

戦略的創造研究推進事業
チーム型研究 (CREST)
追跡評価用資料

研究領域

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」
(2002 年度～2009 年度)

研究総括：谷口 直之

2016 年 3 月

目次

要旨	1
第1章 追跡調査概要	3
1.1 研究領域概要	3
1.1.1 戦略目標	3
1.1.2 研究領域概要	3
1.1.3 研究総括	3
1.1.4 領域アドバイザー	4
1.1.5 研究課題及び研究代表者	5
1.2 研究領域終了後の進展と波及効果	7
1.2.1 研究成果の発展状況や活用状況	7
1.2.2 研究成果から生み出された科学技術や社会・経済への波及効果	9
1.3 研究領域の展開状況(系譜図)	12
第2章 追跡調査(研究領域全体動向)	13
2.1 追跡調査について	13
2.1.1 調査の目的	13
2.1.2 調査の対象	13
2.1.3 調査方法	13
2.2 研究成果概要	14
2.2.1 研究助成金	14
2.2.2 論文	18
2.2.3 特許	20
2.3 科学技術や社会・経済への波及効果	21
2.3.1 科学技術への波及効果	21
2.3.2 社会・経済への波及効果	22
第3章 各研究課題の主な研究成果及び波及効果	24
3.1 2002年度採択課題	24
3.1.1 糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明(伊藤幸成)	24
3.1.2 癌の進展における細胞接着性機能糖鎖の解明(神奈木玲児)	28
3.1.3 感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究(木曾真)	33
3.1.4 糖鎖構造の制御によるがん及びウイルス疾患の予防法及び治療法の開発(小山信人)	37
3.1.5 ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用(鈴木康夫)	41
3.1.6 RNAi法による糖鎖機能解明と利用技術の開発(西原祥子)	45
3.2 2003年度採択課題	49
3.2.1 糖鎖機能を利用した組換えリソソーム酵素の脳内補充療法の開発(伊藤孝司)	49
3.2.2 マイクロドメイン機能異常にもとづく2型糖尿病の病態解明(井ノ口仁一)	53

3.2.3	担癌状態におけるムチンを介した免疫能の変化の解析と応用 (中田博)	57
3.2.4	遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明 (野村一也)	61
3.2.5	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 (宮城妙子)	66
3.2.6	糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーの構築 (山口陽子)	70
3.3	2004 年度採択課題	74
3.3.1	糖鎖の動態—機能相関への統合的アプローチ (木下タロウ)	74
3.3.2	糖鎖シグナルによる獲得免疫応答制御の解明と疾患制御への応用 (鏑田武志)	78
3.3.3	糖修飾システムによる神経機能の発現・制御 (平林義雄)	82
3.3.4	病態における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明 (本家孝一)	86
第4章	科学技術イノベーションに資する研究成果の状況	90
4.1	糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明 (伊藤幸成)	90
4.1.1	研究の概要	90
4.1.2	研究成果の波及と展望	93
	引用文献	96
4.2	糖鎖の動態—機能相関への統合的アプローチ (木下タロウ)	98
4.2.1	研究の概要	98
4.2.2	研究成果の波及と展望	102
	引用文献	104
4.3	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 (宮城妙子)	108
4.3.1	研究の概要	108
4.3.2	研究成果の波及と展望	111
	引用文献	113

要旨

本資料は、戦略的創造研究推進事業のチーム型研究 CREST の研究領域「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」（2002-2009 年度）において、研究終了後一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展状況や活用状況を明らかにし、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）事業及び事業運営の改善等に資するために、追跡調査を実施した結果をまとめたものである。

第 1 章は、研究領域の追跡調査の概要について概説した。まず 1.1 項では本研究領域全体の戦略目標と研究の概要を示した。次いで研究総括及び領域アドバイザー、また、研究課題の各採択年度、研究課題名、研究代表者とその所属について記載した。1.2 項では各研究課題について、本研究領域終了後、研究代表者を中心にもどのように研究が発展したかについて調査した結果を示した。またこれらの研究からどのような新たな科学技術上の成果が生み出されたか、あるいは得られた成果が社会や経済に及ぼした影響についてまとめた。

第 2 章は本研究領域全体の研究概要について、研究期間中及び終了後の成果、成果物について調査の結果をまとめた。2.1 項では本追跡調査の目的と方法について記載した。2.2 項ではそれぞれの研究代表者が本研究開始後に獲得した研究助成金の種類と金額、期間中及び終了後に発表した原著論文の数、出願あるいは登録した特許数を表にまとめた。2.3 項では科学技術への波及効果として各代表者の受賞、学会・研究会等への貢献、その他の活動状況について、調査した結果を記載した。

本研究領域においては、糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンといった生体分子群の有する糖鎖の新たな生物機能を解明し、その利用技術を探るための研究を対象とし、脳神経機能、形態形成、分化における糖鎖の役割と制御のメカニズム等の新しい機能の解明や応用の可能性を開拓する研究、糖鎖の改変によるがんの浸潤転移の制御や感染防止、免疫機能制御の手法探索等の診断、治療、予防への応用を指向する研究、あるいは、糖鎖研究に広く用いられることが期待される糖鎖の超微量解析技術、情報伝達のダイナミックな状況を可視化する技術の実現を目指す研究が実施された。第 3 章は本研究領域の各研究課題について、まず、本研究領域期間中の研究成果と関連論文をまとめ、次に研究終了後の発展状況を記載した。研究終了後の調査については、研究代表者の研究の全体像を記述した後に、科学技術の発展に寄与した代表的成果を取り上げ、さらに社会的、経済的に波及効果の展望についてまとめた。

第 4 章では本研究領域終了後、科学技術イノベーションの観点から進展のあった研究代表者のうち、3 名の研究者にインタビューを行いその研究成果をまとめた。ここでは特に本研究領域終了後、「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」という観点から、世界の科学技術がどのように発展し、その中で各研究者がどのような展開を図り、成果を上げたかについて聴取し、事前調査の結果と併せ、科学技術上の発展及び社会的波及効果の観点から調査結果をまとめた。

伊藤幸成は「糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明」研究をさらに発展させ、2009 年から 2013 年にかけて ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクトを進め、糖タンパク質の細胞内外での作用を系統的に解析する研究へと発展させた。木下タロウは「糖鎖の動態—機能相関への統合的アプローチ」研究から先天性 GPI アンカー欠損症の研究を発展させ、26 個の遺伝子が GPI アンカー型タンパク質の生合成や修飾に必要であることを明らかにした。この GPI アンカー欠損症は新規の難治疾患として認知され、厚労科研費による難治性疾患克服研究事業の研究班「先天性 GPI 欠損症の疾患概念の確立と診断基準の制定：発達障害・てんかんを主症状とする新しい疾

患」研究へ継続されている。宮城妙子は「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」研究を発展させてシアル酸を脱離するリアリダーゼ NEU3 を主に対象としてがん、糖尿病、および神経機能の制御及び阻害剤の創薬について研究を進めた。

第1章 追跡調査概要

1.1 研究領域概要

1.1.1 戦略目標

がんやウイルス感染症に対して有効な革新的医薬品開発の実現のための糖鎖機能の解明と利用技術の確立(2002年度設定)

1.1.2 研究領域概要

本研究領域は、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカンといった生体分子群の有する糖鎖の新たな生物機能を解明し、その利用技術を探るための研究を対象とした。

具体的には2010年代において、免疫反応、がん転移などに関与する「糖鎖」及び糖鎖関連生体情報分子の探索及びその機能解析による情報伝達のメカニズムを解明し、副作用のないがん治療薬(がん細胞だけを特異的に攻撃する治療等)、各種ウイルス・バクテリア感染症の治療・予防薬(ウイルス・バクテリアの標的となる糖鎖を改変するなどによって感染を防止)、糖鎖の制御による遺伝子治療、免疫機能調整等の効率化などを実現することを目指し、そのために必要となる基盤技術を開発することとして以下を達成目標に設定した。

- ・細胞内及び細胞間ネットワークの情報伝達系可視化、超微量解析技術の開発
糖鎖研究に広く用いられることが期待される、糖鎖超微量分析技術や情報伝達のダイナミックな変化を可視化する技術を開発する
- ・機能分子及び情報伝達分子の特定と機能修飾の解析
糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンなどの分子群の中で、特定の糖鎖の生体内標的分子を同定するとともに、糖鎖によるタンパク質標的分子の修飾がもたらす機能変化を解析し、糖鎖の新たな機能を発見する
- ・生体膜構造と情報伝達の関連解析
糖鎖の膜状における動態を支配する構造的、細胞生物学的基盤を明らかにし、その動態と糖鎖機能との相関を解明し、関連する情報伝達メカニズムを明らかにする
- ・脳神経等における機能分子、形態形成・分化関連分子の機能修飾及び輸送・動態の解析
脳神経機能、形態形成、分化における糖鎖の役割と制御のメカニズム等の新しい機能の解明や応用の可能性を開拓する
また、本研究領域は、がんおよび2型糖尿病等の生活習慣病、ウイルスや細菌による感染症などの医薬品開発につながる基礎的研究も対象とされた。

1.1.3 研究総括

谷口 直之

(就任時：大阪大学大学院医学系研究科 教授、現：理化学研究所グローバル研究クラスターグループディレクター)

1.1.4 領域アドバイザー

本研究領域は糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカンといった生体分子群の有する糖鎖に着目し、新たな生物機能を解明し、その利用技術を探索するための研究を進めている。この研究領域の概要に沿って研究を行うため、6人の領域アドバイザーを定め、研究者の指導にあたった。表 1-1 に領域アドバイザーを示す。

表 1-1 領域アドバイザー

領域アドバイザー	所属	役職	任期
川寄 敏祐	立命館大学 糖鎖工学研究センター	センター長	2002年8月～2010年3月
近藤 規元	小野薬品工業(株) 研究渉外室	理事/室長	2002年8月～2010年3月
鈴木 明身	東海大学 糖鎖科学研究所	所長/教授	2002年8月～2010年3月
塚田 裕	(株)エスアールエル	理事	2002年8月～2010年3月
成松 久	国立研究開発法人産業技術総合研究 所 糖鎖医工学研究センター	センター長	2002年8月～2010年3月
若槻 壮市	高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所	教授	2002年9月～2010年3月

(註)所属と役職は本研究領域終了時点に記載

1.1.5 研究課題及び研究代表者

研究課題の公募は2002年度から3年間にわたり計16件の研究課題が採択された。表1-2に各採択年度の研究課題、研究代表者、採択時の所属と役職、終了時の所属・役職および追跡調査時の所属・役職を示した。

表1-2 研究課題と研究者(第1期、第2期、第3期)

期(採択年度)	研究課題	研究者	採択時の所属・役職	終了時の所属・役職	追跡調査時の所属・役職
第1期 (2002)	糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明	伊藤 幸成	理化学研究所 細胞制御化学研究室・主任研究員	理化学研究所 伊藤細胞制御化学研究室・主任研究員	理化学研究所 伊藤細胞制御化学研究室・主任研究員
	癌の進展における細胞接着性機能糖鎖の解明	神奈木 玲児	愛知県がんセンター研究所分子病態学部・部長	愛知県がんセンター研究所分子病態学部・部長	Academic Sinica Institute of BioMedical Sciences・Distinguished Research Fellow
	感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究	木曾 真	岐阜大学農学部・教授	岐阜大学応用生物科学部・教授	岐阜大学応用生物科学部・教授
	糖鎖構造の制御によるがん及びウイルス疾患の予防法及び治療法の開発	小山 信人	タカラバイオ(株) 細胞・遺伝子治療センター・主任研究員	タカラバイオ(株) 臨床開発部・部長	タカラバイオ(株) 臨床管理部・部長
	ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用	鈴木 康夫	静岡県立大学薬学部・教授	中部大学生命健康科学部・教授	中部大学生命健康科学部・客員教授
	RNAi法による糖鎖機能解明と利用技術の開発	西原 祥子	創価大学生命科学研究所・教授	創価大学生命科学研究所・教授	創価大学工学部 生命情報工学科・教授
第2期 (2003)	糖鎖機能を利用した組換えリソソーム酵素の脳内補充療法の開発	伊藤 孝司	徳島大学薬学部・教授	徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部・教授	徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部・教授 薬科学教育部附属 医薬創製教育研究センター長

第2期 (2003)	マイクロドメイン機能異常にもとづく2型糖尿病の病態解明	井ノ口 仁一	北海道大学大学院薬学研究科・助教授	東北薬科大学薬学部・教授	東北薬科大学分子生体膜研究所長・教授
	担癌状態におけるムチンを介した免疫能の変化の解析と応用	中田 博	京都産業大学工学部・教授	京都産業大学工学部・教授	京都産業大学総合生命科学部・教授
	遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明	野村 一也	九州大学理学研究院・助教授	九州大学理学研究院・准教授	九州大学大学院理学研究院・准教授
	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	宮城 妙子	宮城県立がんセンター研究所・部長	宮城県立がんセンター研究所・所長	東北薬科大学分子生体膜研究所・客員教授
	糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーの構築	山口 陽子	東海大学工学部・教授	東海大学工学部・教授	Beckman Research Institute of City of Hope・Professor Emeritus
第3期 (2004)	糖鎖の動態—機能相関への統合的アプローチ	木下 タロウ	大阪大学微生物病研究所 所長・教授	大阪大学免疫学フロンティア研究センター・教授	大阪大学免疫学フロンティア研究センター・教授
	糖鎖シグナルによる獲得免疫応答制御の解明と疾患制御への応用	鏑田 武志	東京医科歯科大学疾患生命科学研究部・教授	東京医科歯科大学疾患生命科学研究部・教授	東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授
	糖修飾システムによる神経機能の発現・制御	平林 義雄	理化学研究所・ユニットリーダー	理化学研究所・チームリーダー	理化学研究所脳科学総合研究センター・チームリーダー
	病態における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明	本家 孝一	高知大学医学部・教授	高知大学教育研究部 医療学系・教授	高知大学教育研究部医療学系・教授

1.2 研究領域終了後の進展と波及効果

1.2.1 研究成果の発展状況や活用状況

本研究領域は、がんやウイルス感染症に対して有効な革新的医薬品開発を実現するため、糖鎖機能を解明するとともにその機能を利用する技術を確認することを目標とし、脳神経機能、形態形成、分化における糖鎖の新しい機能の解明、およびがんの浸潤転移制御、感染防止や免疫機能制御の新たな手法開発と診断、治療、予防への応用を目指して展開された。

実際の達成目標として①細胞内及び細胞間ネットワークの情報伝達系可視化、超微量解析技術の開発、②機能分子及び情報伝達分子の特定と機能修飾の解析、③生体膜構造と情報伝達の関連解析、④脳神経等における機能分子、形態形成・分化関連分子の機能修飾及び輸送・動態の解析の基礎研究、さらには、生活習慣病や感染症等に対する医薬品開発のための基盤研究が掲げられた。その結果、以下に示すような研究成果が得られ、それらはその後も大きく発展している。

(1) 基礎研究成果の展開

①細胞内及び細胞間ネットワークの情報伝達系可視化、超微量解析技術の開発

本研究領域で独自に開発された、生細胞の膜分子間相互作用の紫外線照射を利用した検出法 (Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) 法) や、神経細胞の特殊なリン脂質 OPPC 抗体あるいは人工合成糖鎖を結合した糖タンパク質複合体を利用した解析技術が著しく進展した。

EMARS 法は、質量分析によるプロテオミクス分析法を利用し、細胞表面と同様に細胞内分子の相互作用も検出可能な相互作用分子の検出手法である。従来法では見出せなかったがんや医薬品刺激に関連する分子など、幅広い相互作用分子の同定につながった。この検出法に用いる試薬は本研究領域終了後に国際市場で販売が開始された(本家)。また、細胞膜構成成分のリン脂質 OPPC に対する抗体も、神経伝達分野の研究ツールとして市販されている(本家)。構造が均一な合成糖鎖およびそのタンパク質複合体を用いた解析手法により、糖タンパク質品質管理機構で鍵を握る レクチンシャペロン等の定量的特異性解析が可能になった(伊藤幸成)。

②機能分子及び情報伝達分子の特定と機能修飾の解析

本研究領域では、聴覚障害、がん、感染症等と関連する細胞内の種々の糖鎖関連機能分子が同定され、その機能修飾のメカニズムが解析された。

ヒト患者およびノックアウトマウスにおける研究により、ガングリオシド GM3 合成酵素は聴覚の形成及び維持に必須であることが明らかにされ、難聴に対する治療への研究が進められた(井ノ口)。がんの進展に関してはシアリルルイス糖鎖発現が亢進することが知られているが、これは低酸素抵抗性の獲得および上皮間葉転換によって増強されることが発見され、そのメカニズムが明らかにされた(神奈木)。また、トリインフルエンザのヒト型変異機構が解明され、ヒト間の感染拡大の予知・予防に応用するための、変異分子シグナルの高感度かつ簡易な監視技法が開発された。この監視技法について、タイ、インドネシア、中国などの国家機関や大学と共同研究体制が構築された(鈴木)。また、CD-22 に結合するシアル酸誘導体 GSC-718 が、炎症反応を伴わずにア

ジュバント活性を有することを発見し、ワクチンへの応用研究も行われている(鏝田)。

幹細胞や ES 細胞を用いた糖鎖の細胞分化への関連も研究され、PAPS (3' -ホスホアデノシン-5' -ホスホ硫酸) 輸送体では硫酸化修飾を受けた糖鎖が Wnt、BMP、FGF シグナルを制御して ES 細胞や初期胚の細胞運命を決定しており、PAPS 輸送体の機能低下が様々な疾病を引き起こすことを明らかにした(西原)。

③生体膜構造と情報伝達の関連解析

形成膜にあるシアリダーゼ NEU3 及び膜型レクチンについて、その構造と情報伝達によるがんや糖尿病との関連性に関する知見が精力的に蓄積されている。

形質膜上で機能する NEU3 は、大腸がんに加え、前立腺がんや悪性黒色腫においてシグナル分子として働き、アポトーシスを阻害することによりがんの悪性化を助長することが証明された。この分子を標的とするがん診断・治療法に役立つ創薬開発が継続されている(宮城)。

また、ガングリオシド GM3 合成酵素は、2 型糖尿病などの生活習慣病、末梢のインスリン支配臓器、視床下部食欲中枢の過食シグナル、さらにアレルギー疾患に関連して生体膜マイクロドメインにおいて機能していることが見出され、マイクロドメイン矯正療法ともいえる新規治療法の開発が推進されている。また、ガングリオシド GM3 合成酵素が聴覚形成及び維持に必須であることがヒト患者およびノックアウトマウスの研究から初めて明らかにされ、難聴に対する有効な治療法がない現在、糖脂質が関連する新たな難聴治療法の開発が進められている(井ノ口)。

④脳神経等における機能分子、形態形成・分化関連分子の機能修飾及び輸送・動態の解析

真核細胞の小胞体において細胞ラフトの外面に蛋白質を結合しているグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカー蛋白質や、胎児脳内の糖脂質ホスファチジルグルコシド(PG)に関する研究が継続され、新たな発見がみられた。

GPI アンカー蛋白質は糖脂質の一種で、欠損により知的障害やてんかんを引き起こすことを本研究領域期間中に明らかにしたが、期間終了後にも研究が大きく進展し、脂質ラフトに局在しない場合の機能について、脂肪酸部分のリモデリングが液性免疫系の恒常性維持に重要であることが明らかにされた(木下)。

神経系ラジアルグリア細胞において飽和脂肪酸のみで構成されたグルコース化脂質を発見し、この糖脂質がこれまで知られていたスフィンゴ糖脂質を中心とする脂質ラフトではなく別の脂質ラフトを形成しており、神経細胞の分化や神経細胞の軸索の先端にある成長円錐の動きを制御するなどの、進化的に保存された新しい機能を持っていることが明らかにされた(平林)。

(2) 医薬品開発のための基盤研究の展開

本研究領域で得られた糖鎖の構造及び機能に関する新たな知見は、がん、糖尿病や感染症の診断や治療に結びつける医薬品の開発に向けた基盤研究へと発展している。

糖蛋白質を天然物から単離して利用する従来の生化学的なアプローチは限界を超えていることから、糖鎖の精密な化学合成法を開発し、糖鎖を利用した蛋白質品質管理機構を分子論的に解明した研究では、本研究領域終了後には JST-ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクトが 2010 年 4 月より始動した。糖蛋白質の細胞内外における作用を系統的に解析し、生命科学における有機

化学的手法の優位性を示すモデルケースを世界に先駆けて構築した。人工合成糖鎖および糖タンパク質を有効に用いた、糖タンパク質フォールディング機構の解明などの功績がみられる。さらにこの基礎研究基盤を活用し、蛋白質の立体構造や糖鎖構造異常に起因するアルツハイマー病、プリオン病、糖鎖不全症などの疾病治療、合成糖蛋白質医薬開発、新規な抗感染症薬開発における応用研究がすすめられ、新たな研究の流れを創成した(伊藤幸成)。

蛋白質間相互作用部位をターゲットとした新規バイオ医薬品の開発研究では、中枢神経症状を伴う代表的なリソソーム病である Tay-Sach 病及び Sandhoff 病(GM2 gangliosidosis)、さらにカテプシンAとノイラミナーゼ1の遺伝的欠損症の治療法として、酵素補充法の開発が行われた。Tay-Sachs 病患者の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、従来困難であった患者由来の神経系細胞の病態と当該リソソーム酵素の輸送異常を解析するための新規システムを構築した。また、活性型 CathA を大量発現するトラスジェニック (Tg) カイコの中部絹糸腺から精製した成熟型 CathA は、同欠損症に対する低抗原性酵素補充療法として応用可能であることを示す結果を得た(伊藤孝司)。

非リソソーム代謝機構の生理機能の解明では、Ngly-1 (N-glycanase) が関与していることが明らかになった。涙が出ない病気がこの Ngly-1 遺伝子によるものであることを発見し、Ngly-1 マウスモデルを作成した。Ngly-1^{-/-}は致死である一方、ENGase^{-/-}のダブルノックアウトマウスは生存することが分かり、ENGase 阻害物質がスクリーニングされている (伊藤孝司)。

また、本研究領域期間中に開発したシアル酸含有スフィンゴ糖脂質ガングリオシドの実践的大量合成法を開発し、800 種に及ぶ人工複合糖質プローブの創出に成功し、その後も改良を継続している。神経突起伸展活性を有する LLG-3、GAA-7、自己免疫疾患関連糖鎖ガングリオシド X2 の世界初全合成を達成した。また、シアリルルイスを使用する DDS 法が開発された。シアリルルイスが結合する E-セレクトインは赤血球及び内皮細胞に適用可能であり、P-セレクトインは血小板に、L-セレクトインは白血球に適用可能であることが明らかになり、医薬への応用が進められている(木曾)。

B 細胞上の膜型レクチン CD22/Siglec2 および CD72 の機能については、新規コンセプトによる炎症を誘導しないワクチン用免疫増強剤の開発のプロジェクトが進行中である(鏑田)。

さらに、研究用として *C. elegans* のデータベースが公開された(野村)。

1.2.2 研究成果から生み出された科学技術や社会・経済への波及効果

(1) 研究成果の科学技術の進歩への貢献

世界のトップレベルとして、伊藤幸成らや木曾らの化学合成物が国際的に利用されている。合成遺伝子の約 6 割が日本で同定され機能解析が進められ、糖鎖機能の解明に貢献している。

伊藤幸成らは、糖鎖の精密な化学合成法の開発により糖鎖の研究技術開発分野に顕著な貢献をした。糖鎖を利用したタンパク質品質管理の分子論的解明を目指して JST-ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクトが始動した。糖蛋白質の細胞内外における作用の系統的な解析を目標として、本プロジェクトが生命科学における有機化学的手法の優位性を示すモデルケースを確立し、蛋白質の立体構造や糖鎖構造異常に起因する種々の疾病(アルツハイマー病、プリオン病、糖鎖不全症など)の解決、合成糖蛋白質医薬開発、新規な抗感染症薬開発における新たな研究の流れの創

成への進展が開始されている。伊藤幸成は、Roy L. Whistler International Award in Carbohydrate Chemistry International Carbohydrate Organization を、2010年3月「有機合成化学を基盤とする糖タンパク質の機能解明に向けた研究」で理化学研究所重要業績表彰(S)、2010年7月「糖鎖工学および糖質化学における国際貢献」で竹田国際貢献賞(竹田理化工業)、2012年2月「糖タンパク質の機能解析をめざす複科学的研究」で日本農芸化学会賞(日本農芸化学会)を受賞した。

木曾らは、シアル酸含有スフィンゴ糖脂質ガングリオシドの実践的大量合成法の開発を行った。多種の人工複合糖質プローブの創出に成功し、神経突起伸展活性を有する LLG-3、GAA-7、及び Guillain-Barré 症候群(GBS) 診断に有用な自己免疫疾患関連糖鎖ガングリオシド X2 の世界初全合成を達成した。シアル酸をモチーフにした血液脳関内通過 DDS キャリアの開発も進めており、2007年9月に、世界トップレベル拠点京都大学「物質-細胞統合システム拠点」のサテライト設置機関に選定されている。

さらに開発された独創的な計測技術としては、本家らが開発した膜マイクロドメイン会合分子同定のための EMARS 法がある。この方法は、細胞外マトリクス蛋白質や抗体医薬品の刺激による膜環境変化に伴う細胞膜分子間相互作用の検出を可能にした。EMARS 法を応用して、子宮頸がん細胞 HeLaS3 において、細胞接着分子 $\beta 1$ インテグリンと受容体型チロシンキナーゼ Erb4 の相互作用が細胞移動に関与することを明らかにし、その論文は Spatiotemporally-regulated interaction between $\beta 1$ integrin and ErbB4 that is involved in fibronectin-dependent cell migration. by Yamashita R, Kotani N, Ishiura Y, Higashiyama S, Honke K. で、日本生化学会 オフィシャル英文誌である Journal of Biochemistry (JB) 2011年3月発行、149巻3号、347-355 ページに掲載され、2012年度日本生化学会 JB 論文賞を受賞した。

鈴木らは、トリインフルエンザのヒト型変異機構を解明し、ヒト-ヒト間感染の拡大の予知・予防のための高感度且つ簡易監視(イムノクロマトを原理としたレセプターサーベイランス)技法を開発し、アジア各国の国家機関及び大学と共同で、高病原性トリインフルエンザウイルスのヒト型へのレセプター認識変異を監視する共同研究体制を構築した。

(2) 研究成果の応用に向けた発展状況

本研究領域では、先天性 PGI アンカータンパク質欠損症への治療薬の創出やフコシル化ハプトグロビンの定量による膵臓がん診断キット、前立腺がんマーカーである PSA 糖鎖のアッセイシステムなどの実用化例が顕著である。その他、糖鎖関連分子の機能やメカニズム解析の基礎研究で得られた創薬シーズが JST の A-Step 等の研究を経て抗がん剤等の開発につながっている。

伊藤幸成らの JST-ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクトでは、①新たな合成手法の開発と複合糖質関連分子プローブの創製、②複合糖質の生物機能解明と新規生物活性物質の創製をめざす合成研究、③合成化学的手法による糖蛋白質細胞内動態の解明、④糖鎖結合分子の認識機構解析をテーマとしている。糖蛋白質フォールディングセンサーとして重要な機能を担う酵素 UGGT については独自に開発した非タンパク型基質を用いて、UGGT の糖鎖特異性をはじめとする様々な性質を明らかにし、蛍光性 UGGT 基質の開発に発展し、基質認識能の解明に向けた研究が進んでいる。また従来曖昧であったグルコシダーゼ II の糖鎖特異性を解明した後、分子クラウディング条件下でのグルコシダーゼ II の反応性変化、詳細な速度論的解析、サブユニットの機能解析へと発展している。

木曾らは、シアロ糖鎖を足場とする新機能分子の創製と革新的利用技術の創出の研究において、グルコシルセラミド誘導体を最終のグルコシル化アクセプターとするカセット合成法と、新しい修飾シアル酸連結法という新戦略に基づくガングリオシド合成法を開発し、神経突起伸展活性を有するア LLG-3、GAA-7 の世界初全合成を達成した。また、GBS の診断に重要な筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に類似する自己免疫性神経疾患の原因物質として単離されたガングリオシド X2 の世界初全合成を達成した。ポリオーマウイルス (MCPyV) の感染機構を解明するために、MCPyV のキャプシド蛋白 VP1 と合成シアロ糖鎖の結合特異性を糖鎖マイクロアレイ及び X 線により解析し、VP1 が Neu5Ac- α 2, 3-Gal 構造を認識して結合・感染することを明らかにした。インフルエンザウイルスの新規ガングリオシド受容体の全合成にも成功している。シアル酸をモチーフにした血液脳関内通過 DDS キャリアの開発の研究では、脳血液関門通過を達成するための鍵分子としてシアリル α (2-3) ガラクトシル β 1-3 ガラクトサミン、シアリル α 2-3 ガラクトシル β 1-3 (シアリル α 2-6) ガラクトサミンの合成を行い、DDS キャリアとしての機能を評価した。

本家らの開発した EMARS 法の応用により、子宮頸がん細胞 HeLaS3 において、細胞接着分子 β 1 インテグリンと受容体型チロシンキナーゼ Erb4 の相互作用が細胞移動に関与することが明らかになった。高知大学医学部の久下英明との共同研究で、神経細胞上のリン脂質の分子の一種、1-オレオイル-2-パルミトイル-ホホスファチジルコリン (OPPC) を認識して結合する単クローン抗体の作製に成功した。また、OPPC が培養神経細胞の神経突起先端部やマウス脳のシナプス部位に局在し、さらに、神経細胞が OPPC を突起先端部で作成し、形成された OPPC による細胞膜領域が神経伝達を調節するドーパミン輸送タンパク質や G タンパク質の局在を制御することを明らかにするに至った。さらに肺がん転移に関与するシアリルルイス抗原キャリア蛋白質の同定と診断法の開発も研究している。

鰐田らは、膜型レクチン CD22/Siglec2 よび CD72 の B 細胞機能制御解明の研究を進展させ、CD72 \cdot C 型レクチン様ドメイン (CTLD) のリガンドへの反応を解析するために、CD72CTLD の組み換えタンパク質を用いた高感度の ELISA を開発した。これを用いた CD72 欠損マウスの解析から CD72 が SLE やニューロパチーで重要な自己抗原への免疫応答の負の制御因子であることが明らかになった。新規コンセプトによる炎症を誘導しないワクチン用免疫増強剤の開発プロジェクトが進行中である。

PSA 糖鎖のがん性変異を利用する研究では、PSA は糖タンパク質で前立腺がんマーカーとしてリスク評価にも使用される。PSA は 3 mg では生体に異常はみられないが、4~10 mg はグレーゾーンで 3 割が、がんである。従来の診断ではタンパク質を測定しているが、タンパク質に加えて糖鎖の違いに注目した。大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター研究所長の和田芳直が本研究領域において α 2, 3 シアル酸が付加していると報告していた。その後、弘前大学医学部泌尿器科の大山力がその研究を継続し、 α 2, 3 に特異的な抗体を作成し、抗 PSA 抗体 (タンパク質に対する抗体) と抗 α 2, 3 抗体 (糖鎖に対する抗体) をサンドイッチ様に組み合わせて、 α 2, 3 シアル酸が付加した PSA を特異的に検出することに成功した。

診断薬として臨床検討されるに至った成果として、小山らにより開発された糖鎖上のフコシル基に特異的に結合するレクチン抗体 ELISA キットがある。本研究領域における膵臓がんの新しい腫瘍マーカーの開発中に、膵がん患者の血清中にフコシル化ハプトグロビンが増加することを見だし、新しい膵がんの腫瘍マーカーになる可能性が示された。この結果をもとに、*Aleuria*

aurantia レクチンを利用した ELISA 法によるフコシル化ハプトグロビンの簡便な測定キットを試作した。最終的に発表された ELISA 法は、血清 25～625 倍希釈でも高精度でフコシル化ハプトグロビンを検出することが可能である。

1.3 研究領域の展開状況(系譜図)

本研究領域が 2002 年に開始される前年に、さきがけ研究領域「タイムシグナルと制御」において、理化学研究所の鈴木匡により研究課題「小胞体タンパク質品質管理機構に係る PNGase の構造と機能」が 2001 年度から 2004 年度に実施された。また、本研究領域が終了する前年の 2008 年に、ERATO 袖岡生細胞分子化学プロジェクト（研究総括：理化学研究所袖岡幹子）が開始された。2009 年には伊藤幸成が ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクトを立ち上げた。これらのさきがけ及び ERATO プロジェクトの研究者、研究代表者はいずれも本研究領域に参画した研究者である。

本研究領域の糖鎖に関する研究は、タンパク質、遺伝子につづく第 3 の鎖として注目されてきたが、近年がん等との疾患関連性が明らかになり、医療分野への応用が大きく期待されている分野である。タンパク質や遺伝子のみでは表現できない多様な生体メカニズムにおける生物シグナル分子として、糖鎖関連生体分子が重要であるという知見が蓄積されており、新たに同定された糖鎖関連分子の疾患関連性について、様々な国家関連プロジェクトが推進されている。

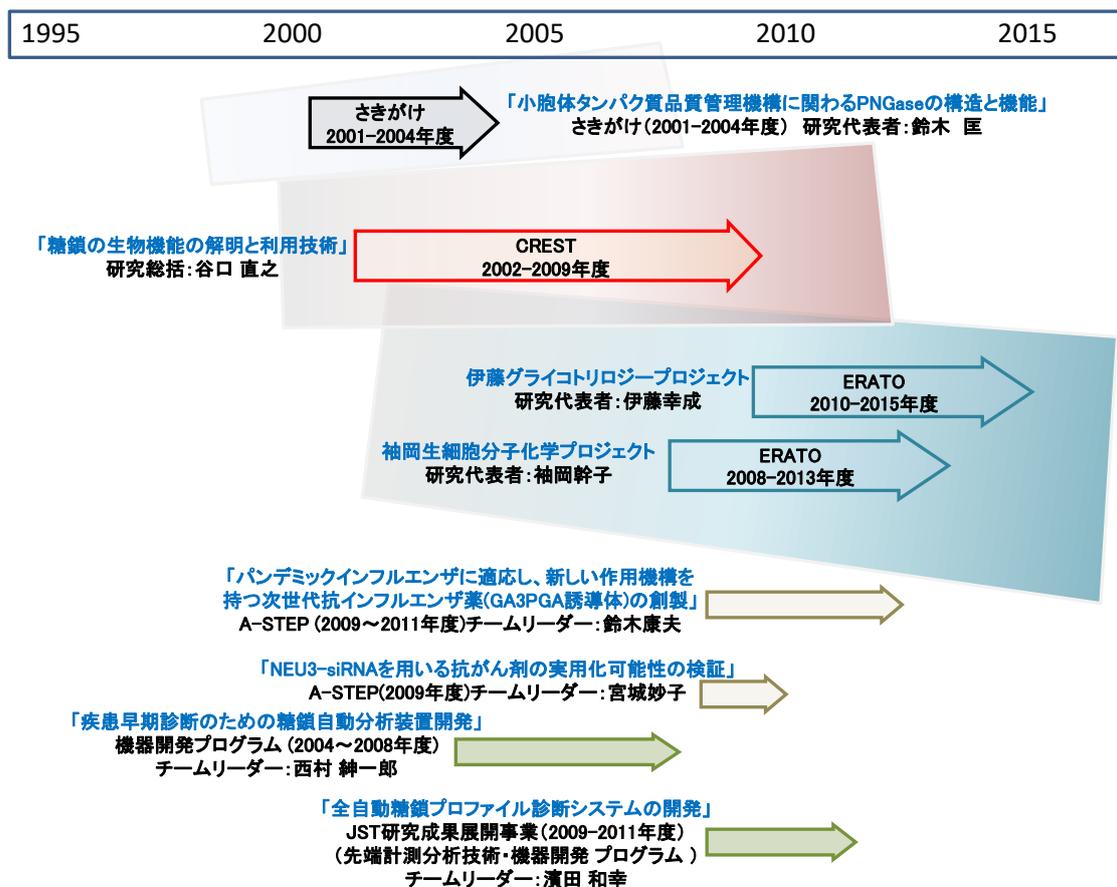


図 1-1 糖鎖研究の系譜図

第2章 追跡調査(研究領域全体動向)

2.1 追跡調査について

2.1.1 調査の目的

追跡調査は研究終了後、一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展状況や活用状況を明らかにし、科学技術振興機構(JST)の事業および事業運営の改善に資するために行うもので、研究領域終了後の研究者の研究課題の発展状況等を調査した。

2.1.2 調査の対象

本追跡調査は CREST 研究領域「糖鎖の生物機能の解明と利用技術(2002-2009 年度)」の研究代表者全員を対象とした。表 2-1 に調査対象と調査対象期間を示す。

表 2-1 調査対象と調査対象期間

	CREST 期間	CREST 終了後調査対象期間	研究課題数
第 1 期	2002 年 11 月～2008 年 3 月	2008 年 4 月～2014 年 9 月	6
第 2 期	2003 年 10 月～2009 年 3 月	2009 年 4 月～2014 年 9 月	6
第 3 期	2004 年 10 月～2010 年 3 月	2010 年 4 月～2014 年 9 月	4

2.1.3 調査方法

(1) 研究助成金

本領域研究の研究代表者が研究代表者となっているプロジェクトを中心に調査した。その中から、助成金総額が 1 千万円/件以上のものを表 2-3 に示している。

研究助成金資金の獲得状況の調査については、下記の Web サイトを利用した。

- ・調査対象者の所属する研究室や本人の Web サイトの調査
- ・競争的研究資金の担当機関の Web サイト
- ・競争的研究資金の担当機関データベース検索

(科学研究費助成事業データベース及び厚生労働科学研究成果データベース)

(2) 論文

論文の抽出は代表研究者の著者名検索により論文リストを出力し、article と review に絞り込み、さらに本課題に無関係な論文を除いた。すなわち、「糖」、「糖鎖」、「糖タンパク質」など、共通するキーワード及び各課題独自のキーワードでヒットしなかった論文を個別に調べ、終了報告書の内容、あるいは糖鎖関連研究と無関係と思われるものを除いた。得られた論文の発行年で分類し、研究期間中及び研究領域終了後の論文の数を求めた。研究領域終了後については、責任著者(第一著者、最終著者、及び連絡責任著者)の論文数を求めた。

本領域研究期間中及び研究終了後の期間の定義は表 2-2 のとおりである。

表 2-2 研究期間中及び研究終了後の論文対象期間

	実際の研究期間	論文対象期間(発行日)	
		研究期間中	研究終了後
第1期	2002年11月～2008年3月	2002年1月～2008年12月	2009年1以降
第2期	2003年10月～2009年3月	2003年1月～2009年12月	2010年1以降
第3期	2004年10月～2010年3月	2004年1月～2010年12月	2011年1以降

・使用データベース：Scopus(エルゼビア社)

(3) 特許

特許出願及び登録状況は、研究代表者が発明者となっており、プロジェクトと関連したものを抽出した。

・使用データベース：ShareResearch(株式会社 日立製作所)

2.2 研究成果概要

2.2.1 研究助成金

本研究領域研究が開始して以降、各代表研究者が獲得した助成金のリストを表 2-3 に示した。ここでは助成金総額が1千万円/件以上で代表者のものを示しているが、各代表者ともさらに多くの課題での研究を行っている。

伊藤幸成は、「糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明」(2002～2007)で、高マンノース型糖鎖の系統的化学合成ルートの確立、酵素—化学的「トップダウン型」コンビナトリアル合成による糖鎖合成など先駆的な合成技術を開発した後、科学技術振興機構(JST)戦略的創造研究推進事業総括実施型研究(ERATO)(2009～2014)に採択され、2010年4月よりグライコトリロジープロジェクトを本格的に始動させた^{1, 2}。

木曾は、「感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究」(2002～2007)で、O-結合型糖蛋白質のコア構造の効率的再構築技術として、「DTBS 効果」を応用する新規な α -立体選択的ガラクトシル化/ガラクトサミン化法を開発し、800種に及ぶ人工複合糖質プローブの創出に成功した。この成果は、インフルエンザや細菌毒素の感染、免疫応答、がん、炎症、自己免疫性神経疾患などの病態の理解に世界的な貢献をするものとなり、科学研究費補助金基礎研究(B)「シアロ糖鎖を足場とする新機能分子の創製と革新的利用技術の創出」(2010～2015)に採択され、神経突起伸展活性を有するガングリオシド(ヒト由来のLLG-3やGAA-7)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)に類似する自己免疫性神経疾患の原因物質として単離されたガングリオシド X2(GBSの診断に重要)などの世界初全合成を達成した³。

鈴木は、「ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用」(2002～2007)で、高病原性トリインフルエンザウイルスのヒト間伝播を可能とする変異機構、すなわちインフルエンザウイルスが宿主の壁を越える分子機構を初めて明らかにした。この間、トリ、ヒトインフルエンザウイ

¹ 理化学研究所基幹研究所 <http://www.asi.riken.jp/jp/laboratories/chieflabs/synthetic/>

² Glycotrily Project News <http://www.jst.go.jp/erato/ito/news.html>

³ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/22380067.ja.html>

ルスの受容体認識特異性を簡便に測定する系を開発し、高病原性トリインフルエンザウイルス (H5N1 亜型) の受容体認識特異性変異検出のサーベイランスへの応用へと発展している。科学研究費補助金基盤研究(B)「高病原性トリインフルエンザウイルスの新型ヒトウイルスヘマグルチニンの変異機構の解明と創薬」(2008～2011)に採択され、インフルエンザ創薬の基盤を確立している。

木下は、「糖鎖の動態-機能相関への統合的アプローチ」(2004～2009)で、細胞膜の外面に様々な蛋白質を繋ぎとめる基のグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカー蛋白質の GPI 部分の生合成と輸送についての発見をした後、科学研究費補助金基盤研究(A)「タンパク質 GPI アンカーの構造変化の分子機構と機能との相関の解明」(2009～2014)に採択された。GPI アンカーの脂肪酸リモデリングを行う酵素の遺伝子の解明については、脂肪酸リモデリングは、液性免疫系の恒常性維持に重要であることを明らかにし、アルキルアシル型 GPI アンカーの生合成機序とその意義の解明については、その脂質リモデリングを行う酵素の遺伝子の解明、そしてアルキルアシル型 GPI アンカーの生理的意義、特に肢根型点状軟骨異形成症との関係を解明する研究を進めている⁴。

鏑田は、「糖鎖シグナルによる獲得免疫応答制御の解明と疾患制御への応用」(2004～2009)で、CD22/Siglec2 機能阻害によりナイーブ B 細胞が記憶 B 細胞様の反応性を獲得することを示す結果を得て、CD22/Siglec-2 阻害剤の開発により、獲得免疫応答を制御し、初回感染でも迅速に大量の抗体産生が可能となる新しい対感染症治療(インフルエンザ等)への道を開いた。また、CD72c の機能解析において、CD72 欠損マウスの樹立により、マウス CD72 が自己抗体産生や自己免疫疾患の発症を制御していることを明らかにし、CD72 が SLE やニューロパチーで重要な自己抗原への免疫応答の負の制御因子であることが明らかとなった。厚生労働科学研究費補助金「新規コンセプトによる炎症を誘導しないワクチン用免疫増強剤の開発」(2013～2015)に採択されている⁵。本家は、科学研究費補助金(挑戦的萌芽研究)「分子間相互作用が生み出す膜マイクロドメイン生物情報」(2010～2011)、産学連携・技術移転事業 A-STEPFS ステージ(探索タイプ)「膜マイクロドメイン会合分子同定のための EMARS 反応標識試薬の開発」(2011)の研究において、独自に開発した生体膜分子間相互作用解析法 EMARS 法を改良するため、第二世代標識試薬を開発し、質量分析を基盤技術とするプロテオミクスによって標識タンパク質を同定することを可能にした^{6, 7}。

⁴ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/21247018.ja.html>

⁵ 厚生労働省科学研究費

<http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/hokabunya/kenkyujigyou/hojokin-koubo-h25/gaiyo/05.html>

⁶ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/22659060.ja.html>

⁷ JST A-STEP

表 2-3 研究者の研究助成金獲得状況

研究者	研究期間	研究種目	研究課題	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	金額 (百万円)
伊藤幸成	2002 年度～ 2007 年度	JST CREST	糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明														407.000
	2005 年度～ 2009 年度	科研費 (学術創成)	生物機能解明をめざす糖タンパク質の統合的合成研究														343.590
	2009 年度～ 2014 年度	JST ERATO	伊藤グライコトリロジープロジェクト														1500.000
神奈木玲児	2002 年度～ 2007 年度	JST CREST	癌の進展における細胞接着性機能糖鎖の解明														484.000
	2002 年度～ 2004 年度	科研費 (特定領域)	がんの血行性転移に関する細胞接着分子の発現制御遺伝子の研究														24.200
	2005 年度～ 2009 年度	科研費 (特定領域)	がん転移浸潤の糖鎖バイオロジー														64.000
木曾真	2002 年度～ 2007 年度	JST CREST	感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究														269.000
	2005 年度～ 2009 年度	科研費 (基盤研究 S)	人工複合糖質プローブの創製と高次生命機能の制御														90.740
	2010 年度～ 2015 年度	科研費 (基盤研究 B)	シアロ糖鎖を足場とする新機能分子の創製と革新的利用技術の創出														17.420
小山信人	2002 年度～ 2007 年度	JST CREST	糖鎖構造の制御による癌及びウイルス疾患の予防法及び治療法の開発														484.000
鈴木康夫	2002 年度～ 2007 年度	JST CREST	ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用														469.000
	2005 年度～ 2006 年度	科研費 (基盤研究 B)	高病原性トリインフルエンザウイルスのヒトへの伝播機構の解明とパンデミック阻止														14.100
	2008 年度～ 2011 年度	科研費 (基盤研究 B)	高病原性トリインフルエンザウイルスの新型ヒトウイルスヘマグルチニンの変異機構の解明と創薬														19.240
	2008 年度～ 2012 年度	私立大学支援	生活環境因子誘発疾患の予知・予防に関する戦略的研究														517.056
	2009 年度～ 2011 年度	JST A-STEP	パンデミックインフルエンザに適応し、新しい作用機構を持つ次世代抗インフルエンザ薬(GA3PGA 誘導体)の創製														60.000
西原祥子	2002 年度～ 2007 年度	JST CREST	RNAi 法による糖鎖機能解明と利用技術の開発														430.000
	2002 年度～ 2008 年度	ハイテクリサーチセンター整備事業	中枢神経系の発生・分化および病態における糖鎖機能の解明-再生医療への応用をめざして														149.500
	2008 年度～ 2010 年度	科研費 (基盤研究 B)	硫酸化修飾の PAPS 輸送体制御による統合的機能解析														20.670
	2009 年度～ 2013 年度	私立大学支援	モデル生物による in vivo 糖鎖生物学 - ES 細胞から病態モデルへ -														77.500

研究者	研究期間	研究種目	研究課題	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	金額 (百万円)
伊藤孝司	2003 年度～ 2008 年度	JST CREST	糖鎖機能を利用した組換え リソソーム酵素の脳内補充 療法の開発														266.000
	2010 年度	武田科学振興 財団特別研究 助成	難病治療用の組換え酵素及 び化学合成糖タンパク製剤 の開発戦略と 新規有効性評価システムの 構築														100.000
	2011 年度～ 2014 年度	科研費 (基盤研究B)	タンパク質間相互作用部位 をターゲットとした新規バ イオ医薬品の開発														18.590
	2014 年度～ 2017 年度	科研費 (基盤研究B)	ネオグライコバイオロジク スの創製とリソソーム病治 療薬開発への応用														12.700
井ノ口仁一	2003 年度～ 2008 年度	JST CREST	マイクロドメイン機能異常 にもとづく 2 型糖尿病の病 態解明														265.000
	2003 年度～ 2004 年度	科研費 (基盤研究B)	生活習慣病や癌へのガング リオシドの関与と新規な病 態診断および治療戦略の検 討														15.300
	2006 年度～ 2007 年度	科研費 (特定領域)	ガングリオシド GM3 合成酵 素遺伝子診断による非小細 胞肺癌の抗癌剤感受性の予 測														12.200
	2011 年度～ 2013 年度	科研費 (基盤研究B)	ガングリオシド GM3 の新た な病態生理学的意義の解明														18.330
	2012 年度～ 2017 年度	私立大学支援	生体膜糖鎖異常に起因する 生活習慣病発症機序の解明 と臨床への応用														85.770
中田博	2003 年度～ 2008 年度	JST CREST	担癌状態におけるムチンを 介した免疫能の変化の解析 と応用														256.000
野村一也	2003 年度～ 2008 年度	JST CREST	遺伝子破壊による糖鎖機能 の戦略的解明														444.000
宮城妙子	2003 年度～ 2008 年度	JST CREST	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														378.000
	2006 年度～ 2007 年度	科研費 (特定領域)	形質膜シアリダーゼによる がん細胞のアポトーシス制 御機構														10.900
	2008 年度～ 2009 年度	科研費 (特定領域)	形質膜シアリダーゼによる がん細胞死の制御機構														16.000
	2009 年度	JST A-STEP	NEU3-siRNA を用いる抗が ん剤の実用化可能性の検証														10.000
山口陽子	2003 年度～ 2008 年度	JST CREST	糖鎖構造特異的単鎖抗体ラ イブラリーの構築														247.000
木下タロウ	2004 年度～ 2009 年度	JST CREST	糖鎖の動態-機能相関への 統合的アプローチ														704.000
	2005 年度～ 2006 年度	科研費 (基盤研究B)	睡眠病トリパノソーマにお ける GPI アンカー型タンパ ク質の生合成と機能に関す る研究														14.300

研究者	研究期間	研究種目	研究課題	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	金額 (百万円)
木下タロウ	2007年度～ 2008年度	科研費 (基盤研究B)	睡眠病トリパノソーマのステージ特異的 GPI アンカー生成機構に関する研究														18.720
	2009年度～ 2013年度	科研費 (基盤研究A)	タンパク質 GPI アンカーの構造変化の分子機構と機能との相関の解明														44.980
鏑田武志	2004年度～ 2009年度	JST CREST	糖鎖シグナルによる獲得免疫応答制御の解明と疾患制御への応用														258.000
	2006年度～ 2007年度	科研費 (基盤研究B)	新興感染症への抵抗性の免疫遺伝学的解析														10.770
	2013年度～ ～2019年度	厚労省科学研究費	新規コンセプトによる炎症を誘導しないワクチン用免疫増強剤の開発														40.000
平林義雄	2004年度～ 2009年度	JST CREST	糖修飾システムによる神経機能の発現・制御														239.000
本家孝一	2004年度～ 2009年度	JST CREST	病態における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明														273.000
	2009年度～ 2011年度	科研費 (基盤研究B)	水・電解質代謝を制御する分子機能の解明														18.590

科研費  JST CREST  JST ERATO  JST A-STEP  私立大学支援 
 文科省事業  厚労省科研費  武田科学振興財団 

科研費：科学研究費助成事業(文部科学省)

私立大学支援：私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(文部科学省)

ハイテクリサーチセンター整備事業：ハイテクリサーチセンター整備事業(文部科学省)

厚労科研費：厚生労働科学研究費補助金各研究事業(厚生労働省)

本研究領域開始以降に開始された代表者としてのプロジェクトで助成金総額が1千万円/件以上のもののみを抽出した。

2.2.2 論文

本研究領域研究の研究代表者が研究期間中及び研究終了後に発表した本研究領域に関連する原著論文の数を表 2-4 にまとめた。また、その中で研究終了後については責任著者となった論文数の数も示している。ほとんどの研究者が本研究終了後も期間中と同等、あるいはそれ以上の多数の論文を発表している。多くは現在も本研究領域と関連した研究を行っている。

表 2-4 研究者の論文(原著論文)数(データ取得日：2014年8月)

期(採択年度)	研究課題	研究代表者	① 研究期間中の論文数	② 研究終了後の論文数	③ 研究終了後の責任著者論文数
第1期(2002)	糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明	伊藤 幸成	55	34	18
	癌の進展における細胞接着性機能糖鎖の解明	神奈木 玲児	49	25	22

第1期(2002)	感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究	木曾 真	40	22	14
	糖鎖構造の制御によるがん及びウイルス疾患の予防法及び治療法の開発	小山 信人	4	4	2
	ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用	鈴木 康夫	40	14	11
	RNAi 法による糖鎖機能解明と利用技術の開発	西原 祥子	16	25	19
第2期(2003)	糖鎖機能を利用した組換えリソソーム酵素の脳内補充療法の開発	伊藤 孝司	20	13	6
	マイクロドメイン機能異常にもとづく2型糖尿病の病態解明	井ノ口 仁一	21	15	10
	担癌状態におけるムチンを介した免疫能の変化の解析と応用	中田 博	13	19	10
	遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明	野村 一也	9	6	6
	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	宮城 妙子	20	18	14
	糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーの構築	山口 陽子	11	17	16
第3期(2004)	糖鎖の動態—機能相関への統合的アプローチ	木下 タロウ	39	36	11
	糖鎖シグナルによる獲得免疫応答制御の解明と疾患制御への応用	鏑田 武志	25	8	4
	糖修飾システムによる神経機能の発現・制御	平林 義雄	28	23	10
	病態における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明	本家 孝一	31	16	16

2.2.3 特許

特許出願及び登録は、研究目的と段階によりその数は異なるが、当該研究が最終的に一定の成果を収め、実用化による社会貢献につながる段階に達したことを示す重要な指標でもある。

本研究領域の研究代表者が研究期間中及び研究終了後に出願した本研究領域に関する特許出願数及び登録数の結果を表 2-5 に示す。

表 2-5 研究期間中・終了後の特許の出願と成立状況

採択年度	研究代表者	研究期間中				研究終了以降			
		出願件数		登録件数		出願件数		登録件数	
		国内	海外 (国際)	国内	海外 (国際)	国内	海外 (国際)	国内	海外 (国際)
2002 年度	伊藤 幸成	11	7	5	1	2	2	2	0
	神奈木 玲児	10	4	8	4	1	0	0	0
	木曾 真	3	4	2	2	3	7	1	0
	小山 信人	5	3	2	0	0	0	0	0
	鈴木 康夫	16	6	7	4	4	3	0	2
	西原 祥子	11	3	6	0	4	2	0	0
2003 年度	伊藤 孝司	5	2	1	1	5	6	0	0
	井ノ口 仁一	8	4	4	2	1	1	1	1
	中田 博	3	1	0	0	2	0	0	0
	野村 一也	0	0	0	0	0	0	0	0
	宮城 妙子	2	2	1	1	0	0	0	0
	山口 陽子	4	1	1	0	0	3	0	0
2004 年度	木下 タロウ	1	0	0	0	0	0	0	0
	鏑田 武志	2	2	1	0	0	0	0	0
	平林 義雄	7	4	0	0	0	0	0	0
	本家 孝一	4	1	1	1	0	0	0	0
領域全体		92	44	39	16	22	24	4	3

2.3 科学技術や社会・経済への波及効果

2.3.1 科学技術への波及効果

(1) 受賞

科学技術の進歩への貢献や研究成果に関する評価を示す指標の一つとして、受賞が挙げられる。表 2-6 に、本研究領域の研究期間中及び研究終了後の研究代表者の受賞を示す。

本研究領域における研究代表者は、国内的にも国際的にも高く評価された研究者がみられた。伊藤幸成は、有機化学を生物科学に結びつけた功績が高く評価され、国内では 2012 年の日本農芸化学会賞を含む 3 つの賞を受賞し、海外では 2008 年に Roy L. Whistler International Award in Carbohydrate Chemistry を受賞した。鈴木はインフルエンザウイルスの研究等を深めて糖鎖ウイルス学を広めた功績に対し、2004 年に中日新聞社から中日文化賞を受賞した。井ノ口は 2006 年に機能糖タンパク質の研究により日本薬学会賞を受賞しており、木下はタンパク質の糖脂質修飾に働く遺伝子群の証明と医学応用研究に対し、文部科学大臣表彰を 2010 年に受けた。

表 2-6 受賞リスト

No.	受賞者	賞名	授賞機関（国名）	受賞年	受賞理由
1	伊藤 幸成	Roy L. Whistler International Award in Carbohydrate Chemistry	International Carbohydrate Organization	2008	有機化学を生物科学に直接的に結びつけた
2		理化学研究所重要業績表彰	理化学研究所	2010	有機合成化学を基盤とする糖タンパク質の機能解明に向けた研究
3		竹田国際貢献賞	竹田化学	2010	糖鎖工学および糖質化学における国際貢献
4		日本農芸化学会賞	日本農芸化学会	2012	糖タンパク質の機能解析をめざす複合科学的研究
5	木曾 真	岐阜新聞大賞（学術部門）	岐阜新聞	2007	糖鎖の人工合成成功
6	鈴木 康夫	日本薬学会賞	日本薬学会	2004	ウイルス感染における糖鎖薬学的研究
7		中日文化賞	中日新聞社	2004	インフルエンザウイルスの研究と創薬への応用
8		中日産業技術賞（グループ受賞）	中日新聞社	2010	可視光応答型触媒 V-CAT を用いた高機能繊維
9		「多ヶ谷勇記念ワクチン研究」イスクラ奨励賞	イスクラ厚生事業団（日本）	2013	糖鎖ウイルス学によるワクチンの品質管理技術の開発
10	伊藤 孝司	康楽賞	公益財団法人 康楽会（日本）	2015	徳島大学への研究成果・貢献
11	井ノ口 仁一	日本薬学会東北支部若手研究者発表賞	日本薬学会	2006	糖鎖機能代替アミノ酸置換法を用いた機能糖タンパク質の結晶構造解析法の開発
12		第 11 回アディポサイエンス研究会シンポジウム優秀ポスター賞	アディポサイエンス研究会	2006	Regulation of Visceral Adipogenesis by Mesentery-Resident Macrophages
13	山口 陽子	Scientific Research Portrait Gallery, City of Hope	City of Hope (USA)	2014	Achievement in purification of active insulin receptors
14	木下 タロウ	文部科学大臣表彰（科学技術賞：研究部門）	文部科学省	2010	蛋白質の糖脂質修飾に働く遺伝子群の証明とその医学応用研究
15	鏑田 武志	フィリップ・フランツ・フォン・ジーボルト賞	ドイツ連邦共和国大統領	2005	
16	平林 義雄	てんかん治療研究振興財団銅賞	てんかん治療研究振興財団	2006	てんかん発症機構に関わる分子基盤の構築

No.	受賞者	賞名	授賞機関 (国名)	受賞年	受賞理由
17	木下 タロウ	International Glycoconjugate Organization Award	International Glycoconjugate Organization (IGO)	2015	a number of outstanding discoveries that significantly contributed to advancement of glycoscience in a field of glycosylphosphatidylinositol (GPI)

(2) 学会等への貢献

本研究領域期間中の 2004 年に三菱化学生命科学研究所所長(当時)の永井克孝を理事長として日本糖鎖科学コンソーシアム (JCGG) ⁸が設立され、領域終了後も本研究領域の研究者も活発な活動を続けており、伊藤幸成は 2005 年から理事を務めている。国際的にも 25th International Carbohydrate Symposium (ICS 2010) 副組織委員長、事務局長(2010 年)、国際糖質機構 (International Carbohydrate Organization) 日本代表(2006 年～)・会長 (President) (2010 年～2012 年)として活躍し、2004 年～2013 年に日本糖質学会の理事、2013 年からは会長を務めている。2014 年 11 月には米国糖質学会 (Society for Glycobiology) との合同会議 (ハワイ) についてもシンポジウムを主催し、「Chemical aspects of glycobiology」のセッションにおいて糖質科学への化学的アプローチについての国際的な情報交換に大きく貢献した。

2.3.2 社会・経済への波及効果

(1) 新聞報道および招待講演等

木曾は、人工複合糖質プローブの創出技術開発の成果に関して、2011 年の 3rd ACGG Conference では「Development of novel ganglioside probes for chemical biology of lipid raft」という題名で、2013 年の第 14 回国際細胞膜研究フォーラムでは「Novel fluorescent ganglioside probe for the single molecule imaging of raft domain」という題名で、また同年の 15th Asian Chemical Congress では「細胞膜メソ領域の 1 分子イメージングのための蛍光糖脂質プローブの開発」という題名で招待講演を行った⁹。

鈴木は、高病原性トリインフルエンザウイルスのヒト間伝播を可能とする変異機構解明の成果に関して、2008 年に The 13th Tokyo Biochemical Research Foundation party で「Study on the Host Range of Influenza Viruses -Analysis of N-glycans in embryonated chicken egg chorioallantoic and amniotic cells responsible for binding and adaptation of human and avian influenza viruses」という題名で招待講演を行った。また、「研究室探訪 新型インフルエンザの謎に挑む～予防・監視の請負人～」(2009 年 4 月 3 日読売新聞)、「研究室探訪-新型インフルエンザの謎に挑む-中部大学生命健康科学部 鈴木康夫教授-予防と監視の請負人」(2009 年 4 月 3 日読売新聞)、「鳥インフルは依然脅威 中部大 生命健康科学部で講演会」(2009 年 5 月 28 日読売新聞)、「中日新聞社賞：多機能も肌触りも維持、V-CAT ファミリー・中部大学」(2010 年 12 月 3 日中日新聞)など新聞でその活動が報道された¹⁰。

⁸ 日本糖鎖科学コンソーシアム (JCGG) <http://www.jcgg.jp/>

⁹ <http://researchmap.jp/read0010814/>

¹⁰ 中部大学ヘルスサイエンスヒルズ平成 20 年度成果報告 http://www.isc.chubu.ac.jp/hsh/report_suzuki.html

(2) その他の社会的貢献

研究総括の谷口を中心として、本研究領域で獲得された研究成果を専門家でない国民が理解できるような比較的やさしい内容の読み物として、冊子「糖鎖を知る」その素顔と病気への挑戦」(図 2-1)にまとめ、JST から無料で配布して広く公表した。著者は、本研究領域に参加した研究リーダーを含む 39 名からなり、カラーの図解を多く取り入れた興味を持ち易く、分かりやすいものとなっている。



図 2-1 糖鎖を知る

第3章 各研究課題の主な研究成果及び波及効果

3.1 2002年度採択課題

3.1.1 糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明（伊藤幸成）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

糖タンパク質には抗体、ホルモン、サイトカインなどがあり、これらは様々な反応に寄与する重要な生体分子である。この糖タンパク質の品質管理機構は小胞体内に存在し、フォールディング、輸送、分解などのシステムにより維持されている。本研究は、この分子機構の解明のため「高マンノース型」糖鎖の網羅的合成(図3-1)¹¹と、合成した糖鎖を用いた、糖タンパク質の品質管理機構に関する糖鎖-タンパク質相互作用や糖タンパク質プロセッシングの解析を目指した(図3-2)¹²。

② 期間中の研究成果

(i) Calnexin(CNX)/Calreticulin(CRT) リガンド糖鎖の合成と相互作用解析

CNX/CRTは小胞体内で機能するレクチン様シャペロンである。本研究領域ではそのリガンドと考えられている12糖の糖鎖(Glc1Man9GlcNAc2, G1M9)やその部分構造及び種々のアナログを合成し、CNX/CRTに特異的な相互作用をNMRおよび合成糖鎖固定化ビーズを用いたフロントアルフィニティークロマトグラフィー(FAC)法により解析した。その結果、CRTは種々のアナログのうちモノグルコシル化高マンノース型糖鎖のMan α 1-3分枝(Glc α 1-3Man α 1-2Man α 1-2Man)を特異的に認識する(図3-2)ことを明らかにし、CRTは高マンノース型糖鎖の微妙な構造を認識することがわかった^[1]。

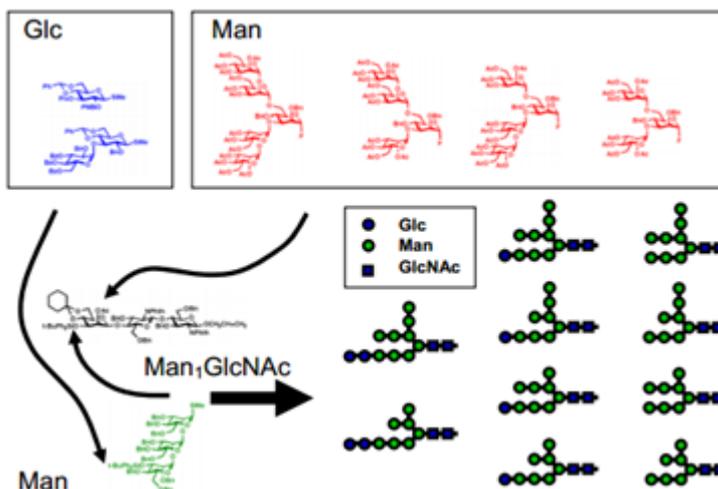


図3-1 高マンノース型糖鎖の合成¹¹

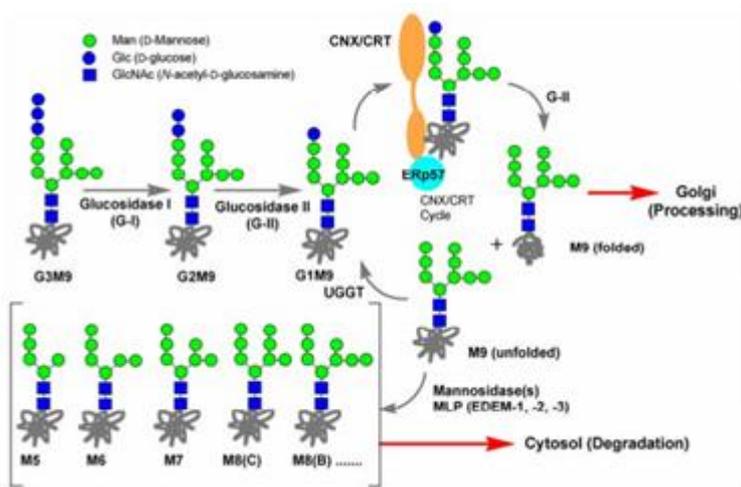


図3-2 小胞体内糖タンパク質プロセッシングと品質管理機構¹¹

¹¹ 研究終了報告書 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei14/tousa/ito.pdf

¹² JST 戦略的創造研究推進事業 ERATO 伊藤グライコロジープロジェクト http://www.jst.go.jp/erato/research_area/ongoing/igk_PJ.html

(ii) Glucosidase II (G-II) の定量的特異性解析

G-II は、Glc1Man9をMan9に導く活性 (Cleavage-2) の他に、Glc2Man9をGlc1Man9に導く活性 (Cleavage-1) を持つ(図3-2)、小胞体内糖タンパク質のプロセッシングとフォールディングに重要なタンパク質である。この2つの活性を、糖鎖-メトトレキセート (MTX) 誘導体 (CHO-MTX) 及びそのジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 複合体を用いた解析により、糖タンパク質をCNX/CRTサイクルに導入するCleavage-1は、CNX/CRTサイクルから糖タンパク質を離脱するCleavage-2より遥かに速く進行することを明らかにし、糖タンパク質がG1M9形としてCNX/CRTサイクルに導入されることがわかった。また、Glc1Man8 (B) がGlc1Man9と同等の反応速度を示すことから、糖鎖のManの個数により反応速度はMan7<Man8<Man9であるという定説に反し、G-IIの活性はMan残基数ではなく、糖鎖末端にManが存在することに依存するという結果を得た^[2]。

(iii) 糖タンパク質グルコース転移酵素 (UGGT) の合成プローブによる定量的解析

小胞体内CNX/CRTサイクルの「フォールディングセンサー」であるUGGT(図3-2)の良好な基質が糖鎖-メトトレキセート (MTX) 誘導体 (CHO-MTX) であることを発見し、M9-MTXが従来用いられてきた thyroglobulin を上回る反応性を有することを明らかにした。これらの高反応性基質を用いることにより、精度の高いUGGTの様々な糖鎖に対する活性測定が可能になった^[3]。その結果、糖タンパク質のプロセッシングとフォールディングサイクルの詳細が初めて明らかになった。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Matsuo I., Wada M., Manabe S., Yamaguchi Y., Otake K., Kato K., Ito Y., Synthesis of monoglucosylated high-mannose-type dodecasaccharide, a putative ligand for molecular chaperone, calnexin, and calreticulin (2003) *Journal of the American Chemical Society*, 125, pp. 3402-3403.
- [2] Totani K., Ihara Y., Matsuo I., Ito Y., Substrate specificity analysis of endoplasmic reticulum glucosidase II using synthetic high mannose-type glycans (2006) *Journal of Biological Chemistry*, 281, pp. 31502-31508.
- [3] Totani K., Ihara Y., Matsuo I., Koshino H., Ito Y., Synthetic substrates for an endoplasmic reticulum protein-folding sensor, UDP-glucose: Glycoprotein glucosyltransferase (2005) *Angewandte Chemie - International Edition*, 44, pp. 7950-7954.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域期間中から、科学研究費補助金学術創成研究費「生物機能解明をめざす糖タンパク質の統合的合成研究」(2005年~2009年)で、合成高マンノース型糖鎖を用いた糖タンパク質の細胞内プロセッシング過程の解析、感染と密接に関連する微生物由来の糖鎖の合成、チオエステル合成法を利用した糖タンパク質やデンドリマーの合成、及びこれらの研究に有用な新規アミノ基保

護基を開発し、さらに超高压条件を利用する効率的合成反応を開発した¹³。本研究領域終了後の2009年から2013年にかけて、科学技術振興機構(JST)戦略的創造研究推進事業総括実施型研究ERATO伊藤グライコトリロジープロジェクト^{12, 14}を進め、本研究領域における成果を基に、有機化学合成により精密に人工合成した糖鎖及び糖タンパク質を用いて、糖タンパク質の細胞内外での作用を系統的に解析する研究を実施した¹⁵。

①科学技術の進歩への貢献

ERATO伊藤グライコトリロジープロジェクトにおいて、オリゴ糖鎖の多様性志向型合成法、均一な糖タンパク質の調整法、糖鎖と糖タンパク質の相互作用測定法を確立した。特に糖タンパク質フォールディングセンサーとして重要な機能を持つ酵素UGGTについて、独自に開発した非タンパク質型基質を用いて、糖鎖特異性などの性質を明らかにした^[1]。さらに蛍光性UGGT基質の開発に発展させ、基質認識能の解明に向けた研究を進めた^[2]。

また、糖タンパク質の品質管理機構としてミスフォールドタンパク質を見分けて排除するメカニズムに注目し、本研究領域で培った化学合成手法を応用して、均一なミスフォールド糖タンパク質を合成する手法を構築した。合成したミスフォールドタンパク質を用いてUGGTによるミスフォールド体の認識機構の解明研究を進め、UGGTがミスフォールド糖タンパク質表面に露出した疎水性領域と糖鎖構造を同時に認識していることを明らかにした^[3]。

このような、人工合成した糖タンパク質を用いた系統的解析の研究手法は、生命科学における有機化学的手法の優位性を示すモデルケースになっている。本研究領域の成果により、糖タンパク質品質管理機構が糖質化学者の間で広く認知されるようになり、特に、糖鎖合成化学とケミカルバイオロジーの融合研究における潮流を生み出した¹⁶。

②社会・経済への波及効果

ERATO伊藤グライコトリロジープロジェクトは2010年4月より本格的に始動し、2010年8月第25回国際糖質シンポジウム(25th International Carbohydrate Symposium)では伊藤幸成は組織委員会の副委員長を務めてプロジェクトにおけるアクティビティを世界に発信した¹⁷。

また、伊藤は2008年7月にRoy L Whistler International Award in Carbohydrate Chemistry (International Carbohydrate Organization)を受賞し、2010年3月には「有機合成化学を基盤とする糖タンパク質の機能解明に向けた研究」で理化学研究所重要業績表彰(S)、さらに2010年7月に「糖鎖工学および糖質化学における国際貢献」で竹田国際貢献賞(竹田理化工業)、2012年2月には「糖タンパク質の機能解析をめざす複合科学的研究」で日本農芸化学会賞(日本農芸化学会)を受賞した¹⁷。

本研究領域およびERATO伊藤グライコトリロジープロジェクトにおける成果は、タンパク質の立体構造や糖鎖構造異常に起因するアルツハイマー病、プリオン病、糖鎖不全症などの疾病の治

¹³ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/17GS0420.en.html>

¹⁴ ERATO Glycotriology Project <http://www.jst.go.jp/erato/ito/index.html>

¹⁵ 理化学研究所基幹研究所 <http://www.asi.riken.jp/jp/laboratories/chief labs/synthetic/>

¹⁶ Izumi M., Kiuchi T., Ito Y., Kajihara Y., Misfolded Glycoproteins as Probes for Analysis of Folding Sensor Enzyme UDP-Glucose : Glycoprotein Glucosyltransferase (2013) Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 25(141), pp. 1-12.

¹⁷ Glycotriology Project News <http://www.jst.go.jp/erato/ito/news.html>

療、合成糖タンパク質医薬品の開発、新規な抗感染症薬の開発における新たな研究手法の創成に役立つ。短期的な視点での応用や技術開発は本研究領域の主眼ではなかったが、本研究領域の成果が契機となり、高品質糖タンパク質医薬の開発に向けた研究が行われている。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文 4 報以内

- [1] Dedola S., Izumi M., Makimura Y., Seko A., Kanamori A., Sakono M., Ito Y., Kajihara Y., Folding of synthetic homogeneous glycoproteins in the presence of a glycoprotein folding sensor enzyme (2014) *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(11), pp. 2883-2887.

- [2] Takeda Y., Seko A., Hachisu M., Daikoku S., Izumi M., Koizumi A., Fujikawa K., Kajihara Y., Ito Y., Both isoforms of human UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase are enzymatically active (2014) *Glycobiology*, 24(4), pp. 344-350.

- [3] Sakono M., Seko A., Takeda Y., Hachisu M., Ito Y., Biophysical properties of UDP-glucose: Glycoprotein glucosyltransferase, a folding sensor enzyme in the ER, delineated by synthetic probes (2012) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 426, pp. 504-510

3.1.2 癌の進展における細胞接着性機能糖鎖の解明（神奈木玲児）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

糖鎖が機能性分子としてがんの進展で大きく寄与する局面を解明し、新たに利用可能な技術開発、及びがんの診断・治療への展開応用として、(a)細胞接着分子セレクチ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機能的意義の解明、(b)シアル酸構造の変化機構の細胞接着の制御における重要性の証明、その多様な構造変化の理解、さらにはがんの診断や治療につながる技術基盤の確立への貢献を目指した¹⁸。

②期間中の研究成果

(i) 局所進行がん病巣におけるシアリルルイス_{x/a}糖鎖発現の亢進機構の解明

細胞の低酸素下培養によりシアリルルイス_{x/a}糖鎖が発現誘導されることを発見し、低酸素状態で転写誘導される糖鎖遺伝子の解析により、転写誘導が転写因子 HIF(hypoxia inducible factor)により起こることを明らかにした。また、患者のがん組織でもこれらの遺伝子転写の増加を確認し、局所進行がん HIF をターゲットにした治療の重要性を示した^{18, [1]}。

(ii) セレクチン糖鎖リガンドによる白血球動態の調節

Tリンパ球におけるセレクチンの特異的リガンド糖鎖であるシアリルルイス_Xの合成の律速酵素であるフコース転移酵素 Fuc-T VIIの転写調節機構を詳細に検索し、転写因子 T-bet と GATA-3 が重要な機能を司っていることを明らかにし(図 3-3)、機能性糖鎖の発現誘導に精妙な転写調節機構が働いていることを示した^{18, [2]}。

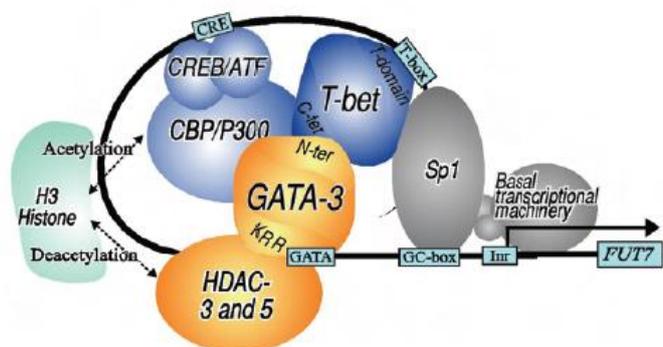


図 3-3 フコース転移酵素 Fuc-T VIIの調節領域に結合する転写因子複合体¹⁸

(iii) がん細胞における糖鎖合成遺伝子のメチル化による転写抑制

固形がんにおいては、がん化に伴い糖鎖合成遺伝子のエピジェネティックな転写抑制が起こり、複雑な糖鎖の合成が不全(「糖鎖不全現象」)となる。消化器がんでは観察される Sd^a糖鎖の発現低下が、合成遺伝子のメチル化によるものであることを明らかにし、糖鎖合成遺伝子のメチル化状態と臨床病理学的特徴との強い相関を示した^{18, [3]}。

¹⁸ 研究終了報告書 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei14/tousa/kannnagi.pdf

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] 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., Kannagi R., Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells—a missing link between Warburg effect and induction of selectin ligand carbohydrates (2004) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, pp. 8132-8137.
- [2] Chen G.-Y., Osada H., Santamaria-Babi L.F., Kannagi R., Interaction of GATA-3/T-bet transcription factors regulates expression of sialyl Lewis X homing receptors on Th1/Th2 lymphocytes (2006) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, pp. 16894-16899.
- [3] Kawamura Y. I., Toyota M., Kawashima R., Hagiwara T., Suzuki H., Imai K., Shinomura Y., Tokino T., Kannagi R., Dohi T., DNA hypermethylation contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer (2008) Gastroenterology, 135, pp. 142-151.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

科学研究費補助金基礎研究(C)「低酸素誘導因子(HIF)により誘導される細胞接着関連遺伝子の転写クラスター解析」(2007～2008)¹⁹、「低酸素誘導因子により転写誘導される細胞接着分子遺伝子群の協同作用の生理的意義」(2009年～2011年)、科学研究費補助金新学術領域研究(研究領域提案型)「がん微小環境における糖鎖を介した細胞接着の役割解明と制御法の開発」(2011年～2013年)、科学研究費補助金基盤研究(C)「低酸素誘導因子 HIF が転写誘導する接着分子遺伝子の細胞遊走能亢進における役割」(2012年～2015年)などを実施した²⁰。

厚生労働科学研究費補助金「がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく診断・治療法の開発に関する研究」(2007年～2009年)(代表者、落合淳志)、「浸潤・転移等、がんの重要な臨床的特性の病理・病態学分子基盤の解析とそれに基づく診断・治療法の開発に資する研究」(2010年～2013年)(代表者、落合淳志)にも糖鎖研究で参加している。

① 科学技術の進歩への貢献

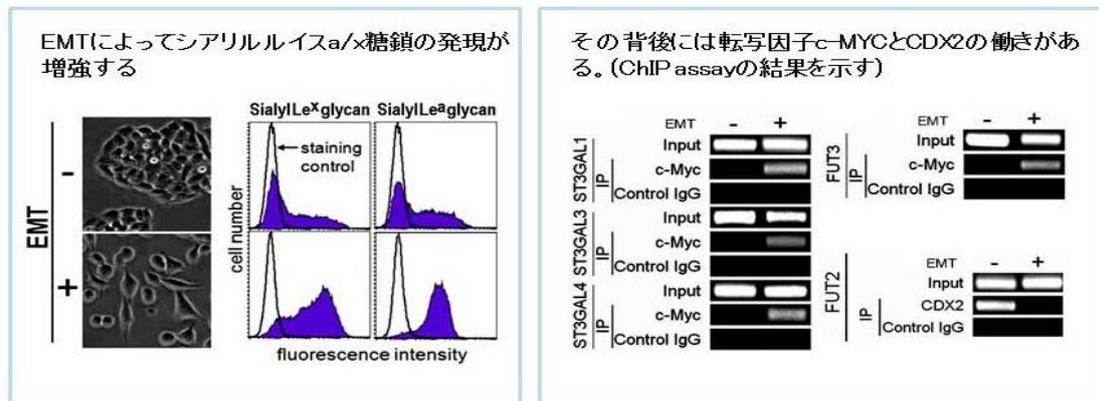
本研究領域終了後、低酸素状態における HIF のシアリルルイス x/a 糖鎖の発現誘導を阻害することによる治療法を確立することを目指して、研究が発展している。がんにおけるシアリルルイス x/a 糖鎖の発現は、がんの進展に伴って増強する。この発現増強の原因のひとつは、がん進展に伴う低酸素抵抗性の獲得に際して転写因子 HIF-1 が数種の糖鎖合成遺伝子の転写を誘導するためであることを本研究領域期間中に見出した²¹が、その後の研究により、がん進展に伴う上皮間葉

¹⁹ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/19590298.ja.html>

²⁰ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/r/80161389.en.html>

²¹ 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., Suzuki A., Kozutsumi Y.,

転換 (Epithelio-mesenchymal transition (EMT)) によってもシアリルルイス x/a 糖鎖の発現が増強することを発見し、さらにこの背後には転写因子 c-MYC と CDX2 の働きがあることを明らかにした^[1] (図 3-4)。



Sakuma et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: 7776-7781, 2012

図 3-4 癌の伸展における細胞接着性機能糖鎖の解明 (提供: 愛知医科大学 神奈木玲児)^[2]

また、正常上皮細胞に発現し免疫抑制作用を持つ正常型糖鎖ががん化によって消退する機構に関する研究では、正常型糖鎖の一部が糖鎖認識分子シグレック-7及びシグレック-9の特異的リガンドであり、これらのシグレックがマクロファージ系細胞における COX2 発現を抑制することを明らかにした。この結果は、正常上皮の糖鎖が COX2 発現抑制作用を持ち、がん化に伴う糖鎖変化によりその抑制作用が失われることを示唆するものであった^{22, [2]}。

高再燃性アトピー性皮膚炎に関する研究では、患者のヘルパーT細胞で発現しているシアリル6-スルホルイス X (G152 グリカン) とサイクリックシアリル6-ルイス X (G159 グリカン) の関連を調べた結果から、フローサイトメトリーによるヘルパーメモリーT細胞の G159 グリカンと G152 グリカンの計測は高再燃性アトピー性皮膚炎患者の同定に臨床的意義をもつ可能性を示した^[3]。

大腸がんについては、大腸がん細胞株 Caco2 において、低酸素状態から正常酸素状態に再度移行した時に、元の正常酸素状態ではみられなかったセラミド種である長鎖スフィンゴシン (d18:1) が出現することを発見した。これらのセラミド種はスフィンゴミエリンや NGSLs を構成するセラミド種の前駆体として合成されるものと考えられる^[4]。

さらに、低酸素で転写誘導される遺伝子を DNA マイクロアレイによって網羅的に調査した際に検出された遺伝子の中から、その遺伝子の shRNA 導入によって低酸素による細胞運動能の亢進が有意に抑制されるものを複数認め、細胞運動能に対する抑制機構を解析中である。これらの shRNA は、細胞の運動能・遊走能のみならず、細胞増殖能にも抑制的に働くなど、様々な疾患に対する治療ターゲットとしてふさわしいという結果が得られていることから、今後 *in vivo* 実験に応用し進めていくという。治療対象には、虚血性疾患、さらに低酸素誘導因子の関与が強いと報じられている炎症性疾患が含まれる²³。

Kanangi R., Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates (2004) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(21), pp. 8132-8137.

²² 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/23112520.en.html>

²³ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/24590364.en.html>

②社会・経済への波及効果

本研究領域は極めて基礎的な分野であるが、がんと糖鎖構造の関係は従来より研究されており、がんの診断分野においては既に抗体を用いた測定キットが開発されている。一例として各種腺がん患者の血清中で高値を示すとされるシアリル Le^xi 抗原 (SLX) 測定用のキットが市販されている²⁴。神奈木らはこれらの本研究領域での研究成果の臨床的実証や製品化などに向けて取り組んでおり、試薬企業と共同で出願し^{25、26、27、28、29、30}、糖鎖を利用した大腸がん、腺がんの検査、がんの悪性度の診断、アポトーシスの検出等に関する特許が登録された。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文 4 報以内

- [1] Sakuma K., Aoki M., Kannagi R., Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition (2012) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(20), pp. 7776-7781.
- [2] Miyazaki K., Sakuma K., Kawamura Y.I., Izawa M., Ohmori K., Mitsuki M., Yamaji T., Hashimoto Y., Suzuki A., Saito Y., Dohi T., Kannagi R., Colonic epithelial cells express specific ligands for mucosal macrophage immunosuppressive receptors siglec-7 and -9. (2012) J of Immunology, 188(9), pp. 4690-4700.
- [3] Sakuma K., Furuhashi T., Kondo S., Yabe U., Ohmori K., Ito H., Aoki M., Morita A., Kannagi R., Sialic acid cyclization of human Th homing receptor glycan associated with recurrent exacerbations of atopic dermatitis (2012) Journal of Dermatological Science, 68(3), pp. 187-193.
- [4] Tanaka K., Tamiya-Koizumi K., Yamada M., Murate T., Kannagi R., Kyogashima M., Individual profiles of free ceramide species and the constituent ceramide species of sphingomyelin and neutral glycosphingolipid and their alteration according to the sequential changes of environmental oxygen content in human colorectal cancer Caco-2 cells (2014) Glycoconjugate Journal, 31(3), pp. 209-219.

²⁴ S L X 「オーツカ」血清中シアリル Le^x-i 抗原測定用試薬

<https://www.otsuka-elibrary.jp/di/prod/product/file/slx/slxbnotk.pdf>

²⁵ 京ヶ島守、遊佐亜希子、後藤嘉子、神奈木玲児、鈴木喜義、山本浩二、宮浦修一、アポトーシスの検出方法、特開 2009-180673 (2009/8/13 出願)、特許 05467185 (2014/2/7 出願)

²⁶ 神奈木玲児、木村尚子、宮崎敬子、松崎祐二、安田洋祐、2-6 シアリル 6-ースルホ糖鎖に対する抗体、特許 05156887 (2012/12/21 登録)

²⁷ 神奈木玲児、宮崎敬子、京ヶ島守、ケモカイン受容体 CCR10 の発現誘導剤、特許 04528898 (2010/6/18 登録)

²⁸ 上條祐司、原厚、青山俊文、井上晃男、野出孝一、京ヶ島守、神奈木玲児、大平真義、宮崎将太、血栓傾向データ収集方法、特許 05105583 (2012/10/12 登録)

²⁹ 上條祐司、原厚、青山俊文、井上晃男、野出孝一、京ヶ島守、神奈木玲児、大平真義、宮崎将太、心血管系疾患既往区別方法、特許 05105583 (2012/10/12 登録)

³⁰ 神奈木玲児、井澤峯子、村松喬、内村健治、細川秀明、大腸癌及び大腸腺腫の検査方法、特許 03805330 (2006/5/19 登録)

④その他

神奈木は、日本糖質学会の評議員(任期 2013. 7. 1～2015. 6. 30)として活動している³¹。

³¹日本糖質学会 <http://www.jscr.gr.jp/?p=contents&id=24>

3.1.3 感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究（木曾真）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

本研究では、病原体の感染、細菌毒素の侵入や腸内細菌が体内に止まるための足場に関する糖鎖の相互作用を制御することを目的として、化学合成法と酵素合成法により、天然型・非天然型の糖鎖複合体を創製し、感染と共生を制御する糖鎖医薬品を開発することを目指した(図 3-5)³²。

②期間中の研究成果

(i) 化学合成による糖鎖合成技術の構築

O-結合型糖タンパク質のコア構造の効率的再構築技術として、糖供与体のC-1位の脱離基やC-2位の保護基の構造にかかわらず高い α -選択性を示す、Di-*tert*-butylsilylene (DTBS) 効果を応用する α -立体選択的ガラクトシル化/ガラクトサミニル化法を開発した。これにより α -ガラクトシド化を高収率で達成できるようになった^[1]。

(ii) 酵素法による糖鎖合成技術の構築と利用

腸内細菌のビフィズス菌から、ムチン型糖鎖のコア I 構造から Galactosyl β 1,3-N-acetyl-galactosamine を遊離する新規の Endo- α -N-acetylgalactosaminidase を発見し^[2]、糖転移活性を利用して、ムチン型糖鎖を有する機能性糖鎖複合体の酵素合成法を確立した。同様に、糸状菌 *Mucor hiemalis* が生産する Endo- β -N-acetylglucosaminidase の糖転移活性を利用して、シアロ糖鎖をキトサンに多価に付加した生理活性糖鎖複合体を酵素合成した。この複合体はヒトおよびトリインフルエンザウイルスの細胞への高い結合阻害活性を示し、ウイルス感染阻害候補薬と考えられた³³。

(iii) ボツリヌス毒素の神経毒性経路の解明

嫌気性細菌 *Clostridium botulinum* が産生する神経毒素の C 型ボツリヌス毒素は、レクチンや機能未知のタンパク質からなる巨大な複合体構造をとり、経口摂取された後小腸から吸収され、体内循環系を介して末梢の神経細胞に到達する。本研究課題では、この毒素は上皮細胞表面のシ

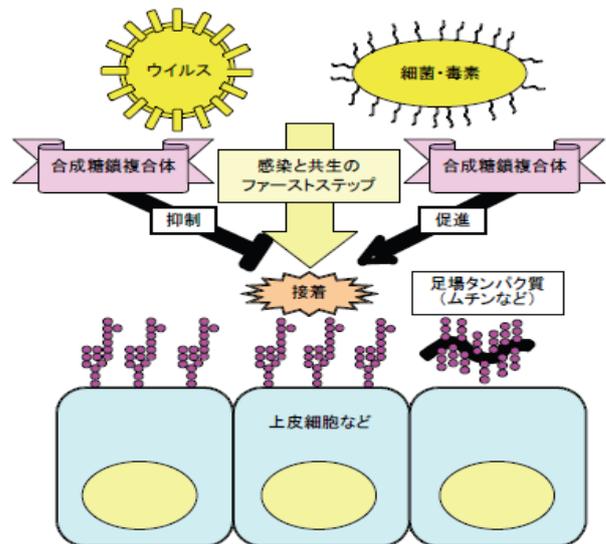


図 3-5 感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究³²

³² 研究終了報告書 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei14/tousa/kiso.pdf

³³ Umekawa M, Huang W, Li B, Fujita K, Ashida H, Wang LX, Yamamoto K., Mutants of *Mucor hiemalis* endo-beta-N-acetylglucosaminidase show enhanced transglycosylation and glycosynthase-like activities (2008) *Journal of Biological Chemistry*, 283, pp. 4469-4479.

アル酸を含む O-結合型糖鎖の強い関与により細胞層バリアーを通過して体内循環系に入った後、神経毒素が分離されて基底膜側へ輸送されることを確認した。またこのトランスサイトosis系路には、毒素複合体の構成成分である HA1 および HA3 タンパク質の複数の特異的な糖認識が関与していることを明らかにした^{32, [3]}。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Imamura A., Kimura A., Ando H., Ishida H., Kiso M., Extended applications of Di-tert-butylsilylene-Directed α -Preedominant galactosylation compatible with C2-Participating groups toward the assembly of various glycosides (2006) Chemistry - A European Journal, 12, pp. 8862-8870.
- [2] Fujita K., Oura F., Nagamine N., Katayama T., Hiratake J., Sakata K., Kumagai H., Yamamoto K., Identification and molecular cloning of a novel glycoside hydrolase family of core 1 type O-glycan-specific endo- α -N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum* (2005) Journal of Biological Chemistry, 280, pp. 37415-37422.
- [3] Nishikawa A., Uotsu N., Arimitsu H., Lee J.-C., Miura Y., Fujinaga Y., Nakada H., Watanabe T., Ohshima T., Sakano Y., Oguma K., The receptor and transporter for internalization of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin into HT-29 cells (2004) Biochemical and Biophysical Research Communications, 319, pp. 327-333.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後も糖鎖複合体の合成技術開発を中心に研究を進め、科学研究費補助金基礎研究(B)「シアロ糖鎖を足場とする新機能分子の創製と革新的利用技術の創出」(2010~2015)において、医学的に意義のある種々の分子の全合成を達成した³⁴。また、科学研究費補助金挑戦的萌芽研究「シアル酸をモチーフにした血液脳関内通過 DDS キャリアの開発」(2010~2013)において、本研究領域で構築した糖鎖合成法を活用して、乳がん特異的な糖鎖をリポソームに結合することにより薬剤送達システム(DDS)を構築した³⁵。

①科学技術の進歩への貢献

本研究領域終了後もシアロ糖鎖・糖脂質ガングリオシドの革新的新規合成法を次々と発明し、シアル酸含有スフィンゴ糖脂質ガングリオシドの実践的な大量合成法を利用して 800 種の人工複合糖質プローブを創出した。得られた多彩な合成分子を用いて、インフルエンザウイルス^{36, 37}、

³⁴ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/22380067.ja.html>

³⁵ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/22658038.ja.html>

³⁶ Childs R. A., Palma A. S., Wharton S., Matrosovich T., Liu Y., Chai W., Campanero-Rhodes M. A., Zhang Y., Eickmann M., Kiso M., Hay A., Matrosovich M., Feizi T., Receptor-binding specificity of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus determined by carbohydrate microarray (2009) Nature Biotechnology, 27, pp. 797-799.

³⁷ Liu Y., Childs R. A., Matrosovich T., Wharton S., Palma A. S., Chai W., Daniels R., Gregory V., Uhlenendorff J., Kiso M., Klenk H.-D., Hay A., Feizi T., Matrosovich M., Altered receptor specificity and cell tropism of D222G hemagglutinin mutants isolated from fatal cases of pandemic A(H1N1) 2009 influenza virus (2010)

ポリオーマウイルス³⁸、マイコプラズマ³⁹、ボツリヌス毒素⁴⁰の感染機構の解明、シアロ糖鎖によるドラッグデリバリーシステム(DDS)の構築、ならびに新規蛍光ガングリオシドプローブの合成⁴¹による細胞膜ガングリオシドの中心的役割の解明等において研究成果を得た。

ガングリオシド合成法の革新については、グルコシルセラミド誘導体を最終のグルコシル化アクセプターとするカセット合成法と新しい修飾シアロ酸連結法を用いた合成法を達成した。この方法により、強力な神経突起伸展活性を有するアオヒトデ由来ガングリオシド LLG-3^[1]及びムラサキヒトデ由来ガングリオシド GAA-7^[2]、自己免疫性神経疾患に関係する新奇ガングリオシドの全合成^[3]に成功した。筋萎縮性側索硬化症(ALS)に類似する自己免疫性神経疾患の原因物質として単離されたガングリオシド X2^[4]の世界初全合成にも成功し、このガングリオシド X2 の Guillain-Barré syndrome (GBS) の診断への利用が検討されている。インフルエンザウイルスの新規ガングリオシド受容体の全合成にも成功しており、各糖鎖の疾患関連性から医薬への応用が検討されている。

また、シアロ糖鎖を足場とするウイルス感染機構の解明の研究も進め、ヒトメルケル細胞がんを惹起するポリオーマウイルス(MCPyV)の感染機構を明らかにするために、MCPyVのキャプシドタンパク質VP1と合成シアロ糖鎖の結合特異性を、糖鎖マイクロアレイ及びX線により解析し、VP1は Neu5Ac- α 2,3-Gal 構造を認識して結合・感染することを明らかにした⁴²。

企業との共同研究では、ドラッグデリバリーシステムのキャリアとなるシアロ糖鎖修飾リポソームを作製し、従来利用されてきた天然ガングリオシドと比較して指向性が高く、大量調整が可能で血管脳関門を通過する DDS キャリアの作製に成功した。現在マウスを用いて得られた糖鎖修飾リポソームの評価を進めている(図3-6)。

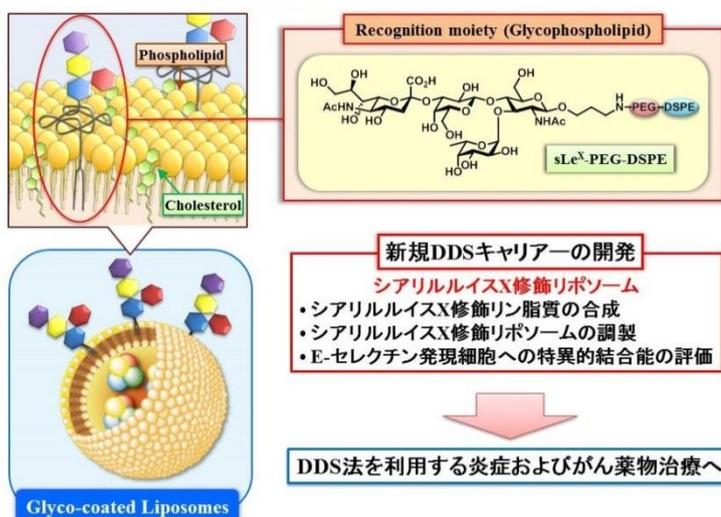


図3-6 シアリルルイス X 修飾リポソームを用いた DDS 法の開発(提供: 岐阜大学、木曾真)

②社会・経済への波及効果

リポソームに指向性に付与する糖鎖を付加した DDS キャリア構築法の研究成果は、乳がん特異的に発現する糖鎖を結合した DDS や血管脳関門を通過する中枢神経系への送達可能な DDS な

Journal of Virology, 84(22), pp. 12069-12074.

³⁸ Neu U., Hengel H., Blaum B.S., Schowalter R.M., Macejak D., Gilbert M., Wakarchuk W.W., Imamura A., Ando H., Kiso M., Arnberg N., Garcea R.L., Peters T., Buck C.B., Stehle T., Structures of merkel cell polyomavirus VP1 complexes define a sialic acid binding site required for infection (2012) PLoS Pathogens, 8(7), e1002738, pp. 8.

³⁹ Kasai T., Nakane D., Ishida H., Ando H., Kiso M., Miyata M., Role of binding in Mycoplasma mobile and Mycoplasma pneumoniae gliding analyzed through inhibition by synthesized sialylated compounds (2013) Journal of Bacteriology, 195(3), pp. 429-435.

⁴⁰ Stenmark P., Dupuy J., Imamura A., Kiso M., Stevens R.C., Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b-insight into the toxin-neuron interaction (2008) PLoS Pathogens, 4(8), e1000129.

⁴¹ Nature Chemical Biology に投稿予定

⁴² 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/22380067.ja.html>

どについて医薬分野での実用化を目指し（図 3-6）、民間企業と岐阜大学との国際共同出願⁴³が国内で登録⁴⁴されている。また、インフルエンザ薬⁴⁵およびノイラミン酸誘導体⁴⁶についても国際特許出願が行われており、今後の応用を目指している。

インフルエンザウイルスの感染機構の研究³⁷では、英国インペリアル・カレッジ・ロンドン医学部糖質科学研究室との共同研究の成果であり、ポリオーマウイルスの感染機構の解明³⁸は、ドイツ、チュービンゲン大学の Interfaculty Institute of Biochemistry 研究チームとの共同研究の成果である。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文 4 報以内

- [1] Tamai H., Ando H., Tanaka H.N., Hosoda-Yabe R., Yabe T., Ishida H., Kiso M., The total synthesis of the neurogenic ganglioside LLG-3 isolated from the starfish *Linckia laevigata* (2011) *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(10), pp. 2330-2333.
- [2] Tamai H., Ando H., Ishida H., Kiso M., First synthesis of a pentasaccharide moiety of ganglioside GAA-7 containing unusually modified sialic acids through the use of N-Troc-sialic acid derivative as a key unit (2012) *Organic Letters*, 14(24), pp. 6342-6345.
- [3] Fujikawa K., Nakashima S., Konishi M., Fuse T., Komura N., Ando T., Ando H., Yuki N., Ishida H., Kiso M., The first total synthesis of ganglioside GalNAc-GD1a, a target molecule for autoantibodies in Guillain-Barré syndrome (2011) *Chemistry*, 17(20), pp. 5641-5651.
- [4] Nakashima S., Ando H., Saito R., Tamai H., Ishida H. and Kiso M., Efficiently synthesizing lacto-ganglio-series gangliosides by using a glucosyl ceramide cassette approach: the total synthesis of ganglioside X2 (2012) *Chemistry - An Asian Journal*, 7, pp. 1041-1051.

④その他

文部科学省「世界トップレベル国際研究拠点形成促進プログラム」において、京都大学の「物質-細胞統合システム拠点」が採択され、岐阜大学は2007年9月に唯一のサテライト設置機関に選定されており、応用生物科学部の木曾真(応用生命科学課程 生理活性物質学分野)は主任研究員として参加している^{47, 48, 49}。

⁴³木曾真、石田秀治、山下泰治、五十嵐貢一、平井政彦、合成糖脂質含有リボソーム、W009/104649 (2011年6月23日公開)

⁴⁴木曾真、石田秀治、山下泰治、五十嵐貢一、平井政彦、合成糖脂質含有リボソーム、特許第05465542号 (2014年1月31日登録)

⁴⁵木曾真、石田秀治、サダゴバン マゲッシュ、鈴木康夫、宮城妙子、ノイラミン酸誘導体、シアリダーゼ活性阻害剤及び抗インフルエンザ薬、PCT/JP2010/073284(2010/12/24 公開)、出願人：国立大学法人岐阜大学、学校法人中部大学

⁴⁶鏑田武志、木曾真、石田秀治、アブドゥ・アラ ハジャジ ハッサン モハメッド、CD22分子に対する高親和性を有しB細胞の増殖を増強する化合物、PCT/JP2010/054406(2010年3月16日)、出願人：国立大学法人岐阜大学、独立行政法人科学技術振興機構

⁴⁷ 岐阜大学世界トップレベル国際研究拠点形成促進プログラム

3.1.4 糖鎖構造の制御によるがん及びウイルス疾患の予防法及び治療法の開発 (小山信人)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

本研究領域は、 α 1,6-フコース転移酵素VIII (FUT8) が形成するコアフコース構造やbisecting GlcNAc等の糖鎖が生命現象に及ぼす影響の分子生物学的、生化学的及びプロテオミクス的手法を用いた分子、細胞、個体レベルでの解明と、糖鎖構造の制御によるがんやウイルス疾患の予防・治療技術及び糖鎖構造に基づく新たな腫瘍マーカーの開発を目指した⁵⁰。

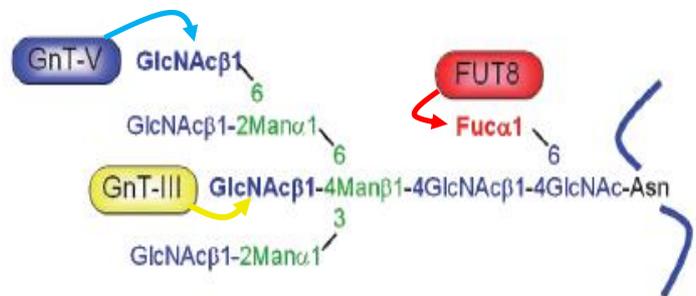


図3-7 FUT8により形成される糖鎖構造⁵⁰

②期間中の研究成果

(i) FUT8 の細胞増殖・分化に及ぼすメカニズム解析

FUT8 のノックアウトマウスの上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)は、 α 1,6 コアフコースが欠損しているため、シグナル伝達に支障をきたし、トリプシンを介したプロテアーゼレセプター2(PAR2)のシグナルが低下し、それが細胞増殖の抑制を引き起こすことを遺伝子発現解析から見出した。さらに、FUT8 をノックダウンしたマウス膵がん細胞の解析により、EGFR-トリプシン-PAR2 シグナル経路が細胞増殖に深く関与していることを解明した明らかにした^{[1], 51}(図 3-8)。

(ii) 新規膵がん腫瘍マーカーの同定

フコースを標的に膵がん患者の血清を分析し、フコシル化ハプトグロビン(Fuc-Hpt)が新規膵がんマーカーになることを明らかにした。更に、Fuc-Hpt測定のためにレクチンを用いたELISA系を開発した^[2]。

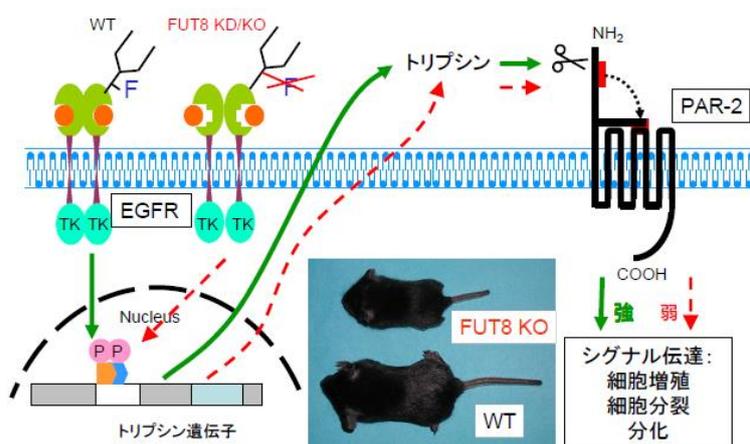


図3-8 FUT8の細胞増殖抑制メカニズム⁵¹

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~lifesci/p1-05.html>

⁴⁸ 岐阜大学生理活性物質学研究室 <http://www1.gifu-u.ac.jp/~kasseil/>

⁴⁹ 京都大学 物質-細胞統合システム拠点 <http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/j/>

⁵⁰ 研究終了報告書 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei14/tousa/koyama.pdf

⁵¹ 平成14年度報告 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/heisei18/pdf/pdf14/14_1/004.pdf

(iii) E4-PHA カラムを用いた肝幹細胞の新規分離法の確立

肝幹細胞様細胞として樹立されたラット肝上皮 (RLE) 細胞の糖鎖をレクチンマイクロアレイ等により糖鎖プロファイリングをしたところ、RLE細胞にはbisecting GlcNAcを含む糖鎖が顕在し、幹細胞及び肝がん細胞株に比べて E4-PHA との反応性が強かったことから E4-PHA カラムを用いた肝幹細胞の新規分離法を確立した^[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Li W., Nakagawa T., Koyama N., Wang X.C., Jin J., Mizuno-Horikawa Y., Gu J., Miyoshi E., Kato I., Honke K., Taniguchi N., Kondo A., Down regulation of trypsinogen expression is associated with growth retardation in α 1,6-fucosyltransferase-deficient mice: attenuation of proteinase-activated receptor 2 activity (2006) *Glycobiology*, 16(10), pp. 1007-1019.
- [2] Narisada M., Kawamoto S., Kuwamoto K., Moriwaki K., Nakagawa T., Matsumoto H., Asahi M., Koyama N., Miyoshi E., Identification of an inducible factor secreted by pancreatic cancer cell lines that stimulates the production of fucosylated haptoglobin in hepatoma cells (2008) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(3), pp. 792-796.
- [3] Sasaki N., Moriwaki K., Uozumi N., Noda K., Taniguchi N., Kameyama A., Narimatsu H., Takeishi S., Yamada M., Koyama N., Miyoshi E., High levels of E(4)-PHA-reactive oligosaccharides: potential as marker for cells with characteristics of hepatic progenitor cells (2009) *Glycoconjugate Journal*, 26(9), pp. 1213-1223.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、Fuc-Hpt を定量するためのレクチン-ELISA キット化が成功し、開発段階へと移行したことを受け、共同研究者である大阪大学大学院医学研究科の三善英知らは、科学研究費補助金新学術領域研究(特定領域研究)「がん患者におけるフコシル化蛋白増加の分子機構の解明」:(2008~2009)で本研究領域の研究を継続してきた。また、2009年10月以降、三善らは、同CREST 本研究領域の木下タロウ研究チームに移り、研究課題「フコシル化の制御とその機能解析」の中で、共同開発プロジェクトとして Validation Study が実施された。その後、文部科学省受託研究・次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム研究テーマ「早期診断マルチバイオマーカー開発」チームの計画班として三善がメンバーに入り(2011-2015年)、研究課題「グリコーム解析によるがんの血中糖鎖バイオマーカーの開発」という内容で研究を行った。その中で、Fuc-Hpt の肝がん、膵がん、大腸がんのバイオマーカーとしての有用性を検討した。

①科学技術の進歩への貢献

フコシル化は、がんで認められる最も重要なオリゴ糖修飾のひとつである。膵がんは最も予後不良ながんの一つであり、その最大の原因は早期発見が困難なことである。本研究領域終了後も、膵がんマーカーとしての実用を目指し、三善らは、膵臓がん診断用に検体中のフコシル化ハプト

グロビン測定用 ELISA の改良を続け ELISA キットを開発した(図 3-9)。

本キットは膵がんだけでなく大腸がんでも Fuc-Hpt と腫瘍マーカー CEA が共に陽性を示した症例では、陰性例に較べて予後不良であることを明らかにした⁵²。さらに、本キットはいくつかの癌のスクリーニング的な診断や治療効果の動向の判定に有用性があることが確認された^{[1], 53}。

長期的に慢性肝疾患を観察した場合、Fuc-Hpt の上昇する症例では、80%に肝がん発症した^[2]。この発がん予測マーカーとしての有用性は、従来の AFP, AFP-L3, PIVKA-II よりも高かった。また、脂肪性肝炎 (NASH) の病理学的な特徴である風船様肝細胞を反映する血中バイオマーカーとして、Fuc-Hpt は有用であることがわかった^[3]。

②社会・経済への波及効果

本研究領域終了後、本研究領域の成果である腫瘍マーカー Fuc-Hpt には、国際特許出願が行われ⁵⁴、多施設の臨床検体を用いた Validation Study が実施された^[1]。更に、三善らは、Fuc-Hpt を定量するためのレクチン-ELISA キットについて総説を発表している⁵⁵。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文 4 報以内

[1] Kamada Y., Kinoshita N., Tsuchiya Y., Kobayashi K., Fujii H., Terao N., Kamihagi K., Koyama N., Yamada S., Daigo Y., Nakamura Y., Taniguchi N., Miyoshi E., Reevaluation of a lectin antibody ELISA kit for measuring fucosylated haptoglobin in various conditions (2013) Clinica Chimica Acta, 417, pp. 48-53.

⁵² Takeda Y1, Shinzaki S, Okudo K, Moriwaki K, Murata K, Miyoshi E., Fucosylated haptoglobin is a novel type of cancer biomarker linked to the prognosis after an operation in colorectal cancer (2012) Cancer, 118, pp. 3036-3043.

⁵³ 木下 憲明, 土屋 陽子, 永井 弘枝, 小林 恭子, 小柳 圭子, 醍醐 弥太郎, 中村 祐輔, 上萩 京子, 大塚 恵, 小山 信人, 三善 英知, 谷口 直之, 膵がん患者におけるフコシル化ハプトグロビン ELISA キットの評価 (2011) 日本分子腫瘍マーカー研究会誌, 26, pp. 88-90

⁵⁴ 近藤昭宏, 李文哲, 中川孝俊, 小山信人, 谷口直之, 加藤郁之進, フコシルトランスフェラーゼの発現を抑制するための組成物, PCT/JP2007/054035 (2007/3/2 出願), W007/100091 (2009/7/23 公開)

⁵⁵ Miyoshi E., Shinzaki S., Moriwaki K., Matsumoto H., Chapter Six - Identification of Fucosylated Haptoglobin as a Novel Tumor Marker for Pancreatic Cancer and Its Possible Application for a Clinical Diagnostic Test (2010) Methods in Enzymology, Volume 478, pp. 153-164.

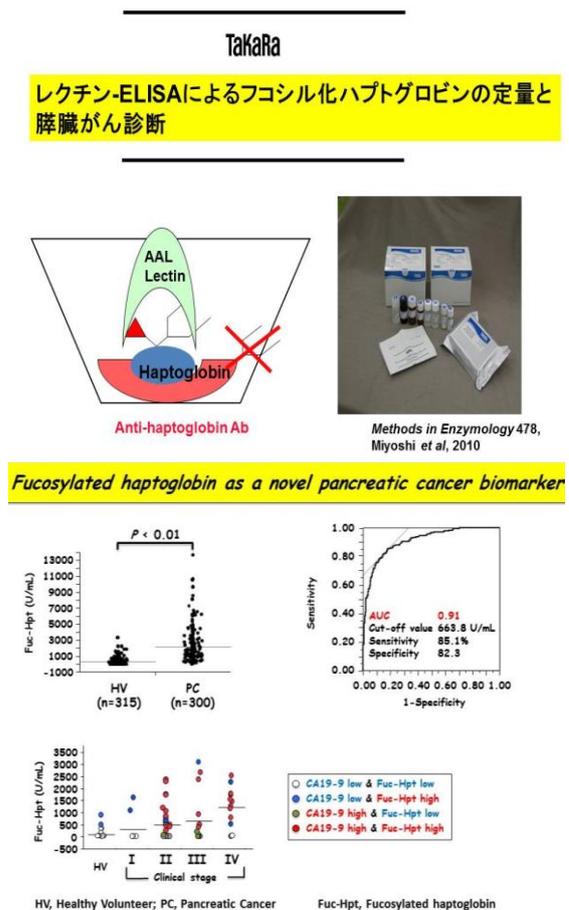


図 3-9 レクチン-ELISA によるフコシル化ハプトグロビンの定量と膵臓がん診断 (提供: タカラバイオ(株)小山信夫、大阪大学三善英知)

- [2] Asazawa H, Kamada Y, Takeda Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kim Y, Nezu R, Kuzushita N, Mita E, Kato M, Miyoshi E. (2014) Serum fucosylated haptoglobin in chronic liver diseases as a potential biomarker of hepatocellular carcinoma development. Clin Chem Lab Med. 2014 Jul 2
- [3] Kamada Y, Akita M, Takeda Y, Yamada S, Fujii H, Sawai Y, Doi Y, Asazawa H, Nakayama K, Mizutani K, Fujii H, Yakushijin T, Miyazaki M, Ezaki H, Hiramatsu N, Yoshida Y, Kiso S, Imai Y, Kawada N, Takehara T, Miyoshi E. (2013) Serum fucosylated haptoglobin as a novel diagnostic biomarker for predicting hepatocyte ballooning and nonalcoholic steatohepatitis. PLOS ONE 8(6), e66328.

④その他

本研究領域の糖鎖シグナルグループ（レクチンによる糖鎖シグナルの解析、肝幹細胞分離法の開発と応用の検討、新規腫瘍マーカーの開発）の大阪大学大学院医学系研究科の三善英知は、科学研究費助成事業（基盤研究(A)）「糖鎖関連分子を標的にした生活習慣病予防マーカーの開発」（2009～2013年度）により、本研究領域の研究を継続し、Fuc-Hpt を定量するためのレクチン-ELISA キットについては、健診受診者などの軽度な異常を発見するだけの感度を得られないなどの課題が見つかってきている。また、1800 人の健診受診者の検査情報と血清の保存を続けるとともに、新しい生活習慣病の予防マーカー開発の基礎的検討と血清を用いた大規模 study を行ない、脂肪肝のうち 10%程度肝硬変に進行する NASH(Non-alcoholic steatohepatitis)を鑑別可能な糖鎖関連マーカーの開発に成功すると共に、Fuc-Hpt が NASH 患者の病理学的な異常と関連している新たな知見も得ている⁵⁶。2012 年には、平成 23 年度「次世代がん研究戦略推進プロジェクト」がん臨床シーズ育成グループの早期診断マルチバイオマーカー開発研究領域チームの一人に選ばれた⁵⁷。

Fuc-Hpt を定量するためのレクチン-ELISA キットの開発については、三善らを中心に J-オイルミルズ研究所と共に、フコースを選択的に認識する新たなレクチンを用いて、更なる感度を上げる検討が続けられている⁵⁸。

⁵⁶ 文部科学省科学研究費助成金ホームページ <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/21249038/2012/3/ja.ja.html>

⁵⁷ 平成 23 年度「次世代がん研究戦略推進プロジェクト」p-direct.mext.go.jp/pressrelease_h240126.pdf

⁵⁸ 東 加奈子, 下村 真由香, 中山 小太郎純友, 高松 真二, 鎌田 佳宏, 小林 夕香, 村田 幸平, 高橋 志郎, 中堅 三弥子, 三善 英知, 新しいレクチン PhoSL を使ったフコシル化ハプトグロビン測定についての検討(2014)日本分子腫瘍マーカー研究会誌, 29, pp. 58-59

3.1.5 ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用（鈴木康夫）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

インフルエンザウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、HIV、熱帯熱性ウイルス(デングウイルス)、幼児・高齢者に感受性の高いウイルス(パラインフルエンザウイルス、インフルエンザウイルス)など有効な治療法が早急に解決されなければならないウイルス感染における機能的グライコミクスを推進し、これによる創薬への応用を目指した⁵⁹。

②期間中の研究成果

(i) インフルエンザウイルス感染におけるノイラミニダーゼ(NA)の役割に関する研究

鳥インフルエンザウイルスや世界大流行を起こしたインフルエンザウイルス株のNAは、感染初期にウイルスが侵入する細胞内エンドソーム内の酸性pHに対して安定であり、この性質がウイルスの宿主細胞内増殖性、病原性発現に必須であることがわかり、NA機能の新たな発見と同時に、NAによるパンデミック新型インフルエンザ発生の事前監視が可能であることを示した^[1]。

(ii) インフルエンザウイルス感染におけるヘマグルチニン(HA)の役割に関する研究

高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)がヒト気道シアロ糖鎖受容体に感染する際に必須なウイルスHAスパイク分子内の糖結合に関連するアミノ酸部位の同定に成功し、H5N1ウイルスの変異により生じるトリ型からヒト型へのパンデミック新型ウイルスの発生は、HA分子内の182番目もしくは192番目のアミノ酸残基の変異を指標とすることで監視可能であることを明らかにした^[2]。

(iii) インフルエンザウイルス感染におけるスルファチドの役割に関する研究と創薬への応用

細胞膜に存在する硫酸化スフィンゴ糖脂質であるスルファチドは、インフルエンザウイルス感染において細胞内で合成されるHAと結合し、ウイルスの宿主細胞内での増殖を促進していることを見出し、ウイルスヌクレオプロテインの核外輸送を高めることを明らかにした。スルファチド合成阻害剤やスルファチドとウイルスHAとの結合を阻害する分子は抗インフルエンザ薬開発の新標的になることを示した^[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3報以内

[1] Suzuki T., Takahashi T., Guo C. T., Hidari K. I., Miyamoto D., Goto H., Kawaoka Y., Suzuki Y., Sialidase activity of influenza A virus in an endocytic pathway enhances viral replication (2005) *Journal of Virology*, 79(18), pp. 11705-11715.

[2] Yamada S., Suzuki Y., Suzuki T., Le M. Q., Nidom C. A., Tagawa-Sakai Y., Muramoto Y.,

⁵⁹ 研究終了報告書 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei14/tousa/suzuki.pdf

Ito M., Kiso M., Horimoto T., Shinya K., Sawada T., Kiso M., Lin Y., Hay A., Haire L.F., Stevens D.J., Russel R.J., Gambin S.J., Skehel J.J., Kawaoka Y., Hemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors (2006) Nature, 444, pp. 378-382.

[3] Takahashi T., Murakami K., Nakagawa M., Kishita H., Watanabe S., Honke K., Ogura K., Tai T., Kawasaki K., Miyamoto D., Hidari K. I., Guo C.-T., Suzuki Y., Suzuki T., Sulfatide regulates influenza A virus replication by association with hemagglutinin delivered to the cell surface (2008) Journal of Virology, 82(12), pp. 5940-5950.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、科学研究費補助金基盤研究(B)「高病原性トリインフルエンザウイルスの新型ヒトウイルスヘマグルチニンの変異機構の解明と創薬」(2008～2011)⁶⁰及び科学研究費補助金挑戦的萌芽研究「ヒトへの感染力の強い高病原性鳥インフルエンザウイルスの監視デバイスの開発」(2013～2015)⁶¹では、本研究領域の成果をもとに当時社会的に大きな問題となった鳥インフルエンザの研究を継続した。また、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「生活環境因子誘発疾患の予知・予防に関する戦略的研究」(2008年度～2012年度)⁶²では、新設のヘルスサイエンスヒルズを拠点として、本研究領域のウイルス感染分野に加えて、がんやメタボリックシンドロームなどの生体内因子と外環境因子の双方が複雑に絡み合って発症する現代病の予知・予防および制御を可能とする国際研究拠点形成を目指した。これらの研究から、「糖鎖、ウイルス、創薬」を鍵語にした本研究領域の成果を、学術的、実用的、糖鎖創薬の面に展開し、糖鎖ウイルス学という新研究分野の開拓と育成を達成して鳥インフルエンザのヒトへの適応性獲得機構研究の飛躍的進展、糖鎖-抗ウイルス創薬の新潮流を創出した⁶³(図 3-10)。

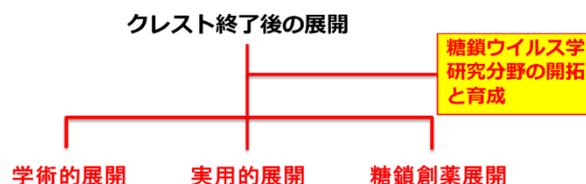


図 3-10 本研究領域終了後の展開

(提供：中部大学 鈴木康夫)

① 科学技術の進歩への貢献

高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1 亜型)HA(H5)がヒトパンデミックを起こす分子変異機構についての研究を進め、高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1 亜型)HA(H5)スパイクの複数のアミノ酸置換がヒト型レセプター(Neu5Ac α 2, 6Gal)結合特異性を増加させることを見だし、それらのアミノ酸を同定した。さらにヒトへの伝播、死亡例が蓄積している変異ウイルス(H5HA/H1N1)を実験的に遺伝子交雑させ、高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの“飛沫”感染成立は、宿主細胞シアロ糖鎖レセプターへの結合に必須であるウイルス HA 糖タンパク質スパイク分子内のわずか 4 つのアミノ酸置換変異(糖鎖付加部位を含むアミノ酸を同定)によることを、分子・動物レベルで先駆的に実証した。これにより、鳥インフルエンザのヒトパンデミック発生

⁶⁰ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/20390028>

⁶¹ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/25670219.ja.html>

⁶² 中部大学ヘルスサイエンスヒルズ <http://www.isc.chubu.ac.jp/hsh/index.html>

⁶³ 中部大学ヘルスサイエンスヒルズ平成 20 年度成果報告 http://www.isc.chubu.ac.jp/hsh/report_suzuki.html

の分子機構が明らかとなり^[1]、防疫体制確立が可能となった⁶⁴(図 3-11)。

実用面での研究開発では、鳥インフルエンザウイルスのヒトへの適応性変異を高感度、迅速、軽量、安価に監視するデバイスを開発した。免疫クロマトおよび PCR を原理とする鳥インフルエンザウイルスのヒト型レセプターシアロ糖鎖への結合性獲得変異を迅速(15 分以内)、軽量(5 グラム以下)、安価(高額な器機を使用せず目視による測定、開発途上国でも使用可能)、高感度に監視できるデバイスを初めて開発した(図 3-12)。これにより、これまで不可能であった、鳥→ヒトへのウイルス伝播変異のグローバルな監視が可能となった^[2]。このデバイスは、アジア各地で分離された高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)のヒト型への変異の兆候の簡便かつ高感度な事前感知、ヒト→ヒト感染によるパンデミック発生の兆候を示すアジア地域の早期特定実現も視野に入れられている^{64, [3]}。

また、糖鎖創薬への展開では、これまで皆無であったヒトインフルエンザウイルスの宿主細胞への吸着、増殖、細胞からの出芽を阻害する新規合成又は天然分子を 15 以上明らかにし⁶⁵、全てのヒトインフルエンザ A、B 型いずれにも有効な新しいコンセプトによるインフルエンザウイルスノイラミニダーゼ阻害分子(2,3 difluoro-5-*N*-acetylneuraminic acid)を開発し、新型パンデミック高病原体インフルエンザにも適応出来る新しい抗インフルエンザ薬開発の基盤を確立した^[4]。

②社会・経済への波及効果

本研究領域において構築した、高病原性鳥インフルエンザウイルスとヒト型に変異したインフルエンザウイルスの受容体認識特異性を分別して測定するデバイスを用いた簡易監視システムは国際特許出願^{66, 67}を行い、国内特許登録を得た。タイ、インドネシア、中国などの国家機関、大

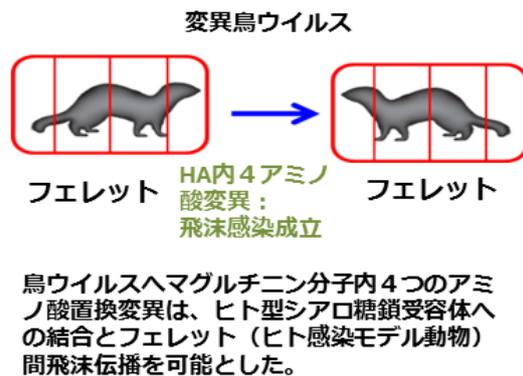


図 3-11 本研究領域終了後の展開

(提供：中部大学 鈴木康夫)

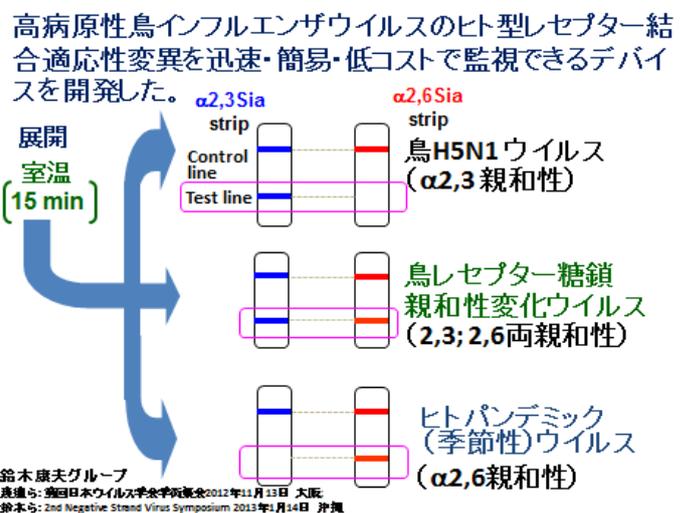


図 3-12 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト型レセプター結合適応性変異監視デバイス⁶⁴

⁶⁴ 中部大学ヘルスサイエンスヒルズ平成 24 年度成果報告

http://www.isc.chubu.ac.jp/hsh/h24_report/highlight.html

⁶⁵ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/r/00046278.ja.html>

⁶⁶ 鈴木康夫; 浅井章良; 鈴木隆; 左一八; 村田健臣; 碓氷泰市; 武田聡; 山田浩平; 野口利忠、ウイルスレセプター糖鎖認識特異性の判別方法、W007/026669 (2009/3/5 公開)、特許第 05130598 号 (2012/11/16 登録)

⁶⁷ Suzuki Y, Asai A, Suzuki T, Hidari K, Murata T, Usui T, Takeda S, Yamada K, Noguchi T, Method for determination of recognition specificity of virus for receptor sugar chain, US Patent Application: Pub.No. US2009/0181362A1 (優先日 2005/9/2)

学と共同研究体制を構築し、当該監視システムの応用研究へと波及している。また、インフルエンザウイルスの宿主レセプター（シアロ糖鎖）への結合（感染初期）およびウイルスの感染細胞からの出芽（感染後期）の両過程を阻害するシアロ糖鎖分子は、それぞれ企業との共同で特許出願⁶⁸、⁶⁹、⁷⁰、⁷¹を行い、実用化が進められている。

また、本研究成果は、新聞報道（2009年4月3日読売新聞、2009年5月28日読売新聞、2010年12月3日中日新聞など）も行われている。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文4報以内

- [1] Imai M., Watanabe T., Hatta M., Das S.C., Ozawa M., Shinya K., Zhong G., Hanson A., Katsura H., Watanabe S., Li C., Kawakami E., Yamada S., Kiso M., Suzuki Y., Maher E.A., Neumann G., Kawaoka Y., Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets (2012) *Nature*, 486(7403), 420-428.

- [2] Takahashi T., Kawakami T., Mizuno T., Minami A., Uchida Y., Saito T., Matsui S., Ogata M., Usui T., Sriwilaijaroen N., Hiramatsu H., Suzuki Y., Suzuki T., Sensitive and direct detection of receptor binding specificity of highly pathogenic avian influenza A virus in clinical samples (2013) *PLoS One*, 8(10), e78125.

- [3] Wang G., Deng G., Shi J., Luo W., Zhang G., Zhang Q., Liu L., Jiang Y., Li C., Sriwilaijaroen N., Hiramatsu H., Suzuki Y., Kawaoka Y., Chen H., H6 influenza viruses pose a potential threat to human health. (2014) *Journal of Virology*, 88(8), pp. 3953-3964.

- [4] Vavricka C.J., Liu Y., Kiyota H., Sriwilaijaroen N., Qi J., Tanaka K., Wu Y., Li Q., Li Y., Yan J., Suzuki Y., Gao G.F., Influenza neuraminidase operates via a nucleophilic mechanism and can be targeted by covalent inhibitors (2013) *Nature Communications*, 4, pp. 1491.

⁶⁸ 木曾真、石田秀治、サダゴバン マゲッシュ、鈴木康夫、宮城妙子、ノイラミン酸誘導体、シアリダーゼ活性阻害剤及び抗インフルエンザ薬、特願 2009-298788(2009/12/28 出願)、特開 2011-136964(2011/7/14)、出願人：国立大学法人岐阜大学、学校法人中部大学

⁶⁹ 福本修一、熊谷賢治、鈴木康夫、スリウィライジャロエン ノングラック、抗鳥インフルエンザウイルス剤及び抗鳥インフルエンザウイルス剤含有製品、特願 2010-532949(2009/10/8 出願)、W010/041702(2012/3/8 公開)、特許第 05558360 号(2014/6/13 登録)

⁷⁰ 我藤伸樹、門脇昭夫、大西由里子、鈴木康夫、抗インフルエンザウイルス剤、特願 2010-181646(2010/8/16 出願)、特許第 05525376 号(2014/4/18 登録)

⁷¹ 鈴木康夫、蟹江治、抗インフルエンザウイルス剤、特願 2013-65700(2013/3/27 出願)、特開 2013-227296(2013/11/7 公開)

3.1.6 RNAi 法による糖鎖機能解明と利用技術の開発 (西原祥子)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

糖鎖の種を越えて保存されている機能に着目して、ショウジョウバエをモデルとした網羅的解析システムから、糖鎖の基本機能の全体像を解明する方法論と技術を開発し、個体レベルでの糖鎖機能の解明を目指した⁷²。

②期間中の研究成果

(i) 網羅的解析の過程で見出された注目すべき遺伝子：O-マンノース転移酵素 (POMT: protein O-mannosyltransferase)

先天性筋ジストロフィーの原因の一つとして報告されているO-Man型糖鎖構造の異常について、2種のショウジョウバエO-マンノース転移酵素、dPOMT1とdPOMT2を新規に同定し、RNAiノックダウン体と変異体を用いた解析により、dPOMT1、dPOMT2はヘテロ重合体を形成し、筋発生に関与していることを明らかにした^{72, 73, [2]} (図3-13)。

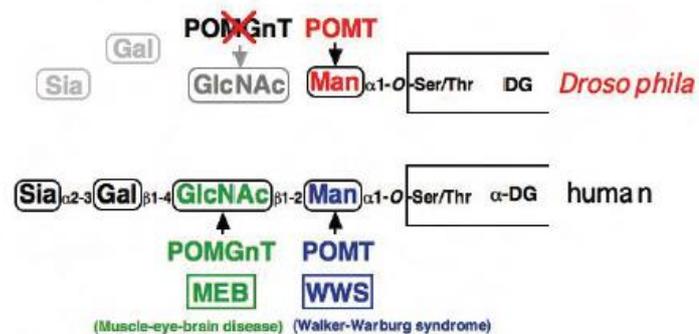


図 3-13 ショウジョウバエとヒトの O-Man 型糖鎖モデル⁷²

(ii) 網羅的解析の過程で見出された注目すべき遺伝子：糖ヌクレオチド輸送体群

糖ヌクレオチド輸送体は、糖ヌクレオチドをゴルジ体や小胞体内腔に輸送し、糖転移酵素のドナー基質を供給している。2 種の新規ショウジョウバエ PAPS (3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホ硫酸) 輸送体遺伝子、dPAPST1 (slalom) と dPAPST2 を同定し、生化学的解析、及び RNAi 変異体を用いた解析から、dPAPST1 と dPAPST2 はゴルジ体内腔に PAPS を輸送することにより、プロテオグリカンの硫酸化に必要な基質を供給し、形態形成に関与していることを明らかにした^{72, [2]}。

(iii) 哺乳類への応用：注目する遺伝子のマウス胚性幹 (ES) 細胞における解析

ヘパラン硫酸の伸長に関わる EXT1 遺伝子を RNAi 法でノックダウンすることにより、ヘパラン硫酸が、マウス ES 細胞の増殖、未分化性・多能性維持、神経系への分化制御に必須な因子であることを明らかにした^{72, [3]}。

⁷² 研究終了報告書 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei14/tousa/nishihara.pdf

⁷³ Kamiyama S., Suda T., Ueda R., Suzuki M., Okubo R., Kikuchi N., Chiba Y., Goto S., Toyoda H., Saigo K., Watanabe M., Narimatsu H., Jigami Y., Nishihara S., Molecular cloning and identification of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter (2003) Journal of Biological Chemistry, 278, pp. 25958-63.

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Ichimiya T., Manya H., Ohmae Y., Yoshida H., Takahashi K., Ueda R., Endo T., Nishihara S., The twisted abdomen phenotype of *Drosophila* POMT1 and POMT2 mutants coincides with their heterophilic protein O-mannosyltransferase activity (2004) *Journal of Biological Chemistry*, 279, pp. 42638-47.
- [2] Goda E., Kamiyama S., Uno T., Yoshida H., Ueyama M., Kinoshita-Toyoda A., Toyoda H., Ueda R., Nishihara S., Identification and characterization of a novel *Drosophila* 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter (2006) *Journal of Biological Chemistry*, 281, pp. 28508-17.
- [3] Sasaki N., Okishio K., Ui-Tei K., Saigo K., Kinoshita-Toyoda A., Toyoda H., Nishimura T., Suda Y., Hayasaka M., Hanaoka K., Hitoshi S., Ikenaka K., Nishihara S., Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells (2008) *Journal of Biological Chemistry*, 283, pp. 3594-3606.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、科学研究費補助金基盤研究(B)「硫酸化修飾の PAPS 輸送体制御による統合的機能解析」(2008~2010)⁷⁴、科学研究費補助金新学術領域研究(研究領域提案型)「神経近位部特異的に局在する糖鎖の構造と軸索区画化における機能の解明」(2012~2014)⁷⁵、科学研究費補助金挑戦的萌芽研究「造血幹細胞の維持と分化を制御する糖鎖関連遺伝子の網羅的探索と解析」(2012~2014)⁷⁶、科学研究費補助金新学術領域研究(研究領域提案型)「ES/iPS 細胞の分化におけるプラズマ照射効果とその分子生物学的機構の解明」(2013~2015)⁷⁷において研究を進めている^{78、79}。

① 科学技術の進歩への貢献

本研究領域終了後、糖鎖やタンパク質の硫酸化に必須な PAPS 輸送体のノックダウン ES 細胞とノックアウトマウスを用いて、硫酸化修飾を受けた糖鎖が Wnt⁸⁰、BMP⁸⁰、FGF⁸⁰、LIF、Fas^[2] シグナルを制御して ES 細胞の未分化性・多能性の維持や分化方向の決定⁸⁰、初期胚における細胞運命の決定に働いていること⁸¹、また、PAPS 輸送体の機能低下が様々な疾病を引き起こすことを明らか

⁷⁴ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/20370051.ja.html>

⁷⁵ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/24110515.ja.html>

⁷⁶ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/24659468.ja.html>

⁷⁷ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/25108514.ja.html>

⁷⁸ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/r/00164575>

⁷⁹ 創価大学工学部大学院工学研究科 <http://www.t.soka.ac.jp/index.php?id=379>

⁸⁰ Sasaki N., Hirano T., Ichimiya T., Wakao M., Hirano K., Kinoshita-Toyoda A., Toyoda H., Suda Y., Nishihara S., The 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters, PAPST1 and 2, contribute to the maintenance and differentiation of mouse embryonic stem cells (2009) *PLoS One*, 4(12), e8262.

⁸¹ Dejima K., Murata D., Mizuguchi S., Nomura K., Izumikawa T., Kitagawa H., Gengyo-Ando K., Yoshina S., Ichimiya T., Nishihara S., Mitani S., Nomura K., Two golgi-resident 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters play distinct roles in heparan sulfate modifications and embryonic and larval development in *Caenorhabditis elegans* (2010) *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), pp. 24717-24728.

にした⁸²。

幹細胞関連研究では、ショウジョウバエ造血幹細胞において、造血幹細胞特異的にグリコサミノグリカン、N-結合糖鎖を合成する糖転移酵素を個々にノックダウンしたモデルの造血幹細胞の増減を測定し、造血幹細胞が減少し、造血幹細胞の維持に関与すると考えられる糖転移酵素、また、造血幹細胞が増加し、造血幹細胞の分化に関与すると考えられる糖転移酵素を複数発見した⁸³。

また、マウス ES 細胞のナイーブ状態の維持に LacdiNAc 糖鎖構造が必須なこと^[1]、マウス ES 細胞をナイーブ状態からプライム状態への遷移において、ヘパラン硫酸 3-O 硫酸化構造を介した Fas シグナルが必要であることを見いだした^[3] (図 3-14)。

以上のように、ES/iPS 細胞などの幹細胞における糖鎖の役割を研究する幹細胞糖鎖生物学の新規分野を創出した。

一方、疾患との関連では、筋ジストロフィーのモデルとなるショウジョウバエをさらに解析する事により、発生過程で筋芽細胞のアポトーシスが亢進しており、これが筋ジストロフィーの新たな病因となる可能性を示した。

さらに、大腸がん細胞及び大腸がん組織における PAPS 輸送体の発現解析、免疫組織学染色により PAPST1 の強い発現を明らかにした。さらに、siRNA による PAPST1 ノックダウン細胞では硫酸化構造が減少した。これらの結果から PAPS 輸送体、特に PAPST1 が硫酸化制御、大腸がん細胞の増殖に関与している可能性が示された^[4]。

②社会・経済への波及効果

本研究領域で解明した糖鎖とシグナルの関係に基づいて、通常の半分以下の短期神経細胞分化系を確立し、「神経細胞の製造方法及び神経細胞分化促進剤」として特許を出願した⁸⁴。その他、分化制御・抑制に関する特許出願が 4 件、活性硫酸輸送因子の発現を抑制又は欠失させた細胞又は動物に関する特許出願が 1 件ある。

また、本研究領域及び私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「モデル生物による in vivo 糖鎖生物学 - ES 細胞から病態モデルへ -」(2009-2014) の成果であるショウジョウバエ筋ジストロフィーモデル⁸⁵については、海外ベンチャーから問い合わせがきている。

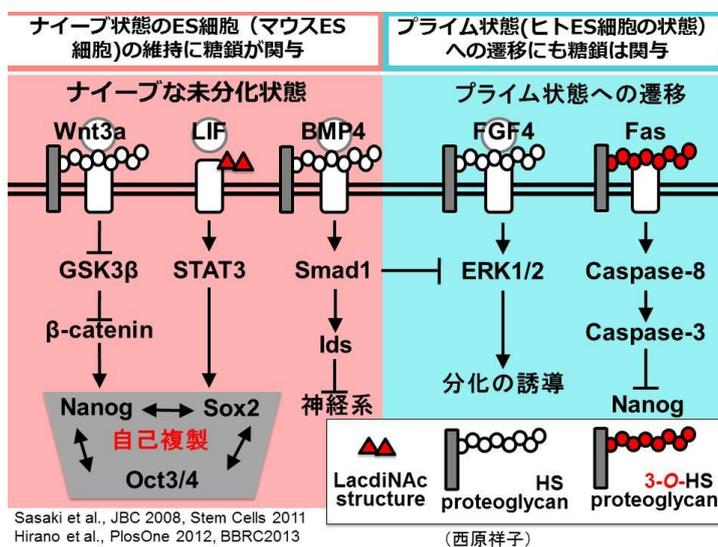


図 3-14 ES 細胞のナイーブ状態からプライム状態への遷移 (提供：創価大学、西原祥子)

⁸² 科学研究費補助金研究成果報告 <https://kaken.nii.ac.jp/pdf/2010/seika/jsps/32690/20370051seika.pdf>

⁸³ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/24659468/2012/11/ja.ja.html>

⁸⁴ 西原祥子、佐々木紀彦、神経細胞の製造方法及び神経細胞分化促進剤、特願 2010-223472 (2010/10/1 出願)、特開 2012-75380 (2012/4/19 公開)、出願人：学校法人創価大学

⁸⁵ Ueyama M., Akimoto Y., Ichimiya T., Ueda R., Kawakami H., Aigaki T., Nishihara S., Increased apoptosis of myoblasts in Drosophila model for the Walker-Warburg syndrome (2010) PLoS One, 5(7), e11557.

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文 4 報以内

- [1] Sasaki N., Shinomi M., Hirano K., Ui-Tei K., Nishihara S., LacdiNAc (GalNAc β 1-4GlcNAc) contributes to self-renewal of mouse embryonic stem cells by regulating LIF/STAT3 signaling (2011) *Stem Cells*, 29, pp. 641-650.
- [2] Hirano K., Sasaki N., Ichimiya T., Miura T., Van Kuppevelt T.H., Nishihara S., 3-O-sulfated heparan sulfate recognized by the antibody HS4C3 contribute to the differentiation of mouse embryonic stem cells via Fas signaling (2012) *PLoS One*, 7(8), pp. e43440.
- [3] Hirano K., Van Kuppevelt T.H., Nishihara S., The transition of mouse pluripotent stem cells from the naïve to the primed state requires Fas signaling through 3-O sulfated heparan sulfate structures recognized by the HS4C3 antibody. (2013) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430, pp. 1175-1181.
- [4] Kamiyama S., Ichimiya T., Ikehara Y., Takase T., Fujimoto I., Suda T., Nakamori S., Nakamura M., Nakayama F., Irimura T., Nakanishi H., Watanabe M., Narimatsu H., Nishihara S., Expression and the role of 3' -phosphoadenosine 5' -phosphosulfate transporters in human colorectal carcinoma (2011) *Glycobiology*, 21(2), pp. 235-246.

④その他

西原祥子は、日本糖質学会理事(2007年8月-現在)、日本学会議連携会員(2008年10月-現在)、日本再生医療学会理事(2013年3月-現在)を務め、日本糖鎖科学コンソーシアム常任理事副会長(2013年1月-2014年12月)を務めた。

3.2 2003 年度採択課題

3.2.1 糖鎖機能を利用した組換えリソソーム酵素の脳内補充療法の開発（伊藤孝司）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

中枢神経障害を伴うリソソーム病の代表例で、 β -Hexosaminidase A(HexA、 $\alpha\beta$ heterodimer)の欠損により、脳内 GM2 ガングリオシドの過剰蓄積を伴って発症する Tay-Sachs 病(Hex α 鎖欠損症)及び Sandhoff 病(Hex β 鎖欠損症)を対象疾患として、酵素製剤の安定供給、血液脳関門による中枢神経症状への有効性の欠如、継続投与による中和抗体の産生等の問題点を克服・改善したヒト型糖鎖含有組換えリソソーム酵素を用いた「糖鎖機能を利用した脳内酵素補充療法の開発」を目指した⁸⁶。

②期間中の研究成果

(i)メタノール資化酵母株を用いたヒト組換え糖鎖含有リソソーム酵素による欠損酵素活性回復能と蓄積 GM2 分解能の評価

メタノール資化酵母 M6PHexA を Tay-Sachs 病(TS)及び Sandhoff 病(SD)患者由来皮膚繊維芽細胞及び Sandhoff 病モデルマウスシュワン細胞の培養液に添加したところ、野生型よりも優れた欠損酵素活性回復能と蓄積 GM2 の分解能を示し、酵素補充療法の酵素剤として利用できる可能性を示した⁸⁶、^[1](図 3-15)。

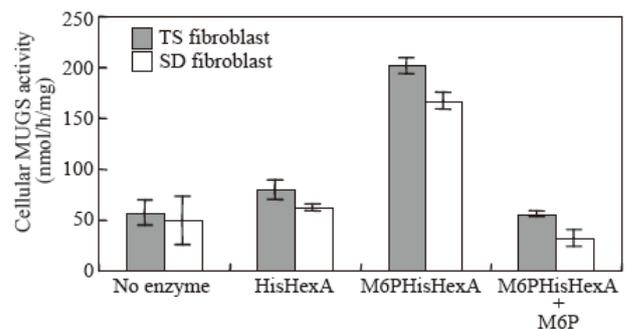


図3-15 TS、SD患者由来皮膚繊維芽細胞へのM6PHisHexA取り込み効果⁸⁶

(ii) Sandhoff 疾患モデルマウス(SD マウス)由来株化ミクログリアの樹立と活性化機構の解析

SD マウスの脳内補充療法を目指し、SD マウス脳由来の株化ミクログリアを樹立し、その性状を解析した(図 3-16)。SD ミクログリアでは GM2、GA2 および末端 GlcNAc 含有オリゴ糖が細胞内に過剰蓄積し、Macrophage inflammatory factor-1(MIP-1 α)の産生・分泌が充進していることを明らかにした。更に、Phospholipase C(PLC)、Protein kinase C(PKC)および B(PKB or Akt)を介したシグナリングが関与し、

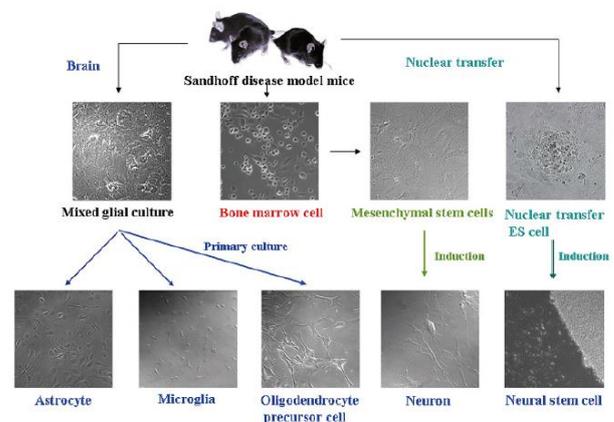


図3-16 SDマウス由来神経系構成細胞の樹立及び誘導⁸⁶

⁸⁶ 研究終了報告書 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei15/tousa/itou.pdf

MIP-1 α 遺伝子の転写及びタンパク質の分泌制御に異常があることを明らかにした^[2]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Akeboshi H., Kasahara Y., Tsuji D., Itoh K., Chiba Y., Jigami Y., Production of human β -hexosaminidase A with highly phosphorylated N-glycans by the overexpression of *Ogataea minuta* MNN4 gene (2009) *Glycobiology*, 19, pp. 1002-1009.
- [2] Kawashita E., Tsuji D., Kawashima N., Nakayama K.-i., Matsuno H., Itoh K., Abnormal production of macrophage inflammatory protein-1 α by microglial cell lines derived from neonatal brains of Sandhoff disease model mice (2009) *Journal of Neurochemistry*, 109, pp. 1215-1224.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

科学研究費補助金挑戦的萌芽研究「新規リソソーム指向性トラフィック制御化合物の探索と治療開発への応用」(2012~2014)⁸⁷、科学研究費補助金新学術領域研究(研究領域提案型)「神経変性を伴うリソソーム蓄積症におけるシナプス病態の解明と治療への応用」(2013~2015)⁸⁸、科学研究費補助金挑戦的萌芽研究「中枢神経症状を伴うリソソーム病患者由来 iN 細胞の誘導と神経変性制御機構の解明」(2014~2016)⁸⁹、科学研究費補助金基盤研究(B)「ネオグライコバイオロジクスの創製とリソソーム病治療薬開発への応用」(2014~2017)⁹⁰で、中枢神経障害を伴う常染色体劣性遺伝病のリソソーム病に着目し、Sandhoff 病疾患モデルマウス(SD マウス:Hexb^{-/-})の細胞治療及び *ex vivo* 遺伝子治療用のドナー細胞の開発を目的とした研究が展開されている。また、同研究室の辻らは、若手研究(B)「リソソーム病における造血系細胞の脳内浸潤機構の解明と治療への応用」(2010~2012)にて、血中コルチコステロンと GM2 ガングリオシドの胸腺萎縮の相関性を見出し、Sandhoff 病のバイオマーカーの可能性を示唆した^[1]。そこで、実際に Tay-Sachs 病及び Sandhoff 病の患者から血液を採取し、MALDI-TOF-MS にて GM2 ガングリオシドを測定し、疾患モデルマウスとの血中及び脳内 GM2 ガングリオシド濃度との相関性が得られた^[3]。

① 科学技術の進歩への貢献

本研究領域終了後、リソソーム内で複合体を構成するヒト・カテプシン A(CathA)とノイラミニダーゼ 1(NEU1)の遺伝的欠損症(リソソーム病)に対し、両者の相互作用部位をターゲットとした新規治療薬を開発する目的で、活性型 CathA を大量発現するトラスジェニック(Tg)カイコの中中部絹糸腺から精製した成熟型 CathA を ESI-MS/MS 解析によりヒトと類似した N 型糖鎖を 2 本もつことを明らかにした。CathA は、欠損症患者由来皮膚線維芽細胞に対して補充効果(有効性)が示され、Tg カイコ由来 CathA は、同欠損症に対する低抗原性酵素補充療法として応用可能であること

⁸⁷ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/24659262.ja.html>

⁸⁸ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/25110722.ja.html>

⁸⁹ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/26670269.ja.html>

⁹⁰ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/26293120.ja.html>

が判明した⁹¹(図 3-17)。一方、Tay-Sachs 病患者皮膚線維芽細胞に対し、センダイウイルスベクターを用いて 4 種の山中ファクター(初期化遺伝子)を導入し、未分化性と多分化能をもつ iPS 細胞の樹立と同 iPS 細胞から神経前駆細胞及び神経幹細胞を分化誘導する培養条件を確立し、患者由来神経系細胞の病態と当該リソソーム酵素のトラフィック異常を解析するための新規システムを構築した。更に、酸性 pH 活性化蛍光プローブと組換え Hex とのコンジュゲートを、細胞外から投与した際に、細胞内の酸性コンパートメントへのデリバリーのイメージングシステムを構築したことで、これまで課題であった組換え Hex の脳内移行解析を確立させた⁹²。

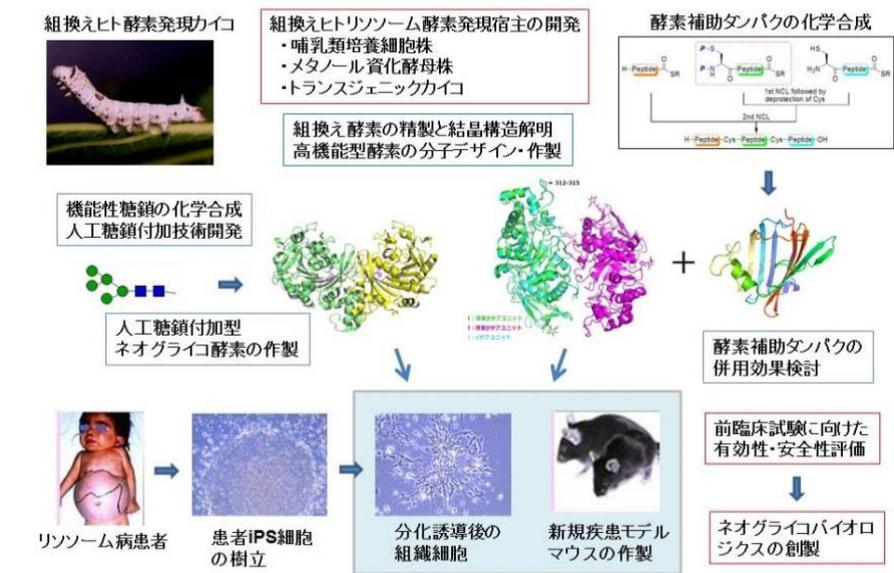


図 3-17 ネオグライコバイオリジクス創製に向けた研究展開 - 希少疾患(リソソーム病)に対する大学発革新的治療薬の開発 (提供: 徳島大学 伊藤孝司)

さらに、異種宿主由来組み換えヒト酵素のリソソーム病に対する脳内補充の有効性を世界初で発表し^[2]、脳内におけるリソソーム蓄積の作用機序を解明した。これらの知見は、リソソーム病を解説した総論にも引用されており⁹³、本研究は世界トップレベルの研究といえる。一方、未だ Tay-Sachs 病及び Sandhoff 病の機序が解明しきれていない中、実際に Tay-Sachs 病及び Sandhoff 病の患者から血液を採取し、MALDI-TOF-MS にて GM2 ガングリオシド濃度を測定した。疾患モデルマウスの血中及び脳内と実際の患者の血中との間で、GM2 ガングリオシド濃度に相関性が得られたことでバイオマーカーになり得ることを示した⁹⁴。

②社会・経済への波及効果

CathA 欠損症患者由来皮膚線維芽細胞からの iPS 様細胞株の樹立に成功し、神経前駆細胞への分化条件も確立した⁹¹ことで、組換え Hex と合わせた治療戦略が考えられる。

⁹¹ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/23390140.ja.html>

⁹² 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/24659262.ja.html>

⁹³ Bellettato C. M., Scarpa M., Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders (2010) Journal of Inherited Metabolic Disease, 33(4), pp. 347-362.

⁹⁴ Kodama T., Togawa T., Tsukimura T., Kawashima I., Matsuoka K., Kitakaze K., Tsuji D., Itoh K., Ishida Y., Suzuki M., Suzuki T., Sakuraba H., Lyso-GM2 ganglioside: a possible biomarker of Tay-Sachs disease and Sandhoff disease. (2011) PLoS One, 6(12), pp. e29074.

ネオグライコバイオロジクスとしての高機能型ヒトリソソーム酵素の開発については、中枢神経障害を伴うリソソーム病動物モデルにおいて、脳室内投与による酵素補充治療の有効性を証明しており^[3]、安全性を実証することが出来れば、Tay-Sachs 病⁹⁵及び Sandhoff 病⁹⁶の患者が期待している脳内酵素補充療法の臨床試験による開発が見込まれる。また、リソソーム性シアリダーゼ（ノイラミニダーゼ-1、NEU1）の欠損症に対する新規治療法の開発において、NEU1 と構造類似のノイラミニダーゼ 2 (NEU2) に対して天然物 Siastatin B が *in vitro* で阻害作用と安定化作用を併せもつことを明らかにし、Siastatin B の誘導体がリソソーム内で NEU1 活性も増強する可能性が示唆された^[4]。さらに X 線自由電子レーザーを用いた次世代創薬の研究も進めている⁹⁷。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文 4 報以内

- [1] Tsuji D., Akeboshi H., Matsuoka K., Yasuoka H., Miyasaki E., Kasahara Y., Kawashima I., Chiba Y., Jigami Y., Taki T., Sakuraba H., Itoh K., Highly phosphomannosylated enzyme replacement therapy for GM2 gangliosidosis (2011) *Annals of Neurology*, 69(4), pp. 691-701.

- [2] Kawashita E., Tsuji D., Toyoshima M., Kanno Y., Matsuno H., Itoh K., Prostaglandin E2 reverses aberrant production of an inflammatory chemokine by microglia from Sandhoff disease model mice through the cAMP-PKA pathway (2011) *PLoS One*, 6(1), pp. e16269.

- [3] Matsuoka K., Tsuji D., Taki T., Itoh K., Thymic involution and corticosterone level in Sandhoff disease model mice: new aspects the pathogenesis of GM2 gangliosidosis (2011) *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(5), pp. 1061-1068.

- [4] Rahman MM, Kitao S, Tsuji D, Suzuki K, Matsuoka K, Matsuzawa F, Aikawa S, Itoh K., Inhibitory effects and specificity of synthetic sialyldendrimers toward recombinant human cytosolic sialidase 2 (NEU2) (2013) *Glycobiology*, 23, pp. 495-504.

⁹⁵ Matsuoka K., Tamura T., Tsuji D., Dohzono Y., Kitakaze K., Ohno K., Saito S., Sakuraba H., Itoh K., Therapeutic Potential of Intracerebroventricular Replacement of Modified Human β -Hexosaminidase B for GM2 Gangliosidosis (2011) *Molecular Therapy*, 19, pp. 1017-1024.

⁹⁶ Matsuoka K., Tsuji D., Aikawa S., Matsuzawa F., Sakuraba H., Itoh K., Introduction of an N-Glycan Sequon Into HEXA Enhances Human β -Hexosaminidase Cellular Uptake in a Model of Sandhoff Disease (2010) *Molecular Therapy*, 18, pp. 1519-1526.

⁹⁷ Gallat FX., Matsugaki N., Coussens NP., Yagi KJ., Boudes M., Higashi T., Tsuji D., Tatano Y., Suzuki M., Mizohata E., Tono K., Joti Y., Park J., Song C., Hatsui T., Yabashi M., Nango E., Itoh K., Coulibaly F., Tobe S., Ramaswamy S., Stay B., Iwata S., Chavas LM., In vivo crystallography at X-ray free-electron lasers: the next generation of structural biology? (2014) *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 17, pp. 369-370.

3.2.2 マイクロドメイン機能異常にもとづく2型糖尿病の病態説明（井ノ口仁一）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

「2型糖尿病などの生活習慣病の病態は、スフィンゴ糖脂質の異常発現によって細胞膜(マイクロドメイン)の構成・構造及び機能が変化し、シグナル伝達が異常になったマイクロドメイン病である」という作業仮説を検証し、新たな分子病態像の解明を目指した⁹⁸。

②期間中の研究成果

(i) 2型糖尿病のインスリン抵抗機構の解明

正常な成熟脂肪細胞におけるインスリン代謝性シグナルは、カベオラに存在するIRから始まり、一連の経路を介して糖の取り込みを行う。一方、インスリン抵抗性状態では、ガングリオシドGM3の増加により、IRがカベオラから解離することで代謝性シグナルが抑制されることを明らかにし、2型糖尿病におけるインスリン抵抗性の病態には、インスリン受容体(IR)のマイクロドメインへの局在化の消失が関与していることを強く示唆する結果が得られた。ヒト血清を用いた検討により、GM3がメタボリックシンドロームの新たなバイオマーカーとなり得ることを見いだした⁹⁸、^[1](図3-18)。

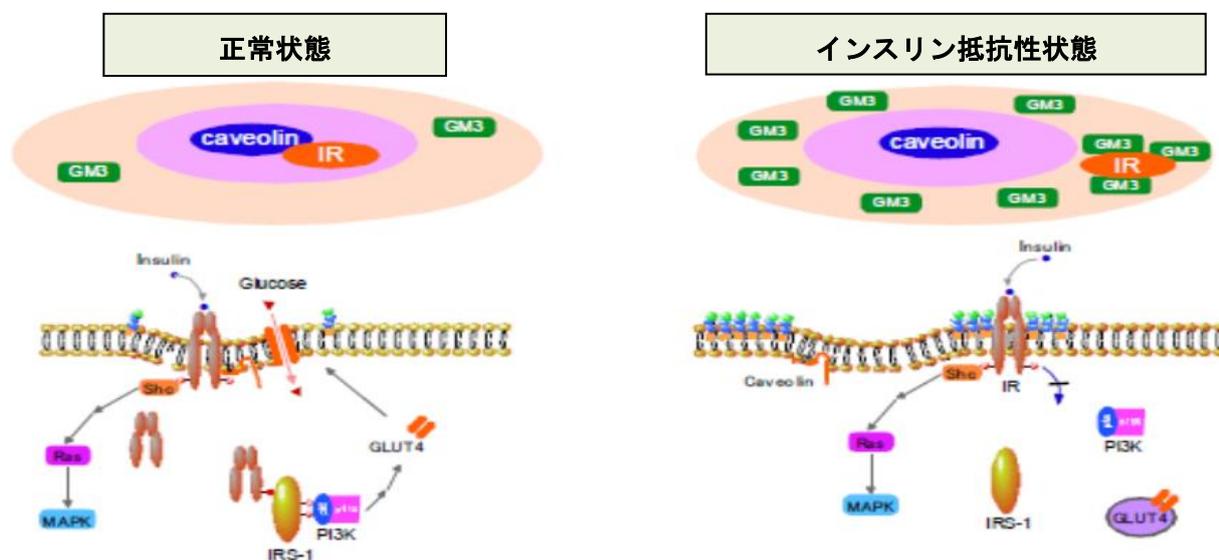


図3-18 マイクロドメイン病の観点からみたインスリン抵抗性の概念図⁹⁹

(ii) GM3合成酵素欠損マウスによるGM3機能の解析

ゴルジ体においてラクトシルセラミドにシアル酸を転移し、GM3を合成するII型の膜タンパク質であるGM3合成酵素の欠損マウスは、生後まもなく聴覚機能異常を発症し、成長するにつれコルチ

⁹⁸ 研究終了報告書 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei15/tousa/inoguchi.pdf

⁹⁹ 研究終了報告書の「図1 マイクロドメイン病の観点からみたインスリン抵抗性の概念図」を一部改変

器が選択的に脱落した。GM2/GD2合成酵素とGD3合成酵素のダブルノックアウトマウス (GM3 only mice) は音に反応するという報告から、GM3が聴覚機能において重要な役割を果たしていることが示唆され、初めて聴覚機能に複合糖質が深く関与していることが示された^{98, [2]}。

(iii) GM3 合成酵素の細胞内局在の解析

GM3 合成酵素の小胞体局在化機構を検討し、GM3 合成酵素の細胞質領域に存在する複数のアルギニン残基 (RRXXXXR) からなる小胞体への逆行輸送シグナルとして機能するシグナル配列 (R-based motif) の存在を証明した。この結果から、GM3 合成酵素が、様々な環境変化やストレス状況下における GM3 及びそれ以降のガングリオシドの安定供給に重要であることを明らかにした^{98, [3]}。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Kabayama K., Sato T., Saito K., Loberto N., Prinetti A., Sonnino S., Kinjo M., Igarashi Y., Inokuchi J., Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance (2007) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, pp. 13678-13683.
- [2] Yoshikawa M., Go S., Takasaki K., Kakazu Y., Ohashi M., Nagafuku M., Kabayama K., Sekimoto J., Suzuki S., Takaiwa K., Kimitsuki T., Matsumoto N., Komune S., Kamei D., Saito M., Fujiwara M., Iwasaki K., Inokuchi J., Mice lacking ganglioside GM3 synthase exhibit complete hearing loss due to selective degeneration of the organ of Corti (2009) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (23), pp. 9483-9488.
- [3] Uemura S., Yoshida S., Shishido F., Inokuchi J., The Cytoplasmic tail of GM3 synthase defines its subcellular localization, stability, and in vivo activity (2009) *Molecular Biology of the Cell*, 20, pp. 3088-3100.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、科学研究費補助金基盤研究(B)「ガングリオシド GM3 の新たな病態生理学的意義の解明」(2011~2014)では、GM3SK0 マウス (KKAy/GM3SK0 及び KK/GM3SK0) の解析を行い¹⁰⁰、さらに同新学術領域研究(研究領域提案型)「聴覚におけるガングリオシドの機能解明」(2014~2016)¹⁰¹では、GM3 の聴覚機能形成における役割についての研究が継続されている。また、私立大学支援「生体膜糖鎖異常に起因する生活習慣病発症機序の解明と臨床への応用」(2012~2017)では、生体膜マイクロドメインにおけるスフィンゴ糖脂質の病態生理学的意義に関する研究を深化させ、2 型糖尿病などの原因であるインスリン抵抗性の発症について新知見を得、マイクロドメイン矯正療法ともいえる新規治療法の開発を推進した¹⁰²(図 3-19)。

¹⁰⁰ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/23370064.ja.html>

¹⁰¹ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/26110717.ja.html>

¹⁰² 東北薬科大学分子生体膜研究所 <http://www.tohoku-pharm.ac.jp/new/sb.cgi?eid=168>

①科学技術の進歩への貢献

糖尿病における GM3 の視床下部での機能の解析を目的として、GM3SK0 マウス (KKAy/GM3SK0 及び KK/GM3SK0) を作成し、糖尿病関連の表現型を 24 週齢で検討した。その結果、インスリン抵抗性改善による糖新生系酵素 (G6P 及び PEPCK) 遺伝子発現の抑制が認められ、糖尿病の発症が両マウスでほぼ完全に抑制されることを見いだした。さらに、マウスの摂食量と体重増加を検討した結果、GM3 及び関連ガングリオシドが、末梢のインスリン支配臓器、さらに視床下部食欲中枢の過食シグナルにおいても機能していることが示唆された^{100, 102, [1]}。

また、GM3 の新たな病態生理学的意義を調べるため、ガングリオシド系列の生合成における二つの鍵酵素である GM3 合成酵素 (GM3S) および GM2/GD2 合成酵素 (GM2/GD2S) の各遺伝子改変マウス (KO) を用いて CD4T 細胞と CD8T 細胞の機能を検討した。GM3S KO と GM2/GD2S KO では対照的な結果を得たことから、T 細胞サブセットごとにその機能発現に必要なガングリオシド分子種が異なり、胸腺における T 細胞分化過程 (レパトア選択) は、T 細胞サブセットごとの糖脂質発現の選択過程でもあり、この糖脂質選択は機能的 T 細胞への成熟に不可欠な現象であるという作業仮説を提唱している。さらに、オボアルブミン (OVA) で惹起したマウス喘息モデルにおいて、GM3S KO では、肺洗浄液中の浸潤細胞 (特に好酸球) および Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5) の著しい減少が認められ、さらに血清中抗原特異的 IgE の出現抑制と、組織学的には気道分泌抑制が確認された^{[2], 100}。

現在使用されている免疫抑制剤は全ての T 細胞の機能を抑制するものであり、そのため様々な副作用が発生しているが、上記の発見を新しい免疫機能の制御法開発に繋げるべく研究を進めている^{101, [3]}。

これらの研究により、炎症状態におけるガングリオシドの発現上昇は、インスリン抵抗性や摂食中枢機能異常を誘発すること、脂肪細胞のホメオスタシスに重要であること^[4]、また喘息などのアレルギー病態を惹起させていることが証明された (図 3-19)。また、聴覚機能形成に関する国際共同研究において、GM3S 欠損患者では聴覚機能障害がみられ、さらに GM3S KO マウスの解析から GM3S が聴覚有毛細胞の組織形成と不動毛の維持に不可欠であることが示され、GM3 依存的膜マイクロドメインが聴覚機能に必須であることが明らかになった^{103[5]}。以上のように世界に先駆けて「マイクロドメイン病」という病態概念と治療法を提唱する裏付けとなった。

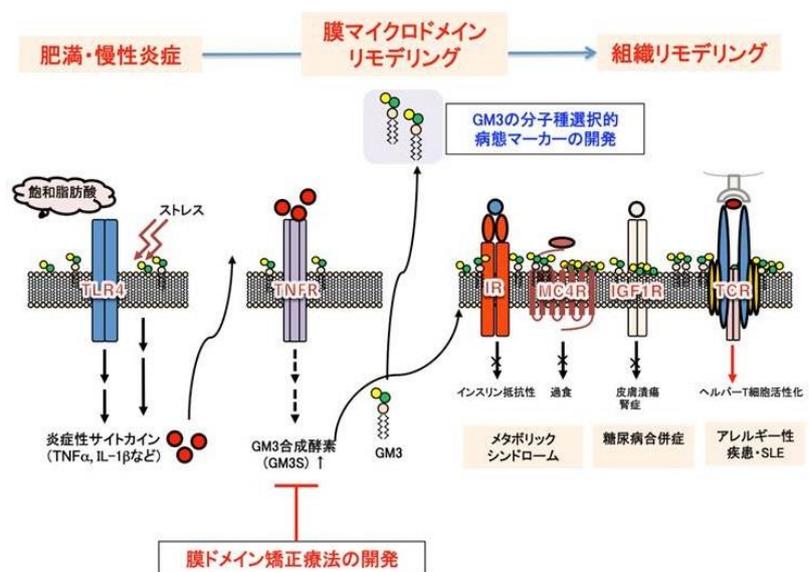


図 3-19 スフィンゴ脂質代謝の恒常性破綻による病態発症機序の解明と診断・治療法の開発 (提供: 東北薬科大学 井ノ口仁一)

¹⁰³ Yoshikawa M, Go S, Suzuki S, Suzuki A, Morlet T, Strauss K, Fujiwara M, Iwasaki K, Inokuchi J., Ganglioside GM3 is essential for the structural integrity and function of cochlear hair cells (2015) Human Molecular Genetics in press (doi: 10.1093/hmg/ddv041).

②社会・経済への波及効果

本研究領域の成果は、インスリン抵抗性病態を示す疾患の検出¹⁰⁴、T細胞機能制御の方法¹⁰⁵、高脂血症の治療剤¹⁰⁶について国際出願を行い、日本で特許を取得しており、臨床応用への実質的な社会貢献を目指している。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文 4 報以内

- [1] Fujiwara H., Ikarashi K., Yamazaki Y., Goto J.-I., Kaneko K., Sugita M., Kato H., Sasaki H., Inokuchi J., Furukawa K., Fujii S., Impairment of hippocampal long-term potentiation and failure of learning in mice treated with d-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (2012) *Biomedical Research (Japan)*, 33, pp. 265-271.
- [2] Nagafuku M., Okuyama K., Onimaru Y., Suzuki A., Odagiri Y., Yamashita T., Iwasaki K., Fujiwara M., Takayanagi M., Ohno I., Inokuchi J.-I., CD4 and CD8 T cells require different membrane gangliosides for activation (2012) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, pp. E336-E342.
- [3] Inokuchi J., Nagafuku M., Ohno I., Suzuki A., Heterogeneity of gangliosides among T cell subsets (2013) *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, pp. 3067-3075.
- [4] Nagafuku M, Sato T, Sato S, Shimizu K, Taira T, Inokuchi J., Control of homeostatic and pathogenic balance in adipose tissue by ganglioside GM3 (2015) *Glycobiology*, 25, pp. 303-318.

④その他

本研究領域期間中の主な成果は、2007年8月14日(火)朝日新聞夕刊、2007年8月15日(水)河北新報社朝刊、2007年8月9日(木)JSTプレスリリース、2007年8月14日(火)東北薬科大学プレスリリース「インスリン抵抗性の新たなメカニズム解明に成功(2型糖尿病の新しい治療法に道)」、2009年5月20日(水)河北新報「聴覚維持の糖脂質発見」などで広く新聞、ニュース等に報道された¹⁰¹。

¹⁰⁴ 井ノ口仁一、インスリン抵抗性病態を示す疾患の検出方法、PCT/JP2007/061246(2007/5/26 出願)、W007/139224(2009/10/15 公開)、特許第 05020239 号(2012/6/22 登録)、出願人：独立行政法人科学技術振興機構

¹⁰⁵ 井ノ口仁一、永福正和、大野勲、奥山香織、ヘルパー T 細胞の選択的機能制御法、PCT/JP2009/068671(2009/10/30 出願)、W010/050584(2012/3/29 公開)、特許第 05232241 号(2013/3/29 登録)、出願人：独立行政法人科学技術振興機構

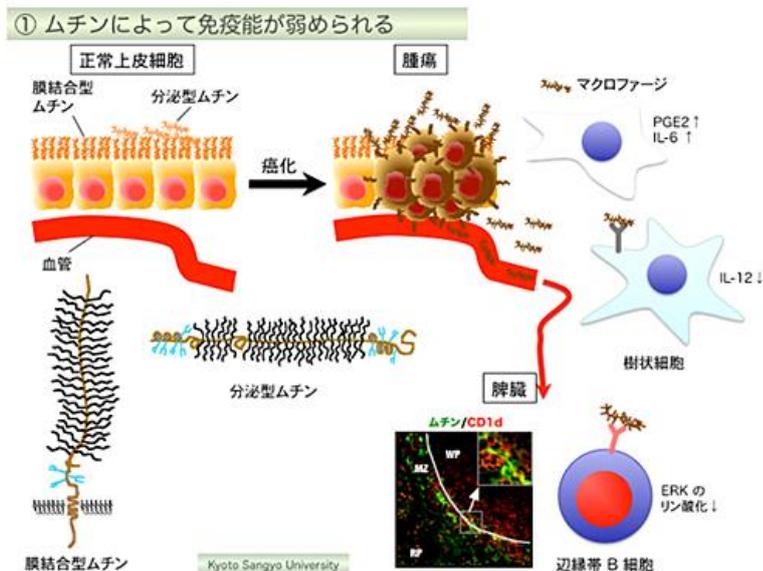
¹⁰⁶ 井ノ口仁一、永福正和、速水博考、高脂血症治療剤のスクリーニング方法、PCT/JP2010/070959(2010/11/25 出願)、W011/065389(2013/4/18 公開)、特許第 05077901 号(2012/9/7 登録)：出願人：独立行政法人科学技術振興機構

3.2.3 担癌状態におけるムチンを介した免疫能の変化の解析と応用（中田博）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

シグレックファミリーやスカベンジャーリセプター(SCR)と上皮性がん細胞の産生するムチンの相互作用の解析を通じ、腫瘍組織形成や担がん状態における免疫能力の低下について、その分子機構を明らかにし、その基礎的データに基づき、担がん状態での免疫力回復あるいは一般的見地からの免疫力の制御などの臨床的応用を目指した^{107、108}(図3-20)。



②期間中の研究成果

図3-20 ムチンによる免疫低下機構¹⁰⁸

(i) 単核食細胞における SCR を介したインターロイキン 6(IL-6)の産生亢進

IL-6は担がん状態における代表的な免疫抑制因子である。可溶性 SCR 組換え体を用いてムチンへの結合を確認するとともに、上皮性がんである大腸がん患者の血清による SCR を介したマクロファージの活性化、IL-6の産生亢進及びムチン除去による不活性化及び CA19-9の血中含量と PGE2(prostaglandin E2)産生の相関性などを明らかにした。担がん状態において、血中に産生されるムチンが SCR を介して単核/マクロファージへ作用することにより IL-6の産生が亢進することを示した^[1]。

(ii) 担がんにおけるムチンによる血管新生亢進の解析

ムチン産生腫瘍と非産生腫瘍担がんマウスの腫瘍増殖を比較し、前者では産生されたムチンにより、浸潤したマクロファージに cyclooxygenase(COX)2が誘導され、PGE2の産生が亢進した。PGE2により血管新生因子の産生が高まるとともに、IFN- γ の産生が低下して Th2 環境がもたらされ、腫瘍増殖が促進された。COX2 特異的阻害剤の投与ではムチン産生腫瘍担がんマウスのみ著しい腫瘍増殖抑制効果を認めた。これらの結果から、ムチン→マクロファージの COX2 誘導→PGE2の過剰産生→血管新生の亢進・免疫抑制というカスケードの存在が強く示唆され、腫瘍増殖にムチンが関与することが示された^{107、[2]}。

(iii) 担がん状態におけるシグレック 2 を介した B 細胞の免疫抑制

シグレック 2 とムチンの結合担がん状態における B 細胞へのムチンの影響を調べた。その結果、担がん状態で産生されるムチンが B 細胞の CD22/シグレック 2 に結合することで B 細胞のアポト

¹⁰⁷ 研究終了報告書 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei15/tousa/nakata.pdf

¹⁰⁸ 京都産業大学ホームページ <http://www.kyoto-su.ac.jp/department/nls/sennin/system/nakata.html>

ーシスを誘導し、免疫を抑制することを明らかにした^[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Yokoigawa N., Takeuchi N., Toda M., Inoue M., Kaibori M., Yanagida H., Tanaka H., Ogura T., Takada H., Okumura T., Kwon A.H., Kamiyama Y., Nakada H., Enhanced production of Interleukin-6 in peripheral blood monocytes stimulated with mucins secreted into the bloodstream (2005) *Clinical Cancer Research*, 11, pp. 6127-6132.
- [2] Sugihara I., Yoshida M., Shigenobu T., Takagi H., Murayama K., Takeuchi N., Toda M., Inoue M., Nakada H., Different progression of tumor xenografts between mucin-producing and -nonproducing mammary adenocarcinoma-bearing mice (2006) *Cancer Research*, 66, pp. 6175-6182.
- [3] Toda M., Hisano R., Yurugi H., Akita K., Maruyama K., Inoue M., Adach T., Tsubata T., Nakada H., Ligation of tumor-produced mucins to CD22 dramatically impairs splenic marginal zone B cells (2009) *Biochemical Journal*, 417, pp. 673-683.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、京都府立医科大学医学系研究科の川人豊および河野正孝らと科学研究費助成事業(基盤研究(C))「関節リウマチにおけるスフィンゴシン 1 リン酸レセプター3(S1P3)の働き」(2011~2012)の研究分担として研究を継続し、関節リウマチ等の炎症に関与する S1P シグナルの分子メカニズムを解明し、S1P3 の阻害薬や遺伝子発現抑制が炎症性疾患の新たな治療ターゲットになることを示した¹⁰⁹。

①科学技術の進歩への貢献

本研究領域終了後、未熟樹状細胞に高発現するシアル酸結合レクチンのシグレック-9 と、上皮がん細胞の産生するムチンとの結合がサイトカイン産生調節・免疫調節に関与する機構の研究では、シグレック 9 は単球ではほとんど発現せず、未熟樹状細胞で高発現し、成熟樹状細胞では減少することを明らかにした。未熟樹状細胞にムチンあるいは合成糖鎖の存在下で LPS を加えてサイトカインの産生を測定したところ、IL-12 の産生が有意に減少し、ムチンとシグレック 9 の相互作用により Th2 環境を強める作用があることが示されたことにより、がん組織微小環境において Th2 環境をつくり出す要因の一つとなり、がん免疫抑制に働いているものと考えられるようになった^[1]。また、シグレック-9 と腫瘍マーカーMUC1 との関連性についての研究では、ヒト結腸癌、膵癌、乳癌組織で免疫細胞の発現するシグレック-9 が、膜結合型ムチン MUC-1 のカウンターレセプターであり、増殖因子媒介性シグナル伝達経路とは別に並行して生じる MUC-1 媒介性シグナル伝達経路を示す可能性があることを示した^[2]。さらに、MUC1 のカウンターレセプターとしては、シグレック-9 の他にガレクチン-3 も機能することがわかった。即ち、ガレクチン-3 の結合は転写因子、 β -カテニンや NF- κ B の MUC-1 へのリクルートを促進し、それぞれ、細胞の増殖や uPA

¹⁰⁹ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/23591445.en.html>

の発現誘導に伴う移動能の亢進をもたらすことを示した^[3]。また、シグレック-9以外の免疫細胞上のシグレックファミリーの機能を検討する過程で、シグレック-3はCD14上の糖鎖に結合することによりTLR-4を介したシグナル伝達を制御することを見出した^[4]。活性化Tリンパ球に関しては、発現するプロヒビン-1、-2が、マクロファージや樹状細胞上に発現するシグレック-9のカウンターレセプターとして、シアル酸非依存性の結合をしており、TCRシグナリングを調節する可能性があることを示した¹¹⁰。

これらの研究結果から、がん組織微小環境において、シグレック-9を介して免疫機能の抑制とがん細胞の増殖の促進がもたらされていることを示し、免疫機能抑制の分子的背景を明らかにした。

さらに、がん浸潤・転移においては、がん浸潤・転移に高発現する遺伝子ppGalNAc-T13(T13)によりSyndecan 1上に発現誘導されるtrimeric Tn(tTn)抗原が、がん転移において果たす機能について、GM1発現が低下した条件下でtTn抗原が発現することから、がん転移促進の分子的背景の一面を明らかにした¹¹¹。

②社会・経済への波及効果

本研究領域終了後に、免疫抑制の機能を有するシアロ型人工ムチンを含有する新規な免疫抑制剤を民間会社と共同開発した¹¹²。他にも、関節リウマチ治療剤¹¹³、卵巣がんと子宮内膜症との鑑別方法¹¹⁴、活性化T細胞の検出方法やT細胞の活性化制御方法およびマーカーとしての使用¹¹⁵について、研究成果を国内外に特許出願している。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文4報以内

[1] Ohta M., Ishida A., Toda M., Akita K., Inoue M., Yamashita K., Watanabe M., Murata T., Usui T., Nakada H., Immunomodulation of monocyte-derived dendritic cells through ligation of tumor-produced mucins to Siglec-9 (2010) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402, pp. 663-669.

[2] Tanida S., Akita K., Ishida A., Mori Y., Toda M., Inoue M., Ohta M., Yashiro M., Sawada T., Hirakawa K., Nakada H., Binding of the sialic acid-binding lectin, Siglec-9, to

¹¹⁰ Yurugi H., Tanida S., Akita K., Ishida A., Toda M., Nakada H., Prohibitins function as endogenous ligands for Siglec-9 and negatively regulate TCR signaling upon ligation (2013) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 434, pp. 376-381.

¹¹¹ Matsumoto Y., Zhang Q., Akita K., Nakada H., Hamamura K., Tsuchida A., Okajima T., Furukawa K., Urano T., Furukawa K., Trimeric Tn antigen on syndecan 1 produced by ppGalNAc-T13 enhances cancer metastasis via a complex formation with integrin $\alpha 5 \beta 1$ and matrix metalloproteinase 9 (2013) *Journal of Biological Chemistry*, 288, pp. 24264-24276.

¹¹² 中田博、免疫抑制剤、特開 2006-062982(2006/3/9 公開)

¹¹³ 中田博、川人豊、関節リウマチ治療剤、PCT/JP2009/051269(2009/1/27 出願)、特開 2011-093804(2011/5/12 公開)、出願人：学校法人京都産業大学

¹¹⁴ 中田博、秋田薫、池原譲、成松久、中西速夫、北脇城、卵巣癌の検出方法、卵巣癌と子宮内膜症との鑑別方法、並びに、キット、特願 2011-16236(2011/1/28 出願)、特開 2012-154881(2012/8/16 公開)、出願人：学校法人京都産業大学、独立行政法人産業技術総合研究所、愛知県、京都府公立大学法人

¹¹⁵ 中田博、万木肇、活性化T細胞の検出方法、T細胞の活性化制御方法、及びマーカーのための使用、特願 2012-69764(2012/3/26 出願)、特開 2013-200264(2013/10/3 公開)、出願人：出願人学校法人京都産業大学

the membrane mucin, MUC1, induces recruitment of β -catenin and subsequent cell growth (2013) Journal of Biological Chemistry, 288, pp. 31842-31852.

[3] Mori Y, Akita K, Tanida S, Ishida A, Toda M, Inoue M, Yashiro M, Sawada T, Hirakawa K, Nakada H, MUC1 Protein Induces Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) by Forming a Complex with NF- κ B p65 Transcription Factor and Binding to the uPA Promoter, Leading to Enhanced Invasiveness of Cancer Cells (2014). Journal of Biological Chemistry, 289, pp. 35193-35204.

[4] Ishida A, Akita K, Mori Y, Tanida S, Toda M, Inoue M, Nakada H. Negative regulation of Toll-like receptor-4 signaling through the binding of lysosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein, CD14, with the sialic acid-binding lectin, CD33 (2014) Journal of Biological Chemistry, 289, pp. 25341-25350.

④その他

中田は、JST 研究成果最適展開支援プログラム推進アドバイザー、京都バイオ産業技術フォーラム幹事、NEDO ピアレビューアー、京都発革新的医療技術研究開発助成事業に係る査読委員を通し、国内の研究分野に貢献している。

3.2.4 遺伝子破壊による糖鎖機能の戦略的解明 (野村一也)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

ヒトと共通の糖鎖遺伝子が多数検出されている線虫において、RNAi 法と遺伝子欠失突然変異株の取得によって糖鎖遺伝子の機能を推定し、ヒトでの病態解明、疾病治療などに役立てることを目指した¹¹⁶(図 3-21)。

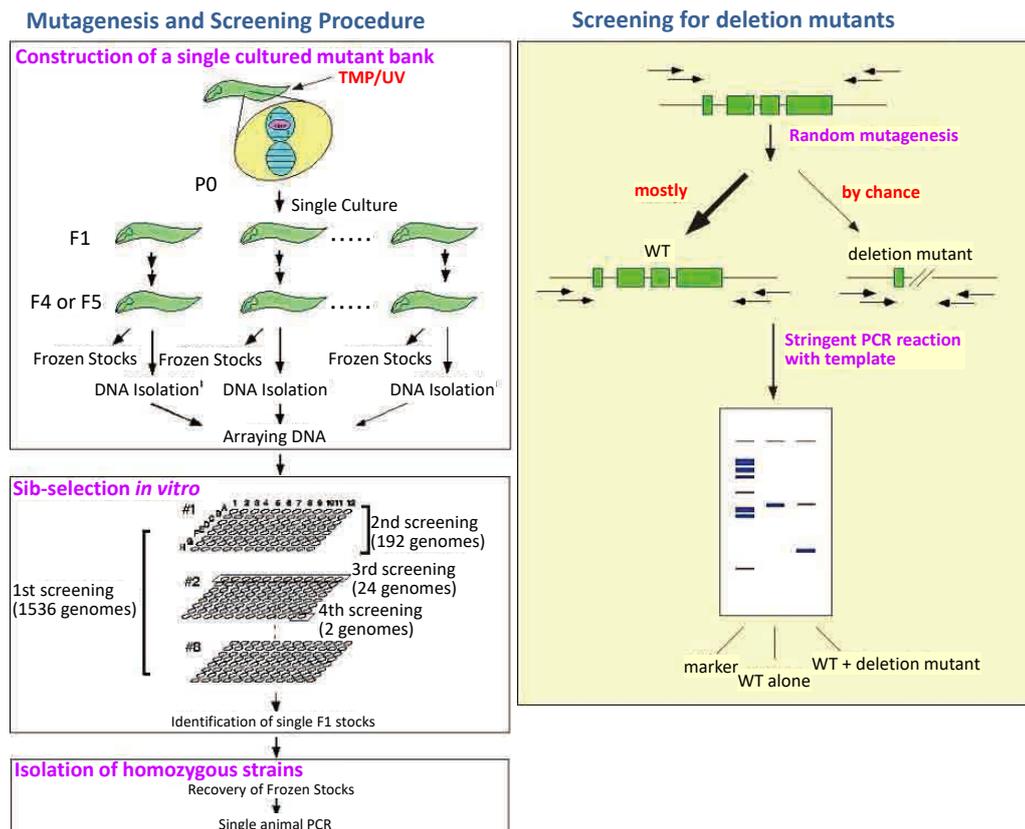


図 3-21 突然変異とスクリーニング(東京女子医科大学、三谷昌平グループと協力)¹¹⁶

②期間中の研究成果

(i) 糖鎖硫酸化に関わる遺伝子の網羅的機能解析

多細胞生物の基本的特徴を有している有効なモデル動物である線虫を材料として、TMP/UV 法による欠失型変異体ライブラリーを作製することで網羅的解析を実施し、PAPS 合成酵素に関わる遺伝子を発見した。この遺伝子について feeding 法により RNAi 機能解析を行い、PAPS 合成酵素により硫酸化した糖鎖が胚発生後期と上皮細胞の形態形成に重要な働きをすることを明らかにした^[1]。

¹¹⁶ 研究終了報告書 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei15/tousa/nomura.pdf

(ii) ガレクチンの細菌感染防御機構の解析

ヒトガレクチン 4 は、がん組織で高発現しているが、糖鎖だけではなく糖脂質、硫酸化コレステロールやリン酸化チロシンも認識する。線虫の全ガレクチン(lec-1 から lec-11)を機能解析し、lec-8 がヒトガレクチン 4 のオーソログであることを明らかにした。さらに、線虫糖脂質結合ガレクチン lec-8 は細菌毒素そのものと競合することで細菌毒素の線虫糖脂質に対する結合を阻害し、生体防禦機構に関わっている可能性を明らかにした^[2]。

(iii) UDP-ガラクトース輸送体の機能解析

ヒトとオーソログのある SLC35B1 ファミリーの遺伝子である UDP-ガラクトース輸送体(HUT-1)について、遺伝子破壊株と RNAi による機能阻害の結果、HUT-1 は小胞体ストレスに関わっていること、幼虫の発生に必須であることを明らかにした^[3]。さらに HUT-1 は小胞体に局在化しており、多細胞生物では小胞体の構造維持に関与している可能性を示した^[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Dejima K., Seko A., Yamashita K., Gengyo-Ando K., Mitani S., Izumikawa T., Kitagawa H., Sugahara K., Mizuguchi S., Nomura K., Essential roles of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase in embryonic and larval development of the nematode *Caenorhabditis elegans* (2006) *Journal of Biological Chemistry*, 281, pp. 11431-11440.
- [2] Ideo H., Fukushima K., Gengyo-Ando K., Mitani S., Dejima K., Nomura K., Yamashita K., *C. elegans* glycolipid-binding galectin functions in host defense against bacterial infection (2009) *Journal of Biological Chemistry*, 284, pp. 26493-26501.
- [3] Dejima K., Murata D., Mizuguchi S., Nomura K.H., Gengyo-Ando K., Mitani S., Kamiyama S., Nishihara S., Nomura K., The ortholog of human solute carrier family 35 member B1 (UDP-galactose transporter-related protein 1) is involved in maintenance of ER homeostasis and essential for larval development in *Caenorhabditis elegans* (2009) *FASEB Journal*, 23, pp. 2215-2225.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、科学研究費補助金挑戦的萌芽研究「線虫初期胚細胞分裂を司るコンドロイチンプロテオグリカンの同定と機能解析」(2011~2012)¹¹⁷、科学研究費補助金基盤研究(C)「線虫配偶子幹細胞ニッチをつかさどる GPI アンカー型タンパク質の同定と機能解析」(2012~2015)¹¹⁸で、線虫 *C. elegans* の個体発生におけるプロテオグリカン関連遺伝子の機能解析や、GPI anchor 型タンパク質合成の意義を明らかにするための線虫合成関連遺伝子のノックアウト、ノックダウンによる研究を進めている。

¹¹⁷ 科学研究費事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/23657093.ja.html>

¹¹⁸ 科学研究費事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/24570165.ja.html>

①科学技術の進歩への貢献

日本が開発して糖鎖生物学実験法が記載されている国際的糖鎖生物学のデータベースである GlycoPOD に、線虫 *C. elegans* 遺伝子の RNAi によるノックダウンのプロトコルを詳細に紹介し¹¹⁹、さらに線虫糖鎖遺伝子の中からヒトの糖鎖遺伝子のオーソログであるものを全て列挙して医師や医学研究者などに使いやすいデータベース CGGDB として集約し、ウェブサイトにて公開した¹²⁰ (図 3-22)。

JCEG ID	Family	Name	Locus Tag	Human Ortholog Name
JCEG001	Asparagine-linked glycosylation (ALG) genes		T26A5.4	ALG1
JCEG002	Asparagine-linked glycosylation (ALG) genes		F09E5.2	ALG2
JCEG003	Asparagine-linked glycosylation (ALG) genes	bus-8	T23F2.1	ALG2
JCEG004	Asparagine-linked glycosylation (ALG) genes		K09E4.2	ALG3
JCEG005	Asparagine-linked glycosylation (ALG) genes		H4307.3	ALG5
JCEG006	Asparagine-linked glycosylation (ALG) genes		C08B11.8	ALG6
JCEG007	Asparagine-linked glycosylation (ALG) genes		Y60A3A.14	ALG7
JCEG008	Asparagine-linked glycosylation (ALG) genes		T08D2.2	ALG7
JCEG009	Asparagine-linked glycosylation (ALG) genes		C08H9.3	ALG8
JCEG010	Asparagine-linked glycosylation (ALG) genes		C14A4.3	ALG9
JCEG011	Asparagine-linked glycosylation (ALG) genes	tag-179	T24D1.4	ALG10
JCEG012	Asparagine-linked glycosylation (ALG) genes		B0361.8	ALG11
JCEG013	Asparagine-linked glycosylation (ALG) genes		ZC513.5	ALG12

図 3-22 *C. elegans* Glycogene Database (CGGDB)

(提供：九州大学、野村一也)

線虫の遺伝子変異体作製技術、RNAi による機能解析の経験の蓄積、4次元共焦点顕微鏡での観測・解析技術、プロテオーム解析手段、糖鎖配列決定法などの周辺技術開発もかなり進み、本研究領域終了後も、GPI アンカー型タンパク質、コアタンパク質、コンドロイチンの細胞分裂における機能の詳細解明の研究を進めている¹²¹。

GPI アンカー型タンパク質合成の意義を明らかにするため、線虫 *C. elegans* を用いて合成関連遺伝子のノックアウト、ノックダウンを行い、GPI アンカー合成が線虫の生殖細胞ニッチの維持に不可欠であるということ、GPI アンカー合成の第一段階をになう酵素 PIGA-1 のノックアウト株は、胚細胞が形成されず子孫を残すことができないこと、このノックアウト株を野生型の *piga-1* 遺伝子の導入でレスキューすると生殖系列の異常は解消されること、さらにノックアウト株の生殖巣の端に存在する体細胞 (distal tip cell : DTC) だけに野生型 *piga-1* 遺伝子を発現させても、やはり完全に生殖巣異常が解消されることから、DTC で合成される GPI アンカー型タンパク質が、生殖巣へと移動して幹細胞ニッチや卵母細胞の形成に働くことを明らかにした^[2]。

以上の研究により、従来不明であった GPI アンカー型タンパク質の隠れた役割を明らかにし、GPI アンカー型タンパク質無しには生命の連鎖が成立しないことを示した。

細胞膜における膜貫通タンパク質の位置制御に重要な役割を果たすとされている NHERF (Na⁺/H⁺)

¹¹⁹ 糖鎖科学オンラインプロトコルデータベース Sayaka Akiyoshi, Kazuko H. Nomura, Kazuya Nomura, GlycoPOD [Glycoscience online protocol database], 2013.01,

<http://jcgdb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeId=t205>

¹²⁰ Kyushu University, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

<http://jcgdb.jp/cggdb/>

¹²¹ 九州大学研究者情報 <http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K000701/research.html>

交換輸送体制御因子)の *C. elegans* のオーソログである NRFL-1 が AAT-6(アミノ酸トランスポーター)と相互作用して、AAT-6 の膜への局在と加齢にともなう膜局在性を制御することを示した^[3]。

本研究領域で得られた線虫糖鎖遺伝子についての成果は、Handbook of Glycosyltransferase and Related Genes 第二版(Springer 2014 発行)に新たに追加・記載されている *C. elegans* 糖鎖遺伝子についての記述のほとんどを占めている。また、本研究領域で得られた成果を世界にむけて公開するため、線虫ゲノムに存在する全てのヒト糖鎖遺伝子のオーソログについて RNAi による阻害実験を CGGDB にて公開した^[4]。特に N 型糖鎖の合成過程を司る遺伝子の RNAi によって体長の減少や小胞体内ストレスが引き起こされるという成果は、ツニカマイシンよりも RNAi が手軽かつ強力に N 型糖鎖合成を阻害できることを明らかにしたものである。この成果は線虫がヒトの先天性グリコシル化異常症 Congenital Disorder of Glycosylation のかけがえのないモデル生物となることを明らかにしたもので、今後の CDG の研究にブレイクスルーをもたらすと期待されている。

②社会・経済への波及効果

2007 年に、米国でヘパリンナトリウム製剤による多数の患者の死亡例が発生した。国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部の川崎ナナは、本研究領域終了後、過硫酸化コンドロイチン硫酸のヘパリンへの混入による事故を未然に防ぐために、プロテオグリカンに付加しているコンドロイチン糖鎖の同定手法を利用して、我が国の医薬品製造における品質管理における過硫酸型コンドロイチン硫酸の検査法を開発し規制基準を策定した。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文 4 報以内

- [1] Nomura K.H., Murata D., Hayashi Y., Dejima K., Mizuguchi S., Kage-Nakadai E., Gengyo-Ando K., Mitani S., Hirabayashi Y., Ito M., Nomura K., Ceramide glucosyltransferase of the nematode *Caenorhabditis elegans* is involved in oocyte formation and in early embryonic cell division (2011) *Glycobiology*, 21, pp. 834-848.
- [2] Murata D., Nomura K.H., Dejima K., Mizuguchi S., Kawasaki N., Matsuishi-Nakajima Y., Ito S., Gengyo-Ando K., Kage-Nakadai E., Mitani S., Nomura K., GPI-anchor synthesis is indispensable for the germline development of the nematode *Caenorhabditis elegans* (2012) *Molecular Biology of the Cell*, 23, pp. 982-995.
- [3] Hagiwara K., Nagamori S., Umemura Y.M., Ohgaki R., Tanaka H., Murata D., Nakagomi S., Nomura K.H., Kage-Nakadai E., Mitani S., Nomura K., Kanai Y., NRFL-1, the *C. elegans* NHERF orthologue, interacts with amino acid transporter 6 (AAT-6) for age-dependent maintenance of AAT-6 on the membrane (2012) *PLoS One.*, 7, pp. e43050.
- [4] Akiyoshi S., Nomura K.H., Dejima K., Murata D., Matsuda A., Kanaki N., Takaki T., Mihara H., Nagaishi T., Furukawa S., Ando K., Yoshina S., Mitani S., Togayachi A., Suzuki Y., Shikanai T., Narimatsu H., Nomura K., RNAi screening of human glycogene orthologs in

the nematode *Caenorhabditis elegans* and the construction of the *C. elegans* glycogene database (CGGDB) (2015) *Glycobiology*, 25, pp. 8-20.

3.2.5 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(宮城妙子)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

形質膜局在型シアリダーゼのヒト型酵素(NEU3)は、各種のヒトがんでほとんど例外なく異常に亢進していること、及びこの遺伝子導入マウスに糖尿病が発症することを本研究領域開始前に見いだしていた。これらの成果に基づき、本研究領域では、NEU3を主な対象として、その生理的機能及びがんや糖尿病等におけるシアリダーゼ異常発現の機構や意義について解析を進め、NEU3発現の制御法を探索し、本遺伝子を標的とした新しい診断・治療法を開発することを目指した¹²²。

②期間中の研究成果

(i) 糖尿病におけるヒト型形質膜シアリダーゼ NEU3 の異常発現亢進の解析

シアリダーゼ NEU3 は形質膜付近でガングリオシドの加水分解に与る酵素である。このシアリダーゼのヒト型酵素である NEU3 を遺伝子導入したマウスでは顕著なインスリン抵抗性を伴う糖尿病の表現型を示すことを見いだした。ここでは NEU3 分子はインスリンシグナル伝達の障害に関わっていることがわかった^[1]。

(ii) がん細胞におけるNEU3の異常発現亢進の解析

シアリダーゼ NEU3 はヒト大腸がん、腎がん、前立腺がん等で異常亢進していることを手術摘出標本で明らかにした。そこで、培養がん細胞において、NEU3 の発現を亢進させると、細胞の運動や浸潤を促進して細胞死を抑制し、がん細胞の悪性度を助長することがわかった。一方、NEU3 をノックダウンすると、がん細胞の運動や浸潤の抑制、細胞死の促進が認められ、NEU3 ががん細胞の生死を左右する分子であり、がん治療の優れた標的分子であることが推察された^[2]。

(iii) がん細胞におけるNEU3のアポトーシス抑制機構の解明

NEU3 ががん細胞のアポトーシスを抑制する分子機構を検討した。NEU3 は Ras の活性化を促進すること、NEU3 の siRNA を導入すると Ras の活性化が阻害され、がん細胞は自ら細胞死に陥るが、正常細胞ではこの現象が見られないことを見いだした(図 3-23)。さらに、NEU3 は

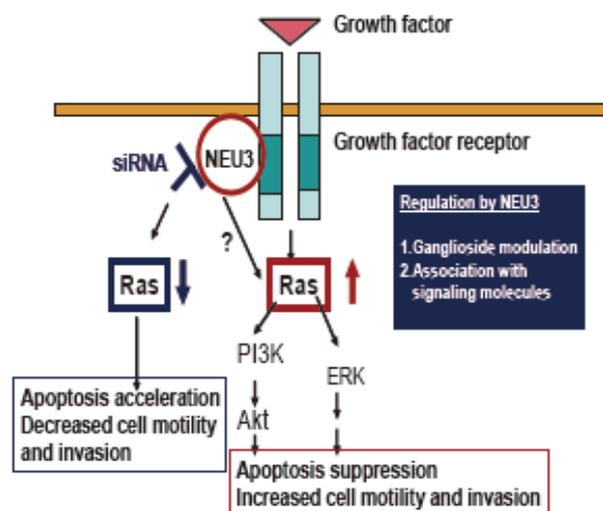


図 3-23 NEU3 は細胞の生死を左右する¹²²

上皮成長因子(EGF)受容体と会合してそのリン酸化を亢進させることによって Ras の活性化をもたらし、ERK と Akt 経路も促進してがん細胞のアポトーシスを抑制していることが明らかになっ

¹²² 研究終了報告書 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei15/tousa/miyagi.pdf

た。この結果から、NEU3 は他のシグナル分子と相互作用することにより Ras の活性化を促進し、がん細胞の生存に重要な役割を担っていることが示され、NEU3 の siRNA ががんの遺伝子治療に有効である可能性が示唆された^[2]。

(iv) NEU3 による腎がん悪性化機構の解明

腎がんでは、サイトカインであるインターロイキン 6 (IL-6) の発現が、がん転移能や悪性度と相関して亢進することが知られている。本研究領域では、この IL-6 と NEU3 の遺伝子発現が有意な相関関係を示し、NEU3 発現が IL-6 のシグナリングをさらに活性化することを明らかにした。NEU3 は、MAPK や IL-6 介在による STAT3 の活性化にはほとんど影響を及ぼさなかったが、IL-6 依存的及び非依存的にフォスファチジルイノシトール-3 (PI3)-キナーゼ/Akt 経路の活性化を亢進した。この結果から、NEU3 は、IL-6

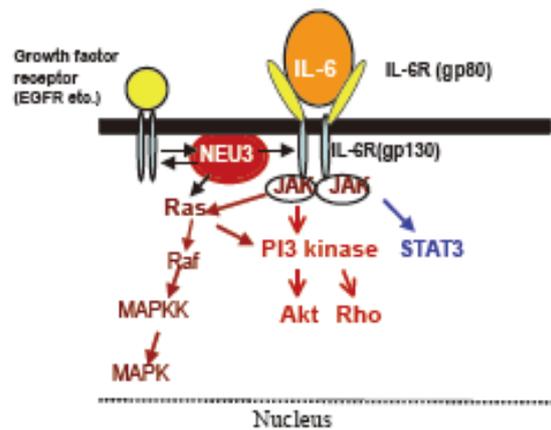


図 3-24 NEU3 による IL-6 シグナリング活性化¹²²

の伝達経路において主に PI3-kinase の経路を活性化させ、腎細胞がんのアポトーシス制御や細胞運動能を助長して悪性形質に影響を及ぼしていることが明らかになった (図 3-24)^{122, [3]}。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Sasaki A., Hata K., Suzuki S., Sawada M., Wada T., Yamaguchi K., Obinata M., Tateno H., Suzuki H., Miyagi T., Overexpression of plasma membrane-associated sialidase attenuates insulin signaling in transgenic mice (2003) *Journal of Biological Chemistry*, 278, pp. 27896-27902.
- [2] Wada T., Hata K., Yamaguchi K., Shiozaki K., Koseki K., Moriya S., Miyagi T., A crucial role of plasma membrane-associated sialidase (NEU3) in the survival of human cancer cells (2007) *Oncogene*, 26, pp. 2483-2490.
- [3] Ueno S., Saito S., Wada T., Yamaguchi K., Satoh M., Arai Y., Miyagi T., Plasma membrane-associated sialidase is up-regulated in renal cell carcinoma and promotes interleukin-6-induced apoptosis suppression and cell motility (2006) *Journal of Biological Chemistry*, 281, pp. 7756-7764.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

科学研究費補助金特定領域研究「形質膜シアリダーゼによるがん細胞死の制御機構」(2008～2009)¹²³、JST 産学連携・技術移転事業研究成果最速展開支援プログラム(A-STEP)シーズ顕在化タイプ「NEU3-siRNA を用いる抗がん剤の実用化可能性の検証」(2009)、科学研究費補助金挑戦的萌芽

¹²³ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/20013047.ja.html>

研究「シアリダーゼ異常によるがんおよび糖尿病発症機構の解明」(2010～2011)¹²⁴、科学研究費補助金新学術領域研究(研究領域提案型)「シアリダーゼによる神経機能の制御」(2012～2013)¹²⁵、JST産学連携・技術移転事業研究成果最適展開支援プログラム(A-STEP)探索タイプ「形質膜シアリダーゼを標的とするがんオーダーメイド医療の開発」(2011)、A-STEP 探索タイプ「担がん血清におけるシアリダーゼ活性の検出とそのがん診断への応用」(2012)、A-STEP 探索タイプ「がんで異常亢進するシアリダーゼの特異的低分子阻害剤の探索と創薬への応用」(2013)において、シアル酸を脱離するリアリダーゼ NEU3 を主に対象としてがん、糖尿病、および神経機能の制御の関係、及び創薬をめざした阻害剤の開発研究を進めている¹²⁶。

①科学技術の進歩への貢献

本研究領域終了後、ヒト前立腺がんにおいて、NEU3 発現が顕著に亢進し、細胞分化とアポトーシスの低下をもたらすことを明らかにした。また、NEU3 過剰発現細胞では、悪性度増強に関わる転写因子である初期増殖応答タンパク質(EGR-1)、アンドロゲンレセプター(AR)および前立腺特異抗原(PSA)の mRNA とタンパク質レベルを上昇することにより AR シグナルを活性化し、アンドロゲン非依存的増殖を示すことがわかった。NEU3 の発現上昇の程度は、前立腺がんの悪性度を示すグリソンスコアと相関しており、NEU3 を siRNA により発現制御すると前立腺がん細胞の増殖を有意に阻害したことから、NEU3 は、アンドロゲン非依存性前立腺がんの進行の調節や悪性度を決定していることが明らかになった^[1]。さらに、前立腺がん患者の血清には非がん血清と比べて有意に高いシアリダーゼ活性が検出され、それが NEU3 であることがわかった^[2]。

また、メラノーマ細胞株を用いた NEU3 過剰発現および siRNA による発現阻害の解析により、NEU3 はアポトーシスを阻害することによりがんの悪性化を助長し、悪性黒色腫においても大腸がんと同程度以上の NEU3 遺伝子発現が亢進することを明らかにした¹²⁷。

これらの結果から、NEU3 が前立腺がんや悪性黒色腫においても siRNA を用いた選択的抑制による治療や新規診断の有力な標的となることを示した。また、NEU3 のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスを用いた発がん研究から、NEU3 ががんの進展のみではなく、発がん過程にも深く関与していることが明らかとなった^{[3],[4]}。この現象は、高発現 NEU3 が EGF 存在下で非がん細胞 NIH-3T3 を悪性転換し、*in vivo* 腫瘍形成能を示すことで検証された¹²⁸。さらに、生理的 NEU3 の活性化因子については、これまで不明であったが、最近、ホスホリパーゼ D1 (PLD1) が産生するホスファチジン酸がその重要な因子であることを見出した¹²⁹。PLD1 は NEU3 のように、がん化で発現上昇を示すので、これらの協調によるがん化への関与が推察された。

¹²⁴ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/22659082.ja.html>

¹²⁵ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/24110514.ja.html>

¹²⁶ 科学研究費助成事業データベース <http://research-er.jp/researchers/view/190415>

¹²⁷ Miyata M., Kambe M., Tajima O., Moriya S., Sawaki H., Hotta H., Kondo Y., Narimatsu H., Miyagi T., Furukawa K., Furukawa K., Membrane sialidase NEU3 is highly expressed in human melanoma cells promoting cell growth with minimal changes in the composition of gangliosides (2011) *Cancer Science*, 102(12), pp. 2139-2149.

¹²⁸ Yamamoto K., Takahashi K., Shiozaki K., Yamaguchi K., Moriya S., Hosono M., Shima H., Miyagi T. Potentiation of epidermal growth factor-mediated oncogenic transformation by sialidase NEU3 leading to Src activation (2015) *PLoS One*, in press

¹²⁹ Shiozaki K., Takahashi K., Hosono M., Yamaguchi K., Hata H., Shiozaki M., Bassi R., Prinetti A., Sonnino S., Nitta K., Miyagi T. Phosphatidic acid-mediated activation and translocation to the cell surface of sialidase NEU3, promoting signaling for cell migration (2015) *FASEB Journal*, in press

②社会・経済への波及効果

本研究領域終了後、NEU3 を標的としたがん治療の対象が、前立腺がんや悪性黒色腫にも広がる可能性を明らかにし¹³⁰、とくに、前立腺がんでは非侵襲性の血清診断への応用の可能性が高まってきた。2012 年の前立腺がんにおける NEU3 の機能解明の論文^[1]は A-IMBN Research においてアジアの研究者による最近のベスト論文のひとつとして選ばれ、研究内容が新聞報道された¹³¹。

また、創薬研究については、2009 年に国内外から NEU3 を標的とした抗がん剤開発についての共同研究の申し込みがあった。実際には JST の A-STEP 研究資金(2009 年)により siRNA による抗がん剤の開発を行い、現在も創薬に向けた共同研究を継続している。なお、同社は国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の「イノベーション推進事業(研究開発型ベンチャー技術開発助成事業)」に「生体試料中の微量 siRNA 定量化キットの実用化開発」が採択され、生体試料中の全長 siRNA を定量する技術を開発して測定キットの実用化を推進した。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文 4 報以内

- [1] Kawamura S., Sato I., Wada T., Yamaguchi K., Li Y., Li D., Zhao X., Ueno S., Aoki H., Tochigi T., Kuwahara M., Kitamura T., Takahashi K., Moriya S., Miyagi T., Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) regulates progression of prostate cancer to androgen-independent growth through modulation of androgen receptor signaling (2012) *Cell Death and Differentiation*, 19(1), pp. 170-179.

- [2] Hata K., Tochigi T., Sato I., Kawamura S., Shiozaki K., Wada T., Takahashi K., Moriya S., Yamaguchi K., Hosono M., Miyagi T. Increased sialidase activity in serum of cancer patients: identification of sialidase and inhibitor activities in human serum (2015) *Cancer Science*, in press

- [3] Shiozaki K., Yamaguchi K., Sato I., Miyagi, T. Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) promotes formation of colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-treated transgenic mice. (2009) *Cancer Science* 100(4), pp. 588-594.

- [4] Yamaguchi K., Shiozaki K., Moriya S., Koseki K., Wada T., Tateno H., Sato I., Asano M., Iwakura Y., Miyagi T., Reduced susceptibility to colitis-associated colon carcinogenesis in mice lacking plasma membrane-associated sialidase (2012) *PLoS One*, 7(7), pp. e41132.

¹³⁰ 東北薬科大学がん糖鎖制御研究室 <http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/ganseigyo/index.html>

¹³¹ 東北薬科大学プレスリリース <http://www.tohoku-pharm.ac.jp/new/index.cgi?eid=274>

3.2.6 糖鎖構造特異的単鎖抗体ライブラリーの構築 (山口陽子)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

糖鎖抗原に対する特異的なヒト型抗体を得るために、抗体産生の機構を生体外で達成できるファージディスプレイ法と人工糖脂質を活用して、各種糖鎖エピトープに特異的かつ高親和性で結合する単鎖抗体を単離し、糖鎖構造特異的・単鎖抗体ライブラリーの構築を目指した (図 3-25、26)¹³²。

抗体産生の機構を生体外で達成できるファージディスプレイ法を活用して、各種糖鎖エピトープに特異的かつ高親和性で結合する単鎖抗体を数多く単離し、糖鎖構造特異的・単鎖抗体ライブラリーの構築を目指した

研究の流れ

ステップ 1 ファージライブラリー ⇨ パニング・スクリーニング ⇨
ファージクローン初期解析 ⇨
ステップ 2 選択ファージクローン ⇨ 発現・精製・解析

図 3-25 ファージ提示 scFv ライブラリーから糖鎖特異的 scFvs の取得・発現・精製・結合性解析 (supported by JST/CREST)

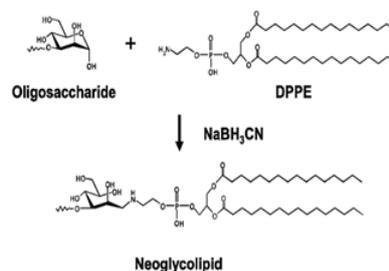
(提供: Beckman Research Institute of City of Hope 山口陽子)

②期間中の研究成果

(i) mannotriose に特異的に結合する単鎖抗体の遺伝子の単離

Mannotriose (Man3)-DPPE を糖鎖抗原として (図 3-23) ファージディスプレイ法で 26 のポジティブクローンを得た。その内の 4 種類の抗体ファージによる SPR 及び ELISA の解析から、Man3 部分に結合し、単鎖抗体タンパク質として発現する抗体遺伝子を取得した^[1]。

A. Synthesis of neoglycolipids



(ii) Man3 に結合する高親和性抗原糖鎖特異的単鎖抗体の作製

(i) で解析単離した 3 つのクローン (1A4-12、5A3 クローン、及び 1G4) について、融合タンパク質の大量発現系を検討し、ヒト IgG Fc と結合した 2 量体としてミエローマ細胞での発現と精製に成功した。また、精製した 2 種の単鎖抗体 5A3 融合タンパク質の糖鎖結合性を解析する目的で、固定化した Man3-BSA に対し SPR 解析した結果、抗原糖鎖に対する高い親和性を持つ 5A3 scFv-Fc を取得した^[2]。この抗体の免疫組織化学への応用と^[3]、他の糖鎖抗原で得られた単鎖抗体の精製と解析¹³³も達成した。

B. Man3-DPPE

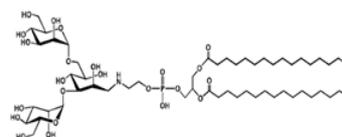


図 3-26 人工糖脂質の合成 (A) とマンノトリオース抗原 (Man3-DPPE) (B)¹³²

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Sakai K., Shimizu Y., Chiba T., Matsumoto-Takasaki A., Kusada Y., Zhang W., Nakata M., Kojima N., Toma K., Takayanagi A., Shimizu N., Fujita-Yamaguchi Y., Isolation and

¹³² 研究終了報告書 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei15/tousa/yamaguchi.pdf

¹³³ Matsumoto-Takasaki A., Horie J., Sakai K., Furui Y., Sato R., Kawakami H., Toma K., Takayanagi A., Shimizu N., Fujita-Yamaguchi Y., Isolation and characterization of anti-T-antigen single chain antibodies from a phage library (2009) Bioscience Trends, 3, pp. 87-95.

characterization of phage-displayed single chain antibodies recognizing non-reducing terminal mannose residues. 1. A new strategy for generation of anti-carbohydrate antibodies (2007) *Biochemistry*, 46, pp. 253-262.

[2] Zhang W., Matsumoto-Takasaki A., Kusada Y., Sakaue H., Sakai K., Nakata M., Fujita-Yamaguchi Y., Isolation and characterization of phage-displayed single chain antibodies recognizing non-reducing terminal mannose residues. 2. Expression, purification, and characterization of recombinant single chain antibodies (2007) *Biochemistry*, 46, pp. 263-270.

[3] Yuasa N., Iida N., Sakaue H., Wilczynski S., Fujita-Yamaguchi Y., Construction of a recombinant single chain antibody recognizing nonreducing terminal mannose residues applicable to immunohistochemistry (2007) *Bioscience Trends*, 1, pp. 108-112.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、科学研究費用助成金基盤研究(C)「新規糖鎖特異的単鎖抗体の大腸菌発現系による大量発現と糖鎖結合性解析」(2010~2013)において、取得した糖鎖特異的ヒト型単鎖抗体(scFv)の精製と詳細な構造及び結合性解析を進めた。まず、初期に作製に成功した高い親和性を有する抗 Man3 抗体の哺乳細胞での発現が著しく下がったことから、解析を進め、Man3 に対する scFv-Fc が小胞体内で糖タンパク質の生合成を阻害することで抗体生産性の高い細胞が淘汰される可能性を示唆した^[1]。大腸菌での可溶性 scFv の大量調製は困難であったため¹³⁴、リフォールディング法を改良し、抗 Man3、抗 T 抗原 scFvs を大腸菌発現系から回収した封入体より十分量の精製 scFvs を得て、SPR、NMR による抗原結合性の解析に成功した¹³⁵、^[3]、^[4]。一方、抗 T 抗原 scFvs に関しては、昆虫細胞で可溶性 scFvs として精製・解析に成功した^[2](表 3-1)。

さらに、本研究課題と同時進行で既存の糖鎖特異的モノクローナル抗体 MLS128 の研究を開始した結果、がん細胞増殖阻害、MLS128 scFv の作成、大腸がん細胞から MLS128 結合性糖タンパク質(110 kDa GP)の同定と解析研究が進展した¹³⁶、¹³⁷、¹³⁸。

¹³⁴ Sakai K., Yuasa N., Tsukamoto K., Takasaki-Matsumoto A., Yajima Y., Sato R., Kawakami H., Mizuno M., Takayanagi A., Shimizu N., Nakata M., Fujita-Yamaguchi Y., Isolation and characterization of antibodies against three consecutive Tn-antigen clusters from a phage library displaying human single-chain variable fragments. (2010) *Journal of Biochemistry*, 147(6), pp. 809-817.

¹³⁵ 科学研究費事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/22570125.ja.html>

¹³⁶ Yuasa N., Ogawa H., Koizumi T., Tsukamoto K., Matsumoto-Takasaki A., Asanuma H., Nakada H., Fujita-Yamaguchi Y., Construction and expression of anti-Tn-antigen-specific single chain antibody genes from hybridoma producing MLS128 monoclonal antibody (2012) *Journal of Biochemistry*, 151, pp. 371-381.

¹³⁷ Matsumoto-Takasaki A., Hanashima S., Aoki A., Yuasa N., Ogawa H., Sato R., Kawakami H., Mizuno M., Nakada H., Yamaguchi Y., Fujita-Yamaguchi Y., Surface plasmon resonance and NMR analyses of anti Tn-antigen MLS128 monoclonal antibody binding to two or three consecutive Tn-antigen cluster (2012) *Journal of Biochemistry*, 151, pp. 273-282.

¹³⁸ Yuasa N., Ogawa H., Koizumi T., Tsukamoto K., Matsumoto-Takasaki A., Asanuma H., Nakada H., and Fujita-Yamaguchi Y., Construction and expression of anti-Tn-antigen-specific single chain antibody genes from hybridoma producing MLS128 monoclonal antibody (2012) *Journal of Biochemistry*, 151, pp. 371-381.

表 3-1 発現・精製・解析のまとめ

(提供: Beckman Research Institute of City of Hope 山口陽子)

Reference [2] & [4] 以外は、研究課題の研究領域終了後から現在までの成果

Clone (Probe used for screening)	Antibody constructs expressed	Cells used for expression	Outcome	Reference 研究領域終了後
1A4, 1G4 (Man3-DPPE)	scFv-Fc/pEE12.4	NS0	No clone	[2]
1A4, 1G4 (Man3-DPPE)	scFv-Fc/pCI-neo	CHO	No clone	[2]
5A3 (Man3-DPPE)	scFv-Fc/pEE12.4	NS0	One clone	[2]
1F12 (Le ^x ;LNFPIII-DPPE)	scFv-Fc/pEE12.4	NS0	One clone	1
3F1 (Le ^x ;LNFPIII-DPPE)	scFv-Fc/pEE12.4	NS0	No clone	1
1G11 (T-antigen E6-BDB)	scFv/phagimid	<i>E. coli</i> TOP10 ⁺ FS	Soluble	[4]
4E10, 4G2 (Tn3-peptide)	scFv/phagimid	<i>E. coli</i> TOP10 ⁺ FS	Soluble	139
5A3, 5C10	GST-scFv/pGX-4T-1	<i>E. coli</i> BL21	Soluble	[2]
1A4, 1G4, 5A3 (Man3-DPPE)	scFv/pET22	<i>E. coli</i> BL21	Inclusion bodies	4
1E6, 1E8 (T-antigen E6-BDB)	scFv/pET22	<i>E. coli</i> BL21	Inclusion bodies	3
1E8, 1E6 (T-antigen E6-BDB)	scFv/pMT/Bip/V5-HIS	<i>Drosophila</i> S2	Soluble	2

① 科学技術の進歩への貢献

ファージを利用して生体外で糖鎖結合性の高い抗体作成を目指し、 10^{-9} M オーダーの高い結合性を有する抗 Man3 抗体及び抗 Le^x 抗体の作製に成功した。ファージ由来及び既存のモノクローナル抗体の解析も進めた結果、がん関連糖鎖としての Tn 抗原 (GalNAc α -Ser/Thr)¹³⁴ 及び T 抗原 (Gal β 1-3GalNAc α -1-Ser/Thr)^{[2][3]} との抗体結合性に関して新知見を得た^{136、137、138}。

② 社会・経済への波及効果

ファージディスプレイ法により新規ヒト型単鎖抗体の取得に成功したことから、がんを標的にした治療薬の開発に繋がると期待できる。中でも、 10^{-9} M オーダーの高い結合性を有する抗 Man3 抗体は、これまでに生体免疫では獲得できなかったものである。さらに、がん関連糖鎖抗原である Tn 及び T 抗原と結合性のある単鎖抗体の開発に成功したことから、がん細胞に特異的なヒト型抗体の応用への道が開かれた。従来の動物性免疫による抗原性の強い抗原に対する抗体ではなく、糖鎖抗原に対しても特異的なヒト型抗体を得る手法を確立したことで、今後の糖鎖関連抗体医薬品、診断薬の開発につながる可能性がある。

本研究領域で開発したファージディスプレイ法により得た糖鎖抗原抗体の解析方法について、国内特許が成立している¹³⁹。

¹³⁹ 中田宗宏、山口陽子、酒井恵子、清水佳隆、千葉朋希、清水信義、高柳淳、糖結合性ファージ提示型抗体の解析方法、特願 2004-243198 (2004/8/24 出願)、特開 2006-58260 (2006/3/2 公開)、特許第 4524414 号 (2010/6/11 登録)

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文 4 報以内

- [1] Yuasa N., Zhang W., Goto T., Sakaue H., Matsumoto-Takasaki A., Kimura M., Ohshima H., Tsuchida Y., Koizumi T., Sakai K., Kojima T., Yamamoto K., Nakata M., Fujita-Yamaguchi Y., Production of anti-carbohydrate antibodies by phage-display technologies: Potential impairment of cell growth as a result of endogenous expression (2010) *Journal of Biological Chemistry*, 285, pp. 30587-30597.
- [2] Yuasa N., Koyama T., Subedi G.P., Yamaguchi Y., Matsushita M., Fujita-Yamaguchi Y., Expression and structural characterization of anti-T-antigen single chain antibodies (scFvs) and analysis of their binding to T-antigen by surface plasmon resonance and NMR spectroscopy (2013) *Journal of Biochemistry*, 154, pp. 521-529.
- [3] Yuasa N., Koyama T., Fujita-Yamaguchi Y., Purification and refolding of anti-T-antigen single chain antibodies (scFvs) expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies (2014) *Bioscience Trends*, 8(1), pp. 24-31.
- [4] Matsumoto-Takasaki A., Yuasa N., Katagiri D., Koyama T., Sakai K., Zamri N., Phung S., Chen S., Nakada H., Nakata M., Fujita-Yamaguchi Y., Characterization of three different single chain antibodies recognizing nonreducing terminal mannose residues expressed in *Escherichia coli* by an inducible T7 expression system (2011) *Journal of Biochemistry*, 150, pp. 439-450.

3.3 2004 年度採択課題

3.3.1 糖鎖の動態—機能相関への統合的アプローチ(木下タロウ)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

糖鎖の動態と機能の相関に統合的にアプローチするため、図 3-27 に示すように、糖鎖動態を時間的流れに沿って、生合成時の動態、膜上動態、プロセッシングの動態に分け、各相における機能との相関を捉えることを目指した。対象として、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカー、N-、O-グリカン、グリコサミノグリカンを取り上げ、機能との相関の解明と病態解明への展開を図った¹⁴⁰。このうち GPI アンカーは、酵母から哺乳類に至るまで真核生物において広く保存されている、小胞体で合成される糖脂質で、ヒトだけでも 150 種以上の膜タンパク質の膜結合に用いられており、本研究領域の中心的研究対象とした¹⁴⁰。

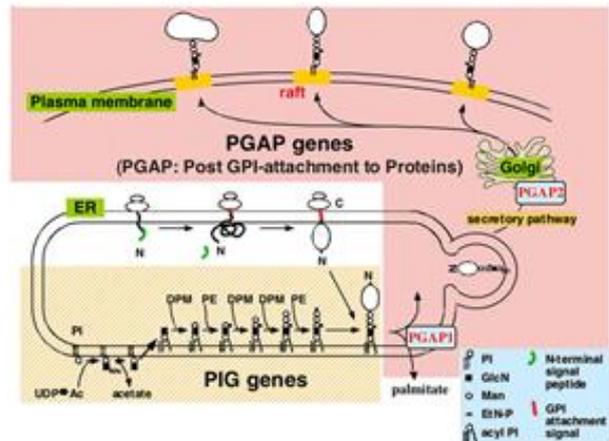


図 3-27 GPI アンカー型タンパク質

② 期間中の研究成果

(i) 先天性 GPI アンカー欠損症の発症機序の解明

共同研究先の英国グループから先天性 GPI アンカー欠損症の 2 家系から樹立した B 細胞株の提供を受け、欠損ステップの特定、原因遺伝子の決定、突然変異の同定により突然変異が遺伝子発現の低下をもたらすメカニズムの解析を行った。その結果、この先天性 GPI アンカー欠損症は、マンノース転移酵素である PIGM 遺伝子のプロモーター領域が変異することにより、好中球や B 細胞など特定の細胞種で、小胞体における GPI アンカーの生合成が著しく低下するために起こっていることが明らかになった^{140, [1]}。

(ii) 糖鎖生合成に関連する先天性 GPI アンカー欠損症の治療法の確立

先天性 GPI アンカー欠損症では、マンノース転移酵素である PIGM 遺伝子のプロモーター領域の点変異がヒストン H4 のアセチル化の低下を起し、その結果 PIGM の転写の低下を来すことを見出した。そこで患者由来の B 細胞株を、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である Butyrate の存在下で培養したところ、ヒストン H4 のアセチル化が回復し、PIGM の転写が回復して細胞表面の GPI アンカー型タンパク質の発現が正常化した。この結果をもとにして、英国の共同研究者が先天性 GPI アンカー欠損症の治療に Butyrate を用いたところ、症状の著しい改善が認められた^{140, [2]}。

¹⁴⁰ 研究終了報告書 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei16/tousa/01kinoshita.pdf

(iii) 糖鎖の膜上動態と機能発現

小胞体の GPI アンカー型タンパク質は、GPI アンカー部分の不飽和脂肪酸がゴルジ体膜上で PGAP2 と PGAP3 遺伝子により脂肪酸リモデリングを受けること、さらにゴルジ体への輸送時には PGAP5 遺伝子により糖鎖リモデリングを受けることを発見した。また、脂肪酸リモデリングが脂質ラフトへの濃縮に必須な現象であることを証明して、膜アンカーに脂質と複雑な糖鎖が含まれている意義のひとつを明らかにした^{140, [3]}。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Almeida A., Murakami Y., Layton M., Hillmen P., Sellick G.S., Maeda Y., Richards S., Patterson S., Kotsianidis I., Mollica L., Crawford D., Baker A., Ferguson M., Roberts, I., Houlston R., Kinoshita T., Karadimitris A., Hypomorphic promoter mutation in the mannosyltransferase-encoding PIG-M gene causes inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency (2006) *Nature Medicine*, 12, pp. 846-851.
- [2] Almeida A.M., Murakami Y., Baker A., Maeda Y., Roberts I.A.G., Kinoshita T., Layton D.M., Karadimitris A., Targeted therapy for inherited GPI deficiency (2007) *New England Journal of Medicine*, 356, pp. 1641-1647.
- [3] Maeda Y., Tashima Y., Houjou T., Fujita M., Yoko-o T., Jigami Y., Taguchi R., Kinoshita T., Fatty acid remodeling of GPI-anchored proteins is required for their raft association (2007) *Molecular Biology of the Cell*, 18, pp. 1497-1506.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、科学研究費補助金基盤研究(A)「タンパク質 GPI アンカーの構造変化の分子機構と機能との相関の解明」(2009~2014)を獲得した¹⁴¹。また、先天性 GPI アンカー欠損症の研究は、大阪大学微生物病研究所の村上良子らと共同で、科学研究費補助金基盤研究(C)「GPI アンカー欠損症の分子病態の解明」(2011~2014)により継続し、26 個の遺伝子が GPI アンカー型タンパク質の生合成や修飾に必要であることを明らかにした¹⁴²。この GPI アンカー欠損症は新規の難治疾患として認知され、厚労科研費による難治性疾患克服研究事業の研究班「先天性 GPI 欠損症の疾患概念の確立と診断基準の制定：発達障害・てんかんを主症状とする新しい疾患」(2014~)が本研究領域木下グループの大阪大学微生物病研究所の村上良子を研究代表者として立ち上がり、病態解明と診断法確立に向けた全国的な研究にまで広がった¹⁴³。また、同様に本研究領域木下グループの大阪大学微生物病研究所の神澤範行を中心に科学研究費補助金基盤研究(B)「ペルオキシソーム病における GPI アンカー生合成異常の病因的意義の解明」(2011~2012)が行われ、ペルオキシソーム病と GPI アンカーの脂質部分の構造との関連性を見出した¹⁴⁴。一方、弘前大学の大山

¹⁴¹ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/21247018.ja.html>

¹⁴² 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/23590363.ja.html>

¹⁴³ 厚生労働省科学研究費

<http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/hokabunya/kenkyujigyuu/hojokin-koubo-h26/gaiyo/13.html>

¹⁴⁴ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/23790365.ja.html>

力を研究責任者とした A-STEP 探索タイプ「前立腺がんの過剰診断を克服する診断マーカーの開発」(2011) による実用化研究も進められた¹⁴⁵。

①科学技術の進歩への貢献

本研究領域終了後の GPI アンカー欠損症に注目した研究により、図 3-28 に示すように、欠損症例が確認された GPI アンカー生成遺伝子は既に 12 遺伝子に及ぶ。PIGW 突然変異に起因する精神遅滞症候群を伴うウエスト症候群および高ホスファターゼ症^[1]、PGAP3 遺伝子の変異による高アルカリホスファターゼ血症を伴う知的障害とてんかんを特徴とする疾患^[2]、PGAP1 遺伝子の変異による知的傷害^[3]などを明らかにした。

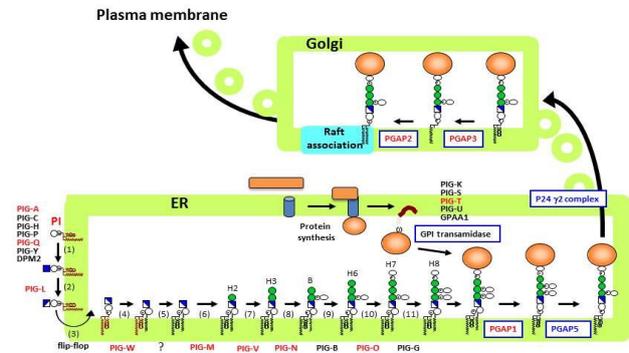
また、遺伝性 GPI アンカー欠損症を誘発する遺伝子に関する研究も進め、小胞体(ER)において GPI アンカー生成に関わっている PIGV 又は PIGO 遺伝子が突然変異を起こしている遺伝性 GPI アンカー欠損症として、高ホスファターゼ症-精神遅滞症候群(HPMR、又は Mabry 症候群)を同定した。この疾患に関して、ドイツ及びデンマークの研究グループと共同研究を行い、ゴルジ体における GPI-APs の脂肪酸リモデリングに関わる PGAP2 が、この疾患に関連することを報告した^[4]、¹⁴⁶、¹⁴⁷。先天性 GPI 欠損症は日本では 100 例程度の希少病であるが、原因となる変異遺伝子を特定して治療法を導く研究において、木下らの研究は世界の先端を進んでおり、さらに関連疾患と治療法が発見される可能性もある¹⁴²。

GPI アンカー型タンパク質は、代表的な脂質ラフト構成成分であるが、それが脂質ラフトに局在しない場合の機能発現は明らかでなかった。そこで本研究領域終了後に、GPI アンカー型タンパク質の脂質ラフト局在に必要な PGAP3 遺伝子のノックアウトマウスを作成し、GPI アンカーの脂肪酸リモデリングのメカニズムと生物学的意義について解析した。その結果、脂肪酸リモデリングが液性免疫系の恒常性維持に重要であることが明らかとなった^[2]。そのメカニズムに関しては、腹腔マクロファージによるアポトーシス細胞の除去が低下していること、および Th2 細胞への偏りがあるためであることがわかった。

②社会・経済への波及効果

本研究で発見した糖鎖分解新規経路が、基礎的な生物学的素過程であると認知され、糖鎖生物学の教科書に取り入れられた¹⁴⁸。

先天性GPI欠損症の発見、変異遺伝子の確定と機能評価、病態解明、治療法開発で世界をリード (木下チーム)



赤字の12遺伝子:欠損症例がすでに見つかったGPIアンカー生成遺伝子

図 3-28 GPI アンカー生成遺伝子 (提供:大阪大学、木下タロウ)

¹⁴⁵ JST A-STEP http://www.jst.go.jp/a-step/hyoka/tansaku_h2502/tansaku_f.html

¹⁴⁶ Krawitz P.M., Murakami Y., Riess A., Hietala M., Kruger U., Zhu N., Kinoshita T., Mundlos S., Hecht J., Robinson P.N., Horn D., PGAP2 mutations, affecting the GPI-anchor-synthesis pathway, cause hyperphosphatasia with mental retardation syndrome (2013) American Journal of Human Genetics, 92, pp. 584-589.

¹⁴⁷大阪大学免疫学フロンティア研究センター Annual Report of IFRec FY 2013 http://www.ifrec.osaka-u.ac.jp/en/publications/annual_rep_2013.pdf

¹⁴⁸ Essential Glycobiology (A. Varki, eds) 2nd edition

また、前立腺特異抗原(PSA)の糖鎖識別による革新的前立腺がん検査法が、木下チームの弘前大学医学部泌尿器科の大山力と大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター研究所長の和田芳直との共同で実用化されつつある。PSA は前立腺がんマーカーとしてリスク評価にも使用されているが、従来は PSA タンパク質が測定の対象物質である。新たに糖鎖の違いに注目し、抗 PSA 抗体(抗タンパク質抗体)と抗 $\alpha 2, 3$ 抗体(抗糖鎖抗体)をサンドイッチ様に組み合わせて、特異的に前立腺がんを検出することに成功した¹⁴⁹。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文 4 報以内

- [1] Chiyonobu T., Inoue N., Morimoto M., Kinoshita T., Murakami Y.,
Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor deficiency caused by mutations in PIGW is associated with West syndrome and hyperphosphatasia with mental retardation syndrome (2014) *Journal of Medical Genetics*, 51(3), pp. 203-207.
- [2] Howard M. F., Murakami Y., Pagnamenta A. T., Daumer-Haas C., Fischer B., Hecht J., Keays D. A., Knight S. J., Kölsch U., Krüger U., Leiz S., Maeda Y., Mitchell D., Mundlos S., Phillips J. A. 3rd., Robinson P. N., Kini U., Taylor J. C., Horn D., Kinoshita T., Krawitz P. M., Mutations in PGAP3 impair GPI-anchor maturation, causing a subtype of hyperphosphatasia with mental retardation (2014) *American Journal of Human Genetics*, 94(2), pp. 278-287.
- [3] Murakami Y., Tawamie H., Maeda Y., Büttner C., Buchert R., Radwan F., Schaffer S., Sticht H., Aigner M., Reis A., Kinoshita T., Jamra R. A., Null mutation in PGAP1 impairing Gpi-anchor maturation in patients with intellectual disability and encephalopathy (2014) *PLoS Genetics*, 10(5), pp. e1004320.
- [4] Hansen L., Tawamie H., Murakami Y., Mang Y., Ur Rehman S., Buchert R., Schaffer S., Muhammad S., Bak M., Nothen M. M., Bennett E. P., Maeda Y., Aigner M., Reis A., Kinoshita T., Tommerup N., Baig S. M., Abou Jamra R., Hypomorphic mutations in PGAP2, encoding a GPI-anchor-remodeling protein, cause autosomal-recessive intellectual disability (2013) *American Journal of Human Genetics*, 92, pp. 575-583.

¹⁴⁹ A-STEP ホームページ http://www.jst.go.jp/a-step/hyoka/tansaku_h2502/tansaku_f.html

3.3.2 糖鎖シグナルによる獲得免疫応答制御の解明と疾患制御への応用（鏗田武志）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

Bリンパ球に発現するシグナル制御機能をもつ膜型レクチン分子CD22/Siglec-2及びCD72とその糖鎖リガンドに着目し、獲得免疫応答におけるこれらの分子の役割を明らかにすることにより、獲得免疫応答における糖鎖シグナルとそのレセプターの重要性を明らかにし、改変糖鎖リガンドを用いた免疫制御法の開発を行うことを目指した¹⁵⁰ (図3-29¹⁵¹)。

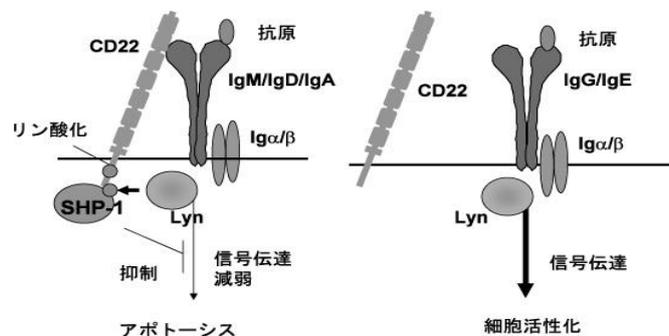


図3-29 CD22によるシグナル制御¹⁵¹

②期間中の研究成果

(i) CD22/Siglec-2の機能解明

CD22/Siglec-2 (B細胞抗原受容体シグナルの負の制御因子) 欠損マウスの抗体産生応答について詳細な検討を行った。CD22/Siglec-2欠損ナイーブB細胞がin vivoでの抗原刺激による免疫応答の際に記憶B細胞のように迅速に活性化・増殖し、抗体産生を行うことを発見した。このことから、CD22/Siglec-2の機能を阻害することによりナイーブB細胞が記憶B細胞様の反応性を獲得できることが示された^{150, [1]}。

(ii) CD22/Siglec-2 制御化合物の開発

CD22/Siglec-2は $\alpha 2,6$ シアル酸に結合することが知られている。Neu5Gc $\alpha 2,6$ Galのシアル酸の9位を修飾した種々の化合物を合成し、CD22/Siglec-2にIC₅₀が数 μ Mで結合する優れた化合物の開発に成功し、この化合物を用いて高感度にCD22に結合する化合物の親和性を測定するELISAを開発した。さらにシアル酸の2位にベンジル基を導入することで、ヒトおよびマウスCD22に高い親和性 (IC₅₀が0.1 μ M程度) で結合するシアル酸誘導体GSC-718の合成に成功した^[2] (図3-30)。

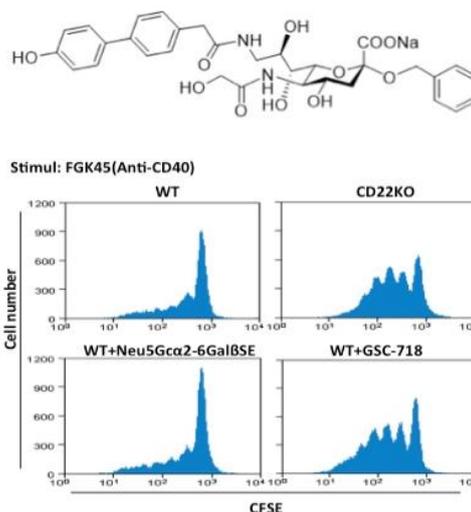


図3-30 CD22/Siglec-2に高親和性で結合するシアル酸誘導体GSC-718

(提供：東京医科歯科大学 鏗田武志)

¹⁵⁰ 研究終了報告書 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei16/tousa/02tsubata.pdf

¹⁵¹ 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部免疫学研究室 <http://sbsn.tmd.ac.jp/jpn/research/faculty/jpn-007.html>

(iii) CD72 の機能解析

CD72 の機能を解析するため、CD72 の 4 つのハプロタイプのうち NOD. CD72^b のコンジェニックマウスを樹立したところ、メスで糖尿病の発症が顕著に増加した。染色体領域では、B 細胞機能に関わる Pax5、Munc13-2 遺伝子の発現が、NOD. CD72^b マウスと 1 型糖尿病を自然発症する nonbese diabetic (NOD) マウスとで差がなかったため、CD72^b が糖尿病の発症を増強することが示唆された^[3]。また、NOD. CD72^b マウスは糖尿病発症頻度が高く、1 型糖尿病の病態解析や治療法開発の有用なモデルとなることが示された¹⁵⁰。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Onodera T., Poe J.C., Tedder T.F., Tsubata T., CD22 regulates time course of both B cell division and antibody response. (2008) *Journal of Immunology*, 180, pp. 907-913.
- [2] Abdu-Allah H.H.M., Tamanaka T., Yu J., Lu Z., Sadagopan M., Adachi T., Tsubata T., Kelm S., Ishida H. and Kiso M., Design, synthesis, and structure-activity relationships of novel series of sialosides as CD22-specific inhibitors (2008) *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, pp. 6665-6681.
- [3] Hou R., Ohtsuji M., Ohtsuji N., Zhang L., Adachi T., Hirose S., Tsubata T., Centromeric interval of chromosome 4 derived from C57BL/6 mice accelerates type 1 diabetes in NOD. CD72^b congenic mice (2009) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380, pp. 193-197.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

科学研究費補助金新学術領域研究(研究領域提案型)「B リンパ球における受容体エンドサイトーシスとエンドソームシグナリングの統合的理解」(2011~2013)¹⁵²、科学研究費補助金基盤研究(B)「B リンパ球レクチンの糖鎖認識と機能」(2011年~2014)¹⁵³、厚生労働科学研究費補助金「新規コンセプトによる炎症を誘導しないワクチン用免疫増強剤の開発」(2013~2015)¹⁵⁴、科学研究費補助金基盤研究「B リンパ球に発現するシグレックとその糖鎖リガンドについての研究」(2014~2017)¹⁵⁵で、膜型レクチン分子による B 細胞活性化の制御をテーマとし、B リンパ球抗原受容体を介するシグナル伝達を負に制御する膜型レクチン分子 CD22/シグレック 2、その分子と機能重複する CD72 のシグナル制御のしくみ、さらに急性感染症への抵抗性やニューロパチーとの関係を解明する研究を進めている^{151, 152}。また、B リンパ球のアポトーシス制御と自己免疫についての研究をテーマとして、CD40 の関与についても解明を進めている¹⁵⁵。

¹⁵² 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/23113709.ja.html>

¹⁵³ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/23390063.ja.html>

¹⁵⁴ 厚生労働省科学研究費

<http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/hokabunya/kenkyujigyou/hojokin-koubo-h25/gaiyo/05.html>

¹⁵⁵ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/26293062.ja.html>

①科学技術の進歩への貢献

本研究領域で開発した B リンパ球で発現する CD22/Siglec-2 の阻害剤 GSC718 は、自然界のリガンドに比べて 1 万倍以上高い親和性で結合する¹⁵⁶。本研究領域終了後、本薬剤の類似化合物について、CD22/Siglec-2 と類似の Siglec-4/MAG(myelin-associated glycoprotein) との比較による選択性のドッキングシミュレーション解析および CD22 阻害活性の生物学的解析により調べた。その結果、CD22 に強い親和性を持つ糖鎖の 2-6Gal10MP 残基は結合プロセスに重要ではなく、非糖鎖成分に置換できることが新たに明らかになり、次世代 CD22 阻害剤デザインへの新たな方向性が示された^[1]。

本研究領域で明らかにした CD72 の自己免疫の制御や多糖抗原への免疫応答への関与に関する研究を進め、C57BL/6 (B6) マウスに MRL マウスに CD72^c を導入して作製した B6. CD72^c コンジェニックマウスにより自己免疫疾患の症状を見たところ、B6. CD72^c マウスは症状を示さなかったが、B6. CD72^c/1pr マウスは中等度の発症をした。同様に CD72^b を発現する MRL コンジェニックマウスを作製し自己免疫疾患の症状を見たところ、MRL/1pr マウスに比べ、MRL. CD72^b/1pr マウスでは症状が減弱化した。この結果、CD72^c 自身は自己免疫疾患を誘導しないが、1pr 変異による発症を修飾する修飾遺伝子であることがわかった。CD72 はヒトでも多型が知られており、自己免疫性リンパ増殖症候群 (ALPS) における修飾遺伝子として機能していることが示唆された^{157, [3]}。

そこで、ヒトの CD72 多型の研究を行い、自己免疫疾患防御的 CD72 ハプロタイプと他の CD72 ハプロタイプにおける血清免疫グロブリンレベルの比較やスプライスアイソフォームである CD72f1 (full-length CD72) と CD72 Δ ex8 (CD72 splicing isoform that lacks exon 8) の発現レベルの比較などの結果、ヒト CD72 多型は、小胞体局在 CD72 Δ ex8 タンパク質の発現制御により全身性エリテマトーデス (SLE) への感受性だけでなく抗体産生も調節していることが示唆された^[2]。

②社会・経済への波及効果

B 細胞における CD22 機能を抑制することから成る免疫応答の促進方法¹⁵⁸ および CD22 分子に対する高親和性を有し B 細胞の増殖を増強する化合物¹⁵⁹ は国際出願を行い、前者については国内で特許登録が得られている。炎症をおこさないアジュバントは、副作用を伴わないワクチンアジュバントとして用いることができ、製品化できれば、社会的・経済的なインパクトは大きいと期待される。現在、厚生労働科学研究費補助金「新規コンセプトによる炎症を誘導しないワクチン用免疫増強剤の開発」(2013~2015) および製薬会社との共同研究¹⁶⁰ により、開発を進めている。

NOD. CD72^b マウスは国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所医薬基盤研究所実験動物資源

¹⁵⁶ 東京医科歯科大学難治疾患研究所年報 2014

<http://www.tmd.ac.jp/mri/guide/pamphlet/data/annualreport/2014j.pdf>

¹⁵⁷ 東京医科歯科大学難治疾患研究所年報 2013

<http://www.tmd.ac.jp/mri/guide/pamphlet/data/annualreport/2013j.pdf>

¹⁵⁸ 鏑田武志、小野寺大志、B 細胞における CD22 機能を抑制することから成る免疫応答の促進方法、

PCT/JP2007/074634 (2007/12/21 出願)、W008/078673 (2010/4/22 公開)、特許第 05243269 号 (2013/4/12 登録)、出願人：独立行政法人科学技術振興機構

¹⁵⁹ 鏑田武志、木曾真、石田秀治、アブドゥ・アラ ハジヤジ ハッサン モハメッド、CD22 分子に対する高親和性を有し B 細胞の増殖を増強する化合物、PCT/JP2010/054406 (2010/3/16 出願)、特開 2011-032180 (2011/2/17 公開)、出願人：国立大学法人岐阜大学、独立行政法人科学技術振興機構

¹⁶⁰ 文部科学省・大学間 GP「大学間連携共同教育推進事業」課題発見・解決型 Ph.D プログラム疾患予防科学コース・領域「東京医科歯科大：免疫の不思議から疾患予防へ 鏑田研究室」

http://gks.tmd.ac.jp/dpsc/?page_id=1224

バンクに登録されている¹⁶¹。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文 4 報以内

- [1] Abdu-Allah H.H., Watanabe K., Completo G.C., Sadagopan M., Hayashizaki K., Takaku C., Tamanaka T., Takematsu H., Kozutsumi Y., Paulson J.C., Tsubata T., Ando H., Ishida H., Kiso M., CD22-antagonists with nanomolar potency: The synergistic effect of hydrophobic groups at C-2 and C-9 of sialic acid scaffold (2011) *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19, pp. 1966-1971.
- [2] Hitomi Y., Adachi T., Tsuchiya N., Honda Z., Tokunaga K., Tsubata T., Human CD72 splicing isoform responsible for resistance to systemic lupus erythematosus regulates serum immunoglobulin level and is localized in endoplasmic reticulum (2012) *BMC Immunology*, 13, 72.
- [3] Xu M., Hou R., Sato-Hayashizaki A., Man R., Zhu C., Wakabayashi C., Hirose S., Adachi T., Tsubata T., Cd72^c is a modifier gene that regulates Fas^{lpr}-induced autoimmune disease (2013) *Journal of Immunology*, 190(11), pp. 5436-5445.

¹⁶¹ 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所医薬基盤研究所実験動物資源バンク
http://animal.nibio.go.jp/j_nodcd72b.html

3.3.3 糖修飾システムによる神経機能の発現・制御 (平林義雄)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

膜糖脂質の脂質分子のグルコース化の機構を知ることを目的として、セラミドのグルコース化に関わるグルコシルセラミド合成酵素(GlcT-1)の個体レベルでの機能を、マウス、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュを用いて解析し、多様な膜糖脂質の中樞神経系での生理機能を明らかにすることを旨とした¹⁶² (図 3-31)。

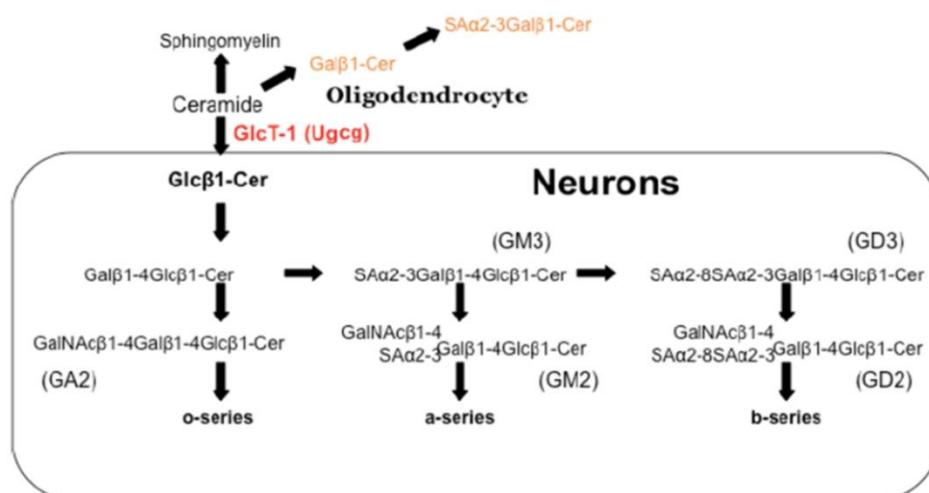


図3-31 神経系のスフィンゴ糖脂質合成経路。グルコシルセラミドは、ニューロンに存在する全てのシアル酸含有糖脂質(ガングリオシド)の合成に関わる前駆体糖脂質である¹⁶²。

②期間中の研究成果

(i) 膜糖脂質である発達期放射状グリア細胞に特異的に発現する新規ホスファチジルグルコシド(PtdGlc)の構造およびその特性解析

HL60 細胞由来の脂質ラフト画分をマウスに免疫して得た単クローン抗体(DIM21)を使い、ラット胎仔脳より、DIM21 陽性糖脂質である新規 PtdGlc を単離・精製し、その完全化学構造を決定した。膜糖脂質である新規 PtdGlc は、グリセロール骨格の sn-1 に C18:0、sn-2 に C20:0 を含む単一分子種として発達期の放射状グリアに時期特異的に発現していることを明らかにした^[1] (図 3-32)。

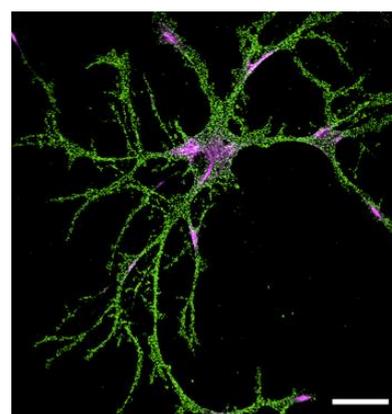


図 3-32 DIM21 抗体による培養アストログリア細胞の免疫染色¹⁶²

(ii) 膜糖脂質におけるグルコース代謝制御メカニズムの解析

ショウジョウバエ Bride of sevenless (BOSS) は、G タンパク質共役受容体 (GPCR) ファミリーに属する生理機能未知の 7 回膜貫通型糖タンパク質である。セラミドのグルコース化に関わる

¹⁶² 研究終了報告書 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei16/tousa/03hirabayashi.pdf

GlcT-1 の個体レベルでの生理機能を明らかにするため、BOSS が哺乳動物であるマウスの脂肪組織に相当する脂肪体に強発現し、細胞外グルコースに応答する機能タンパク質(脂質ラフトに存在)であることを明らかにした。欠損変異体では、血リンパ液中の糖と脂質量が増加しており、インスリンシグナル伝達が破壊されたハエと類似していた。BOSS は、膜糖脂質において生体全体のグルコースの蓄積と消費バランスを調整する機能を有していると想定され、糖脂質代謝に関わる肥満や糖尿病などの疾患の理解と新たな治療法の開発に貢献すると期待された^[2](図 3-33)。

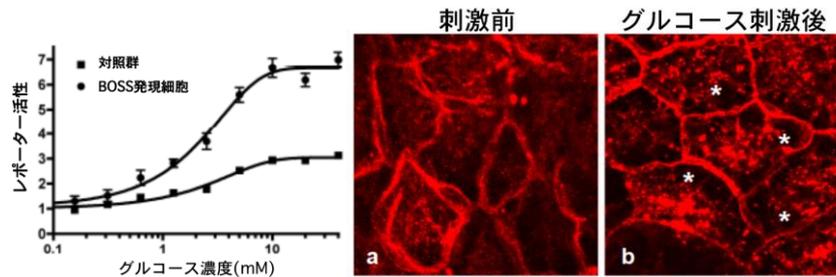


図 3-33 BOSS 受容体は細胞外グルコース濃度変化に応答する¹⁶²

(iii) マウス胎仔脳における膜糖脂質である新規 PtdGlc の細胞内外情報伝達機能とその特性

先の研究^[1]で、マウス胎仔脳内に PtdGlc の存在を同定し構造を明らかにしてきた。更に、その特性について明らかにするため、特異抗体を用いた網羅的な組織発現解析により、PtdGlc がマウス胎児期の神経幹細胞、アストログリア系譜の細胞膜表面に発現していることを明かにした。また、生後の第三脳室 SVZ 領域に存在する神経幹細胞に存在が確認された。PtdGlc は脂質ラフトに局在し、その特異抗体で刺激すると、EGF 受容体を介した神経細胞内外情報伝達経路を活性化し、アストログリアへの分化を促すことから、PtdGlc は膜糖脂質において神経系細胞の分化制御に重要な細胞内外情報伝達機能を果たすことが示された^[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Nagatsuka Y., Horibata Y., Yamazaki Y., Kinoshita M., Shinoda Y., Hashikawa T., Koshino H., Nakamura T., Hirabayashi Y., Phosphatidylglucoside exists as a single molecular species with saturated fatty acyl chains in developing astroglial membranes (2006) *Biochemistry*, 45(29), pp. 8742-8750.
- [2] Kohyama-Koganeya A., Kim Y. J., Miura M., Hirabayashi Y., A Drosophila orphan G-protein coupled receptor BOSS functions as a glucose-responding receptor. Loss of boss causes abnormal energy metabolism (2008) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, pp. 15328-15333.
- [3] Kinoshita M. O., Furuya S., Ito S., Shinoda Y., Yamazaki Y., Greimel P., Ito Y., Hashikawa T., Machida T., Nagatsuka Y., Hirabayashi Y., Lipid rafts enriched in phosphatidylglucoside direct astroglial differentiation by regulating tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptors (2009) *Biochemical Journal*, 419, pp. 565-575.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、科学研究費補助金新学術領域研究(研究領域提案型)

「新規グルコース化脂質分子による神経ガイダンス制御:(2012~2014)¹⁶³

にて、神経系における新機能グルコース化脂質を発見した(図 3-34)。その糖脂質は、これまで知られていたスフィンゴ糖脂質を中心とする脂質ラフトではなく、別の脂質ラフトを形成しており、神経細胞の分化や、神経細胞の軸索の先端にある成長円錐の動きを制御するなど、新しい機能を持っていることが明らかにされてきた¹⁶⁴。

神経系における新機能グルコース化脂質の発見

飽和脂肪酸のみで構成された糖リン脂質を神経ラジアルグリア細胞に見出す

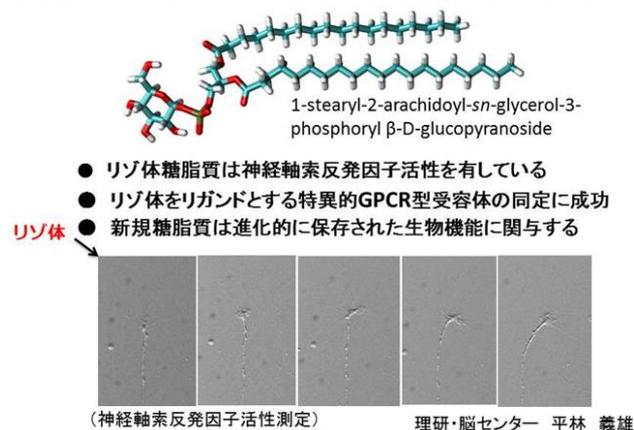


図 3-34 神経系における新機能グルコース化脂質の発見

(提供: 理化学研究所脳科学総合研究センター 平林義雄)

① 科学技術の進歩への貢献

本研究領域終了後、武藤らの研究¹⁶⁵と共に、遺伝性アルツハイマー病の原因遺伝子であるプレセニリン1の変異が、神経芽細胞腫においてGlcT-1を削減することにより、神経細胞内外の情報伝達に欠陥を与えていることを明らかにした^[1]。

また、本研究領域において、ショウジョウバエの体内中のグルコースと脂質代謝ホメオスタシスに関わる7回膜貫通型糖タンパク質(BOSS/GPRC5B)を見出し、これが脂質代謝のホメオスタシス維持機構に関わる重要な膜構成分子であることを明らかにした¹⁶²ことを受け、その後、BOSSがグルコース濃度の情報を細胞内に伝えるエネルギーセンサーの可能性があると明らかにした¹⁶⁶。2012年には、理化学研究所脳科学総合研究センター神経膜機能研究チームのYeon-Jeong Kim及び平林らは、脂肪細胞膜上にあるGタンパク質共役受容体GPRC5Bが脂質代謝を制御することを見出し、肥満による2型糖尿病の発症機構の理解及び新治療法の開発に貢献できる成果を発表した。この研究では、GPRC5Bの機能を探るため、GPRC5Bタンパク質複合体を精製し、GPRC5Bに結合する因子を同定した。その結果、GPRC5Bが脂質ラフトに局在し、細胞内外シグナルの伝達に重要な役割を担うチロシンリン酸化酵素Fynと結合してその酵素活性を制御することを見出し^[2]、更に、GPRC5Bは脂肪組織と中枢神経系に高い発現を示し、GPRC5B遺伝子欠損マウスは、野生型マウスに比して、高脂肪食を与えられても太らず、血糖値も正常な値を維持し、脂肪組織の慢性炎症も見られないことを見出した^[2]。これにより、細胞膜上の脂質ラフトに局在するGPRC5Bは、Fynと結合してその酵素活性を制御し、それらの細胞内外シグナル伝達システムが肥満や2型糖尿病の発症に重要な役割を果たしていることを明らかにした^{167, [2]}。

¹⁶³ 文部科学省科学研究費助成金ホームページ <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/24110519.ja.html>

¹⁶⁴ RIKEN NEWS 2013 May, pp. 8-11.

<http://www.riken.jp/~media/riken/pr/publications/news/2013/rn201305.pdf>

¹⁶⁵ 文部科学省科学研究費助成金ホームページ <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/17046021.ja.html>

¹⁶⁶ 理化学研究所広報プレスリリース <http://www.riken.jp/pr/press/2012/20080923/>

¹⁶⁷ 理化学研究所広報プレスリリース <http://www.riken.jp/pr/press/2012/20121121/>

②社会・経済への波及効果

1996年に平林らが遺伝子を発見したグルコシルセラミド合成酵素¹⁶⁸は、その阻害剤が、ゴーシェ病やリソソーム病などの糖脂質蓄積による代謝異常症における酵素補充療法治療薬として使われており、後の研究により、bcl-2の阻害剤であるHA14-1¹⁶⁹がグルコシルセラミド合成酵素も阻害することを見出した^[3]ことで、抗がん剤、パーキンソン病などの神経性疾患、糖尿病治療薬としても期待されている¹⁶⁴。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文4報以内

- [1] Mutoh T., Kawamura N., Hirabayashi Y., Shima S., Miyashita T., Ito S., Asakura K., Araki W., Cazzaniga E., Muto E., Masserini M., Abnormal cross-talk between mutant presenilin 1 (I143T, G384A) and glycosphingolipid biosynthesis (2012) *FASEB Journal*, 26(7), pp. 3065-3074.
- [2] Kim Y.J., Sano T., Nabetani T., Asano Y., Hirabayashi Y., GPRC5B activates obesity-associated inflammatory signaling in adipocytes (2012) *Science Signaling*, 5(251), ra85.
- [3] Niino S., Nakamura Y., Hirabayashi Y., Nagano-Ito M., Ichikawa S., A small molecule inhibitor of Bcl-2, HA14-1, also inhibits ceramide glucosyltransferase (2013) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 433(2), pp. 170-174.

¹⁶⁸ Ichikawa S., Hirabayashi Y., Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis (1998) *Trends in Cell Biology*, 8, pp. 198-202.

¹⁶⁹ Wang J.-L., Liu D., Zhang Z.-J., Shan S., Han X., Srinivasula S.M., Croce C.M., Alnemri E.S., Huang Z., Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells (2000) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, pp. 7124-7129.

3.3.4 病態における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明（本家孝一）

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

糖脂質は、生体膜上でコレステロールや膜タンパク質と会合して、膜マイクロドメイン(脂質ラフト)とよばれる超分子アッセムブリーを形成し、膜輸送や細胞接着やシグナル伝達のためのプラットフォームを提供する。脂質ラフトに対する抗体の作製や膜マイクロドメイン指向性プローブによる膜マイクロドメインを可視化し、がんやウイルス感染の免疫における膜マイクロドメインの機能に関わる糖鎖の役割を解明することを目指した¹⁷⁰。

②期間中の研究成果

紫外線で活性化されるアリールアジド基は西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)によって活性化されてナイトレンラジカルを生じることを発見した。この原理を利用して、生きている細胞の任意の細胞膜上分子から300 nmの範囲内に近接する分子を標識する方法 Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) 反応(図3-35)を開発した。

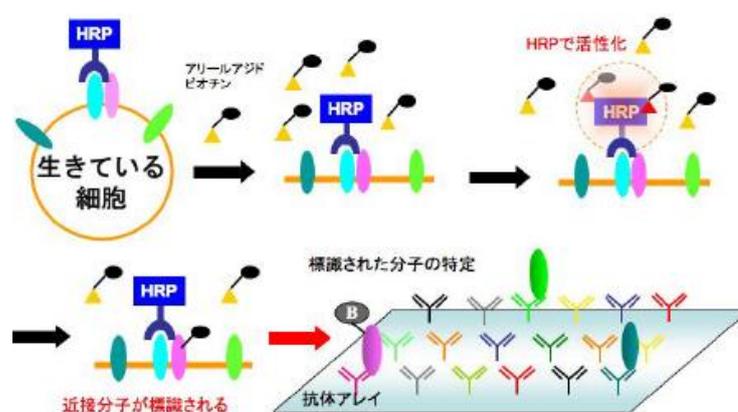


図 3-35 抗体アレイによる EMARS 標識タンパク質の同定¹⁷⁰

EMARS法は広く細胞分子生物学の分子間のネットワークの解明に役立つことから、それらを標的とする創薬研究のツール開発に応用できることが示された^[1]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト

- [1] Kotani N., Gu J., Isaji T., Udaka K., Taniguchi N., Honke K., Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells (2008) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(21), pp. 7405-7409.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、科学研究費補助金(挑戦的萌芽研究)「分子間相互作用が生み出す膜マイクロドメイン生物情報」(2010~2011)¹⁷¹、産学連携・技術移転事業 A-STEP 探索タイプ「膜マイクロドメイン会合分子同定のための EMARS 反応標識試薬の開発」(2011)¹⁷²の研究において、独自に開発した生体膜分子間相互作用解析法 EMARS 法を改良するため、第二世代標識試薬を開発し、質量分析を基盤技術とするプロテオミクスによって標識タンパク質を同定することを可能にした。

¹⁷⁰ 研究終了報告書 http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei16/tousa/04honke.pdf

¹⁷¹ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/22659060.ja.html>

¹⁷² JST A-STEP

さらに、科学研究費補助金(挑戦的萌芽研究)「肺がん転移に関与するシアリルルイス抗原キャリアタンパク質の同定と診断法の開発」(2013~2015)¹⁷³を獲得し、糖タンパク質硫酸転移酵素 GP3ST のシアリルルイス抗原(がんの転移に関与)の発現抑制機能を利用して、GP3ST 遺伝子導入により大腸がん細胞や肺がん細胞の転移を抑制することを目指して研究も進めている¹⁷⁴。

①科学技術の進歩への貢献

抗体アレイシステムは高感度に、かつ、容易に分子を同定できるが、限られた種類の抗体しか搭載されておらず、同定できる分子に制限がある。この欠点を補完するために、EMARS 産物の同定に質量分析によるプロテオミクス分析法を用いて分子を同定する方法を開発した^[1]。

また、機能的分子間相互作用を見つけるために EMARS 法を活用し、子宮頸がん細胞 HeLaS3 においてフィブロネクチン依存細胞移動に影響を及ぼす $\beta 1$ インテグリンと受容体型チロシンキナーゼ ErbB4 の間に空間時間依存的相互作用があることを見いだした^[2]。

HRP を脂質ラフト内に発現させるため、HRP を GPI-アンカー型融合タンパク質(HRP-GPI)にし、ヒト崩壊促進因子(DAF)とヒト Thy-1 由来の GPI 付加シグナル配列を HRP の C 末端に連結した 2 種類の HRP-GPI をヒト HeLa S3 細胞に発現させ、生細胞上で EMARS 反応を行った。その結果、異なる GPI 付加シグナル配列をもつ HRP-GPI は、異なる N 型糖鎖付加を受け、異なる分子会合体を形成した。このことから、個々の脂質ラフトドメイン中の特定の GPI-アンカータンパク質と会合する分子クラスターを生理的条件下で同定でき、細胞表面と同様に細胞内の分子間相互作用の研究ツールに広く利用できる可能性が示された^{[3], 174} (図 3-36)。

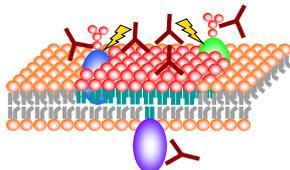
また、細胞膜の基本成分であり糖鎖と共に細胞内シグナル伝達や細胞間クロストークに重要な役割を果たしていると考えられるリン脂質に関して、特定の部位にオレイン酸を有するリン脂質の一種である 1-オレオイル-2-パルミトイル-ホスファチジルコリン(OPPC)に対するモノクローナル抗体を作製し、OPPC が神経細胞の突起先端部やマウス脳のシナプス部位に局在することを見いだした。この結果、細胞膜においてリン脂質のリモデリングが行われ、その結果生成されたリン脂質の細胞膜微小環境が神経細胞のシグナル伝達において重要であることが示唆され、本抗 OPPC モノクローナル抗体が神経伝達研究のツールとして有効であることが明らかになった^[4]。

¹⁷³ 科学研究費助成事業データベース <http://kaken.nii.ac.jp/d/p/25670166.ja.html>

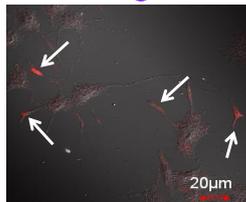
¹⁷⁴ 高知大学医学部生化学講座 http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_bichm/research01.htm

膜マイクロドメインをみる分子の眼

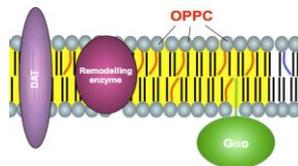
その1： 膜マイクロドメインに対する抗体作製



各種細胞の膜マイクロドメインを丸ごとマウスに免疫して、構成分子に対する単クローン抗体を作製する。



・リン脂質1-オレオイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン(OPPC)を認識する単クローン抗体を得た。
・OPPCはニューロンの突起先端部に局在することを見出した。
・突起先端部でつくられたOPPCドメインに、機能タンパク質のドパミントランスポーター(DAT)やGタンパク(Gα)が会合してくることがわかった。
(Kuge et al. J Biol Chem. 2014)



EMARS標識試薬と抗OPPC抗体を市販

その2： 膜マイクロドメイン会合分子の標識 (EMARS法)



・EMARS法は、生きている細胞の細胞表面で会合する分子を見つげるための方法である(1)。

・EMARS反応で標識された分子は、抗体アレイ(1)や質量分析(2)で同定できる。
・EMARS法を応用して、フィブロネクチン依存細胞移動におけるβ1インテグリンとErbB4の空間時間依存的相互作用(3)と、抗体医薬品のリツキシマブの刺激によって誘導されるCD20とFGFR3の相互作用(4)を見いだした。
・遺伝子工学で発現させたHRPを用いてEMARS反応を行う新バージョンのEMARSシステムを樹立した(5)。

(1) Kotani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008;105:7405 (2) Jiang et al., Proteomics 2012; 12:54 (3) Yamashita et al., J. Biochem. 2011; 149:347 (4) Kotani et al., J. Biol. Chem. 2012; 287:37109 (5) Miyagawa-Yamaguchi et al., PLoS ONE 2014; 9:e93054

図3-36 膜マイクロドメインを見る分子の眼

(提供：高知大学 本家孝一)

②社会・経済への波及効果

EMARS法のための試薬について国内外に特許出願を行い、国内では登録に至った¹⁷⁵。このEMARS法試薬は、2012年から『EMARS試薬Ar-Flu』の商品名で、国際市場で販売されている。

また、抗リン脂質OPPC抗体は、神経突起先端部に局在する特殊なリン脂質であるOPPCを検出するリン脂質OPPC特異的認識モノクローナル抗体試薬として、「Anti-1-Oleoyl-3-Palmitoyl-Phosphatidylcholine (OPPC) 15-3C1」の市販が開始された。神経伝達メカニズムや疾患の病態解明、細胞間のクロストーク等に関する研究ツールとなる。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文4報以内

[1] Jiang S., Kotani N., Ohnishi T., Miyagawa-Yamaguchi A., Tsuda M., Yamashita R., Ishiura Y., Honke K., A proteomics approach to the cell-surface interactome using the enzyme-mediated activation of radical sources reaction (2012) Proteomics, 12(1). pp. 54-62.

[2] Yamashita R, Kotani N, Ishiura Y, Higashiyama S, Honke K., Spatiotemporally-regulated interaction between β1 integrin and ErbB4 that is involved in fibronectin-dependent cell migration (2011) Journal of Biochemistry, pp. 149:347-355.

¹⁷⁵ 本家孝一、小谷典弘、谷口直之、細胞膜上分子と相互作用する化合物の検出方法、特願2007-17667(2007/1/29出願)、PCT/JP2008/051002(2008/1/24出願)、特開2008-182917(2008/8/14公開)、特許第04929462号(2012/2/24登録)、出願人：国立大学法人高知大学、国立大学法人大阪大学

- [3] Miyagawa-Yamaguchi A., Kotani N., Honke K.,
Expressed glycosylphosphatidylinositol-anchored horseradish peroxidase identifies
co-clustering molecules in individual lipid raft domains (2014) PLoS One, 9(3), pp.
e93054.
- [4] Kuge H., Akahori K., Yagyu K., Honke K., Functional Compartmentalization of the Plasma
Membrane of Neurons by a Unique Acyl Chain Composition of Phospholipids (2014) Journal
of Biological Chemistry, 289, pp. 26783-26793.

④その他

医学系研究科生命医学系専攻博士課程修了の山下竜右が学位論文研究で EMARS 法を応用し、子宮頸がん細胞 HeLaS3 において、細胞接着分子 $\beta 1$ インテグリンと受容体型チロシンキナーゼ Erb4 の相互作用が細胞移動に関与することを明らかにして日本生化学会のオフィシャル英文誌に掲載され^[2]、2012 年度日本生化学会 JB 論文賞を受賞した¹⁷⁴。

第4章 科学技術イノベーションに資する研究成果の状況

4.1 糖タンパク質の品質管理における糖鎖機能の解明（伊藤幸成）

4.1.1 研究の概要

(1) 研究テーマの状況(国内)

タンパク質の品質管理機構における糖鎖の研究は、従来の生化学的な供給による構造が均一で規定された糖鎖及び糖タンパク質のアプローチでは限界があったことから、合成化学的に様々な糖鎖を供給することにより、糖タンパク質の品質を管理する機構である、フォールディング、輸送、分解などのシステムの解明をねらいとして研究を継続している¹⁷⁶。本研究領域で、Calreticulin(小胞体シャペロン)、Fbs1(ユビキチンリガーゼ)、ERGIC-53/VIP36(カーゴレセプター)の糖鎖認識特異性の解明や、フォールディングセンサーとしてUGGT(UDP-グルコース：糖タンパク質グルコース転移酵素)基質の開発に成功し、その後2009年から2013年にかけて、JST 戦略的創造研究推進事業総括実施型研究 ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクト^{177, 178, 179}を進め、有機化学合成により精密に人工合成した糖鎖及び糖タンパク質を用いて、糖タンパク質の細胞内外での作用を系統的に解析する研究を進めている。

(i) 小胞体における糖タンパク質フォールディング機構の解明

小胞体内の糖タンパク質品質管理機構において、UGGTは、ミスフォールドした糖タンパク質のみをモノグルコシル化するフォールディングセンサーとして働く。モノグルコシル化は、レクチン様シャペロンである Calnexin/Calreticulin (CNX/CRT)の相互作用の目印となつてリフォールディングが行われ、Glucosidase II (G-II)によりグルコースが切断されて Man9GlcNAc2 (M9)へと変換される。このときリフォールデ

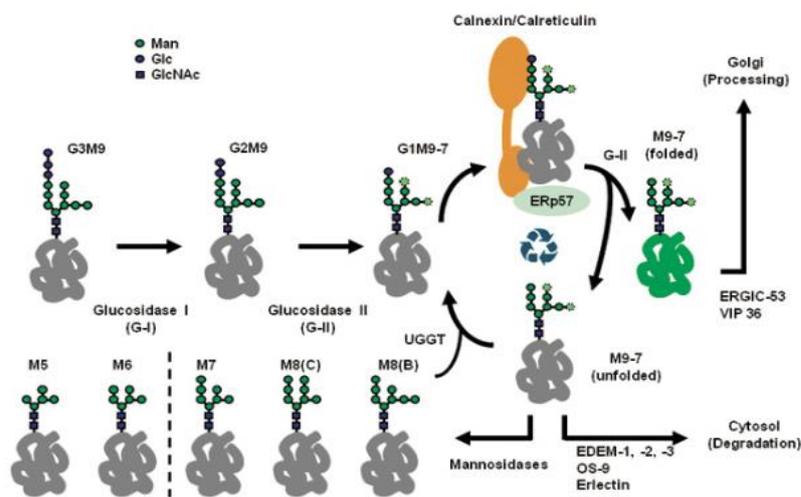


図4-1 小胞体における糖タンパク質フォールディング機構¹⁸⁰

(提供：理化学研究所 伊藤幸成)

¹⁷⁶ 理化学研究所伊藤細胞制御化学研究室 http://www.riken.jp/research/labs/chief/synth_cell_chem/

¹⁷⁷ ERATO Glycotriology Project <http://www.jst.go.jp/erato/ito/index.html>

¹⁷⁸ JST 戦略的創造研究推進事業 ERATO <http://research-er.jp/projects/view/112734>

¹⁷⁹ ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクトホームページ
http://www.jst.go.jp/erato/research_area/ongoing/igk_PJ.html

イングされなかった糖タンパク質は、再びこのリフォールディングサイクルに入る(図 4-1)¹⁸⁰。

従来、生物学的手法により様々なモデル糖タンパク質が調製されているが、糖鎖構造とタンパク質構造に不均一性が見られることが多かった。化学合成法を構築することにより、糖鎖及びタンパク質のいずれの構造も均一な変性及び活性型糖タンパク質を調製することに成功し、タンパク質部分の構造を自在に可変したものを合成することが可能になり、小胞体内での UGGT の基質認識とフォールディングメカニズムに関する研究を以下の(ii)~(v)のように発展させた^[1]。

(ii) 化学・酵素法によるトップダウン型高マンノース型糖鎖ライブラリーの構築

本研究領域期間中に構築した糖鎖プローブの種々の合成手法に改良を加え、高分子担体を使用しない糖鎖迅速合成法としてトップダウン型高マンノース型糖鎖合成法を開発した。この方法は、高マンノース型糖鎖の非還元末端を、グルコース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミンの 3 種類の単糖で保護し、対応する糖加水分解酵素により選択的に除去する選択的グリコシル化法を利用して、出発原料の 14 糖の化学的合成を行うものである^[3]。この方法により、高マンノース型糖鎖として最も複雑なトリグルコシル化 14 糖をはじめ、全ての小胞体型糖鎖の合成に成功した^[2]、¹⁸⁰。

(iii) 化学合成による天然型及びミスフォールド型糖タンパク質の合成法の構築

小胞体内において糖タンパク質フォールディングセンサーとして機能している UGGT の認識機構解明のために、モデルタンパク質として、天然では糖鎖を持たないインターロイキン 8(IL-8)を選定した。IL-8 は X 線結晶構造解析及び NMR 解析により三次元構造が知られていること、Native chemical ligation 法を用いた化学合成法が構築されていること、アミノ酸 72 残基からなる分子内の 2 か所にあるジスルフィド結合を組み換えることによりミスフォールドタンパク質を意図的に作製することができることから、モデルタンパク質として適切である。鶏卵の卵黄から M9-Asn を単離してオリゴ糖が結合したペプチド断片を合成し、これに他のペプチド断片を順次結合させて IL-8 の全長型糖タンパク質を合成することにより、化学合成による糖タンパク質の合成方法を確立した^[5]。作製した全長糖タンパク質を用い、空気酸化条件下で酸化的フォールディングを行った。反応過程において、ジスルフィド結合 1 本を持つ中間体が生成し、天然型、2 種のミスフォールド単量体、ミスフォールドホモ 2 量体の 4 種類の生成物が得られた^[6]。ペプチド合成化学に糖鎖科学を融合させ、世界で初めて均一で安定な天然型及びミスフォールド型の糖タンパク質の化学的合成に成功した^[1]。これらの研究は、ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクトの一環で、大阪大学の梶原康宏との共同で行われた¹⁷⁷。

(iv) UGGT のミスフォールディング認識機構の解明

作製した天然型及び複数のミスフォールド型の IL-8 糖タンパク質を用いて、UGGT に特徴的な選択的機能を確認した^[6]。化学合成した単一の糖タンパク質を UGGT の基質として用いた結果、UGGT は天然型とミスフォールド体の立体配座の違いを区別できるだけでなく、糖タンパク質の構造のわずかな違いを認識できることを明らかにし、同じミスフォールド体でも基質特異性に差がある

¹⁸⁰ 理化学研究所 伊藤細胞制御化学研究室ホームページ
<http://www.asi.riken.jp/jp/laboratories/chiefclabs/synthetic/>

ことが判明した^[7]。また、IL-8 糖タンパク質の一つのリジン残基を 9 種類の疎水性アミノ酸に置換した場合は天然型に比べてグルコース転移が速く、UGGT による基質認識において疎水性残基の寄与が大きいことが示された^[1]。

(v) 糖タンパク質フォールディング過程解析における in vitro 擬似細胞内環境システムの開発

これまでタンパク質のフォールディングを確認するためには活性測定法を利用して、タンパク質を高度に希釈した条件で行われてきた。しかし、タンパク質は小胞体内において、生体物質が 30-40% という高濃度に含まれる液体の中で機能している。そこで、高濃度に生体高分子を混合して小胞体条件を模した in vitro タンパク質フォールディング評価システムを開発し、本研究領域で解明した糖タンパク質品質管理の分子機構における主要タンパク質である G-II や UGGT の糖タンパク質フォールディング機能を測定した。その結果、細胞内のように生体分子が高濃度の条件下では、G-II の cleavage-1 と cleavage-2 の反応速度は同等であったことから cleavage-1 の反応速度の方が大きいという従来の希釈系でのタンパク質の振る舞いとは異なる場合があることが判明した。本方法により、UGGT によるグリコシル化反応速度は生体分子が高濃度の条件下と希釈系では同等で、 α -マンノシダーゼによる糖鎖のトリミング速度は生体分子が高濃度の条件下では遅いという新たな知見が得られた^[8]。この方法により、生体内でのタンパク質の詳細な速度論的解析、サブユニットの機能解析が可能となった^[1]。

(vi) PNGase タンパク質の新機能の解明

細胞質ペプチド:N-グリカナーゼ (PNGase) は、酵母からほ乳類まで幅広い真核生物に保存されているタンパク質である。酵母やほ乳動物の PNGase は、糖タンパク質から N 型糖鎖を切り取る脱糖鎖活性を持ち、出来損ないの糖タンパク質を分解する過程を促進すること、また PNGase の活性がプロテアソームにおける分解に重要であることを証明した^[9] (図 4-2)。

その後、真核細胞の細胞質に広く存在する PNGase が、既に知られている脱糖鎖活性とは別の、生存に関わる生理機能を持つことを発見した。この研究では、ショウジョウバエにおける PNGase オルソログタンパク質を PNGase-like (Png1) と命名し、この Png1 をコードする遺伝子の変異体を作製することで、Png1 の生理機能を解析した。その結果、生育異常が見られない出芽酵母^[10]と異なり、ショウジョウバエの Png1 変異体では発生や生殖に顕著な異常が生じ、最終的には致死に至ることを見いだした。また、この Png1 には、脱糖鎖活性がなかったことから、脱糖鎖活性は生存に必須ではなく、Png1 には生存に関わる別の重要な機能があることが判明した。さらに、マウスの PNGase をショウジョウバエ Png1 変異体に導入すると、この変異体は正常に成長したことから、Png1 の新たな機能は、ほ乳類をはじめ幅広い生物

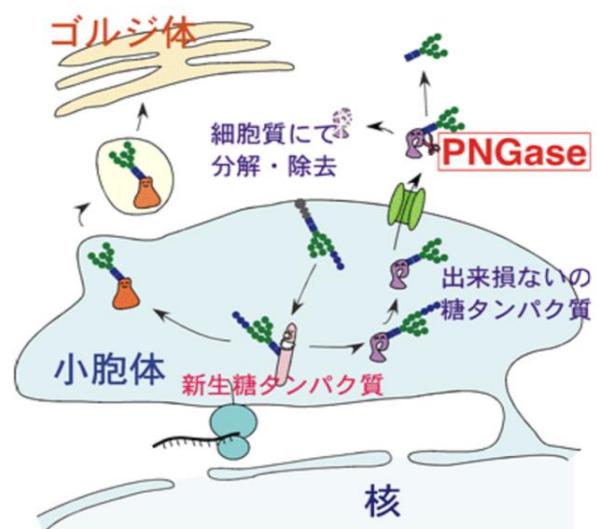


図 4-2 N 型糖鎖を切断する PNGase の酵素活性¹⁸¹

種に共通して存在する可能性が高まった^[11]。これらのことから、PNGase タンパク質の重要性は、脱糖鎖活性以外の部分にある可能性を初めて示し、変異体では発生や生殖の顕著な異常に関わることから、この PNG オルソログの変異体の研究から得られた成果は遺伝疾患の治療に向けた研究に発展することが考えられる^[18]。

(2) 海外での共同研究の状況

糖鎖の化学合成法、及びその化学合成糖鎖を用いて行った糖認識の精密な研究アプローチは世界的に認められ、海外の研究グループとも広く共同研究が実施されている。その結果、糖加水分解酵素ファミリー-127 β -L-アラビノフラノシダーゼの立体構造解析(米国)^[12]、HIV の Glycan shieldの研究(米国)^[13]、1,2-cis glucosamine oligomer^[14]及び配糖体^[15]の化学合成法の研究(スイス)において研究成果が得られた。

4.1.2 研究成果の波及と展望

(1) 科学技術への波及と展望

本研究領域の成果の一つである高マンノース型糖鎖の系統的合成で世界の頂点に立つ伊藤幸成は、天然生物試料とは比較にならない大量で、かつ均一で正確な構造をもつ糖鎖を化学合成により調製する方法を確立し、これを用いて糖鎖情報を解明することを目的として、ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクトを実施した(図 4-3)^[17]。この ERATO のプロジェクトの研究成果により、高マンノース型糖鎖の系統的合成についてはほぼ完了し、細胞内に存在する配列についてはすべて供給可能となった。また、これらの合成糖鎖を用いた糖ペプチド合成と Native chemical ligation 法により全長糖タンパク質を合成する方法の構築、及び天然型とミスフォールディング型を均一に作製することに世界で初めて成功し、糖鎖研究の中で有機化学的手法の優位性が示された。これは世界的にもユニークな状況であり、他の追随を許さない大きなインパクトを持つものとなった。

このような、人工合成した糖タンパク質を用いた系統的解析の研究手法は、生命科学における有機化学的手法の優位性を示すモデルケースになっている。特に、UGGT はミスフォールディングによる露出された(タンパク質の)疎水性部分を認識する、というミスフォールディング認識メカニズムが一般的であることが明らかになれば、科学技術に与える影響は大きい^[18]。

伊藤幸成らの研究成果は、タンパク質の立体構造や糖鎖構造異常に起因する種々の疾病(アルツハイマー病、プリオン病、糖鎖不全症など)の治療、合成糖タンパク質医薬品の開発、新規な抗感染症薬の開発に結びつく可能性がある。本研究領域の成果により、糖タンパク質品質管理機構が糖質化学者の間で広く認知されるようになり、特に、糖鎖合成化学とケミカルバイオロジーの融合研究における新たな潮流が生み出された。

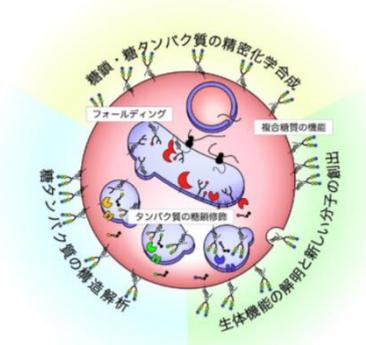


図 4-3 ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクト^[17]

¹⁸¹ 理化学研究所プレスリリース <http://www.riken.jp/pr/press/2010/20100511/>

また、ERATO 研究と並行して、特定の糖鎖構造を持つタンパク質だけを可視化する技術が、本研究領域の研究分担者であった鈴木匡（理研システム糖鎖グループ）らを中心とするチームによって開発された。これは、目的とするタンパク質のうち特定の糖鎖構造を持つものだけを検出し可視化できる蛍光イメージング技術である。タンパク質は、機能を発揮するためにさまざまな翻訳後修飾を受けるが、糖鎖修飾（付加）もそのうちの 1 つであり、糖鎖はタンパク質の立体構造や安定性、水溶性などの性質に大きな影響を及ぼすだけでなく、糖鎖構造の違いがタンパク質の輸送や細胞表面における安定性に関わっている例がさまざまな疾患で報告されている。しかし、糖鎖は生体内で多様な構造で存在するため解析が難しく、「糖鎖構造が変わるとなぜ病気になるのか」など、原因から結果までの全貌を解明することは困難とされていた。こうした理由から、特定の糖鎖構造を持った糖タンパク質だけを検出し、細胞内でどのような動きをするのかを可視化する技術が求められていた。

本研究では、2 型糖尿病に関わることが知られている膜タンパク質 GLUT4 と、単糖の一種であるシアル酸のそれぞれに、2 つの異なる蛍光物質を結合させた。

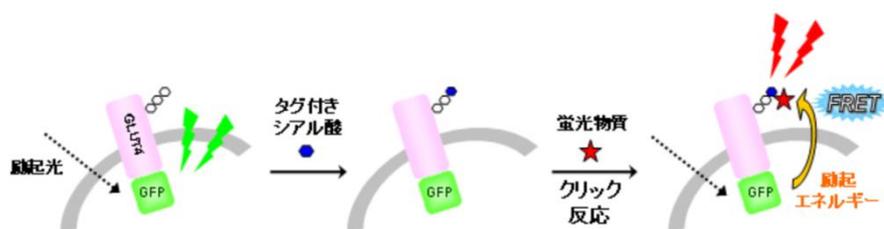


図 4-4 特定の糖鎖構造を持つタンパク質の可視化¹⁸²

GLUT4 にシアル酸が付加され、2 つの蛍光物質が接近したときに発せられる FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) のシグナルを検出することにより、シアル酸が付加した糖鎖を持つ GLUT4 だけを区別することに成功した(図 4-4)。さらに、シアル酸の付加が GLUT4 に及ぼす影響を調べるために細胞内へのグルコースの取り込みを観察したところ、シアル酸を持つものは持たないものと比べて取り込み速度が遅いことが分かった。この可視化技術を用いることで、特定の糖鎖を持つタンパク質の細胞内での動きや役割を多角的に調べることができる。また、糖鎖が疾患に深く関与していることから、発症のメカニズムの解明や治療法の開発にも寄与する^{[16]、182}。

糖タンパク質糖鎖変換に注目し、糖鎖プロセッシングに基づく疾患解析の研究が成蹊大学工学部物質生命理工学科生体分子化学研究室の戸谷希一郎を中心に行われている。この研究ではヒト体内でフォールディング不良タンパク質が蓄積することによって、生命システムの下流で多様な疾患が発症することに焦点を当てた。化学合成した人工糖鎖基質を、健常及び疾患モデル動物の肝臓から遠心分画した小胞体画分と反応させ、反応液の HPLC クロマトグラムに現れる糖鎖溶出パターンから疾患の特徴を比較した。具体的には非肥満型 2 型糖尿病モデルラット由来の小胞体画分から再構成した糖鎖プロファイルと健常モデル由来のものと比較し、糖タンパク質排出シグナルに相当する糖鎖群の生成が有意に増加することを見出した。また骨粗鬆症モデルマウス由来の小胞体画分から糖鎖プロファイルを再構成した場合、そのパターンには健常モデル由来の糖鎖プロファイルと比較して、糖タンパク質分解シグナルが明らかに増加する傾向が観察された。さらに、両疾患に特異的な糖鎖プロファイルを分子レベルで理解するため、糖鎖プロセッシングに関わるタンパク質群について活性及び発現レベルで解析を行ったところ、各タンパク質の量と糖鎖プロセッシング状況に相関がある箇所も認められた。一方、一部に両者に相関が認められない箇所が

¹⁸² 理化学研究所プレスリリース <http://www.riken.jp/pr/press/2012/20120620/>

あることが分かった。この結果は疾患が糖鎖プロセッシング酵素の比活性にも影響を与えている事を示すものと考えられる¹⁸³。

(2) 社会・経済への波及と展望

本研究領域の成果をもとにその後 ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクトで開発された有機化学に基づく糖タンパク質の調製技術^[6]は、これまで細胞を用いる調製法に頼っていたバイオベンチャーや製薬会社において、革新的な創薬技術開発の基礎となった。特に、サイトカインに属するインターロイキン、エリスロポエチンの化学合成の成功は、バイオ医薬品の化学合成に一定の道筋をつけたと言え、これまでにない品質のバイオ医薬品の実用化につながる技術として高く評価されている¹⁸⁴。

また、細胞の恒常性の維持には、糖タンパク質のフォールディングを含む品質管理機構は必須であるため、このシステムの破たんは多くの疾患と関連し、アルツハイマー症候群など、わが国を含めた先進国において社会的に重要視される疾患もその中に含まれる。これまでに得られた成果はこれらの疾患を直接的に解決するものではないが、UGGT の機能解析等の成果は今後、タンパク質フォールディングに関連する疾患の治療薬の開発につながる基盤となる¹⁸⁴。

伊藤幸成は 2008 年 7 月の Roy L. Whistler International Award in Carbohydrate Chemistry (International Carbohydrate Organization) の受賞を受けており、有機化学を生物科学に直接的に結びつけた業績が国際的及び社会的にも高く評価されている。

(3) その他特筆すべき事項

伊藤幸成は、日本糖質学会 理事(2004 年～2013 年)・会長(2013 年～)、日本糖鎖科学コンソーシアム理事(2005 年～)、25th International Carbohydrate Symposium (ICS 2010) 副組織委員長、事務局長(2010 年)、国際糖質機構(International Carbohydrate Organization)日本代表(2006 年～)・会長 (President) (2010 年～2012 年)、立教大学理学部客員教授、ACS Chemical Biology 誌 Associate Editor (2013 年～)、Chemistry A European Journal 誌 Editorial Board、Carbohydrate Research 誌 Editorial Board、Journal of Carbohydrate Chemistry 誌 Editorial Board を務めている^{17, 185}。

伊藤幸成は 2013 年から日本糖質学会(JSCR、Japanese Society of Carbohydrate Research)の会長を務め¹⁸⁶、2014 年 11 月には本研究領域の研究総括をしていた理化学研究所の谷口がプレジデント(会長)を務める米国糖質学会(Society for Glycobiology)との合同会議がハワイで開催された¹⁸⁷。今回の合同会議は、CREST で本研究領域がスタートした 2004 年に、研究総括の谷口が日本糖質学会会長であった時に開催されてから 10 年目にあたる。伊藤幸成が主催したサテライトシンポジウム I 「Chemical aspects of glycobiology」では、糖質科学への化学的アプローチについ

¹⁸³ 科研費データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/23681049/2011/3/ja.ja.html>

¹⁸⁴ ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクト事後評価(予備評価)報告書

¹⁸⁵ ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェクト研究総括 http://www.jst.go.jp/erato/ito/profile_YIto.html

¹⁸⁶ 日本糖質学会「会長からのメッセージ」<http://www.jscr.gr.jp/?p=contents&id=23>

¹⁸⁷ Society for Glycobiology (SFG) & Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR) 2014 Joint Annual Meeting http://www.glycobiology.org/calendar_display.php?id=7162、<http://www.glycobiology.org/meetings-past.php>

て議論がなされた¹⁸⁸。なお、米国では2012年に米国学術研究会議(the National Research Council of the National Academies)が Transforming Glycoscience: A Roadmap for the Future (2012)¹⁸⁹ を発表しており、本研究領域に関連する研究が強力に進められている。

引用文献

- [1] Ito Y., Takeda Y., Deciphering the roles of glycan processing in glycoprotein quality control through organic synthesis (2013) *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 77(12), pp. 2331-2338.
- [2] Takeda Y., Totani K., Matsuo I., Ito Y., Chemical approaches toward understanding glycan-mediated protein quality control (2009) *Current Opinion in Chemical Biology*, 13, pp. 582-591
- [3] Koizumi A., Matsuo I., Takatani M., Seko A., Hachisu M., Takeda Y., Ito Y., Top-Down Chemoenzymatic Approach to a High-Mannose-Type Glycan Library: Synthesis of a Common Precursor and Its Enzymatic Trimming (2013) *Angewandte Chemie*, 52, pp. 7426-7431.
- [4] Seko A., Matsuo I., Takeda Y., Koizumi A., Hachisu M., Takatani M., Aikawa J., Ito Y., Top-down synthesis of a library of high mannose-type glycans: preparation of various high mannose glycans from a tetradeca-saccharide precursor by glycosidase digestions, 22nd International Symposium on Glycoconjugates (GLYC022), Dalian, China, 2013. 6. 23-28
- [5] Izumi M., Makimura Y., Dedola S., Seko A., Kanamori A., Sakono M., Ito Y., Kajihara Y., Chemical Synthesis of intentionally Misfolded homogeneous Glycoprotein: a unique approach for the study of glycoprotein quality control (2012) *Journal of the American Chemical Society*, 134, pp. 7238-7241.
- [6] Dedola S., Izumi M., Makimura Y., Seko A., Kanamori A., Sakono M., Ito Y., Kajihara Y., Folding of synthetic homogeneous glycoproteins in the presence of a glycoprotein folding sensor enzyme (2014) *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(11), pp. 2883-2887.
- [7] Takeda Y., Seko A., Hachisu M., Daikoku S., Izumi M., Koizumi A., Fujikawa K., Kajihara Y., Ito Y., Both isoforms of human UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase are enzymatically active (2014) *Glycobiology*, 24(4), pp. 344-350.
- [8] Totani K., Ihara Y., Matsuo I., Ito Y., Effects of macromolecular crowding on

¹⁸⁸ JSCR News Letter [http://www.jscr.gr.jp/images/contents/11/NL18_2\(2014\)HP.pdf](http://www.jscr.gr.jp/images/contents/11/NL18_2(2014)HP.pdf)

¹⁸⁹ <http://dels.nas.edu/Report/Transforming-Glycoscience-Roadmap/13446>

- glycoprotein processing enzymes (2008) *Journal of American Chemical Society*, 130, pp. 2101-2107.
- [9] Hagihara S., Goda K., Matsuo I., Ito Y., Analysis of ER-associated glycoprotein degradation using synthetic glycopeptide probes (2007) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360, pp. 357-362.
- [10] Zhao G., Li G., Zhou X., Matsuo I., Ito Y., Suzuki T., Lennarz W.J., Schindelin H., Structural and mutational studies on the importance of oligosaccharide binding for the activity of yeast PNGase (2009) *Glycobiology*, 19, pp. 118-125.
- [11] Funakoshi Y., Negishi Y., J. Gergen P., Seino J., Ishii K., Lennarz W.J., Matsuo I., Ito Y., Taniguchi N., Suzuki T., Evidence for an Essential Deglycosylation-Independent Activity of PNGase in *Drosophila melanogaster* (2010) *Plos One*, 5, e10545.
- [12] Ito T., Saikawa K., Kim S., Fujita K., Ishiwata A., Kaeothip S., Arakawa T., Wakagi T., Beckham G.T., Ito Y., Fushinobu S., Crystal structure of glycoside hydrolase family 127 β -l-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* (2014) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 447, pp. 32-37.
- [13] Pejchal R., Doores K.J., Walker L.M., Khayat R., Huang P.-S., Wang S.-K., Stanfield R.L., Julien J.-P., Ramos A., Crispin M., Depetris R., Katpally U., Marozsan A., Cupo A., Maloveste S., Liu Y., McBride R., Ito Y., Sanders R.W., Ogohara C., Paulson J.C., Feizi T., Scanlan C.N., Wong C.-H., Moore J.P., Olson W.C., Ward A.B., Pognard P., Schief W.R., Burton D.R., Wilson I.A., A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield (2011) *Science*, 334, pp. 1097-1103.
- [14] Manabe S., Satoh H., Hutter J., Luthi H.P., Laino T., Ito Y., Significant substituent effect on the anomerization of pyranosides: Mechanism of anomerization and synthesis of a 1,2-cis glucosamine oligomer from the 1,2-trans anomer (2014) *Chemistry - A European Journal*, 20, pp. 124-132.
- [15] Satoh H., Manabe S., Ito Y., Luthi H.P., Laino T., Hutter J., Endocyclic cleavage in glycosides with 2,3-trans cyclic protecting groups (2011) *Journal of the American Chemical Society*, 133, pp. 5610-5619.
- [16] Haga Y., Ishii K., Hibino K., Sako Y., Ito Y., Taniguchi N., Suzuki T., Visualizing specific protein glycoforms by transmembrane fluorescence resonance energy transfer (2012) *Nature Communications*, 3, pp. 907.

4.2 糖鎖の動態—機能相関への統合的アプローチ (木下タロウ)

4.2.1 研究の概要

(1) 研究テーマの状況 (国内)

①GPI アンカー型タンパク質の生合成と輸送¹⁹⁰

グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型タンパク質は、GPI アンカーが結合したタンパク質である。GPI アンカーは、イノシトールリン脂質にグルコサミン、3つのマンノース、エタノールアミンリン酸が結合した基本骨格をもつ糖脂質であり、PIG (Phosphatidyl Inositol Glycan) 遺伝子群によって小胞体で合成される。この糖鎖部分の側鎖構造や脂質部分の分子種には生物種や細胞、タンパク質によって違いが見られる^[1]。タンパク質の翻訳は小胞体で別に行われた後、そのC末端のカルボキシル基と GPI アンカーのエタノールアミンリン酸のアミド結合により GPI アンカー型タンパク質となって細胞膜に結合する (図 4-5)。さらに GPI アンカー型タンパク質は、PGAP (Post GPI-Attachment to Proteins) 遺伝子群によって脂質部分と糖鎖部分の構造が変化するリモデリングを起こすことを、本研究領域期間中に明らかにした。リモデリングが起こらない変異株では GPI アンカー型タンパク質は効率よく輸送されず、ラフトに局在できないことも明らかにした^[2]。

GPI アンカーの脂肪酸リモデリングについて、GPI アンカーは小胞体においてフォスファチジルイノシトール (PI) の sn2 位の脂肪酸に不飽和脂肪酸を持つ形で合成され、ゴルジ体でステアリン酸に置換されること、不飽和脂肪酸の除去に PGAP3 が、ステアリン酸の付加に PGAP2 が必要であることを発見した^[3]。また、糖鎖リモデリングについては、GPI アンカー型タンパク質が小胞体からゴルジ体へ輸送される際に、GPI 前駆体の段階で結合している第2マンノースのエタノールアミンリン酸側鎖が、タンパク質へ付加した後、PGAP5 によって除去されるという過程が存在することを発見し、この糖鎖リモデリングが GPI アンカー型タンパク質の小胞体からゴルジ体への効率的な輸送に重要であることを示した^[2]。さらに、糖タンパク質と糖脂質の輸送及び N-、O-型糖鎖の構造形成に、ゴルジ体の pH が重要であり、その制御には新規の塩素イオンチャンネル GPHR がプロトンポンプのカウンターイオンチャンネルとして働くことが必須であることを明らかにした^[4]。また、糖鎖リモデリングによるがんの浸潤・転移に深く関わっている細胞接着分子であるインテグリンの機能制御に着目して研究を進め、上皮増殖因子 (EGF) やトランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF-beta) などの増殖因子受容体およびインテグリンに付加された N-型糖鎖により、膜上の受容体の機能が正または負に制御されることを明らかにした^[5]、^[6]。また、インテグリン二量

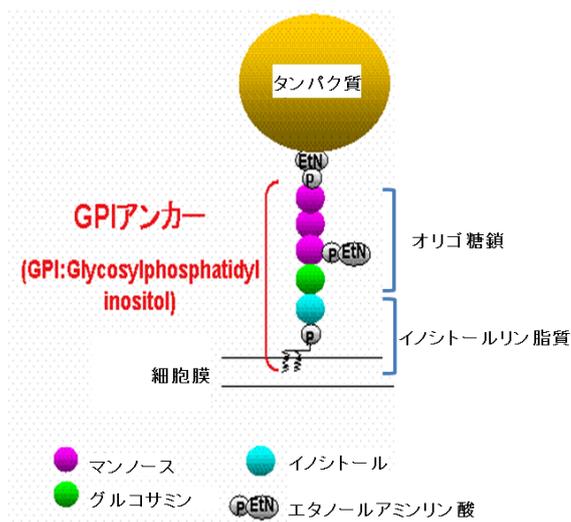


図 4-5 GPI アンカー型タンパク質の構造^[1]

¹⁹⁰ 科学研究費補助金基盤研究 (A) 「タンパク質 GPI アンカーの構造変化の分子機構と機能との相関の解明」 (2009~2014) <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/21247018.ja.html>

体の形成に重要な糖鎖付加部位を同定した^{[6], [7]}。

さらに PGAP3 遺伝子の flox マウスを作製して CAG-Cre マウスと交配し、全身で PGAP3 をノックアウトしたマウスを得た。これらのマウスの中には、加齢とともに抗イムノグロブリン抗体を産生する個体が現れ、脾臓に胚中心を自然形成する個体や腎糸球体が大きくなり免疫複合体を沈着している個体も観察されたことから、脂肪酸リモデリングは、液性免疫系の恒常性維持に重要であることが明らかにした。そのメカニズムについては、腹腔マクロファージによるアポトーシス細胞の除去が有意に低下していること、Th2 細胞への偏りがあることがわかった^{[8], [9]}。また、脂質リモデリングが正常な GPI アンカータンパク質においては糖鎖のオリゴマー形成が促進され、免疫応答にも関連していることを明らかにした^[9]。

一方、リモデリングにおけるアルキルアシル型 GPI アンカーについての生合成機序も明らかにした。アルキルアシル型 GPI アンカーを作り出す GPI 脂質リモデリングの反応^[10]において、アルキルグリセロールを含む供与体が 1 アルキル 2 アシルホスファチジルエタノールアミンであることを示唆する結果が得られ、1 アルキル 2 アシルグリセロリン酸の脱リン酸酵素の候補と想定していた遺伝子をノックダウンしたところ、リモデリング自体に働く遺伝子であることが示された^{191, [11]}。

GPI-アンカー型タンパク質の構造変化と輸送に関わる遺伝子群の解明のため、これまでに確立された輸送遅延変異株の性状解析を進めた。その結果、セラミドのような極めて長い脂質の ER からゴルジ体への輸送も GPI アンカーにより制御されていることが明らかになった^[12]。現在、GPI アンカーのアルキルアシル型への脂質リモデリングを行う酵素の遺伝子を明らかにし、ノックアウトマウスの作製と解析により、アルキルアシル型 GPI アンカーの生理的意義、特に肢根型点状軟骨との関係を解明することを目指している。さらに、PI-アンカー型タンパク質の輸送遅延変異株の責任遺伝子を単離し、GPI-アンカー型タンパク質の構造変化と輸送に関わる遺伝子群を明らかにする研究を進めている^{191, [12]}。

②先天性 GPI 欠損症の発症機序解明

本研究領域では、先天性 GPI 欠損症の発症機序を英国の共同研究先のグループとともに解明し適用薬を見出してその治療にも成功した。この先天性 GPI 欠損症は、門脈血栓症と欠神発作を主徴として常染色体劣性の遺伝形式をもつ新規の疾患である。その後、同様の GPI の生合成に部分的な欠損を生じた遺伝性 GPI 欠損症について、村上及び海外共同研究と共に研究を進めている。先天性 GPI 欠損症の症状は多様であるが、てんかん発作や知的障害を症状とするものが多く、さらに欠損遺伝子ごとに顔貌異常、心疾患、短指骨、難聴、高ホスファターゼ血症等がみられ、治療が広く望まれている^[13]。木下らは本研究領域期間中を含め、これまでに GPI-アンカー型糖タンパク質の生合成に関わる主要遺伝子のほとんどを発現クローニング法で単離し、26 個の遺伝子が GPI アンカー型タンパク質の生合成や修飾等に関連していることを明らかにし¹⁹³、12 遺伝子について欠損症例 (PIGM、PIGV、PIGO、PIGA、PIGQ、PIGW、PIGL、PIGN、PIGT、PAGP1、PGAP2、PGAP3

¹⁹¹ 科研費データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/21247018/2012/3/ja.en.html>

¹⁹² 大阪大学免疫学フロンティア研究センター糖鎖免疫学
<http://www.ifrec.osaka-u.ac.jp/jpn/laboratory/immunoglycobiology/outline.php>

¹⁹³ 科学研究費助成事業データベース <https://kaken.nii.ac.jp/d/p/23590363.ja.html>

の欠損症)を確認した¹⁹⁴。

2013年にはPIGOに変異を持つ先天性 GPI 欠損症を初めて同定した^[10]。この欠損症は高ホスファターゼ-精神遅滞症候群 (HPMR、又は Mabry 症候群)を伴うもので、小胞体における GPI 生合成の後期段階に GPI 生合成に必須な mannosyltransferase である PIGV 又は PIGO の欠損を同定した。初期段階および GPI トランスアミダーゼの欠損では同様の症状がみられなかった。作用機序として、後期 GPI 中間体が GPI トランスアミダーゼに認識され、一部のアルカリホスファターゼのシグナル配列が切断されて細胞外へ分泌されると考えられている^[14]。今後、同様の症状を示す原因未同定の疾患においても、疾患発症の原因として GPI の生合成異常が検出されることを期待して、現在解析が進められている^[13]。

③細胞内小器官であるリサイクリングエンドソームの機能解析

リサイクリングエンドソームは、細胞内分子がエンドサイトーシスを受けたのちに細胞膜へ戻っていく過程で一時期に滞留する核近縁部の膜系として、1980年代に同定された比較的歴史の浅い細胞小器官である。

細胞内小器官のリサイクリングエンドソームは、ホスファチジルセリンの細胞内逆行性輸送に関わっており、糖鎖関連物質の細胞内輸送に重要であることを田口友彦らが発見した。エンドサイトーシス小器官に局在するホスファチジルセリンは、細胞機能との関連性が不明であったが、新たにリサイクルエンドソームでの逆行性膜輸送に必須であることを見出し、これまで機能未知であった eectin-2 タンパク質は、そのプレクストリン相同 (PH) ドメインを介して後期エンドソームに濃縮しているホスファチジルセリンと結合していることを突き止めた。また、この eectin-2 は後期エンドソームからゴルジ膜の輸送に関与している事を初めて明らかにした。これはヒト由来の PH ドメインの結晶構造から、PH ドメインのフォスファチジルコリンの認識機構を原子レベルで解明した成果である^[15]。

④GPI アンカー型タンパク質の輸送に働く遺伝子群の同定と機能解明

ゴルジ装置などの分泌経路の小器官は、機能を保持するために重要な固有の酸性 pH を持っているが、その酸性 pH による小器官の機能調節機構はほとんど分かっていなかった。本研究領域では、GPI アンカー型タンパク質だけでなく、広く糖タンパク質と糖脂質の輸送及び N-、O-型糖鎖の構造形成に、ゴルジ体の pH が重要であること、その制御に新規の塩素イオンチャンネル GPHR がプロトンポンプのカウンターイオンチャンネルとして働くことが必須であることを明らかにした^[16]。現在、GPHR ノックアウト細胞およびマウスを用いて、糖鎖修飾、タンパク質輸

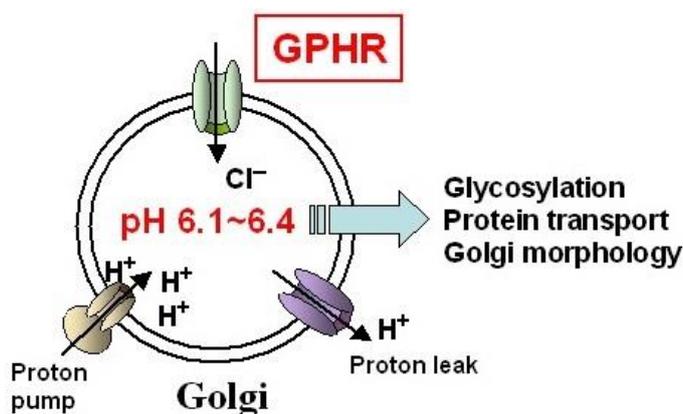


図 4-6 ゴルジ装置 pH ホメオスターシスの役割¹⁹²

¹⁹⁴ 大阪大学免疫学フロンティア研究センター Annual Report of IFRec FY 2013
http://www.ifrec.osaka-u.ac.jp/en/publications/annual_rep_2013.p

送や細胞内シグナリングの制御という観点から、ゴルジ装置の酸性 pH ホメオスターシスの様々な生理的役割を追究している¹⁹²。

GPI アンカー型タンパク質の小胞体からゴルジ装置への輸送は、コートタンパク質複合体 II (COPII) 小胞が行っているが、GPI アンカー型タンパク質の糖鎖の PGAP1 による脱アシル化および PGAP5 による脱リン酸化が小胞体からゴルジ体への「輸送シグナル」となっている。新たに同定した P24 タンパク質がその糖鎖シグナルを特異的に認識することにより積荷受容体として機能することを突き止めた。この p24 タンパク質ファミリーは、膜内腔側に Golgi dynamics (GOLD) ドメイン、コイルド・コイルドメイン、細胞質側には COPII および COPI と結合するモチーフを有する I 型の膜タンパク質で、ゴルジ体における COPI の形成や小胞体からの積荷の選別に関与している。p24 タンパク質は一次配列から α , β , γ , δ の四つのサブファミリーに分類され、ファミリー間でヘテロオリゴマーを形成し、小胞体—ゴルジ体間をリサイクリングしている。哺乳動物細胞の p24 β 1 および p24 δ 1 のノックダウンにより GPI アンカー型タンパク質の輸送が遅延することを明らかにした^[17]。また、GPI アンカー型タンパク質の小胞体でのリモデリングが行えない PGAP1 および PGAP5 変異株は GPI アンカー型レポータータンパク質と p24 タンパク質との結合が減少することから、正しく構造変化した GPI アンカー型タンパク質を認識していることが示唆された^[18]。

(2) 海外での共同研究の状況

先天性 GPI アンカー欠損は、高ホスファターゼ症-精神遅滞を示す Mabry syndrome と CHIME syndrome や早期発症てんかん性脳症の Ohtahara syndrome と West syndrome などの一部に存在することを同定した¹⁹⁴。この成果に関しては、ドイツやデンマーク、英国と共同研究を進め、デンマーク、ドイツとの共同研究では、常染色体劣性遺伝性疾患の一つは、ゴルジ体で GPI-APs の脂肪酸リモデリングに関わる PGAP2 が第 3 の責任遺伝子であることを明らかにした^[19]。

ドイツの Krawitz らのグループとの共同研究で、精神遅滞、けいれんおよび筋緊張低下などの多様な神経学的異常および高ホスファターゼ症が特徴とする高ホスファターゼ症-精神遅滞症候群 1 は、二卵性双生児を含む同胞 3 例の 1 家系でのゲノム領域の解析により、PIGV 遺伝子のホモ接合体変異であることを証明した^[20]。

また、中等度～重度の精神運動発達遅滞、顔貌異常、末節骨短縮、高ホスファターゼ症を特徴とする高ホスファターゼ症-精神遅滞症候群 2 については、姉妹 2 例と別の女兒 1 例の常染色体劣性疾患の遺伝子解析と *in vitro* での PIGO-欠乏 CHO 細胞株を用いた研究を行った。その結果、責任遺伝子は GPI のエタノールアミンリン酸を 3 番目のマンノースへの結合に関与する PIGO (Phosphatidylinositol glycan, class 0) の複合ヘテロ接合体変異による A1P 遊離が原因であることを明らかにした^{[21]、[22]}。

ドイツと英国の研究グループとは、高ホスファターゼ症候群-精神遅滞症候群 4 の患者 3 家系 5 例において、PGAP3 遺伝子のホモ接合または複合ヘテロ接合を証明し、CHO 細胞で調べた *in vitro* 機能実験では、全ての突然変異が PGAP3 の機能の部分的欠陥の原因となっていることを明らかにした。これらの突然変異では、ゴルジ体において GPI-AP の脂肪酸リモデリングが低下し、GPI-AP のラフト会合と解離が悪化していた。この成果により、神経発達と機能において GPI-AP の脂質部分の成熟化の重要性が明らかになった^[23]。

これらの国際的共同研究の成果から、PIGV/PIGO/PIGW、PGAP2、PGAP3 等による GPI アンカー欠損を原因とする高ホスファターゼ症-精神遅滞症候群の分子メカニズムは、それぞれ異なることが明らかとなった¹⁹⁴。

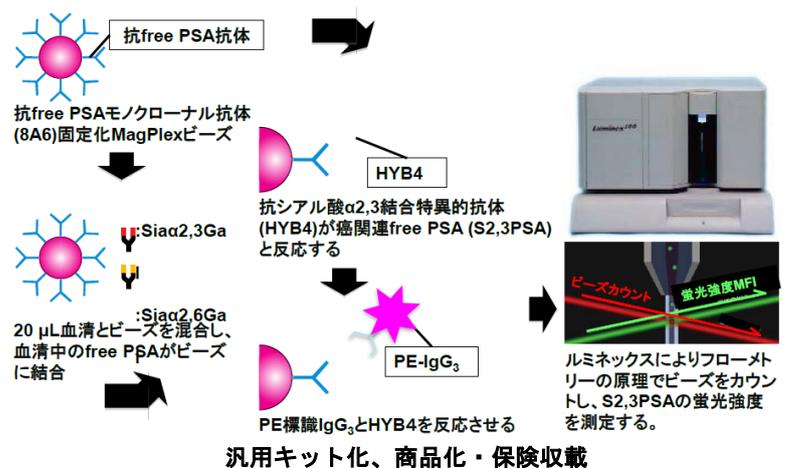
4.2.2 研究成果の波及と展望

(1) 科学技術への波及と展望

本研究領域で発見された GPI 生合成に必須の遺伝子 PIG-M のプロモーター部位の点変異を原因とする先天性 GPI アンカー欠損症は、モデルマウスを作製してさらに詳細な病態の解析が進められている。また、先天性 GPI アンカー欠損症は新規の難治疾患として認知され、病態解明と診断法確立にむけた研究が全国規模に広がった。日本では先天性 GPI 欠損症は 100 例の希少病とされてきたが、先天性 GPI アンカー欠損症の新たな標的分子として、国内外の研究グループを含めると 17 の GPI アンカー生合成遺伝子について欠損症例が見つかった^[13]。そのうち高ホスファターゼ症候群-精神遅滞症候群における PGAP 遺伝子の分子機構についても、ドイツ、デンマーク、英国などの海外との共同研究により分子機構が明らかになっており(4.2.1.(2)参照)、治療につながる研究が行われている。

また、本研究領域においてマウスモデルをもとに作用機序が明らかにされた涙が出ない病気は、世界的に Ngly-1 病と呼ばれて研究が広がっている。米国 CNN ニュースでも、2014 年 3 月 20 日「泣かない子供：新しい遺伝子病の発見」として取り上げられた¹⁹⁵。近年、治療法について専門家のミーティングも行われており、2014 年 2 月に米国サンディエゴにおいては Ngly-1 に特化したシンポジウムが開催されている。同年 11 月にハワイで開催された日本糖質学会-米国糖質科学会合同年会¹⁹⁶においても、米国がネットワークを作って Ngly-1 のセッションを設けており、医療における研究者-医師-両親の連携など治療方法の検討が世界的に議論されている¹⁹⁷。

癌関連PSA (S2,3PSA)の測定法概要



汎用キット化、商品化・保険収載
企業との共同研究進行中 (和光純薬・システムインストルメンツ)

図 4-7 PSA 糖鎖のがん性変異を利用した新規アッセイシステム
(提供：木下タロウ、大山力、和田芳直)

¹⁹⁵ CNN ニュース <http://edition.cnn.com/2014/03/20/health/ngly1-genetic-disorder/>

¹⁹⁶ Society for Glycobiology (SFG) & Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR) 2014 Joint Annual Meeting http://www.glycobiology.org/calendar_display.php?id=7162

¹⁹⁷ 2014 SFG & JSCR JOINT MEETING、PROGRAM AND ABSTRACTS FOR 2014 JOINT MEETING OF THE SOCIETY FOR GLYCOBIOLOGY (SFG) AND THE JAPANESE SOCIETY OF CARBOHYDRATE RESEARCH (JSCR) November 16-19, 2014 Honolulu, Hawaii

(2) 社会・経済への波及と展望

①糖タンパク質糖鎖分析法構築とがん診断への応用

本研究領域の成果により、前立腺がん特異抗原(PSA)の糖鎖識別による革新的前立腺がん検査法の実用化研究が進んでおり(図 4-7)、糖鎖異常症の診断に革新をもたらす技術に発展している。この前立腺がん診断法は、木下チームの弘前大学医学部泌尿器科の大山力と大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター研究所長の和田芳直との共同で開発し、2012年に特許出願された。

PSAは糖タンパク質であり、これまでも前立腺がんマーカーとして診断薬に利用されてきた。PSAの検出量3 ng/Lでは異常はないが、4~10 ng/Lでは発がん性の可能性があり、そのうち3割はがんを発症するとされている。従来の前立腺がんの診断では、PSAタンパク質の測定をもとにしているが、血清中のタンパク質レベルの上昇はがん特異的でなく前立腺肥大症や炎症においても見られるため、がん診断の精度をさらに向上させるため糖鎖の違いに着目した。和田らは本研究領域期間中に、前立腺がん特異的に発現するタンパク質には α 2,3シアル酸が結合した分岐N-glycanが多いが、正常PSAにはこのような2本鎖N-glycanはほとんど含まれずハイブリッドタイプや高マンノースタイプが主体であることを見出した。その後、大山らがこのがん性変化に着目して α 2,3シアル酸に特異的な抗体を作成し、この抗体を用いて前立腺がん特異的 Sia α 2,3Gal糖鎖を持つ free PSA アッセイ系を構築した^[24]。このアッセイ系により前立腺がんおよび前立腺肥大症患者血清の Sia α 2,3Gal-free PSA 含有量を測定した結果、従来の PSA 検査で前立腺がんの疑いがあると判断された患者で針生検により良性疾患と診断された患者のうち、約75.5%の患者について針生検が不要と判定された。したがって、本アッセイ系は従来法よりもがん性の検出に関して特異性が高いことが示唆され、現在実用化に向けて研究が継続されている¹⁹⁸。

②糖鎖分解の新規経路発見の治療への応用^[25]

本研究課題の主たる共同研究者である鈴木匡は、非リソソーム代謝機構の生理機能には Ngly-1(N-glycanase)が関与していることを明らかにし、涙が出ない病気がこの Ngly-1 遺伝子によるものであることを発見した。この Ngly-1 病は、多くの場合、精神遅滞(例えば4歳児は1歳程度の機能が観察される)や四肢の力の虚弱化がみられる。近年、海外でこのような症状をもつ患者が新たに Ngly-1 病と診断され、患者数は現在17名である。

従来 Ngly-1 についての知見はほとんど得られておらず、本研究領域で世界に先駆けて確立していたマウスの疾患モデル動物を用いて鈴木らの研究により Ngly-1^{-/-}は致死であるが、下流の酵素 ENGase^{-/-}のダブルノックアウトマウスは生存することが判明し、その後世界で新たな知見が蓄積されている。これらの結果を応用した Ngly-1^{-/-}の致死性を回避する治療手段が期待されて

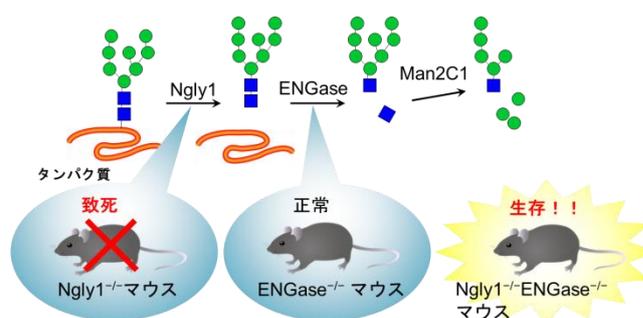


図 4-8 非リソソーム代謝機構の生理機能の解明
(提供：理化学研究所 鈴木匡)

¹⁹⁸ A-STEP 事後評価 http://www.jst.go.jp/a-step/hyoka/tansaku_h2502/tansaku_f.html

おり、ENGase 阻害物質の探索が行われている(図 4-8)。

また、本研究で発見した糖鎖分解新規経路は基礎的な生物学的素過程であると認知され、糖鎖の生物学の教科書に取り入れられた^[25]。

引用文献

- [1] Ferguson M. A., Kinoshita T., Hart G. W., Chapter 11 Glycosylphosphatidylinositol Anchors (2008) *Essentials of Glycobiology* (Varki A., Cummings R. D., Esko J. D., Freeze H. H., Stanley P., Bertozzi C. R., Hart G. W., Etzler M. E. eds.), pp. 143-161, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [2] Fujita M., Maeda Y., Ra M., Yamaguchi Y., Taguchi R., Kinoshita T., GPI glycan remodeling by PGAP5 regulates transport of GPI-anchored proteins from the ER to the Golgi (2009) *Cell*, 139, pp. 352-365.
- [3] Maeda Y., Tashima Y., Houjou T., Fujita M., Yoko-o T., Jigami Y., Taguchi R., Kinoshita T., Fatty acid remodeling of GPI-anchored proteins is required for their raft association (2007) *Molecular Biology of the Cell*, 18, pp. 1497-1506.
- [4] Maeda Y., Ide T., Koike M., Uchiyama Y., Kinoshita T., GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus (2008) *Nature Cell Biology*, 10, pp. 1135-1145.
- [5] Isaji T., Sato Y., Zhao Y., Miyoshi E., Wada Y., Taniguchi N., Gu J., N-glycans on the beta-propeller domain of the integrin alpha5 subunit are essential for alpha5beta1 heterodimerization, expression on the cell surface and its biological function (2006) *Journal of Biological Chemistry*, 281, pp. 33258-33267.
- [6] Isaji T., Sato Y., Fukuda T., Gu J., N-glycosylation of the I-like domain of beta1 integrin is essential for beta1 integrin expression and biological function: Identification of the minimal N-glycosylation requirement for alpha 5beta 1 (2009) *Journal of Biological Chemistry*, 284, pp. 12207-12216.
- [7] Sato Y., Isaji T., Tajiri M., Yoshida-Yamamoto S., Yoshinaka T., Somehara T., N-Fukuda T., Wada Y., Gu J., An N-glycosylation site on the beta-propeller domain of the integrin alpha5 subunit plays key roles in both its function and site-specific modification by beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III (2009) *Journal of Biological Chemistry*, 284, pp. 11873-11881.
- [8] Fujita M., GPI-anchor remodeling: potential functions of GPI-anchors in intracellular

- trafficking and membrane dynamics (2012) *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821, pp. 1050–1058.
- [9] Seong J., Implication of lipid moiety in oligomerization and immunoreactivities of GPI-anchored proteins. (2013) *Journal of Lipid Research*, 54, pp. 1077–1091.
- [10] Kuki I., Takahashi Y., Okazaki S., Kawaki H., Ehara E., Inoue N., Kinoshita T., Murakami Y., Vitamin B6-responsive epilepsy due to inherited GPI deficiency (2013) *Neurology*, 81, pp. 1467–1469.
- [11] Kanzawa N., Shimozawa N., Wanders R. J. A., Ikeda K., Murakami Y., Waterham H. R., Mukai S., Fujita M., Maeda Y., Taguchi R., Fujiki Y., Kinoshita T., Defective lipid remodeling of GPI anchors in peroxisomal disorders, Zellweger syndrome, and rhizomelic chondrodysplasia punctata (2012) *Journal of Lipid Research*, 53(4), pp. 653–663.
- [12] Loizides-Mangold U., GPI anchors regulate glycosphingolipid levels (2012) *Journal of Lipid Research* 53, pp. 1522–1534.
- [13] 藤田盛久、GPI アンカー型タンパク質の生合成・リモデリング機構、生化学、第 85 巻第 11 号、pp. 985–995、2013
- [14] Murakami Y., Kanzawa N., Saito K., Krawitz P. M., Mundlos S., Robinson P. N., Karadimitris A., Maeda Y., Kinoshita T., Mechanism for release of alkaline phosphatase caused by glycosylphosphatidylinositol deficiency in patients with hyperphosphatasia mental retardation syndrome (2012) *Journal of Biological Chemistry*, 287, pp. 6318–6325.
- [15] Uchida Y., Hasegawa J., Chinnapen D., Inoue T., Okazaki S., Kato R., Wakatsuki S., Misaki R., Koike M., Uchiyama Y., Iemura S. -I., Natsume T., Kuwahara R., Nakagawa T., Nishikawa K., Mukai K., Miyoshi E., Taniguchi N., Sheff D., Lencer W. I., Taguchi T., Intracellular phosphatidylserine is essential for retrograde membrane traffic through endosome (2011) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, pp. 15846–15851.
- [16] Maeda Y., Ide T., Koike M., Uchiyama Y., Kinoshita T., GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus (2008) *Nature Cell Biology*, 10, pp. 1135–1145.
- [17] Takida S., Maeda Y., Kinoshita T., Mammalian GPI-anchored proteins require p24 proteins for their efficient transport from the ER to the plasma membrane (2008) *Biochemical*

Journal, 409, pp. 555-562.

- [18] Fujita M., Watanabe R., Jaensch N., Romanova-Michaelides M., Satoh T., Kato M., Riezman H., Yamaguchi Y., Maeda Y., Kinoshita T., Sorting of GPI-anchored proteins into ER exit sites by p24 proteins is dependent on remodeled GPI (2011) *Journal of Cell Biology*, 194, pp. 61-75.
- [19] Hansen L., Tawamie H., Murakami Y., Mang Y., ur Rehman S., Buchert R., Schaffer S., Muhammad S., Bak M., Nöthen M.M., Bennett E.P., Maeda Y., Aigner M., Reis A., Kinoshita T., Tommerup N., Baig S.M., Abou Jamra R., Hypomorphic mutations in PGAP2, encoding a GPI-anchor-remodeling protein, cause autosomal-recessive intellectual disability (2013) *American Journal of Human Genetics*, 92, pp. 575-583.
- [20] Krawitz P.M., Schweiger M.R., Rodelsperger C., Marcelis C., Kolsch U., Meisel C., Stephani F., Kinoshita T., Murakami Y., Bauer S., Isau M., Fischer A., et al., Identity-by-descent filtering of exome sequence data identifies PIGV mutations in hyperphosphatasia mental retardation syndrome (2010) *Nature Genetics*, 42, pp. 827-829.
- [21] Krawitz P.M., Murakami Y., Hecht J., Kruger U., Holder S.E., Mortier G.R., Delle Chiaie B., De Baere E., Thompson M.D., Roscioli T., Kielbasa S., Kinoshita T., Mundlos S., Robinson P.N., Horn D., Mutations in PIGO, a member of the GPI-anchor-synthesis pathway, cause hyperphosphatasia with mental retardation (2012) *American Journal of Human Genetics*, 91, pp. 146-151.
- [22] Krawitz P.M., Murakami Y., Rieß A., Hietala M., Krüger U., Zhu N., Kinoshita T., Mundlos S., Hecht J., Robinson P.N., Horn D., PGAP2 mutations, affecting the GPI-anchor-synthesis pathway, cause hyperphosphatasia with mental retardation syndrome (2013) *American Journal of Human Genetics*, 92, pp. 584-589.
- [23] Howard M.F., Murakami Y., Pagnamenta A.T., Daumer-Haas C., Fischer B., Hecht J., Keays D.A., Knight S.J.L., Kolsch U., Kruger U., Leiz S., Maeda Y., Mitchell D., Mundlos S., Phillips III J.A., Robinson P.N., Kini U., Taylor J.C., Horn D., Kinoshita T., Krawitz P.M., Mutations in PGAP3 impair GPI-anchor maturation, causing a subtype of hyperphosphatasia with mental retardation. (2014) *American Journal of Human Genetics*, 94, pp. 278-287
- [24] Tegtmeyer L.C., Rust S., Van Scherpenzeel M., Ng B.G., Losfeld M.-E., Timal S., Raymond K., He P., Ichikawa M., Veltman J., Huijben K., Shin Y.S., Sharma V., Adamowicz M., Lammens M., Reunert J., Witten A., Schrapers E., Matthijs G., Jaeken J., Rymen D.,

Stojkovic T., Laforêt P., Petit F., Aumaitre O., Czarnowska E., Piraud M., Podskarbi T., Stanley C.A., Matalon R., Burda P., Seyyedi S., Debus V., Socha P., Sykut-Cegielska J., Van Spronsen F., De Meirleir L., Vajro P., DeClue T., Ficicioglu C., Wada Y., Wevers R.A., Vanderschaeghe D., Callewaert N., Fingerhut R., Van Schaftingen E., Freeze H.H., Morava E., Lefeber D.J., Marquardt T., Multiple phenotypes in phosphoglucomutase 1 deficiency (2014) *New England Journal of Medicine*, 370, pp. 533-542.

[25]Harada Y., Nakajima K., Masahara-Negishi Y., Freeze H.H., Angata T., Taniguchi N., Suzuki T., Metabolically programmed quality control system for dolichol-linked oligosaccharides (2013) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, pp. 19366-19371.

4.3 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（宮城妙子）

4.3.1 研究の概要

(1) 研究テーマの状況(国内)

細胞ががん化すると、細胞表面の糖タンパク質や糖脂質の糖鎖に異常が起こる。特に酸性糖シアル酸の異常は、がんの転移や浸潤と関わっている。シアリダーゼは、このシアル酸を脱離することによって、細胞シアル酸量を調節する糖分解酵素であるが、細胞の増殖や分化、あるいは細胞内の情報伝達を制御する働きをすることが次第にわかってきた。さらに、シアリダーゼの生理機能を明らかにし、この発現異常によってもたらされる種々の細胞機能の破綻と意義について、主に、がん注目し、そのがん診療への応用を目指して研究を続けている。

遺伝子クローン化とその性状解析に世界で初めて成功した形質膜シアリダーゼ NEU3 について、ヒト大腸がんで異常発現をみいだしたので、その機構や意義を検討してきた。このトランスジェニックマウスの解析では NEU3 が糖尿病の発症に関わっていることを発見した^[1]。このマウスにおいては、期待されたような大腸がんの発症は見られなかったが、本研究領域終了後、発がん剤アゾキシメタンの投与により、前がん病変である Aberrant crypt foci (ACF) の形成が大腸粘膜で有意に増加し^[2]、逆に、ノックアウトマウスでは炎症誘導性大腸腫瘍の発生頻度が低下していることがわかった^[3]。これは NEU3 の発がん過程への関与を示唆している。また、がんで発現低下傾向を示す NEU1^[4]や NEU4^[5]を高発現させると、がん細胞は正常細胞に似た性質を示し、がん転移能や細胞接着を低下させた(図 4-9, 10)。3種のシアリダーゼのがんにおけるユニークな役割が明らかになりつつある。

本研究領域終了後、大腸がん^[6]、腎がん^[7]の他に悪性黒色腫^[8]および前立腺がん^[9]でも NEU3 ががんの悪性化と関連することを明らかにした。これらの成果を基に、NEU3 に対する siRNA や特異抗体、阻害剤による新規治療法の開発を続けている。

①NEU3 の糖尿病発症への関与

インスリン抵抗性糖尿病を発症した NEU3 トランスジェニックマウスにおける結果^[1]を基に、2型糖尿病患者において、ガングリオシド代謝酵素のうち NEU3 と SIAT9 の遺伝子多型、変異を検索

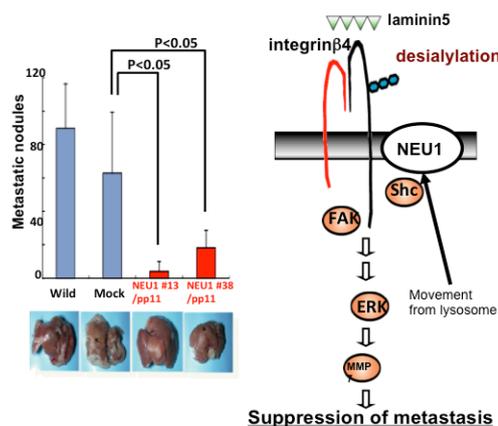


図4-9 NEU1によるがん転移能の抑制^[4]
(提供：東北薬科大学 宮城妙子)

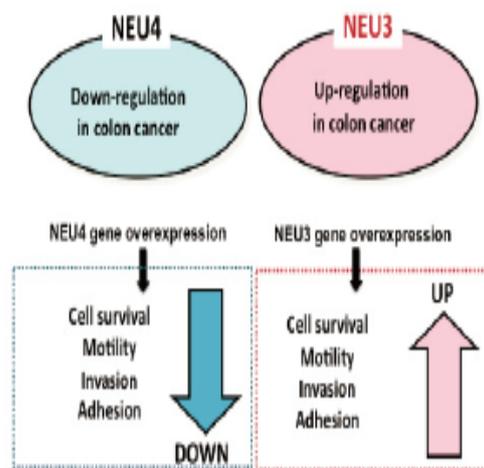


図 4-10 NEU3 及び NEU4 のがんにおける役割^[5]
(提供：東北薬科大学 宮城妙子)

し、臨床像との関連を解析した。2型糖尿病患者において見いだされた NEU3 遺伝子の多型の頻度が正常者に比べて有意に高く ($p < 0.001$)、かつインスリン抵抗性と高い相関を示した。NEU3 変異体を作成して wild-type と比較した結果、変異体は酵素反力学的には大きな差は認められないものの、インスリン分泌能やタンパク自身の安定性等が変化している可能性が示唆された¹⁹⁹。

②悪性黒色腫における NEU3 の関与

ガングリオシド GD3 非発現メラノーマ細胞 SK-MEL-28-N1 に GD3 合成酵素遺伝子を導入した GD3 発現細胞を解析した結果、GD3 の高発現により細胞の増殖及び浸潤能の亢進が認められ、FCS 刺激により、MAPK、Akt、FAK、p130Cas 及び paxillin などの細胞増殖、細胞浸潤に関係するタンパク質のリン酸化が増強された。GD3 の発現により細胞接着性も増大し、インテグリンを介した接着刺激により細胞増殖や浸潤性が亢進し、p130Cas 及び paxillin も顕著に活性化された。また、ヒトメラノーマ細胞では大腸がん細胞と同等の Neu3 遺伝子発現が認められた^[8]。

③ホルモン不応性前立腺がんにおける NEU3 の役割

前立腺がんは近年増加傾向にあるが、その治療としてがんを増大させるアンドロゲンの働きを抑えるホルモン療法が行われている。しかし、次第にホルモン療法に抵抗性を示すようになり、がんが再燃することがあり、治療上の大きな問題となっている。この過程において、NEU3 が前立腺がん患者のがん組織で異常に増加すること、その変化ががんの悪性度と相関することを見いだした。さらに、この酵素異常はホルモン療法においてホルモンの作用を抑制している状態でもがん細胞の生存を増強してがんを増大させていることがわかった。また、マウスに移植した前立腺がんは NEU3 の発現を siRNA により低下させるとがんが縮小することが判明した。

この現象に関連する分子メカニズムの検証も行われた。NEU3 を強制発現させると、AKT 及び ERK1/2 のリン酸化は活性化され、アポトーシスが抑制され、EGR-1、AR、PSA の発現が増加したが、PI3 キナーゼや MAP キナーゼの阻害剤によって、これらの発現増加は失われた。一方、siRNA により NEU3 発現を阻害すると細胞死が促進され、Bcl-2 ならびに悪性度増強に関わる EGR-1 の発現量が低下したので、ホルモン不応性前立腺がんにおける NEU3 の悪性化への関与機構が明らかになった (図 4-11)^[9]。

現在、NEU3 発現の低下によるホルモン不応性前立腺がんの治療への応用の可能性も考慮して研究を続けている。また、がんにおける NEU3 発現レベルの定量と PSA 検査との併用により、より正確な診断ができることがわかってきたので、新しい前立腺がんの診断方法の確立も視野に入れている¹³⁰。さらに、前立腺がん患者の血清には非がん血清と比べて有意に高いシアリダーゼ活性が検出され、それが NEU3 であることをみいだしたので^[10]、非侵襲性の診断法として、サンドイッチ ELISA による血清 NEU3 定量も臨床科との共同で開発できる可能性がある。

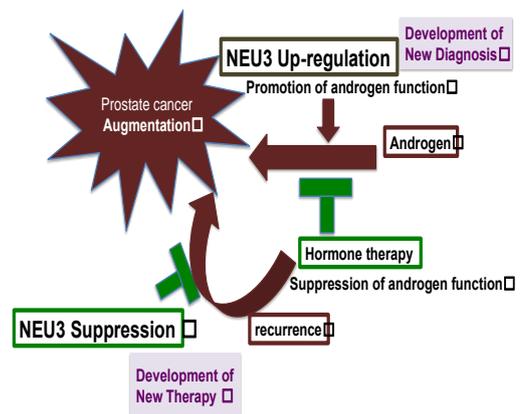


図4-11 前立腺がんの新規診断薬の開発^[9]

(提供：東北薬科大学 宮城妙子)

¹⁹⁹ Suzuki et al. The 18th International Symposium Glycoconjugates. Florence, Italy, 2005. 9.

④NEU3 のがん化における役割の解明

先述のように、NEU3 トランスジェニックやノックアウトマウスにおける観察により、NEU3 ががんの進展のみではなく、発がん過程にも大いに影響していることが推察されてきた。そこで、この可能性について、テトラサイクリン誘導系の大腸がんNEU3 ノックダウン細胞を用いて調べると、軟寒天培地上でのコロニー形成能やヌードマウスにおける *in vivo* 腫瘍形成能が有意に低下した。これらの細胞では、NEU3 が Wnt の共レセプターである LRP 6 のリン酸化を上昇して、Wnt/

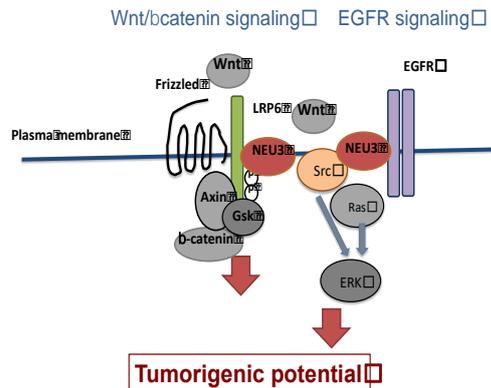


図4-12 NEU3によるWnt及びEGFシグナルの活性化^[11]

(出典：東北薬科大学 宮城妙子)

ノックアウトが幹細胞及び Wnt の関連遺伝子の発現低下を招いていることが明らかとなった。ここでも、NEU3 ががんの進展のみではなく、がん化能をも制御していることを推察させた(図 4-12)^[11]。この Wnt シグナルの活性化は Ras/MAPK シグナル活性化にも依存して居り、大腸がんのがん化と進展には発がん過程の初期における Wnt と Ras シグナルの両方の活性化を必要とするという最近の知見を検証するもので、ガングリオシド発現の調節を介して、シグナルの調節をする NEU3 の新しいがんにおける役割の発見でもある。また、EGFR のリン酸化亢進を介して、Ras/MAPK シグナル活性化をもたらす NEU3 の高発現は、実際に、NIH-3T3 細胞の形質転換をもたらすこともわかってきた^[12]。これらの最近の知見は、NEU3 ががん化能に大きく関わっていることを示すことになった。

⑤NEU3 によるがんおよび糖尿病発症に関する分子機構の解明

NEU3 のがん及び糖尿病発症への関与について、NEU3 亢進をもたらす EGFR シグナル及びインスリンシグナル異常の 2 つの作用について *in vivo* および *in vitro* の解析を行った。NEU3 を過剰発現してがんの悪性度が増強したトランスジェニックマウスでは、膵β細胞肥大を起こしてインスリン抵抗性の糖尿病を発症する一方、発がん剤アゾキシメタン投与により前がん病変 ACF 形成の促進が起こる。このふたつの異なった病態への NEU3 の関与機構を解析した結果、NEU3 による Wnt シグナルの活性化がふたつの病態に関わっている可能性が示唆された。さらに、④で述べたように、*in vitro* 系において、NEU3 発現亢進が Wnt シグナルを活性化させ、NEU3 によるがんの悪性進展に大きく影響していることがわかった。一方、NEU3 のトランスジェニックマウスで見られたような膵・細胞の増殖とラ氏島肥大およびその後のインスリン抵抗性の出現には、Wnt シグナルの活性化が必要であるという最近の報告がある。NEU3 ががんと糖尿病というふたつの病態にここでクロストークしている可能性が強く示唆された。今後この観点から詳細に検討を進めたい。

⑥CD44 の活性化におけるシアリダーゼの関与

マウスT細胞に着目し、CD44の活性化におけるシアリダーゼの関与を調べる目的で、ダニ抗原誘発マウスアトピー型急性喘息モデルを作製した。この喘息モデルにおいて抗CD44抗体の前処置により気道への活性化T細胞(Th2細胞)の集積が抑制され、気道炎症及び気道過敏性の亢進が抑制さ

れた。生体内にHA結合性CD4陽性T細胞が存在し、抗原刺激により脾臓細胞のシアリダーゼ (NEU1、NEU3) の発現が亢進し、CD4陽性T細胞のHA 結合性が誘導されることから、喘息の病態形成へのシアリダーゼの関与が示唆された^[13]。

⑦NEU3 の軸索伸展再生の促進機構

シアリダーゼ NEU3 が初代培養海馬神経細胞で軸索の伸展再生を促進するという現象の機構の解明をめざした。その結果、シアリダーゼ感受性の GD1b、GT1b が細胞膜表面受容体によって認識され、細胞内の CaMK II の活性化を経てフィロポディアの形成、樹状突起の伸展を促進することを見出した。一方、シアリダーゼ抵抗性の GM2 も同様の細胞膜表面受容体によって認識されて、樹状突起伸展にいたるシグナルを活性化していることを見出したが、その経路では PKA が用いられていた。Neu3 感受性のガングリオシド GT1b、GD1b はブラジキニン B2 受容体を活性化するリガンドであることが明らかになった。また、NEU3 が神経細胞分化を促進し、NEU4 が抑制していること^[14]、さらに、がんで上昇するといわれるポリシアル酸結合神経接着因子 NCAM のポリシアル酸を水解する働きを NEU4 にみいだした^[15]。この結果によって、がんにおける NEU4 低下のひとつの意義を明らかにすることになった。

(2) 海外での共同研究の状況

本研究領域期間中に NEU3 が糖尿病だけでなく大腸がんおよび腎臓がんにおいても悪性化に関与していることを突き止めた論文を公表し、研究領域終了後に海外の製薬企業から共同研究の申し込みがあった。また、NEU3 の生理的な活性化がホスホリパーゼ D1 (PLD1) を介したホスファチジン酸によって起こることをイタリアの研究グループと共同でみいだした^[16]。さらに、Neu3 ノックアウトマウスによる GM2 ガンリオドーシスの機構解明など、カナダやトルコのグループと共同研究中である。

4.3.2 研究成果の波及と展望

(1) 科学技術への波及と展望

各種ヒトがんで異常亢進するシアリダーゼ NEU3 は、がんの細胞死を抑制など、悪性度を増強していることを発見した。その機序のひとつとして、増殖シグナルを過剰に活性化していることを明らかにした。即ち、NEU3 は酵素触媒反応にとどまらず、自らもシグナル分子として分子間相互作用を介してシグナル制御に与ることが示され、糖鎖酵素分子としての新機能の発見となった。

形質膜シアリダーゼを標的とするがん治療薬の開発研究が行われている (図 4-13)。

siRNA による創薬研究については、A-STEP シーズン型「NEU3-siRNA を用いる抗がん剤の実用化可能性の検証」(2009) において、siRNA による抗がん剤の開発を行い、現在も創薬に向けた研究を継続し

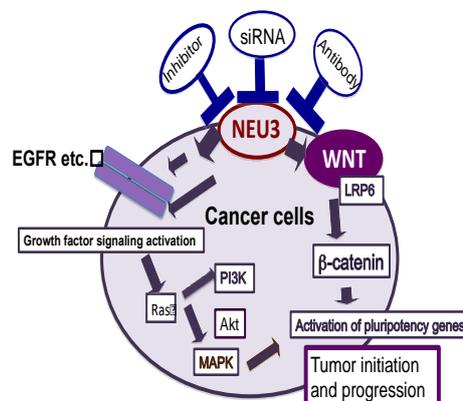


図4-13 NEU3を標的としたがん治療法の開発
(出典：東北薬科大学 宮城妙子)

ている²⁰⁰。がん細胞に siRNA を効率的に運ぶ DDS の選択、およびヒト卵巣がん、胃がん、大腸がん、膀胱がんなどから感受性の高いがん種を選択が行われた。その結果、2 種の国内市販の DDS を用いることにより、4 種の担がんモデルにおいてがん増殖阻止効果を示した。なお、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の「イノベーション推進事業(研究開発型ベンチャー技術開発助成事業)」に「生体試料中の微量 siRNA 定量化キットの実用化開発」が採択され、生体試料中の全長 siRNA を定量する技術を開発して測定キットの実用化が進められた¹³²。

特異的抗体による創薬研究については、抗体作製分野で高い技術を持つベンチャー企業と共同で開発を進めている。

NEU3 特異的阻害剤については、A-STEP 探索タイプ「がんで異常亢進するシアリダーゼの特異的 低分子阻害剤の探索と創薬への応用」(2013)において、NEU3 阻害剤のスクリーニングを東京大学 創薬オープンイノベーションセンターと共同で 20 万化合物ライブラリーに対して行ったが、有意に NEU3 を特異的に阻害する活性を持つ化合物は最終的には得られなかった。また現在、北里大学 と共同で、NEU3 阻害剤として天然物 300 に対するスクリーニングを行っている。また、NEU1、NEU3、 NEU4 に対する阻害剤デザインを行い^[17]、岐阜大との共同で NEU1 阻害剤の合成に成功している^[18]。

肺がん等において、がんで過剰発現する EGF 受容体 (EGFR) のキナーゼ阻害剤は、遺伝子変異 が陽性の場合のみ薬剤効果があり、その後の耐性出現などの問題点も多いことから、A-STEP 探索 タイプ「形質膜シアリダーゼを標的とするがんオーダーメイド医療の開発」(2011)では、EGFR の 活性化を介してがんの悪性形質を促進する NEU3 の診断・治療薬としての有用性について検討した。 その結果、EGFR キナーゼ阻害剤のゲフィチニブによる増殖抑制効果がないとされていた EGFR 遺 伝子変異陰性の肺がん細胞においても、NEU3 を高発現させると EGFR の活性化が亢進されるだけ でなく、ゲフィチニブに対する薬剤感受性が上昇し細胞増殖が有意に抑制されたことから²⁰¹、 NEU3 はがんの診断・治療の標的として有用であることが推察された²⁰²。

(2) 社会・経済への波及と展望

シアリダーゼ NEU3 を標的とするがんまたは糖尿病治療のための医薬品に関して、国際特許出願 ²⁰³が行われ、国内では登録に至っている²⁰⁴。企業との共同研究による形質膜シアリダーゼに対す る siRNA、抗体医薬、阻害剤の開発はこの国内特許をもとに進められている。

また、シアリダーゼの生理機能及び病態との関わり、特にがんの発生や進展への重要な関与に ついての知見は、抗がん剤創薬を目的として注目され、2012 年の前立腺がんにおける NEU3 の機 能解明の論文^[9]は、A-IMBN Research においてアジアの研究者による最近のベスト論文のひとつ として選ばれ、新聞報道がなされた²⁰⁵。この選定に関しては Nature 誌の記者から取材も受け、世界 的にインパクトを及ぼしたことが示された。

²⁰⁰ <http://www.genecare.co.jp/ja/topics/20091029/index.htm>

²⁰¹ 第 4 回東北糖鎖研究会 <http://www.glycoforum.gr.jp/square/touhoku04/>

²⁰² A-Step ホームページ http://www.jst.go.jp/a-step/hyoka/tansaku_h2502/tansaku_f.html

²⁰³ 宮城妙子、和田正、山口壹範、がんまたは糖尿病治療のための医薬組成物、W006/054555 (2008 年 5 月 29 日公開)、 出願人：宮城県

²⁰⁴ 宮城妙子、和田正、山口壹範、がんまたは糖尿病治療のための医薬組成物、特許第 04851940 号 (2011 年 10 月 28 日登録)、出願人：宮城県

²⁰⁵ 東北薬科大学プレスリリース <http://www.tohoku-pharm.ac.jp/new/index.cgi?eid=274>

(3) その他特筆すべき事項

本研究領域の宮城グループの袖岡幹子は、領域終了後に JST の ERATO 「袖岡生細胞分子化学プロジェクト」(2009-2014) を実施し、細胞のアポトーシス機構に関する研究をさらに発展させてネクローシス(細胞壊死)のメカニズムの解明に貢献し、新たなネクローシス阻害剤 IM-54 の開発などの成果を上げている。

引用文献

- [1] Sasaki A., Hata K., Suzuki S., Sawada M., Wada T., Yamaguchi K., Obinata M., Tateno H., Suzuki H., Miyagi T., Overexpression of plasma membrane-associated sialidase attenuates insulin signaling in transgenic mice (2003) *Journal of Biological Chemistry*, 278, pp. 27896-27902.
- [2] Shiozaki K., Yamaguchi K., Sato I., Miyagi, T., Plasma membrane -associated sialidase (NEU3) promotes formation of colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-treated transgenic mice. (2009) *Cancer Science* 100(4), pp. 588-594.
- [3] Yamaguchi K., Shiozaki K., Moriya S., Koseki K., Wada T., Tateno H., Sato I., Asano M., Iwakura Y., Miyagi T., Reduced susceptibility to colitis-associated colon carcinogenesis in mice lacking plasma membrane-associated sialidase (2012) *PLoS One*, 7(7), e41132.
- [4] Uemura T., Shiozaki K., Yamaguchi K., Miyazaki S., Satomi S., Kato K., Sakuraba H., Miyagi T., Contribution of sialidase NEU1 to suppression of metastasis of human colon cancer cells through desialylation of integrin $\beta 4$ (2009) *Oncogene*, 28, pp. 1218-1229.
- [5] Shiozaki K., Yamaguchi K., Takahashi K., Moriya S., Miyagi T., Regulation of sialyl lewis antigen expression in colon cancer cells by sialidase NEU4 (2011) *Journal of Biological Chemistry*, 286, pp. 21052-21061.
- [6] Wada T., Hata K., Yamaguchi K., Shiozaki K., Koseki K., Moriya S., Miyagi T., A crucial role of plasma membrane-associated sialidase (NEU3) in the survival of human cancer cells (2007) *Oncogene*, 26, pp. 2483-2490.
- [7] Ueno S., Saito S., Wada T., Yamaguchi K., Satoh M., Arai Y., Miyagi T., Plasma membrane-associated sialidase is up-regulated in renal cell carcinoma and promotes interleukin-6-induced apoptosis suppression and cell motility (2006) *Journal of Biological Chemistry*, 281, pp. 7756-7764.
- [8] Miyata M., Kambe M., Tajima O., Moriya S., Sawaki H., Hotta H., Kondo Y., Narimatsu

- H., Miyagi T., Furukawa K., Furukawa K., Membrane sialidase NEU3 is highly expressed in human melanoma cells promoting cell growth with minimal changes in the composition of gangliosides (2011) *Cancer Science*, 102(12), pp. 2139-2149.
- [9] Kawamura S., Sato I., Wada T., Yamaguchi K., Li Y., Li D., Zhao X., Ueno S., Aoki H., Tochigi T., Kuwahara M., Kitamura T., Takahashi K., Moriya S., Miyagi T., Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) regulates progression of prostate cancer to androgen-independent growth through modulation of androgen receptor signaling (2012) *Cell Death and Differentiation*, 19(1), pp. 170-179.
- [10] Hata K., Tochigi T., Sato I., Kawamura S., Shiozaki K., Wada T., Takahashi K., Moriya S., Yamaguchi K., Hosono M., Miyagi T. Increased sialidase activity in serum of cancer patients: identification of sialidase and inhibitor activities in human serum (2015) *Cancer Science*, in press
- [11] Miyagi T, Takahashi K, Shiozaki K, Yamaguchi K, Hosono M. Plasma membrane-associated sialidase confers cancer initiation, promotion and progression. (2015) *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 842, pp. 139-145.
- [12] Yamamoto K., Takahashi K., Shiozaki K., Yamaguchi K., Moriya S., Hosono M., Shima H., Miyagi T. Potentiation of epidermal growth factor-mediated oncogenic transformation by sialidase NEU3 leading to Src activation (2015) *PLoS One*, in press
- [13] Katoh S, Maeda S, Fukuoka H, Wada T, Moriya S, Mori A, Yamaguchi K, Senda S, Miyagi T. A crucial role of sialidase Neu1 in hyaluronan receptor function of CD44 in T helper type 2-mediated airway inflammation of murine acute asthmatic model. (2010) *Clinical Experimental Immunology* 161, pp. 233-241.
- [14] Shiozaki, K., Koseki, K., Yamaguchi, K., Shiozaki, M., Narimatsu H., and Miyagi, T: Developmental change of sialidase Neu4 expression in murine brain and its involvement in the regulation of neuronal cell differentiation. (2009) *Journal of Biological Chemistry*, 284, pp. 21157-21164.
- [15] Takahashi K., Mitoma J., Shiozaki K., Hosono M., Sato C., Yamaguchi K., Kitajima K., Higashi H., Nitta K., Shima H., and Miyagi T.: Sialidase NEU4 Hydrolyzes Polysialic Acids of Neural Cell Adhesion Molecules and Negatively Regulates Neurite Formation by Hippocampal Neurons. (2012) *Journal of Biological Chemistry*, 287, pp. 14816-14826.
- [16] Shiozaki K., Takahashi K., Hosono M., Yamaguchi K., Hata H., Shiozaki M., Bassi R.,

Prinetti A., Sonnino S., Nitta K., Miyagi T. Phosphatidic acid-mediated activation and translocation to the cell surface of sialidase NEU3, promoting signaling for cell migration (2015) The FASEB Journal, in press

[17] Magesh S., Suzuki T., Miyagi T., Ishida H., Kiso M. Homology modeling of human sialidase enzymes NEU1, NEU3 and NEU4 based on the crystal structure of NEU2: Hints for the design of selective NEU3 inhibitors. (2006) Journal of Molecular Graphics and Modelling, 25, pp. 96-207.

[18] Magesh S., Moriya S., Suzuki T., Miyagi T., Ishida H., Kiso M., Design, synthesis, and biological evaluation of human sialidase inhibitors. Part 1: Selective inhibitors of lysosomal sialidase (NEU1) (2008) Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 18, pp. 532-537.