

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成 14 年度採択研究代表者

神奈木 玲児

(愛知県がんセンター分子病態学部 部長)

「癌の進展における細胞接着性機能糖鎖の解明」

1. 研究実施の概要

セレクトインとその糖鎖リガンドを介した細胞接着について、**神奈木グループ**は、細胞接着分子セレクトインとその特異的リガンド糖鎖を介した細胞接着の機能的意義を明らかにすることを研究目的としている。本年度は特に硫酸化型のセレクトインの特異的リガンドであるシアリル 6-スルホ Le^x 糖鎖について、ヒトヘルパーメモリーT細胞の皮膚ホーミングにおける役割を解析し、またモデル動物(硫酸基転移酵素遺伝子ノックアウトマウス)を用いて硫酸化型リガンド糖鎖の生理的意義を検索した。また、癌の進行に伴う。また、癌の進行に伴う転写因子 hypoxia inducible factor の発現亢進によって誘導される糖鎖関連遺伝子と、それにより引き起こされる細胞表層糖鎖の変化についてさらに解析した。**北島グループ**は生体において細胞表面のシアル酸の構造変化によって細胞接着機能が正負に制御される機構を利用して、癌細胞の転移増殖を人為的に制御することを目指し、細胞の接着性に関わる新規シアル酸構造であるサイクリックシアル酸、硫酸化シアル酸、デアミノシアル酸およびポリ・オリゴシアル酸構造に着目して、これまでにそれらの検出法の開発と存在分布解析を行った。**小島グループ**は細胞や機能性分子から人工糖脂質ライブラリーを構築し、それらに含まれる機能性糖鎖の同定ならびに解析を行うことを目的としている。本年度は、モデルオリゴ糖を用いて蛍光標識糖鎖に変換可能な蛍光人工糖脂質を創成し、この蛍光人工糖脂質が機能および構造解析に有用であることを確認した。今後はこの蛍光人工糖脂質化によって大腸癌細胞株の E-セレクトインリガンドを解析する。

CD44 とヒアルロン酸を介した細胞接着について、**浜口グループ**はヒアルロン酸合成が活性化している v-Src 癌化細胞やヒト癌由来細胞株を用いて、ヒアルロン酸合成酵素とそのレセプターである CD44、あるいはその下流のシグナル伝達因子を標的とする、癌細胞の浸潤転移を抑制する新たな遺伝子治療法を開発しようと試みた。また**板野グループ**はヒアルロン酸糖鎖合成を標的とした癌浸潤転移阻止技術を開発するため、精製ヒアルロン酸合成酵素を用いた無細胞ヒアルロン酸合成系を確立した。今後は新規ヒアルロン酸合成阻害剤の探索を加速するとともに、阻害活性の認められた化合物についてはマウス動物試験により制癌・抗転移活性を評価して、前臨床試験的なデータの取得に努める。

2. 研究実施内容

セレクトインとその糖鎖リガンドを介した細胞接着について、**神奈木グループ**は、ヒトヘルパーメモリーT細胞の皮膚ホーミングにおける細胞接着分子セレクトインと硫酸化型のセレクトインの特異的リガンドであるシアリル 6-スルホ Le^x 糖鎖を介した細胞接着の役割を解析した。健康人ヒト末梢血リンパ球のうちヘルパーメモリーT細胞の約 10~15%は無刺激下でシアリル 6-スルホ Le^x 糖鎖を発現し、E-、P-、L-セレクトインと接着する。抗シアリル 6-スルホ Le^x 抗体によりこの接着が阻害されることから、シアリル 6-スルホ Le^x 糖鎖が接着を媒介していると考えられる。シアリル 6-スルホ Le^x 糖鎖を発現するヘルパーメモリーT細胞サブセットは CCR4⁺CCR9⁻α4β7-integrin⁻であり、皮膚ホーミング性のヘルパーメモリーT細胞であることが判明した。このT細胞はフコース転移酵素 VII および硫酸基転移酵素 HEC-GlcNAc6ST の mRNA を有意に発現していることから、これらによりシアリル 6-スルホ Le^x が合成されていると考えられた。一方、ナイーブT細胞のリンパ節へのホーミングにおいては、我々は以前にシアリル 6-スルホ Le^x が高血管内皮細静脈に発現し、これがセレクトインのリガンドであることを報告したが、今年度は硫酸基転移酵素 HEC-GlcNAc6ST および GlcNAc6ST-1 遺伝子のダブルノックアウトマウスを用いて、HEC-GlcNAc6ST と GlcNAc6ST-1 がその合成に関与していることを明らかにした。また、腫瘍巣の低酸素条件による癌のプロGRESSIONに伴い、シアル酸トランスポーター sialin 遺伝子の転写が増大し、これにより N-グリコシル型のシアル酸 NeuGc の発現が癌細胞で誘導されることを明らかにした。

北島グループは細胞接着に関わるシアル酸の構造変化と細胞接着制御の解明を目指して、(1) サイクリックシアル酸形成とセレクトインおよび関連シアル酸結合分子を介する細胞接着制御の解明、(2) その他のシアル酸構造変化による細胞接着制御の解明、(3) シアル酸を介する相互作用の人為的制御による癌の進展防御の技術基盤の開発を行なう。項目(1)については、まず、サイクリックシアル酸残基の普遍的存在証明のために、14、15 年度で開発した化学的検出法を、平成 16 年度ではさらに改良することに成功した。平成 17 年度においては、予備的に固形癌細胞においてこのシアル酸構造の存在を見出した。また癌細胞と正常細胞における存在検索を進め、ている。さらに、平成 15 年以来、検出と機能解析への利用を目指して、この糖残基を特異的に認識する酵素を微生物において探索し、その活性を見出した。項目(2)については、α2,8-ポリシアル酸に関して、

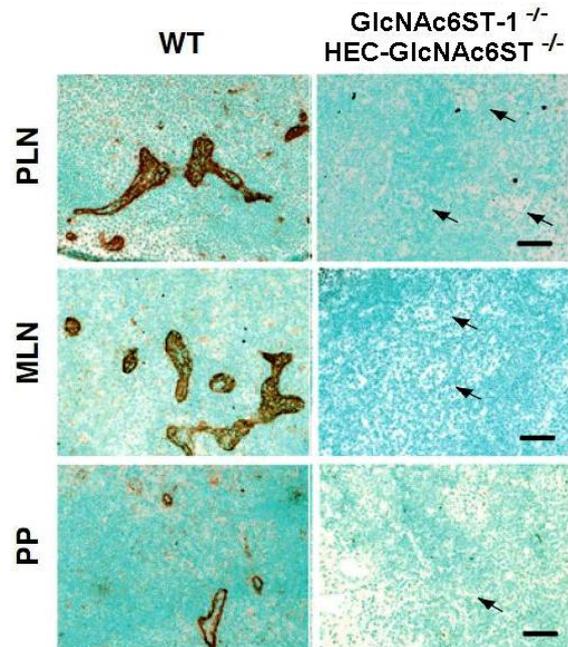


図. 硫酸基転移酵素 HEC-GlcNAc6ST および GlcNAc6ST-1 遺伝子のダブルノックアウトマウスにおけるリンパ装置高血管内皮細静脈のシアリル 6-スルホ Le^x の発現喪失. 特異抗体による検出を示す. PLN:末梢リンパ節、MLN:腸間膜リンパ節、PP:パイエル版.

平成 15 年度においてヒト乳 CD36 上に、平成 16 年度において脳ミクログリア細胞上の CD36 上に α 2,8-ポリシアル酸構造を発見した。また、我々が独自に発見した α 2,8-ジ・オリゴシアル酸構造、硫酸化シアル酸構造、 α 2,9-ポリシアル酸構造については、平成 16、17 年度において、検出法の確立、モノクローナル抗体の調製が完了し、哺乳動物の組織における存在が示された。さらに、項目 (3) について、細胞における生合成経路の理解によって、関連糖鎖遺伝子の発現制御による細胞レベルでの特定シアル酸誘導体の量的調節が可能になるが、KDN については哺乳動物における生合成経路の全貌を解明することができた。

小島グループは糖鎖構造解析技術および人工糖脂質の作製・ハンドリング技術を活用して、接着性機能糖鎖の人工糖脂質ライブラリーを作製し、それを用いてセレクチンのリガンドであるシアリル Lewis X をはじめとする多様な細胞接着性糖鎖を解明することを目的としている。本年度は、この目的を達成するために、1) 微量の機能性糖鎖の検出と解析を同一のサンプルから一連の操作で行うことができる方法を確認し、2) 大腸がん細胞株の E-セレクチンリガンド分子の接着機能性糖鎖の同定を試みている。1) については、本年度は、蛍光人工糖脂質をシアル酸含有糖鎖に適応させるため、蛍光脂質プローブの創成を行った。プローブ (ABA-DPPE) はジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE) とパラアミノ安息香酸 (ABA) とをカルボジイミドで縮合させて合成した。このプローブとオリゴ糖 (Le^x5糖) とを還元アミノ化反応により縮合し、蛍光人工糖脂質へと導くための条件検討を行い、定量的に縮合ができる条件を設定した。また、今回の方法で得た蛍光人工糖脂質を PVDF 膜上に固定化し、抗体での検出、ホスホリパーゼ D 消化による人工糖脂質からの蛍光標識糖鎖の回収、および蛍光標識糖鎖の HPLC による分離、MS による構造解析を系統的に検討し、いずれも支障なく行えることを確認した。現在、反応の微量化と N-型糖鎖への応用条件について検討している。項目 2) については、昨年度に E-セレクチンリガンド分子が大腸がん細胞株のマイクロドメイン中に存在することを見だし、解析を進めた。マイクロドメイン中にはシアリル Le^a エピトープをもつ 120kDa および 30kDa の糖タンパク質が非常に高濃度に集積していることが判明した。N-グリカナーゼ処理の結果から、120kDa および 30kDa の糖タンパク質中のシアリル Le^a エピトープは、それぞれ O-および N-結合型糖鎖上に主に担われていると推定された。また、N-glycanase 処理後 E-セレクチン-Fc で免疫沈降すると 120kDa の糖タンパク質の E-セレクチンと結合性が減弱ないし消失したため、N-結合型糖鎖が E-セレクチンとの結合に関して何らかの機能を果たしていると考えられた。今後はビアコアなどを用いてその結合性を解析するとともに、これら分子上の糖鎖を蛍光人工糖脂質に誘導後、上記方法に基づいた機能解析と構造解析を行う予定である。

浜口グループはヒアルロン酸合成が活性化している v-Src 癌化細胞やヒト癌由来細胞株を用いて、ヒアルロン酸合成酵素とそのレセプターである CD44、あるいはその下流のシグナル伝達因子を標的とする siRNA アンチセンスを開発し、癌細胞の浸潤転移を抑制する新たな遺伝子治療法を開発しようと試みた。細胞外マトリックスのヒアルロン酸とそのレセプターである CD44 は、種々の生理機能を担うと共に、その合成・発現の増大が大腸癌、肺癌、乳癌やグリオーマ等で観察され、腫瘍マーカーとしても注目されている。腫瘍組織におけるヒアルロン酸合成の活性化は、1930 年代からラ

ウス肉腫ウイルスによる発癌過程で観察されている。しかしその生理・病理的意義は長らく不明のままであった。本研究では、癌細胞において恒常的に活性化されているシグナル伝達系に焦点をあて、特定のシグナル伝達因子に対する siRNA やアンチセンスを癌細胞に導入し、そのヒアルロン酸依存細胞運動や、マトリックスメタロプロテイナーゼの分泌に対する作用を調べる。更にはポイデンチャンバーを用いた浸潤能の測定や、ヌードマウスを用いて癌細胞の浸潤転移に対する影響を調べ、新たな制癌療法の開発を試みるものである。本年は、ヒアルロン酸合成と CD44 発現の腫瘍特異的活性化機構の解析とそれを標的とする癌細胞浸潤阻害法を研究し、FAK、Stat3、Ras/MAPK/AP-1 が重要なシグナル伝達因子として機能し、HAS,1 HAS2 の転写を活性化、ヒアルロン酸合成を活性化する事を明らかにしている。さらに、FAK、Stat3、Jun に対する siRNA を開発し、これらの蛋白質合成を抑制する事に成功した。また BATF による癌浸潤転移の抑制については、Stat3 の下流で AP-1 と拮抗する因子として、BATF を見いだした。ヒアルロン酸合成が亢進している v-Crk 癌化細胞に、条件依存性に BATF を発現できる系を確立した。BATF 発現によりヒアルロン酸の合成を抑制できる事を確認した。更にこの減少を補完する系として、D/Nfos や c-Jun に対する siRNA の開発を行い、同様の結果を得つつ有る。更に新たな展開として、ヒアルロン酸/CD44 シグナルの研究の他、癌細胞で発現が低下する糖蛋白質 SHPS-1 について研究を進めたところ、SHPS-1/SHP-2 が炎症性サイトカインや ConA による MMP 産生に重要な役割を担う事を見いだした。更に、SHPS-1 が ConA の機能的なレセプターとして細胞内シグナルの活性化にかかわる事を見いだした。そこで、ヒアルロン酸と合わせて、ConA/SHPS-1 の細胞機能に及ぼす影響を解析中である。

板野グループは、これまでの結果より、異常なヒアルロン酸合成を正常化することで、癌の退縮や転移の阻止が可能と考えた。そこで、ヒアルロン酸糖鎖合成を作用点とした抗転移剤の開発が重要となる。ヒアルロン酸合成機構を解明し、無細胞ヒアルロン酸合成系を確立する目的で、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いたヒアルロン酸合成酵素(HAS)蛋白質の大量発現と精製を試みた。さらに HAS 蛋白質をヒスチジンタグとの融合蛋白質として発現し、界面活性剤により活性を保持した状態で可溶化、さらにアフィニティー精製することに成功した。昆虫細胞系においても従来の哺乳動物細胞系で発現した場合と同程度の活性を保持した HAS 蛋白質を得ることが示された。可溶化のための界面活性剤としては、概して親水部に糖鎖を持った非イオン性のものが適していることがわかった。リン脂質により膜の再構成を図ったものは界面活性剤で可溶化しただけのものに比べて活性が向上した。リン脂質の種類に関しては、親水部の電荷、アルキル鎖長や不飽和度の違いが HAS 蛋白質の安定性に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。さらに膜の再構成前後の HAS 蛋白質をゲルろ過クロマトグラフィーにより分画したところ、複数のピークが現れたが、高分子量域にある HAS 蛋白質-脂質複合体のピークが相対的に最も活性が高いことがわかった。以上の結果から、脂質等により HAS 蛋白質が堅固に保持された安定な複合体として存在する場合には、十分な活性が維持されることが示唆された。

3. 研究実施体制

「神奈木」グループ

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

「北島」グループ

- ①研究分担グループ長：北島 健（名古屋大学、教授）
- ②研究項目：細胞接着に関わるシアル酸の構造変化と細胞接着制御の解明

「小島」グループ

- ①研究分担グループ長：小島 直也（東海大学・糖鎖工学研究施設、教授）
- ②研究項目：
 - 1) 微量の機能性糖鎖の検出と解析を同一のサンプルから一連の操作で行うことができる新規解析法の確立
 - 2) 大腸がん細胞株の E-セレクチンリガンド分子の接着機能性糖鎖の同定

「浜口」グループ

- ①研究分担グループ長：浜口 道成（名古屋大学、教授）
- ②研究項目：ヒアルロン酸合成が活性化している v-Src 癌化細胞やヒト癌由来細胞株を用いて、ヒアルロン酸合成酵素とそのレセプターである CD44、あるいはその下流のシグナル伝達因子を同定し、これらの因子標的とする、癌細胞の浸潤転移を抑制する新たな遺伝子治療法を開発する。

「板野」グループ

- ①研究分担グループ長：板野 直樹（信州大学大学院医学研究科加齢適応医科学系専攻、助教授）
- ②研究項目：
 - 1. ヒアルロン酸・CD44 による癌転移促進機構の解明
 - 2. ヒアルロン酸合成機構の解明と合成阻害剤の開発

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

（神奈木グループ）

- Ohmori, K., Fukui, F., Kiso, M., Imai, T., Yoshie, O., Hasegawa, H., Matsushima, K., and Kannagi, R. Identification of cutaneous lymphocyte-associated antigen as sialyl 6-sulfo Lewis x, a selectin ligand expressed on a subset of skin-homing helper memory T cells. *Blood*, [Epub ahead of print], 2005.
- Uchimura, K., Gauguet, J.M., Singer, M.S., Tsay, D., Kannagi, R., Muramatsu, T., Von Andrian, U.H., and Rosen, S.D. A major class of L-selectin ligands is eliminated in mice deficient in two sulfotransferases expressed in high endothelial venules. *Nat. Immun.*, **6**: 1105-1113, 2005.
- Satoh, T., Kanai, Y., Wu, M.H., Yokozeki, H., Kannagi, R., Lowe, J.B., and Nishioka, K. Synthesis of $\alpha(1,3)$ fucosyltransferases IV- and VII-dependent eosinophil selectin ligand and recruitment to the skin. *Am. J. Pathol.*, **167**: 787-796, 2005.
- Otsubo, N., Ishida, H., Kannagi, R., and Kiso, M. Design and synthesis of a novel neo-glycolipid containing sialyl Lewis X determinant carried on the mucin GlcNAc β 1-6GalNAc α core structure. *Tetrahedron Asymmetry*, **16**: 1321-1327, 2005.
- Tjew, S.L., Brown, K.L., Kannagi, R., and Johnson, P. Expression of *N*-acetylglucosamine 6-*O* sulfotransferases (GlcNAc6STs) -1 and -4 in human monocytes: GlcNAc6ST-1 is implicated in the generation of the 6-sulfo *N*-acetylglucosamine/Lewis x epitope on CD44 and is induced by TNF- α . *Glycobiology*, **17**: 7C-13C, 2005.
- Yagi, H., Takahashi, N., Yamaguchi, Y., Kimura, N., Uchimura, K., Kannagi, R., and Kato, K. Development of structural analysis of sulfated *N*-glycans by multi-dimensional HPLC mapping methods. *Glycobiology*, **15**: 1051-1060, 2005.
- Yamaguchi, M., Ishida, H., Kanamori, A., Kannagi, R., and Kiso, M. 6-*O*-Sulfo sialylparagloboside and sialyl Lewis X neo-glycolipids containing lactamized neuraminic acid: Synthesis and antigenic reactivity against G159 monoclonal antibody. *Glycoconj. J.*, **22**: 95-108, 2005.

（北島グループ）

- Fujita, A., Sato, C., Munster-Kuhnel, A.-K., Gerardy-Schahn, R., and Kitajima, K. Development of a simple and efficient method for assaying cytidine monophosphate sialic acid synthetase activity using an enzymatic reduced nicotinamide adenine dinucleotide/oxidized nicotinamide adenine dinucleotide converting system. *Anal. Biochem.* **337**: 12-21, 2005.
- Yasukawa, Z., Sato, C., and Kitajima, K. Inflammation-dependent changes in $\alpha 2,3$ -, $\alpha 2,6$ -, and $\alpha 2,8$ -sialic acid glycotopes on serum glycoproteins in mice. *Glycobiology* **15**: 827-837, 2005.

（小島グループ）

- Takahashi, Y., Inamine, A., Hoshimoto, S., Haraguchi, S., Yoshizawa, E., Kojima, N., Abe, R.,

- Takemori, T.: Novel Role of the Ras Cascade in Memory B Cell Response. *Immunity*, **23**, 127-138, 2005
- Tang, W., Guo, Q., Usuda, M., Kokudo, N., Seyama, Y., Minagawa, M., Sugawara, Y., Nakata, M., Kojima, N., and Makuuchi, M. Histochemical Expression of Siloglycoconjugates in Carcinoma of the Papilla of Vater. *Hepato-Gastroenterology*, **52**, 67-71, 2005

(浜口グループ)

- Ito S, Ito Y, Senga T, Hattori S, Matsuo S, Hamaguchi M. v-Src requires Ras signaling for the suppression of gap junctional intercellular communication. *Oncogene*. [Epub ahead of print] 2005
- Fukaya Y, Ishiguro N, Senga T, Ichigotani Y, Sohara Y, Tsutsui M, Shioura T, Iwamoto T, Hamaguchi M. A role for PI3K-Akt signaling in pulmonary metastatic nodule formation of the osteosarcoma cell line, LM8. *Oncol Rep*. 14(4):847-852, 2005.
- Tanimura Y, Kokuryo T, Tsunoda N, Yamazaki Y, Oda K, Nimura Y, Naing Mon N, Huang P, Nakanuma Y, Chen MF, Jan YY, Yeh TS, Chiu CT, Hsieh LL, Hamaguchi M. Tumor necrosis factor alpha promotes invasiveness of cholangiocarcinoma cells via its receptor, TNFR2. *Cancer Lett*. 219(2):205-213,2005.
- Yoshida T, Iwamoto T, Adachi K, Yokota T, Miyake Y and Hamaguchi M. Functional analysis of the effect of forced activation of STAT3 on M1 mouse leukemia cells. *Int J Mol Med*. 15(2):269-75,2005.
- Naito Y, Suzuki N, Huang P, Hasegawa H, Sohara Y, Iwamoto T and Hamaguchi M. Requirement of multiple signaling pathways for the augmented production of hyaluronan by v-Src. *Nagoya J. Med. Sci*. 67: 101-108, 2005.

(板野グループ)

- Kanomata, N., Yokose, T., Kamijo, T., Yonou, H., Hasebe, T., Itano, N., Kimata, K., and Ochiai, A. Hyaluronan synthase expression in pleural malignant mesotheliomas. *Virchows Arch*. **446**:246-250, 2005.
- Yabushita, H., Kishida, T., Fusano, K., Kanyama, K., Zhuo, L., Itano, N., Kimata, K., and Noguchi, M. Role of hyaluronan and hyaluronan synthase in endometrial cancer. *Oncol Rep*. **13**:1101-1105, 2005.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 1 件 (CREST 研究期間累積件数 : 5 件)