

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成14年度採択研究代表者

神奈木 玲児

(愛知県がんセンター分子病態学部 部長)

「癌の進展における細胞接着性機能糖鎖の解明」

1. 研究実施の概要

神奈木グループは、細胞接着分子セレクトインとその特異的リガンド糖鎖を介した細胞接着のがんの進展における意義を明らかにすることを目的としている。セレクトインの特異的リガンド糖鎖シアリルLe^{x/a}糖鎖の発現は、がんの発生源地である正常上皮細胞とくらべ、癌化した細胞では著しく亢進しているが、本年度はその発現亢進のメカニズムを研究し、低酸素時にはたらく転写因子hypoxia inducible factorの作用がその背景にあることを明らかにした。糖鎖発現の制御機構の研究として重要な進歩と考えられ、今後引き続きシアリルLe^{x/a}糖鎖発現の誘導機構について研究を継続する。**北島グループ**は、セレクトインとその糖鎖リガンドの結合がリガンド中のシアリ酸の構造変化で制御される分子機構を解明するとともに、このようなシアリ酸側の構造変化が引き起こす細胞機能制御の普遍性と癌進展との関連を探究する。本年度までに、その探究に必要な基本的な方法論の開発に取り組み成功したため、今後の癌細胞と正常細胞におけるシアリ酸を介する細胞接着の解析が可能になった。**小島グループ**はセレクトイン糖鎖リガンドの構造と機能を解明するために、接着性機能糖鎖エピトープを有する人工糖脂質の糖鎖工学的的手法による合成・精製を行うとともに、癌細胞上の接着性複合糖質糖鎖を人工糖脂質へと変換し、各種接着分子と相互作用を解析することで、癌細胞に特徴的な機能性糖鎖を検索する。これまでに微生物由来糖転移酵素を用いてセレクトインリガンドおよびその前駆体である人工糖脂質を酵素学的手法により効率良く作製する技術および人工糖脂質の構造解析法を確立した。

浜口グループはヒアルロン酸合成が活性化しているv-Src癌化細胞やヒト癌由来細胞株を用いて、ヒアルロン酸合成酵素とそのレセプターであるCD44、あるいはその下流のシグナル伝達因子を標的とする、癌細胞の浸潤転移を抑制する新たな遺伝子治療法を開発しようとしている。本年度はヒアルロン酸合成酵素(HAS)に対する特異抗体を作成し、これを用いてv-SrcがSTAT3依存的にヒアルロン酸合成酵素特にHAS2の発現を活性化する事を明らかにした。**板野グループ**は、ヒアルロン酸複合体形成が CD44-ヒアルロン酸相互作用の促進に働くことを本年度明らかにした。次年度以降は、ヒアルロン酸複合体がCD44を介して細胞を活性化する機構を解明する。また4-メチルウンベリフェロンのヒアルロン酸合成阻害機構に関する解析を行い、新たな阻害機構を明らかにした。今後は、ヒアルロン酸合

成の制御技術を確立して癌の浸潤転移阻止を目指す。

2. 研究実施内容

細胞が悪性化するとさまざまな糖鎖異常が出現する。とくに細胞接着分子セレクトインのリガンドであるシアリルLe^xやシアリルLe^a糖鎖の発現は癌細胞で亢進し、これらの糖鎖と血管内皮E-セレクトインとの結合により癌の血行性転移や腫瘍血管形成が促進される。細胞の悪性化に伴う糖鎖変化の機構として古くから「糖鎖不全現象」と「異常糖鎖の新規合成」の二つの機構が知られている。神奈木グループは、本年度は「異常糖鎖の新規合成」の機構によるシアリルLe^{x/a}糖鎖発現の亢進機構の解明を試みた。癌細胞はしばしば低酸素状態にさらされ、低酸素状態を克服する代謝偏倚を獲得する事が知られているので、とくに低酸素時にはたらく転写因子hypoxia inducible factor (HIF) のシアリルLe^{x/a}糖鎖発現に対する作用を解析した。その結果、細胞の低酸素下培養によってシアリルLe^{x/a}の発現が有意に誘導されることを見いだした(図1)。

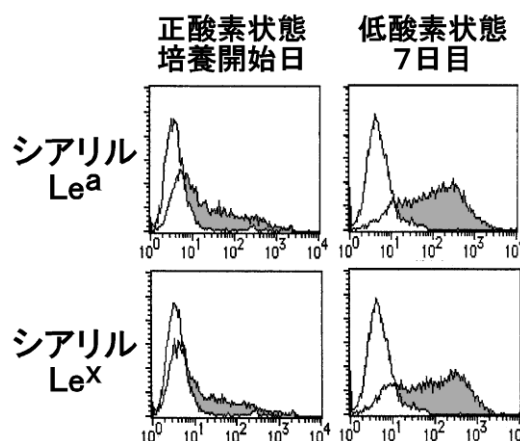


図1. 大腸癌細胞の低酸素培養によるシアリル Le^{x/a}発現誘導.

この誘導の分子生物学的機序を明らかにするために、低酸素で転写誘導される遺伝子をDNAマイクロアレイ法およびRT-PCR法にて検索したところ、糖転移酵素および糖トランスポーター遺伝子数種の転写誘導を認めた。これら遺伝子の低酸素による転写誘導は、リポーターアッセイにおいて転写因子HIFのドミナントネガティブ体の共発現により消失し、HIFの下流にある現象と考えられた。また低酸素によりα5-integrinやsyndecan-4などの

接着分子の発現も強く誘導された(図2)。以上の成果を*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:8132-8137, 2004にて報告した。

セレクトインの糖鎖リガンドであるシアリル6-スルホLe^x分子中のシアリ酸がサイクリックシアリ酸に変化することによってセレクトインとの結合が解除されることが神奈木らによって初めて見いだされた。このようなシアリ酸側の構造変化によって細胞機能が発現・解除される制御機構は、

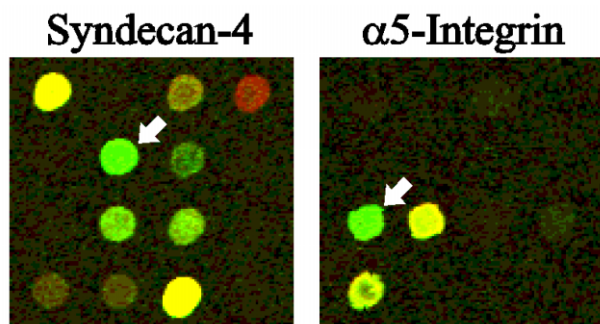


図2. DNA マイクロアレイによる低酸素による Syndecan-4, α 5-integrin 遺伝子の発現誘導 (Normoxia-赤, Hypoxia-緑).

セレクトインだけでなく他のシアル酸結合分子においても起こることが推測される。**北島グループ**はこの可能性を探究するために、特に、癌細胞と正常細胞におけるシアル酸を介する細胞接着に着目して、その分子機構を解明すると共に、それを人為的に制御する技術基盤の確立を目指している。平成15年度では、サイクリックシアル酸形成とセレクトインおよび関連シアル酸結合分子を介する細胞接着制御の解明およびユニークなシアル酸構造の制御的機能の解明を目指した。まず、これらの解明研究の基本となる微量化学検出法の開発では、サイクリックシアル酸の定量法の目処をつけることができた。その過程で、サイクリックシアル酸が想像以上に存在していることを示唆する結果が得られたが、今後その確実な証明を行う必要がある。また、より正確に検出する化学的方法を用いて、種々の細胞臓器における存在分布の検索を行う予定である。また、サイクリックシアル酸以外のユニークなシアル酸構造の機能に関しては、硫酸化シアル酸、ジ・オリゴ・ポリシアル酸に注目して研究を進めた。特に、硫酸化シアル酸の微量検出を可能にする化学的検出法、検出抗体の開発とその利用において進展があった（投稿準備中）。このように本年度は、サイクリックシアル酸を含めユニークなシアル酸の構造と生物学的機能研究に必要な方法論の確立することをほぼ達成できた。したがって、今後、種々の癌細胞における存在検索、癌進展との関わりの解明の研究へと発展させる予定である。

小島グループは多様な機能性糖鎖およびその人工糖脂質の創成を目的として、ラクトN-テトラオースをDPPE化し人工糖脂質へと変換後HPLCにより精製し、このラクトN-テトラオース-DPPEを基質として市販の α 2-3シアル酸転移酵素によりシアリルラクトN-テトラオース-DPPEへと変換した。変換効率は約50%であった。一方、細菌由来の糖転移酵素を用いた天然からは得難い糖鎖およびその人工糖脂質の創出についても検討した。キラン・バレー症候群の原因菌と言われているキャンピロバクターの菌体破碎液より酵素を抽出し、Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-DPPEを基質として反応させたところ、また非常に高い効率（約60%）でシアリル化糖鎖に変換することが可能であったが、Sia α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-DPPE以外に2つの生成物が認められた。シアリダーゼに対する感受性からこれら2種の生成物はGal β 1-3GlcNAc β 1-3(Sia α 2-4/6)Gal β 1-4Glc-DPPE, Sia α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3(Sia α 2-4/6)Gal β 1-4Glc-DPPEであると推定された。すなわちキャンピロバクターのシアル酸転移酵素は非還元端のガラクトース残基のみならず内側に存在するガラクトースに対してもシアル酸を導入することができると考えられた。またGal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-DPPEを基質とした場合も同様の生成物が確認された。動物由来のシアル酸転移酵素を用いた場合ルイスXやルイスa構造からシアリルルイスXやシアリルルイスaには変換できないため、本酵素を用いてルイスXからシアリルルイスXへの変換を試みた。ラクトフコペンタースIII-DPPE (Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-DPPE)を基質として反応させたところ、非常に効率良くシアル酸を含む糖鎖に変換したが、このシアリル化糖鎖はシアリダーゼ処理に抵抗性を示すこと、および抗アリアルルイスX抗体と反応しないことからGal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3(Sia α 2-4/6)Gal β 1-4Glc-DPPEであると予想された。従って、キャンピロバクターのシアル酸転移酵素でもル

イスXからシアリルルイスXへの変換は不可能であると考えられた。しかしながら、バクテリア由来の糖転移酵素を用いることで、通常動物では存在し得ない糖鎖構造の創出が可能であると考えられた。今後は本年度作製したシアリルラクトN-テトラオース-DPPEとピロリ菌由来のフコース転移酵素を用いて、セレクチンリガンド候補糖鎖を創成する予定である。

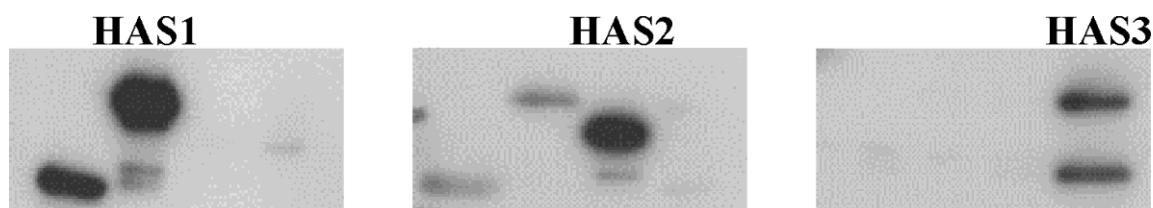


図4. 抗HAS抗体の反応性.

浜口グループは本年は、ヒアルロン酸合成酵素 (HAS) を特異的に認識できる抗体を作成し、その抗体を用いてv-SrcがSTAT3依存的にヒアルロン酸合成酵素、特にHAS2の発現を活性化することを明らかにした。まず最初にGST融合蛋白の形で、HASのそれぞれ特異的なアミノ酸配列部分をバクテリアに発現し、抗体を作成した (図3)。抗HAS2抗体を用いて細胞を蛍光染色したところ、がん化細胞で特異的な蛍光を観察できた (図4)。次に、RT-PCR法で種々のsrc変異株発現細胞におけるHASの発現を調べた。その結果、HASの中でも特にHAS1、HAS2に癌化に特異的な発現の活性化が認められた (図5)。

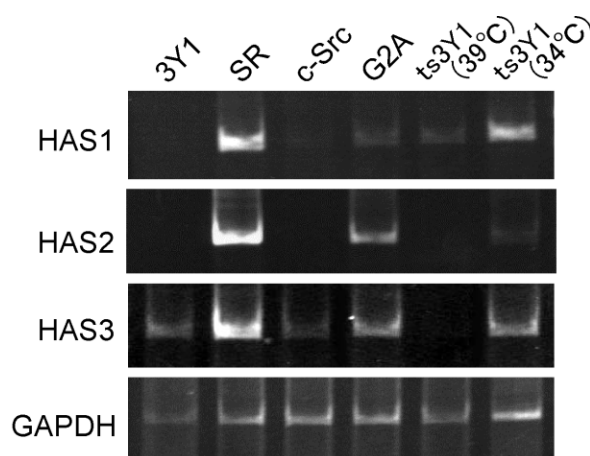


図5. 各種src変異株発現細胞におけるHASの発現.

板野グループは、「ヒアルロン酸・CD44による癌転移促進機構の解明」および「ヒアルロン酸合成機構の解明と合成阻害剤の開発」の課題と取り組んだ。ヒアルロン酸・CD44による癌転移促進機構の解明を目的に、本年度はヒアルロン酸-CD44相互作用の機構解明を試みた。まずヒアルロン酸依存的な

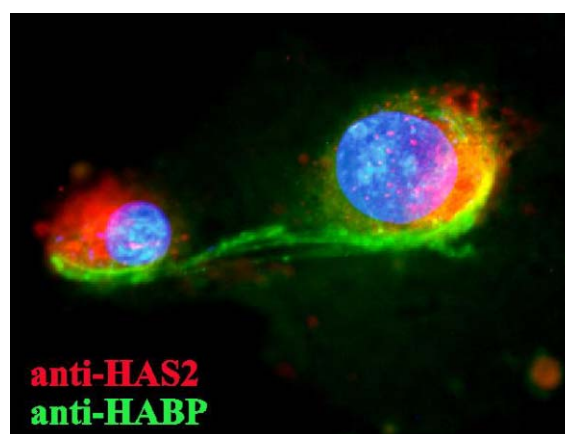


図4. 抗HAS抗体による蛍光染色.

CD44の機能にヒアルロン酸複合体形成が及ぼす効果を細胞接着実験により検討した。ヒアルロン酸複合体と対照のヒアルロン酸単独を塗布した培養皿を用いて、CD44高発現細胞の接着を両細胞基質間で比較検討した。そしてヒアルロン酸単独では細胞接着が認められない濃度下において、ヒアルロン酸複合体が強い細胞接着活性を示すことを明らかにした。またこの接着はヒアルロン酸の添加や細胞を抗CD44抗体にて前処理することで完全に阻害された。以上の成果より、ヒアルロン酸複合体の形成がCD44-ヒアルロン酸を介した細胞接着の促進に重要であることを見出した。また、本研究の目的であるヒアルロン酸合成機構の解明と合成阻害剤の開発を念頭に、既存のヒアルロン酸合成阻害剤である4-メチルウンベリフェロン(MU)の作用機序に関する解析を行い、新たな阻害機構の存在を明らかにした。MUが濃度依存的にヒアルロン酸合成酵素活性を阻害すること、またUDP-グルクロン酸糖転移酵素(UGT)の糖転移反応によりMUグルクロン酸が生成することを明らかにした。特にMUのグルクロン酸化がヒアルロン酸合成の阻害に重要な役割を果たしていることが証明されたことで、新規阻害剤の開発を行う上で新たな方向性が示された。また本解析の過程でヒアルロン酸合成開始反応に促進機構が存在し、合成制御に働く可能性が示唆された。

3. 研究実施体制

神奈木グループ

- ① 研究分担グループ長：神奈木 玲児（愛知県がんセンター分子病態学部・部長）
- ② 研究項目：セレクチンと糖鎖リガンドを介した細胞識別・接着の制御機構とがんの進展

北島グループ

- ① 研究分担グループ長：北島 健（名古屋大学生物機能開発利用研究センター・助教授）
- ② 研究項目：細胞接着に関わるシアル酸の構造変化と細胞接着制御の解明

小島グループ

- ① 研究分担グループ長：小島 直也（東海大学工学部生命化学科・助教授）
- ② 研究項目：細胞接着性機能糖鎖の構造解析と人工糖脂質を用いた糖鎖の機能解析

濱口グループ

- ① 研究分担グループ長：濱口道成（名古屋大学大学院医学系研究科・教授）
- ② 研究項目：癌細胞の浸潤転移を制御するヒアルロン酸-CD44シグナルの研究

板野グループ

- ① 研究分担グループ長：板野 直樹（愛知医科大学分子医科学研究所・講師）
- ② 研究項目：ヒアルロン酸糖鎖を標的とした癌浸潤転移阻止技術の開発と創薬

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

神奈木グループ

- Koike, T., Kimura, N., Miyazaki, K., Yabuta, T., Kumamoto, K., Takenoshita, S., Chen, J., Kobayashi, M., Hosokawa, M., Taniguchi, A., Kojima, T., Ishida, N., Kawakita, M., Yamamoto, H., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., and Kannagi, R. Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells—a missing link between Warburg effect and induction of selectin ligand carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**: 8132–8137, 2004.
- Itano, N., Sawai, T., Atsumi, F., Miyaishi, O., Taniguchi, S., Kannagi, R., Hamaguchi, M., and Kimata, K. Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation. *J. Biol. Chem.*, **279**: 18679–18687, 2004.
- Suzuki, A., Yoshioka, S., Sekine, M., Yonekawa, H., Takenaka, M., and Kannagi, R. Core 2 GlcNAc transferase and kidney tubular cell-specific expression. *Glycoconjugate J.*, **20**: 151–156, 2004.
- Hamada, T., Hirota, H., Yokoyama, S., Yamaguchi, M., Ohtsu, Y., Ishida, H., Kiso, M., Kanamori, A., and Kannagi, R. NMR structure elucidation of cyclic sialyl 6-sulfo Lewis x, a biologically dormant form of L-selectin ligand. *Tetrahedron Lett.*, **44**: 1167–1170, 2003.
- Tsuchida, A., Okajima, T., Furukawa, Ke., Ando, T., Ishida, H., Yoshida, A., Nakamura, Y., Kannagi, R., Kiso, M., and Furukawa, K. Synthesis of disialyl Lewis a structure in colon cancer cell lines by a sialyltransferase ST6GalNAc VI responsible for the synthesis of a-series gangliosides. *J. Biol. Chem.*, **278**: 22787–22794, 2003.
- Yamaguchi, M., Ishida, H., Kanamori, A., Kannagi, R., and Kiso, M. Studies on the endogenous L-selectin ligands: systematic and highly efficient total synthetic routes to lactamized-sialyl 6-O-sulfo Lewis X and other novel gangliosides containing lactamized neuraminic acid. *Carbohydr. Res.*, **338**: 2793–2812, 2003.
- Hiraiwa, N., Yabuta, T., Yoritomi, K., Hiraiwa, M., Tanaka, Y., Suzuki, T., Yoshida, M., and Kannagi, R. Transactivation of the fucosyltransferase VII gene by human T-cell leukemia virus type 1 tax through a variant cAMP-responsive element. *Blood*, **101**: 3615–3621, 2003.

北島グループ

- Maehashi, E., Sato, C., Ohta, K., Harada, Y., Matsuda, T., Hirohashi, N.,

Lennarz, W. J., and Kitajima, K. Identification of the sea urchin 350 kDa sperm binding protein as a new sialic acid-binding lectin that belongs to the heat shock protein 110 family. Implication of its binding to gangliosides in sperm lipid rafts in fertilization. *J. Biol. Chem.* **278**: 42050-42057, 2003.

小島グループ

- Takano, Y, Kojima, N., Nakahara, Y., Hojo, H., and Nakahara, Y. Solid-phase synthesis of core 2 O-linked glycopeptide and its enzymatic sialylation. *Tetrahedron*, **59**, 8415-8417, 2003
- Shimizu, Y., Yamakami, K., Gomi, T., Nakata, M., Asanuma, H., Tadakuma, T. and Kojima, N. Protection against *Leishmania major* infection by oligomannose-coated liposomes. *Bioorg. & Med. Chem.*, **11**, 1191-1195, 2003
- Kuroda, Y., Nakata, M., Makino, A., Matsumoto, A., Ohashi, K., Itahashi, K., Takeuchi, F., Goto, M., Kojima, N., and Mizuochi, T. Structural studies on IgG oligosaccharides of patients with primary Sjögren's syndrome. *Glycoconjugate J.*, **19**, 23-31, 2002 (published in 2003 Apr)
- Tang, T., Nakata, M., Konishi, T., Kojima, N., Mizuochi, T., & Makuuchi, M. Association of histochemical expression of *Maackia amurensis* leucoaggrutin-positive glycoconjugates with behavior of human gastric cancer. *Histophthology*, **42**, 239-245, 2003

浜口グループ

- Shigeru Hashimoto, Yasuhito Onodera, Ari Hashimoto, Miwa Tanaka, Michinari Hamaguchi, Atsuko Yamada and Hisataka Sabe. Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101(17):6647-6652 (2004).
- Yukio Seki, Noriko Suzuki, Munehisa Imaizumi, Takashi Iwamoto, Yuichi Ueda and Michinari Hamaguchi. STAT3 and MAPK in human lung cancer tissues and suppression of oncogenic growth by JAB and dominant negative STAT3. *Int. J. Onc.* 24:931-934 (2004).
- Naoki Itano, Takahiro Sawai, Fukiko Atsumi, Osamu Miyaishi, Shun'ichiro Taniguchi, Reiji Kannagi, Michinari Hamaguchi and Koji Kimata. Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation. *J. Biol. Chem.* 279(18):18679-18687 (2004).
- Yasushi Takenouchi, Myat Lin Oo, Takeshi Senga, Yasuo Watanabe, Kazuya

Machida , Kou Miyazaki , Yuji Nimura and Michinari Hamaguchi Tyrosine phosphorylation of NOS3 in a breast cancer cell line and Src-transformed cells. *Oncol. Rep.* 11(5):1059-1062 (2004).

- Takashi Iwamoto, Takeshi Senga, Kouichi Adachi and Michinari Hamaguchi. Stat3-dependent induction of interleukin-3 receptor expression in leukemia inhibitory factor-stimulated M1 mouse leukemia cells. *Cytokine* 25:136-139 (2004).
- Toshio Kokuryo, Tatsuyoshi Yamamoto, Koji Oda, Junichi Kamiya, Yuji Nimura, Takeshi Senga, Yoshinari Yasuda, Yoshiyuki Ohno, Yasuni Nakanuma, Miin-Fu Chen, Yi-Yin Jan, Ta-Sen Yeh, Cheng-Taug Chiu, Ling-Ling Hsieh and Michinari Hamaguchi. Profiling of gene expression associated with hepatolithiasis by complementary DNA expression array. *Int. J. Onc.* 22:175-179 (2003).
- Takeshi Senga, Shotaro Iwamoto, Tsunehiko Yoshida, Takeshi Yokota, Koichi Adachi, Yozo Miyake, Eiichi Azuma, Michinari Hamaguchi, and Takashi Iwamoto. LSSIG is a novel murine leukocyte specific GPCR that is induced by th activation of STAT3. *Blood* 101:1185-1187 (2003).
- Myat Lin Oo, Takeshi Senga, Aye Aye Thant, A. R. M. Ruhul Amin, Pengyu Huang, Naing Naing Mon and Michinari Hamaguchi. Cysteine residues in the C-terminal lobe of Src: Their role in the suppression of the Src kinase *Oncogene* 22:1411-1417 (2003).
- A. R. M. Ruhul Amin, Takeshi Senga, Myat Lin Oo, Aye Aye Thant and Michinari Hamaguchi. Secretion of matrix metalloproteinase-9 by the proinflammatory cytokine, IL-1 β : a role for the dual signaling pathways, Akt and Erk. *Genes to Cells* 8:515-523 (2003).
- A. R. M. Ruhul Amin, Myat Lin Oo, Takeshi Senga, Noriko Suzuki, Gen-Sheng Feng and Michinari Hamaguchi. SHP-2 regulates Concanavalin A-dependent secretion and activation of MMP-2 via the Erk and p38 pathways *Cancer Res.* 63(19):6334-6339 (2003).
- A. R. M. Ruhul Amin, Yasukatu Ichigotani, Myat Lin Oo, Md. Helal Uddin Biswas, Hong Yuan, Pengyu Huang, Naing Naing Mon and Michinari Hamaguchi. The PLC-PKC cascade is required for IL-1 β -dependent Erk and Akt activation: their role in proliferation. *Int. J. Onc.* 23:1727-1731 (2003).

板野グループ

- Itano, N., Sawai, T., Astumi, F., Miyaishi, O., Taniguchi, S., Kannagi, R., Hamaguchi, M., and Kimata, K. Selective Expression and Functional

Characteristics of Three Mammalian Hyaluronan Synthases in Oncogenic Malignant Transformation. *J. Biol. Chem.* **279**: 18679-18687, 2004

- Yamada, Y., Itano, N., Narimatsu, H., Kudo, T., Morozumi, K., Hirohashi, S., Ochiai, A., Ueda, M., and Kimata, K. Elevated transcript level of hyaluronan synthase1 gene correlates with poor prognosis of human colon cancer *Clin. Exp. Metastasis* **21**: 57-63, 2004

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：3件（CREST研究期間累積件数：3件）