

「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

小山 信人

(タカラバイオ (株) 細胞・遺伝子治療センター 主幹研究員)

「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」

1. 研究実施の概要

N-Acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) は糖タンパク質の *N*-結合型糖鎖に bisecting *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) を転移する酵素であり、GnT-III 遺伝子を過剰発現させることによって B 型肝炎ウイルス (HBV) 遺伝子の発現および HBV 関連タンパクの分泌が抑制されること、メラノーマの実験的肺転移が抑制されること等が報告されている。また、fucosyltransferase 8 (FUT8) は *N*-結合型糖鎖の Asn に隣接する GlcNAc にフコースを転移してコア・フコース構造を形成させる酵素であり、糖鎖にコア・フコースを持たない抗体は高い antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) 活性を有することが知られている。われわれは、bisecting GlcNAc 及びコア・フコース構造と生命現象の関係を解明し、がんやウイルス疾患の治療法・診断法の開発につなげることを目的としている。

ノックアウトマウス及びノックダウン細胞株の解析により、FUT8 遺伝子の発現を抑制するとトリプシノーゲン遺伝子の発現が低下すること及び細胞増殖が抑制されることを見出している。細胞レベルの解析により、トリプシノーゲン遺伝子の発現抑制から細胞増殖抑制に至るシグナル伝達には protease-activated receptor 2 (PAR2) が関与することを明らかにした。FUT8 ノックダウンによる増殖抑制は一部のヒトがん細胞株においても見られる現象なので、糖鎖構造の制御によるがん治療法開発のための基礎的知見となりうる。

膵がんをはじめとするがん患者の血清において、フコシル化ハプトグロビンが高率で検出されることを見出した。膵がんは早期発見が困難な難治がんであり、フコシル化ハプトグロビンの簡便な測定法を開発できれば膵がんのマーカーとして有用である。

これまでの研究成果として、GnT-III 遺伝子の強制発現により発現量の変化する遺伝子及び糖鎖の合成・分解に関与する遺伝子を搭載した DNA マイクロアレイを作製した。これを用いて膵がんや白血病の遺伝子発現解析を行った。その結果、膵がんでは GnT-IVb 遺伝子の発現が上昇していること、慢性骨髄性白血病の芽球転化期と慢性期では遺伝子発現パターンが大きく異なることがわかった。これらの成果はがんの診断や治療に応用できる可能性がある。

今後は、糖鎖のフコシル化における FUT8 及びその他のフコース代謝酵素の役割を明らかにするとともに、糖鎖構造の違いに基づいたがんの血清診断法の開発に重点を置いて研究を進める予

定である。

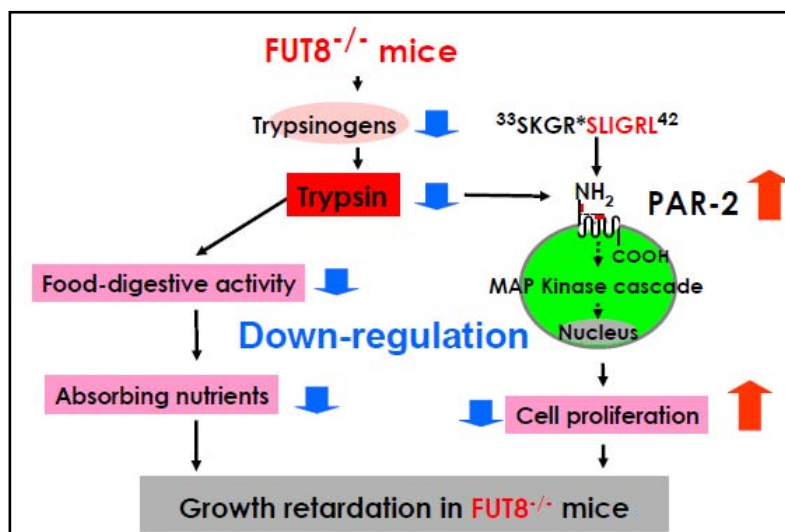
2. 研究実施内容

FUT8 遺伝子ノックアウト(FUT8^{-/-})マウスは著しい成長障害を示し、生後短期間のうちに死亡する。野生型マウスと FUT8^{-/-}マウスの胎児における遺伝子発現を解析したところ、FUT8^{-/-}マウスでは少なくとも4種類のトリプシノーゲン遺伝子の発現が最大1/10程度にまで低下していた。

トリプシンが関与するシグナル伝達分子として protease-activated receptor 2 (PAR2) が知られており、直腸がんや膵がんなどにおいて細胞増殖との関係は研究されているが、肝がん細胞についてはまだ報告されていない。PAR2 は膜タンパク質であり、トリプシンが作用することにより新たに露出する N 末端付近のアミノ酸配列がそれ自身のリガンドとなり、細胞増殖等のシグナルを伝達する。FUT8 遺伝子発現抑制とトリプシノーゲン遺伝子発現抑制の関係を解明するため、トリプシン高発現株であるマウス膵がん細胞株 TGP-49 における FUT8 遺伝子のノックダウン実験を行った。レトロウイルスベクターを用いて安定ノックダウン株を作製したところ、ほぼ完全に FUT8 遺伝子の発現が抑制され、これに由来する糖鎖構造も消失した。また、ノックダウンによりトリプシノーゲン遺伝子の発現及び細胞増殖も抑制された。PAR2 のリガンドとして機能することが知られているペプチド(配列:SLIGRL)をノックダウン株に添加したところ、細胞増殖の回復が見られた。これにより、FUT8 遺伝子の発現抑制による細胞増殖抑制に PAR2 が関与することを明らかにした(Li et al. 論文 revise 中、特許出願済み)。

ここでノックダウンに用いた siRNA 配列はヒト及びラットの FUT8 遺伝子にも共通である。ヒト肝がん細胞株 HepG2 の FUT8 ノックダウンを行ったところ、細胞増殖抑制効果が見られた。他のヒト肝がん細胞株(Hep3B、Huh6、Huh7 など)を用いた同様の実験により、増殖抑制効果は細胞ごとにその作用機作が異なることが推察された。すなわち、コア・フコースの転移は糖転移酵素の働きのみで支配されるのではなく、転移反応に関わる分子の統合的な解析が必要である可能性が示されたと考えられる。

膵がん患者において、血清中フコシル化ハプトグロビンが上昇することを発見した。血清中のハプトグロビンのフコシル化をレクチンブロットで解析したところ、膵がん患者の 60%、大腸がん患者の 40%、肝がん、肝硬変及び胃がん患者の 20%、健常人の 3%が陽性であり、膵がんで有意に陽性率が高かった。また、膵がんの臨床病期と陽性率の間に正の相関が見られた。患者血清および膵癌細胞の



培養上清からハプトグロビンを精製し、糖鎖構造を質量分析法によって解析した結果、糖鎖末端とコアにおけるフコシル化を確認した。今後、フコシル化ハプトグロビンの産生機序を解析するとともに、臨床的なパラメータからの解析を行う。

われわれは、膵がん等のがん患者血清において、 β カゼインへの結合性を有する物質のレベルが上昇することを見出した。 β カゼインのリガンドは高分子の複合体と考えられ、その構成成分のいくつかを同定した。構成成分の生物学的機能を、その遺伝子をノックダウンすることによって明らかにしつつある。将来的には、複合体を簡易的に同定するシステムを構築し、がんの血清診断法として応用する。

マトリプターゼ(膜結合型セリンプロテアーゼ)の糖鎖が GnT-V による修飾を受けると、分解が遅延することを細胞レベルですでに報告している。精製したタンパク質レベルでこの現象を証明した。次に、ヒト甲状腺がんの組織を用いて免疫組織染色によって GnT-V とマトリプターゼの発現の相関を検討した。その結果、マトリプターゼのタンパク質発現量は mRNA 発現とは相関せず、GnT-V と非常に高い相関関係を認めた。将来的に β 1-6 鎖をもつマトリプターゼを定量できる ELISA 法が開発できれば、分子マーカーとしての有用性が期待できる。

GnT-III 遺伝子の強制発現により発現量が変動する遺伝子を網羅的に取得し、これらの遺伝子及び糖鎖の合成や分解に関与する遺伝子を搭載した DNA マイクロアレイをすでに作製している。このマイクロアレイを用いて、膵がん細胞と正常膵の遺伝子発現を比較したところ、正常膵においては GnT-IVa 遺伝子、膵がんにおいては GnT-IVb 遺伝子の発現が高いことがわかった。これと同様の発現パターンが実際のヒト膵がん組織でも観察できた。また膵がんで GnT-IVa の発現が低下する機序として、エピジェネティックな因子が関与することがわかった。

慢性骨髄性白血病の芽球転化期(BC)には GnT-III の発現が上昇することが知られている。上記のマイクロアレイを用いて、慢性期(CP)及び BC 患者の末梢血単核球(PBMC)における遺伝子発現を解析した。1 例の CP 及び 4 例の BC について解析したところ、BC 各サンプル間では発現パターンに相関があった(相関係数 0.4~0.7)のに対して、CP と BC 各サンプルの間には相関がなかった(相関係数 < 0.1)。BC 特異的な発現変動を示す遺伝子が見つければ、BC の早期予測や予防法・治療法の開発に応用できる可能性がある。

肝幹細胞様の RLE 細胞には bisecting GlcNAc を持つ糖鎖が多く含まれることをすでに見出している。RLE 細胞に EGF とニコチンアミドを添加して肝細胞に分化させたところ、アルブミン遺伝子の発現上昇とともに、bisecting GlcNAc を持つ糖鎖に特異的な E4-PHA レクチンへの結合性の低下が見られた。このことから、RLE 細胞の分化度と糖鎖構造の間には関連があることが明らかになった。E4-PHA を用いて、自然肝がん発症ラットである LEC ラットの肝臓から RLE 様細胞を分離、クローン化した(LECHS)。四塩化炭素で肝炎を起こした SD ラットの脾臓に LECHS を投与したところ、肝炎及び肝臓の線維化が抑制され、肝臓の修復に効果があることが示された。今後、LEC ラット由来の肝幹様細胞の生物学的特徴と糖転移酵素 GnT-III の関係を明らかにする。

GnT-V により形成される多分岐糖鎖はがんの転移と深く関わっており、GnT-III により bisecting GlcNAc を付加された糖鎖は GnT-V の基質にはならないことが知られている。GnT-III 遺伝子の発

現を調節する物質をスクリーニングする目的で 5'-RACE により転写開始点を探索し、強力な新規プロモーター (F2-1) を本研究によりすでに取得している。F2-1 プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子の upstream に連結したプラスミドを Huh7 細胞に導入し、被験試料を培養液中に添加して培養、ルシフェラーゼ活性を測定するというスクリーニング系を構築した。現在、数百株の微生物培養上清についてアッセイを進めている。このようにして得られる物質は抗がん剤又はそのリード化合物、健康食品等としての利用が考えられる。

3. 研究実施体制

「タカラバイオ」グループ

①研究分担グループ長：小山 信人（タカラバイオ（株）細胞・遺伝子治療センター、DNA 機能解析センター、主幹研究員）

②研究項目：

1. 糖鎖遺伝子による肝炎／肝癌の新しい治療薬開発のための基礎的検討
2. GnT-III 遺伝子発現誘導物質及び GnT-V 遺伝子発現抑制物質の探索

「糖鎖治療学」グループ

①研究分担グループ長：近藤 昭宏（大阪大学大学院医学系研究科 糖鎖治療学講座、寄附講座教授）

②研究項目：糖鎖遺伝子による肝炎／肝癌の新しい治療薬開発のための基礎的検討

「糖鎖シグナル」グループ

①研究分担グループ長：三善 英知（大阪大学大学院医学系研究科 生化学講座、助教授）

②研究項目：糖鎖／レクチンシステムを用いた癌の血清診断法の開発および肝臓の分化に関する研究

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

- Kitazume S, Nakagawa K, Oka R, Tachida Y, Ogawa K, Luo Y, Citron M, Shitara H, Taya C, Yonekawa H, Paulson JC, Miyoshi E, Taniguchi N, Hashimoto Y. (2005) In vivo cleavage of alpha 2,6-sialyltransferase by Alzheimer's beta-secretase. *J Biol Chem* 280 (9), 8589-95.
- Takemura F, Inaba N, Miyoshi E, Furuya T, Terasaki H, Ando S, Kinoshita N, Ogawa Y, Taniguchi N, Ito S. (2005) Optimization of liver biopsy RNA sampling and use of reference RNA for cDNA microarray analysis. *Anal Biochem* 337 (2), 224-234.

- Tomiie M, Isaka S, Miyoshi E, Taniguchi N, Kimura T, Ogita K, Tsutsui T, Shimoya K, Nakagawa T, Kondo A, Koyama M, Murata Y. (2005) Elevated expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in first trimester human placenta. *Biochem Biophys Res Commun* **330** (3), 999–1004.
- Sturla L, Fruscione F, Noda K, Miyoshi E, Taniguchi N, Contini P, Tonetti M. (2005) Core fucosylation of N-linked glycans in Leukocyte Adhesion Deficiency/Congenital Disorder of Glycosylation IIc (LAD II/CDG IIc) fibroblasts. *Glycobiology* **15** (10), 924–934.
- Gao CX, Miyoshi E, Uozumi N, Takamiya R, Wang X, Noda K, Gu J, Honke K, Wada Y, Taniguchi N. (2005) Bisecting GlcNAc Mediates the Binding of Annexin V to Hsp47. *Glycobiology* **15** (11), 1067–75.
- Ishibashi Y, Dosaka-Akita H, Miyoshi E, Shindoh M, Miyamoto M, Kinoshita I, Miyazaki H, Itoh T, Kondo S, Nishimura M and Taniguchi N. (2005) Expression of N-Acetylglucosaminyltransferase V in the development of human esophageal cancers: immunohistochemical data from carcinomas and nearby non-cancerous lesions. *Oncology* **69** (5), 428–35.
- Wang X, Inoue S, Gu J, Miyoshi E, Noda K, Li W, Mizuno-Horikawa Y, Nalano M, Asahi M, Takahashi M, Uozumi N, Lee S H, Ikeda Y, Yamaguchi Y, Aze Y, Tomiyama Y, Fujii J, Suzuki K, Kondo A, Shapiro S D, Lopez-Otin C, Kuwaki T, Okabe M, Honke K, and Taniguchi N. (2005) Dysregulation of TGF- β 1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (44), 15791–6.
- Kim YS, Kang HY, Kim JY, Oh S, Kim CH, Ryu CJ, Miyoshi E, Taniguchi N, Ko JH. (2005) Identification of target proteins of N-acetylglucosaminyl-transferase V in human colon cancer and implication of protein tyrosine phosphatase kappa in enhanced cancer cell migration. *Proteomics* **6** (4), 1187–91.
- Misonou Y, Asahi M, Yokoe S, Miyoshi E, Taniguchi N. (2005) Acrolein Produces Nitric Oxide through the Elevation of Intracellular Calcium Levels to Induce Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Nitric Oxide* **14** (2), 180–7.
- Okuyama N, Ide Y, Nakano M, Nakagawa T, Yamanaka K, Moriwaki K, Murata K, Ohigashi H, Yokoyama S, Eguchi H, Ishikawa O, Ito T, Kato M, Kasahara A, Kawano S, Gu J, Taniguchi N, and Miyoshi E. (2005) Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation. *Int. J Cancer* **118** (11), 2803–08.
- Wang X, Gu J, Ihara H, Miyoshi E, Honke K, Taniguchi N. (2006) Core fucosylation regulates EGF receptor-mediated intracellular signaling. *J Biol Chem* **281** (5), 2572–7.

- Lee SH., Takahashi M, Honke, K, Miyoshi E, Osumi D, Sakiyama H, Ekuni A, Wang X, Inoue S, Gu J, Kadomatsu K, and Taniguchi N. (2006) Loss of core fucosylation of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 impairs its function, leading to the upregulation of serum levels of insulin-like growth factor-binding protein 3 in Fut8^{-/-} mice. *J Biochem* **139**, 351-8.
- Ide Y, Miyoshi E, Nakagawa T, Gu J, Tanemura M, Nishida T, Ito T, Yamamoto H, Kozutsumi Y and Taniguchi N (2006) Aberrant expression of *N*-Acetylglucosaminyltransferase-IVa and IVb (GnT-IVa and b) in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **341** (2), 478-82.
- Inamori K, Mita S, Gu J, Mizuno-Horikawa Y, Miyoshi E, Dennis JW, and Taniguchi N. (2006) Demonstration of the expression and the enzymatic activity of *N*-acetylglucosaminyltransferase IX in the mouse brain. *Biochim Biophys Acta* 2005 Dec 27; Epub ahead of print.
- Inamori K, Gu J, Ohira M, Kawasaki A, Nakamura Y, Nakagawa T, Kondo A, Miyoshi E, Nakagawara A, and Taniguchi N. (2006) High expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis. *FEBS Letters* **580**, 627-632.
- Watanabe T, Ihara H, Miyoshi E, Honke K, Taniguchi N, and Taguchi T. (2006) A specific detection of GlcNAc beta1-6 Man alpha1-branches in N-linked glycoproteins based on the N-acetylglucosaminyltransferase VI. *Glycobiology* 2006 Jan 20; Epub ahead of print.
- Ito Y, Akinaga A, Yamanaka K, Nakagawa T, Kondo A, Dickson R B, Lin C-Y, Miyauchi A, Taniguchi N, Miyoshi E. (2006) Co-expression of matriptase and *N*-acetylglucosaminyltransferase V in thyroid cancer tissues; its possible role in prolonged stability *in vivo* by aberrant glycosylation. *Glycobiology* 2006 Feb 6; Epub ahead of print.
- Shigeta M, Shibukawa Y, Ihara H, Miyoshi E, Taniguchi N, Gu J. (2006) β 1,4-*N*-Acetylglucosaminyltransferase III potentiates β 1 integrin-mediated neuritogenesis induced by serum deprivation in Neuro2a cells. *Glycobiology* 2006 Mar 10; Epub ahead of print.
- Iijima J, Zhao Y, Isaji T, Kameyama A, Nakaya S, Wang X, Ihara H, Cheng X, Nakagawa T, Miyoshi E, Kondo A, Narimatsu H, Taniguchi N, Gu J. (2006) Cell-cell interaction-dependent regulation of N-acetylglucosaminyltransferase III and the bisected N-glycans in GE11 epithelial cells: Involvement of E-cadherin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem* 2006 Mar 14; Epub ahead of print.
- Miyagawa S, Nakatsu S, Nakagawa T, Kondo A, Matsunami K, Hazama K, Yamada J, Tomonaga K, Miyazawa T, Shirakura R. (2005) Prevention of PERV infections in pig to human xenotransplantation by the RNA interference silences gene. *J Biochem (Tokyo)* **137**(4), 503-508.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：3 件（CREST 研究期間累積件数：4 件）