

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成15年度採択研究代表者

宮城 妙子

(宮城県立がんセンター研究所 所長)

「がんや糖尿病等におけるシアリダーゼ異常の機構解明と制御」

1. 研究実施の概要

従来からシアル酸と癌の深い関連性が指摘されてきた。その実体解明をめざして、シアル酸量調節を担うシアリダーゼの研究を進めてきた。その結果、先に遺伝子単離に成功した形質膜局在型シアリダーゼ (NEU3) が各種ヒトがんで発現がほとんど例外なく異常に亢進していること、この遺伝子導入マウスに糖尿病が発症することを明らかにした。さらに、NEU3がシグナル関連分子のカベオリンやGrb-2と会合すること、各種増殖因子レセプターのシグナリングに深く関与していることもわかってきた。最近の結果は、高発現NEU3ががん細胞の接着や浸潤・運動能を亢進し、アポトーシスを抑制することを検証している。本研究では、癌や糖尿病等におけるシアリダーゼ異常発現の機構・意義について解析をさらに進め、その制御法を探索し、本遺伝子をターゲットとした新しい診断・治療法の開発をめざす。

2. 研究実施内容

シアリダーゼの生理的・病理的役割の解明を当面の研究課題とする宮城グループは、16年度、NEU3シアリダーゼが細胞接着や浸潤・運動等のシグナリングについても制御していることを明らかにした。シアリダーゼが触媒反応によるガングリオシドの修飾を介して、あるいは、酵素蛋白自体が他のシグナル分子と相互作用することによって、積極的に関わっている可能性を示す証拠を得ることができた。また、NEU3発現亢進ががん細胞のアポトーシス抑制をもたらす一方、NEU3のノックダウンがアポトーシスを誘導することを検証することができたので、その標的分子の同定を進めている。NEU3の多様な生理機能の全貌解明をめざして、免疫や神経機能についても解析進めた。免疫機能については、マウス好酸球性炎症モデルを用いて調べた結果、リンパ球の気道への浸潤にヒアルロン酸とCD44の結合が重要であり、CD44のヒアルロン酸結合性に内因性シアリダーゼ活性が深く関わっている可能性を見いだした。さらに、Neu3が神経軸索の形成に、TrkA活性を上昇させることによって直接的に特異的に関与していることが明らかになった。新規シアリダーゼNEU4の性状解析を行い、大腸がんではNEU3と逆に発現が低下していることがわかった。

糖尿病におけるシアリダーゼの役割の解明を分担課題としている鈴木グループは、高齢

正常者156例，耐糖能正常者182例，2型糖尿病患者172例を対象にNEU3遺伝子多型を検索した。138C/T多型のアレル頻度は，高齢正常者および耐糖能正常者に比べて，2型糖尿病患者で有意に高頻度であった。また，耐糖能正常者の解析では，138Tアレルを有する症例は，138Cアレルを有する症例に比べて，インスリン感受性が有意に低値であった。すなわち，138C/T多型はインスリン抵抗性を介して，2型糖尿病に関連することが明らかになった。また，NEU3過剰発現の意義を解明する目的で，アデノウイルスベクターを用いて，NEU3をC57B/6Nマウスの肝臓に過剰発現させたところ，予期に反して耐糖能とインスリン感受性は逆に改善した。さらに，2型糖尿病モデル動物，KKAyマウスの肝臓にNEU3を過剰発現させたところ，やはり耐糖能とインスリン感受性は改善した。著明なインスリン抵抗性糖尿病発症を示すNEU3トランスジェニックマウスにおける病態の差異について検討している。

シアリダーゼを標的とした治療薬の開発をめざして，袖岡グループは，特異的阻害剤の設計と合成を分担している。インフルエンザの治療薬として利用されている遷移状態アナログはNEU3に対してはほとんど効果がない。新たにリード化合物を創製することが必要であるが，形質膜上に存在する膜タンパク質であるため3次構造決定は簡単ではない。そこで16年度はNeu3の高い基質特異性に着目し，新規ガングリオシドアナログの設計と合成を検討した。

古川グループは，ガングリオシド糖鎖の異常発現とその癌性形質との関連を糖鎖合成系の観点から明らかにし，ガングリオシド合成系を介してシアリダーゼ異常の制御をめざす。本年度はメラノーマにおけるガングリオシドGD3発現の癌性形質誘導における分子メカニズムを明らかにした。GD3非発現メラノーマ細胞SK-MEL-28-N1 (N1)にGD3合成酵素遺伝子を導入し，その増殖，浸潤性を検討したところ，細胞の増殖および浸潤能の亢進が認められ，FCS刺激により，MAPK，Akt，FAK，p130Casおよびpaxillinのリン酸化が増強した。また，GD3発現メラノーマ細胞では，p130Casおよびpaxillinは細胞の浸潤能に，p130Casは増殖能に関与することが明らかになった。

神経細胞におけるシアリダーゼの機能と病態の解明を主な分担としている東グループは，NEU3による神経細胞の軸索の伸展・再生の促進機構として，カルシウム情報伝達系の関与を予測し実験を進めた。神経芽腫細胞株や，繊維芽細胞株にNeu3を強発現し調べた結果，細胞膜のカルシウムポンプ (PMCA) の機能が抑制されていることを示唆する結果を得た。Neu3高発現によるPMCAの活性抑制がリン酸化や細胞膜マイクロドメイン分布の変化によって起こる可能性を調べたが，これらとは関係がなく，Neu3による分解産物の作用により起こることが推察された。

3. 研究実施体制

宮城グループ

- ① 研究分担グループ長：宮城 妙子（宮城県立がんセンター研究所、所長）
- ② 研究項目：シアリダーゼの機能解明

シアリダーゼのがんや糖尿病等における異常発現機構と意義の解析

鈴木グループ

- ① 研究分担グループ長：鈴木 進（東北大学大学院医学研究科分子代謝病態学、
助教授）
- ② 研究項目：アデノウイルスベクターを用いたシアリダーゼ (NEU3) 肝過剰発現マウスの解析，2型糖尿病患者のNEU3遺伝子解析

袖岡グループ

- ① 研究分担グループ長：袖岡幹子（東北大学多元物質科学研究所、教授）
- ② 研究項目：NEU3の基質ミミック型の阻害剤の設計と合成

古川グループ

- ① 研究分担グループ長：古川圭子（名古屋大学大学院医学系研究科生物化学講座、
講師）
- ② 研究項目：がんにおけるガングリオシド糖鎖の異常発現と癌形質との関連の解析
ガングリオシド合成系によるシアリダーゼ異常の制御

東グループ

- ① 研究分担グループ長：東 秀好（理化学研究所脳科学総合研究センター、研究員）
- ② 研究項目：神経細胞におけるシアリダーゼの機能と異常について

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

- Papini, N., Anastasia, L., Tringali, C., Croci, G., Bresciani, R., Miyagi, T., Yamaguchi, K., Preti, A., Prinetti, A., Prioni, S., Sonnino, S., Tettamanti, G., Venerando, B. and Monti, E.: The plasma membrane-associated sialidase Neu3 modifies the cell surface ganglioside pattern through cell-to-cell interactions. *J. Biol. Chem.* 279, 16989-16995, 2004
- Da Silva, J.S., Hasegawa, T., Miyagi, T., Dotti, C.J. and Avad-Rodriguez, J.: A symmetric membrane ganglioside sialidase activity specifies axonal fate. *Nat. Neurosci.* 8, 606-615, 2005.
- Katoh, S., Matsumoto, N., Matsumoto, K., Fukushima, K., and Matsukura S: Elevated interleukin-18 levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients with eosinophilic pneumonia. *Allergy* 15, 850-856, 2004
- Katoh, S., Matsumoto, N., Matsumoto, K., Tokojima, M., Ashitani J., Nakamura-Uchiyama, F., Matsushima, K., Matsukuras., and Nawa Y.: A possible role of TARC in antigen-specific Th2-dominant responses in patients with paragonimiasis westermani. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 134, 248-252, 2004

- Suzuki S, Wenyi Z, Hirai M, Hinokio Y, Suzuki C, Yamada T, Yoshizumi S, Suzuki M, Tanizawa Y, Matsutani A, Oka Y: Genetic Variations at Urotensin II and Urotensin II Receptor Genes and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Japanese. *Peptide* 25, 1801-1808, 2004.
- Takahashi K, Satoh J, Kojima Y, Negoro K, Hirai M, Hinokio Y, Kinouchi Y, Suzuki S, Matsuura N, Shimosegawa T, Oka Y: Promoter polymorphism of SLC11A1 (formerly NRAMP1) confers susceptibility to autoimmune type 1 diabetes mellitus in Japanese. *Tissue Antigens* 63, 231-236, 2004.
- Goodfellow, JA., Bowes, T., Sheikh, K., Odaka, M., Halstead, SK., Humphreys, PD., Wagner, ER., Yuki, N., Furukawa, K., Furukawa, K., Plomp, JJ., Willison, HJ. : Over-expression of GD1a ganglioside sensitizes motor nerve terminals to anti-GD1a antibody-mediated injury in a model of acute motor axonal neuropathy. *J. Neurosci.* 25(7), 1620-1628, 2005
- Hamamura, K., Tanahashi, K., Furukawa, K., Hattori, T., Hattori, H., Mizutani, H., Ueda, M., Urano, T., Furukawa, K.: GM1 expression in H-ras-transformed NIH3T3 results in the suppression of cell proliferation inducing the partial transfer of activated H-ras from non-raft to raft fraction. *Int. J. Oncol.* 26(4) 897-904 2005
- Kamimura, Y., Furukawa, K., Kittaka, D., Nishio, M., Hamamura, K., Fukumoto, S., Furukawa, K.: Differential enhancing effects of alpha2,8-sialyltransferase on the cell proliferation and mobility. *Int. J. Oncol.* 26(2) 337-344, 2005
- Nishio, M., Fukumoto, S., Furukawa, K., Ichimura, A., Miyazaki, H., Kusunoki, S., Urano, T., Furukawa, K.: Over-expressed GM1 suppresses NGF signals by modulating the intra-cellular localization of NGF receptors and membrane fluidity in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 279, 33368-33378, 2004
- Boffey, J., Nicholl, D., Wagner, ER., Townson, K., Goodyear, C., Furukawa, K., Furukawa, K., Conner, J., Willison, HJ. Innate murine B cells produce anti-disialosyl antibodies reactive with *Campylobacter jejuni* LPS and gangliosides that are polyreactive and encoded by a restricted set of unmutated V genes. *J. Neuroimmunol* 152(1-2) 98-111, 2004
- Higashi, H. and Chen, N. H. :Ganglioside/protein kinase signals triggering cytoskeletal actin reorganization. *Glycoconjugate J.* 20: 49-58., 2004.

- 檜尾好徳, 鈴木進, 平井完史, 鈴木千登世, 石原寿光, 高橋和眞, 佐藤譲, 片桐秀樹, 佐々木明德, 秦敬子, 和田正, 山口壱範, 宮城妙子, 岡芳知: ガングリオシド特異的形質膜シアリダーゼ遺伝子 (NEU3) とインスリン抵抗性. *Diabetes Frontier* 15:562, 2004.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数 : 1件 (CREST研究期間累積件数 : 1件)