

「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、がんの発生母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、発癌初期の発現誘導にはエピジェネティックな遺伝子発現抑制機構がその背景にあることを明らかにした。また、癌の進行に伴うその発現亢進に、転写因子hypoxia inducible factorが関与する分子生物学的機構を詳細に解析した。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はリガンド中のシアル酸の構造変化で制御されることに着目し、その分子機構を解明し、このようなシアル酸側の構造変化による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、シアル酸の構造変化を追跡する確実な方法論の開発を行い、現在、実際の組織・細胞における詳細な存在分布の解析を行っている。今後、細胞接着における機能研究が可能になった。**小島グループ**は細胞や機能性分子から人工糖脂質ライブラリーを構築し、それらに含まれる機能性糖鎖の同定ならびに解析を行うことを目的としている。そのために、微量で人工糖脂質の検出が可能な蛍光人工糖脂質の作製法を開発し、それらのハンドリング技術を構築した。さらに大腸がん細胞株のマイクロドメイン中に含まれるE-セレクトインリガンド分子中に含まれる接着機能性糖鎖の解析のため、リガンド分子から蛍光人工糖脂質ライブラリーを作製し、機能性糖鎖の同定を行ってゆく。

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する。 **板野グループ**はヒアルロン酸の腫瘍形成促進作用を明らかにする目的で、血管新生に対するヒアルロン酸作用の動物試験を行い、ヒアルロン酸マトリックスが血管形成を促進することを見出した。また、ヒアルロン酸無細胞合成系の確立を目指して、バキュロウイルス発現系によるヒアルロン酸合成酵素蛋白質の大量発現と精製法を確立した。今後はこの無細胞ヒアルロン酸合成系を用いて糖鎖合成阻害剤の探索を行う。

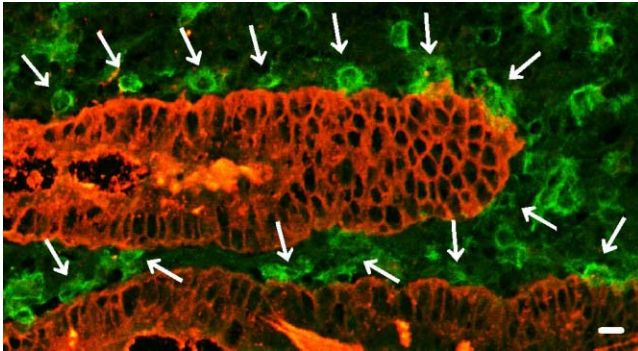


図1. ヒト大腸粘膜における上皮細胞と白血球との接着。上皮細胞の糖鎖リガンドジシアリルLe^aを赤で、この糖鎖と特異的に結合するSiglec-7陽性の白血球を緑で染色しコンフォーカル顕微鏡で観察した。

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、本年度は発癌初期に「糖鎖不全現象」のメカニズムによって消化器癌細胞においてシアリルLe^a糖鎖の発現が誘導される機構を解明した。正常消化管上皮細胞においては、シアリルLe^a糖鎖はごく弱くしか発現されて居らず、それよりも複雑な構造を持つ2-3, 2-6ジシアリルLe^a糖鎖が強く発現している。これは、正常上皮細胞ではシアリル酸転移酵素ST6Gal1NAcVIの働きによって合成されている。癌化した細胞ではST6Gal1NAcVI遺伝子の発現が抑制され、このため癌細胞ではシアリルLe^a糖鎖の発現が誘導される。この背景には、癌化に伴うDNAのメチル化やヒストンの脱アセチル化などのエピジェネティックな遺伝子発現抑制機構が存在することが明らかになった。また、正常上皮細胞に強く発現するジシアリルLe^a糖鎖は、Siglec-7の特異的糖鎖リガンドとして働き、正常粘膜内で白血球系細胞と上皮細胞との相互作用を媒介することを明らかにした（図1）。この細胞間相互作用は正常粘膜内の免疫学的ホメオスタシスを保持する働きをしていると見られる成績が得られつつある。一方、進行癌では、転写因子hypoxia inducible factor (HIF)のシアリルLe^{x/a}糖鎖発現がさらに亢進するが、この機構についても引き続き解析を進めた。

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分子中のシアリル酸は、脱アセチル化、さらに環状ラクタム化されて、セレクトインとの結合が制御される。北島グループはこのようなシアリル酸構造の変化による細胞接着の制御機構の生体内における普遍性の検証と、シアリル酸構造の人為的改変による細胞接着機能の制御を目指して、(1) サイクリックシアリル酸形成とセレクトインおよび関連シアリル酸結合分子を介する細胞接着制御の解明、(2) その他のシアリル酸構造変化による細胞接着制御の解明、(3) シアリル酸を介する相互作用の人為的制御による癌の進展防御の技術基盤の開発を行なう。(1)については、サイクリックシアリル酸残基の普遍的な存在証明のために、14、15年度で開発した化学的検出法を、さらに改良することに成功した（投稿準備中）。予備的に癌細胞においてこのシアリル酸存在を見出した。(2)については、乳腺および乳以外のCD36上にポリシアリル酸の存在を検索した。血球には存在せず、脳において見出された（投稿準備中）。また、KDN、

ジシアル酸構造、硫酸化シアル酸構造などユニークなシアル酸の検出法が確立できた。現在、癌および正常細胞におけるこれらのシアル酸の存在様式を組織学的に検証しているところである。(3)について、まず、サイクリックシアル酸を介する相互作用については、現在、この糖残基を特異的に認識する有用酵素の探索を行っている。硫酸化シアル酸やポリシアル酸と相互作用する分子の検索においては、微量で相互作用を測定する蛍光分光装置を用いた相互作用測定法、および表面プラズモン共鳴装置を用いた定量法の開発に着手した。

小島グループは糖鎖構造解析技術および人工糖脂質の作製・ハンドリング技術を活用して、接着性機能糖鎖の人工糖脂質ライブラリーを作製し、それを用いてセレクトインのリガンドであるシアリルルイスXをはじめとする多様な細胞接着性糖鎖を解明することを目的としている。本年度は、この目的を達成するために、1) 微量の機能性糖鎖の検出と解析を同一のサンプルから一連の操作で行うことができる方法を確立し、2) 大腸がん細胞株のE-セレクトインリガンド分子の接着性機能糖鎖の同定を試みている。微量の機能性糖鎖の検出と解析を同一のサンプルから一連の操作で行うことができる方法の確立のために、まずリン脂質と糖鎖の間に蛍光団を有する蛍光人工糖脂質へと糖鎖を誘導する方法を検討し、ついでこの蛍光人工糖脂質を膜上またはプレート上で各種レクチンにより検出した後、ホスホリパーゼD処理により蛍光ラベルされた機能性糖鎖を遊離させる方法の妥当性について検討した。蛍光人工糖脂質はパラアミノ安息香酸で還元末端をラベルした糖鎖（ラクトースなど）のカルボン酸をWSCとHOBtで活性エステルへと導いた後、ホスファチジルエタノールアミンと縮合させることで定量的に合成した。人工糖脂質の合成確認はMALDI-TOF-MSにて行った。これらの蛍光人工糖脂質をPVDF膜上にスポットし各種レクチンを用いて検出したところ、それぞれのレクチンの糖鎖結合特異性に応じて検出が可能であった。さらにPVDF膜上に固定化した人工糖脂質を直接ホスホリパーゼDで消化することにより、人工糖脂質から蛍光標識糖鎖として糖鎖部分を定量的に回収した後、人工糖脂質由来の蛍光標識糖鎖をHPLCによる分離、MSによる構造解析が行えることを確認した。すなわち蛍光人工糖脂質を用いることで、微量の接着性（レクチン反応性）の機能糖鎖を検出、同定することが可能になったと考えられる。今後はプローブとして蛍光標識リン脂質を作製し、常法の還元アミノ化により糖鎖を直接蛍光人工糖脂質に誘導する方法を構築し、その微量化を目指す予定である。一方、大腸がん細胞株のE-セレクトインリガンド分子に関しては、リガンド分子の効率的な精製方法を検討した。細胞をトリトンX-100含有緩衝液でホモジナイズし、常法に従いマイクロドメインを調製したところ、シアリルLe^aエピトープをもつ120kDaおよび40kDaの糖タンパク質が非常に高濃度にマイクロドメインに集積していることが判明した。特に40kDaの糖タンパク質はマイクロドメインにのみ存在していた。さらに、この糖タンパク質を含むマイクロドメインをE-セレクトイン-Fcで免疫沈降するとLe^aエピトープをもつ120kDaおよび40kDaの糖タンパク質ともにE-セレクトイン-Fc結合画分に回収されたので、マイクロドメインがE-セレクトインのリガンドとなりうることも判明した。しかし、マイクロドメインからオクチルグルコースでこれら糖タンパク質を抽出した後、E-セレクト

ン-Fcで免疫沈降すると120kDaの糖タンパク質のみがE-セレクトインと結合した。従って、120kDaおよび40kDaの糖タンパク質はマイクロドメイン中で複合体を形成しているものと考えられた。なおN-グリカナナーゼ処理の結果から、120kDaおよび40kDaの糖タンパク質糖鎖はそれぞれO-およびN-結合型糖鎖であると推定された。またSW10831-2-8株で発現しているジシアリルLe^aエピトープはこのマイクロドメイン中の40kDa糖タンパク質にのみ存在していた。今後は、これらの糖タンパク質をマイクロドメインから精製し、分子上の糖鎖を蛍光人工糖脂質に誘導後、上記方法に基づいた機能解析と構造解析を行う予定である。

浜口グループはv-*Src*癌化細胞において、ヒアルロン酸合成活性化シグナルを検討した結果、*Ras*シグナルと*Stat3*シグナルが共益して高いヒアルロン酸合成をもたらす事を明らかにした。更に、*Stat3*で転写が活性化されるヒアルロン酸合成酵素は、主にHAS1及びHAS2である事が明らかになった。*Stat3*のsiRNAをデザインし、その作用をみたところ*Src*癌化細胞のヒアルロン酸合成を著明に抑制する事が明らかになった。更に、肺癌組織において、*Stat3*が高い頻度で恒常的に活性化している事を明らかにした。そこで現在siRNAの作用を、ヒアルロン酸合成の高いひと癌細胞においても検討中である。また、我々はヒアルロン酸—CD44シグナルの研究と平行して、癌の浸潤転移に関与する糖蛋白質を調べている。ConAは、その刺激下でマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)分泌を活性化する事が知られている。このシグナルは、癌の浸潤転移に重要な役割を担うものとして、我々は注目してきた。その結果、SHPS-1がConAのMMP分泌刺激を伝達する機能的なレセプターである事を明らかにした。

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を目的に、本年度はヒアルロン酸糖鎖合成とマトリックス形成を制御する技術の開発に取り組んだ。そして、腫瘍形成や癌転移の促進に働く血管新生に対して、ヒアルロン酸糖鎖合成の抑制が及ぼす効果を動物試験により検討した。具体的には、ヒアルロン酸合成酵素(HAS)遺伝子の発現をRNAi法により抑制し、あるいは、HASアイソフォームのうちHAS1遺伝子の欠損マウスを作製して、マトリゲルプラグアッセイにより血管新生を評価した。その結果、マトリゲル内に新生した血管周囲にはヒアルロン酸マトリックスが形成されており、その形成にHAS1とHAS2が合成酵素として関与していることを見出した。マトリゲル内への血管侵入を測定した結果、HAS1遺伝子欠損マウスは野生型マウスのそれと有意差を認めなかったが、HAS2のRNAiを作用させると、血管侵入の有意な抑制が観察された。以上の結果より、HAS2によって合成されるヒアルロン酸が血管新生に深く関与していることが明らかとなった。また、ヒアルロン酸合成機構の解明と合成阻害剤の開発を目的として、本年度は無細胞ヒアルロン酸合成系の確立を目指し、バキュロウイルス発現系を用いたHAS蛋白質の大量発現と精製を試みた。そして、HAS蛋白質をヒスチジンタグとの融合蛋白質として発現し、界面活性剤により活性を保持した状態で可溶化、さらにアフィニティー精製することに成功した。今後、この無細胞ヒアルロン酸合成システムにより、ヒアルロン酸合成阻害剤のハイスループットな探索を目指す。

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（名古屋大学生物分子応答研究センター・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人工糖脂質ライブラリーの構築とそれ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（原著論文）発表

神奈木グループ

- Miyazaki, K., Ohmori, K., Izawa, M., Koike, T., Kumamoto, K., Furukawa, K., Ando, T., Kiso, M., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Yoshida, A., Takeuchi, M., and Kannagi, R. Loss of disialyl Lewis^a, the ligand for lymphocyte inhibitory receptor Siglec-7, associated with increased sialyl Lewis^a expression on human colon cancers. *Cancer Res.*, **64**: 4498-4505, 2004.
- 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.

- Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K., and Kimura, N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.*, **95**: 377–384, 2004.
- Kannagi, R., Goto, Y., and Fukui, F. In search of the carbohydrate structures on CD44 critical for hyaluronic acid binding – roles of sialylation and sulfation. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **16**: 211–223, 2004.
- Kannagi, R. Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression – the Warburg effect revisited. *Glycoconjugate J.*, **20**: 353–364, 2004.
- Hirata, T., Furukawa, Y., Yang, B.G., Hieshima, K., Fukuda, M., Kannagi, R., Yoshie, O., and Miyasaka, M. Human PSGL-1 interacts with the skin-associated chemokine CCL27 via sulfated tyrosines at the PSGL-1 amino terminus. *J. Biol. Chem.*, **279**: 51775–51782, 2004.
- Kakizaki, I., Kojima, K., Takagaki, K., Endo, M., Kannagi, R., Ito, M., Maruo, Y., Sato, H., Yasuda, T., Mita, S., Kimata, K., and Itano, N. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J. Biol. Chem.*, **279**: 33281–33289, 2004.
- Kanda, H., Tanaka, T., Matsumoto, M., Umemoto, E., Ebisuno, Y., Kinoshita, M., Noda, M., Kannagi, R., Hirata, T., Murai, T., Fukuda, M., and Miyasaka, M. Endomucin, a sialomucin expressed in high endothelial venules, supports L-selectin-mediated rolling. *Int. Immunol.*, **16**: 1265–1274, 2004.
- Murata, K., Miyoshi, E., Ihara, S., Kameyama, M., Ishikawa, O., Doki, Y., Fukuoka, H., Tarui, T., Takada, Y., Kannagi, R., Taniguchi, N., and Imaoka, S. Attachment of colon cancer cells onto vascular endothelial cells is enhanced by *N*-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V). *Oncology*, **66**: 492–501, 2004.
- Uchimura, K., Kadomatsu, K., El-Fasakhany, F.M., Singer, M.S., Izawa, M., Kannagi, R., Takeda, N., Rosen, S.D., and Muramatsu, T. *N*-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1 regulates expression of L-selectin ligands and lymphocyte homing. *J. Biol. Chem.*, **279**: 35001–35008, 2004.

北島グループ

- Miyata, S., Sato, C., Kitamura, S., Toriyama, M., and Kitajima, K. A major flagellum sialoglycoprotein in sea urchin sperm contains a novel polysialic acid, an α 2,9-linked poly-*N*-acetylneuraminic acid chain, capped by an 8-*O*-sulfated sialic acid residue. *Glycobiology*, **14**: 827-840, 2004.
- Asahina, S., Sato, C., and Kitajima, K. Developmental expression of a sialyltransferase responsible for sialylation of cortical alveolus glycoprotein during oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Biochem. (Tokyo)*, **136**:189-198, 2004.
- Fujita, A., Sato, C., Munster-Kuhnel, A.-K., Gerardy-Schahn, R., and Kitajima, K. Development of a simple and efficient method for assaying cytidine monophosphate sialic acid synthetase activity using an enzymatic reduced nicotinamide adenine dinucleotide/oxidized nicotinamide adenine dinucleotide converting system. *Anal. Biochem.*, **337**: 12-21, 2005.

小島グループ

- Tang, W., Guo, Q., Usuda, M., Kokudo, N., Seyama, Y., Minagawa, M., Sugawara, Y., Nakata, M., Kojima, N., Makuuchi, M. Histochemical expression of sialoglycoconjugates in carcinoma of the papilla of Vater. *Hepatogastroenterology* **52**, 67-71, 2005.
- Aida-Hyugaji, S., Takano, K., Takada, T., Hosoya, H., Kojima, N., Mizuochi, T., Inoue, Y. Theoretica; studies of binding of mannose-binding protein to monosaccharides. *Chem. Phys. Lett.* **398**, 37-43, 2004
- Takano, Y., Hojo, H., Kojima, N., and Nakahara, Y. Synthesis of a mimic for the heterogeneous surface of core 2 sialoglycan-linked glycoprotein. *Organic Lett.* **6**, 3135-3138, 2004
- Matsusita, M., Matsusita, A., Endo, Y., Nakata, M., Kojima, N., Mizuochi, T., and Fujita, T. Origin of the classical complement pathway: lamprey orthologue of mammalian C1q acts as a lectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10127-10131, 2004

浜口グループ

- Tanehiko Yoshida, Takashi Iwamoto, Koichi Adachi, Takeshi Yokota, Yozo Miyake, Michinari Hamaguchi. Functional analysis of the effect of forced activation of STAT3 on M1 mouse leukemia cells. *Int J Mol Med.*

15(2):269-275 (2005).

- Yoko Tanimura, Toshio Kokuryo, Nobuyuki Tsunoda, Yukiko Yamazaki, Koji Oda, Yuji Nimura, Yasuni Nakanuma, Min-Fu Chen, Yi-Yin Jan, Ta-Sen Yeh, Cheng-Taug Chiu, Ling-Ling Hsieh, Tetsuro Nagasaka and Michinari Hamaguchi Tumor necrosis factor α promotes invasiveness of a cholangiocarcinoma cell line, CCKS1, via its receptor, TNFR2. *Cancer Lett.* **219**(2): 205-213 (2005).
- Hideaki Nakamura, Hiroko Fukami, Yuko Hayashi, Akira Tachibana, Shigekazu Nakatsugawa, Michinari Hamaguchi and Kanji Ishizaki. Cytotoxic and Mutagenic Effects of Chronic Low-Dose-Rate Irradiation on hTERT-Immortalized Human Cells. *Radiation Research* **163**: 283-288 (2005).
- 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).

板野グループ

- Kakizaki, I., Kojima, K., Takagaki, K., Endo, M., Kannagi, R., Ito, M., Maruo, Y., Sato, H., Yasuda, T., Mita, S., Kimata, K., and Itano, N. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J. Biol. Chem.* **279**: 33281-33289, 2004.
- (2) 特許出願
H16年度特許出願件数：3件（CREST研究期間累積件数：6件）