能解析については第 3 章で詳細を述べる。

第 2 章 非三重らせん状の VI 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖は *COL6A1* の既存とは異なる遺伝子産物である

非三重らせん状の IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖である NTH $\alpha 1(\text{IV})$ の発現は、ヒト培養細胞、ヒト胎盤及びウサギ組織で観察される。NTH $\alpha 1(\text{IV})$ と IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の翻訳後修飾が異なることから、NTH $\alpha 1(\text{IV})$ の生物学的機能は IV 型コラーゲンとは異なる可能性が考えられた。そこで、我々は NTH $\alpha 1(\text{IV})$ の生物学的機能を精査する為に、いくつかの抗 NTH $\alpha 1(\text{IV})$ 抗体を作製した。我々は、これらの抗体のキャラクタリゼーションの過程で抗体#141 が、NTH $\alpha 1(\text{IV})$ に加えて 140 kDa のポリペプチドである 140K を認識することを見出した。

第 2 章では、140K が *COL6A1* によってコードされる新規な非三重らせん状 VI 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖、NTH $\alpha 1(\text{VI})$ であることを示した。また、NTH $\alpha 1(\text{VI})$ の発現は、いくつかのヒト癌細胞株のコンディションメディウムで観察されたことから、NTH $\alpha 1(\text{VI})$ が腫瘍形成に関与していることが示唆された。一方、レクチン反応性から、NTH $\alpha 1(\text{VI})$ の糖鎖修飾が三重らせん構造を形成する VI 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖とは異なることが明らかとなった。以上の結果から、NTH $\alpha 1(\text{VI})$ は VI 型コラーゲンとは生合成機構や生物学的機能が異なることが示唆された。さらに、NTH $\alpha 1(\text{VI})$ が新たな創薬標的分子となり得る可能性が示された。

第 3 章 非三重らせん状の VI 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖、NTH $\alpha 1(\text{IV})$ 、の癌細胞増殖への関与

VI 型コラーゲンは、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 及び $\alpha 3$ 鎖から構成される。その内の *COL6A1* によってコードされる $\alpha 1$ 鎖は、高転移性のヒト膵臓癌細胞株 BxPC-M8 の遊走と浸潤及びヒト前立腺癌細胞株 LNCaP の増殖に関与していることが報告されている。また、*COL6A1* によってコードされる非三重らせん状ポリペプチド NTH $\alpha 1(\text{VI})$ の発現が、いくつかの癌細胞株のコンディションメディウム中で認められることを我々は明らかにしている。以上の知見から、NTH $\alpha 1(\text{VI})$ は癌細胞の遊走、浸潤、増殖に関与している可能性がある。しかし、NTH $\alpha 1(\text{VI})$ の癌細胞増殖への関与は不明であった。

第 3 章では、NTH $\alpha 1(\text{VI})$ 及び NTH $\alpha 1(\text{VI})$ 由来ペプチドの癌細胞の増殖に及ぼす影響について検討した結果を示している。具体的には、高転移性のヒト膵臓癌細胞株 S2-VP10 のコ

ンディションメディウム中に NTH $\alpha 1(VI)$ が存在すること及び COL6A1 ノックダウンにより S2-VP10 細胞の増殖が抑制されることを明らかにした。COL6A1 ノックダウンによる増殖抑制作用は、S2-VP10 細胞のコンディションメディウムによりレスキューされるが、VI 型コラーゲンではレスキューできないことが確認された。さらに、分子量により分画したコンディションメディウムのレスキュー活性を検討した。その結果、10 kDa 未満画分ではレスキュー活性が認められたが、NTH $\alpha 1(VI)$ を含む 10 kDa を超える画分ではレスキュー活性を示さないことが明らかとなった。また、COL6A1 ノックダウン処理をした 10 kDa 未満画分のコンディションメディウムではレスキュー活性の減弱が観察されたことから、NTH $\alpha 1(VI)$ 由来の 10 kDa 未満のペプチドが増殖に関与していると考えられた。すなわち、NTH $\alpha 1(VI)$ の 10 kDa 未満のペプチドへの断片化が癌細胞増殖促進活性に必要であること、本ペプチドは NTH $\alpha 1(VI)$ から生成されると考えられること及びその作用機序は VI 型コラーゲンとは異なることが示された。

第 4 章 総合討論

本研究では、抗体#141 が認識する 140K の同定を行うことで、新規な非三重らせん状コラーゲンポリペプチドである NTH $\alpha 1(VI)$ を見出し、NTH $\alpha 1(VI)$ 由来ペプチドが癌細胞株に対して増殖促進作用を有することを明らかにした。NTH $\alpha 1(VI)$ や NTH $\alpha 1(VI)$ 由来ペプチドは、新たな診断マーカーや創薬標的として有用であると考えられるが不明な点も多い。今後解決すべき課題として、1) NTH $\alpha 1(VI)$ 由来ペプチドの配列決定、2) NTH $\alpha 1(VI)$ 由来ペプチドの作用機序解明、3) NTH $\alpha 1(VI)$ や NTH $\alpha 1(VI)$ 由来ペプチドの産生機構の解明、4) 臨床検体での NTH $\alpha 1(VI)$ や NTH $\alpha 1(VI)$ 由来ペプチドの発現確認や測定系の開発が挙げられる。

第 4 章では、これらの課題について考察を行い、今後の研究の進むべき方向性を提示した。

本研究の結果から、NTH $\alpha 1(VI)$ や NTH $\alpha 1(VI)$ 由来ペプチドが、新たな診断薬や医薬品の標的分子となりうる可能性が示された。しかしながら、診断薬や医薬品への応用展開を図る為には、上述の課題を解決する必要がある。今後、共同研究も視野に入れて、課題の解決ができればと考えている。また、本研究から、非三重らせん状コラーゲンポリペプチドが、IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖や $\alpha 2$ 鎖以外にも存在することが明らかとなった。非三重らせん状コラーゲンポリペプチド研究の今後の発展にも期待したい。

審査付論文

博士論文申請者がファーストオーサーである論文は、下記の1から4の論文である。また、本研究の主たる内容を含む論文は1と4及び本研究に関連する論文は2と5である。

1. Sato T, Tokunaka K, Saiga K, Tomura A, Sugihara H, Hayashi T, Imamura Y, Morita M. Involvement of non-triple helical type VI collagen $\alpha 1$ chain, NTH $\alpha 1$ (VI), in the proliferation of cancer cells. *Oncol Rep.* 44: 2297–2305, 2020.
2. Sato T, Takano R, Takahara N, Tokunaka K, Saiga K, Tomura A, Sugihara H, Hayashi T, Imamura Y, Morita M. Identification of a common epitope in the sequences of COL4A1 and COL6A1 recognized by monoclonal antibody #141. *J. Biochem.* 165: 85–95, 2019.
3. Sato T, Konno J, Sekiguchi A, Yoneki N, Kawano K, Hayashi T, Ogawa Y, Kikitsu A, Aijima T, Hara K, Hara S, Hayashi H, Fuchigami K, Igo N, Takashima Y, Kobayashi Y, Mori M, Yamamoto K, Niwa M, Saiga K, Ichimura E. Long-lasting immunosuppressive effects of tacrolimus-loaded micelle NK61060 in preclinical arthritis and colitis models. *Ther Deliv.* 9: 711–729, 2018.
4. Sato T, Takano R, Tokunaka K, Saiga K, Tomura A, Sugihara H, Hayashi T, Imamura Y, Morita M. Type VI collagen $\alpha 1$ chain polypeptide in non-triple helical form is an alternative gene product of *COL6A1*. *J Biochem.* 164: 173–181, 2018.
5. Morita M, Sugihara H, Tokunaka K, Tomura A, Saiga K, Sato T, Imamura Y, Hayashi T. Preparation and partial characterization of monoclonal antibodies specific for the nascent non-triplehelical form of the type IV collagen alpha 1 chain. *Biochem Biophys Rep.* 9: 128–132, 2017.