

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成 15 年度採択研究代表者

宮城 妙子

(宮城県立がんセンター研究所 所長)

「がんや糖尿病等におけるシアリダーゼ異常の機構解明と制御」

1. 研究実施の概要

従来からシアル酸と癌の深い関連性が指摘されてきた。その実体解明をめざして、シアル酸量調節を担うシアリダーゼの研究を進めてきた。その結果、先に遺伝子単離に成功した形質膜局在型シアリダーゼ (NEU3) が各種ヒトがんで発現がほとんど例外なく異常に亢進していること、この遺伝子導入マウスに糖尿病が発症することを見いだした。その後、NEU3 がシグナル関連分子のカベオリンや Grb-2 と会合すること、各種増殖因子レセプターのシグナリングに深く関与していること、細胞のアポトーシスを抑制することもわかってきた。17 年度はとくに、高発現 NEU3 ががん細胞の接着や浸潤・運動能を亢進し、アポトーシスを抑制するなど、がんの種々の悪性形質を助長することを検証した。本研究では、癌や糖尿病等におけるシアリダーゼ異常発現の機構・意義について解析をさらに進め、その制御法を探索し、本遺伝子をターゲットとした新しい診断・治療法の開発をめざす。

2. 研究実施内容

研究目的

形質膜局在型シアリダーゼ (NEU3) の異常発現ががんや糖尿病の病態に深く関わっている証拠が種々の観点から挙げられてきた。これら疾患における NEU3 の病理的役割を解明し、その制御法を探索して、本遺伝子をターゲットとした新しい診断・治療法の開発の可能性を検討する。さらに、他のシアリダーゼ発現との関連についても調査し、NEU3 の特異的役割を探る。

研究方法

培養細胞や遺伝子改変マウスおよび糖尿病モデルマウス等を用いて、NEU3 が関わる細胞現象やシグナル分子群について解析した。NEU3cDNA や NEU3siRNA 導入により、NEU3 発現を人工的に制御し、その影響について細胞あるいは個体レベルで観察した。また、NEU3 の新規阻害剤の合成を検討した。

研究結果

宮城グループはこれまで、NEU3 ががんの病態に密接すること、シグナリングを修飾していることを分子レベルで証明してきた。17 年度は、NEU3 が細胞接着や浸潤・運動等のシグナリングについても制御しており、がんで活性化する FAK, ILK, Shc, integrin β 4 等のシグナル分子の活性

をさらに促進し、がんの悪性形質を助長していることを明らかにした。さらに、NEU3 は Ras の活性化を促進すること、siRNA を導入すると、Ras の活性化を阻害し、がん細胞が特別の刺激もなく自ら細胞死に陥ること、正常細胞ではこの現象が見られないことがわかった。シアリダーゼが触媒反応によるガングリオシドの修飾を介して、あるいは、酵素蛋白自体が他のシグナル分子と相互作用することによって、積極的に関わっている可能性が強く示唆された。また、NEU3 の多様な生理機能の全貌解明をめざして、免疫や神経機能についても解析を進めた。免疫機能については、先に、マウス好酸球性炎症モデルを用いて、CD44 のヒアルロン酸結合性に内因性シアリダーゼ活性が深く関わっている可能性を見いだしたが、本年度は、抗原感作、チャレンジによる気道過敏性および CD4T 細胞、好酸球性の気道炎症が抗 CD44 抗体の前処置により抑制されることがわかった。抗原感作脾臓細胞は、*in vitro* での 24 時間の抗原再刺激により CD4T 細胞中の数%がヒアルロン酸結合性を獲得したが、脾臓細胞全体を用いた PCR 法ではシアリダーゼ発現はむしろ低下していた。シアリダーゼ発現に関しては経時的あるいは CD4T 細胞だけを用いた検討が必要である。さらに、Neu3 が神経軸索の形成に、TrkA と結合し、活性を上昇させることによって直接的に関与している可能性が示唆され、NGF シグナル経路を詳細に調査している。

糖尿病におけるシアリダーゼの役割の解明を目的として、鈴木グループは、NEU3 アデノウイルスベクターを用いてそれぞれ通常食と高脂肪食を与えた C57B/6N マウスと KKAy マウスの肝臓に NEU3 を過剰発現させて、*In vivo* におけるインスリン感受性と耐糖能への NEU3 の関与を検討した。NEU3 を肝臓に過剰発現させると、通常食 C57B/6N マウスの体重増加は対照マウスに比べて有意に少なく、また随時血糖値も 2 週間有意に低値であった。通常食の肝 NEU3 過剰発現マウスでは対照マウスに比べて、インスリン感受性と耐糖能は有意に改善した。高脂肪食負荷マウスでも肝 NEU3 過剰発現により随時血糖値も 2 週間有意に低値であった。また、肝 NEU3 過剰発現は高脂肪食負荷 C57B/6N マウスと KKAy マウスの耐糖能も有意に改善させた。NEU 過剰発現により、肝臓グリコーゲンと中性脂肪の蓄積が誘導され、かつ肝での PPAR γ 発現も増加した。肝 NEU3 過剰発現マウスの肝臓におけるガングリオシド組成変化を TLC で分析すると、GM1 の増加と GM3 の減少を示した。肝 NEU3 過剰発現マウスの肝では、Insulin receptor substrate 1 (IRS1) のチロシンリン酸化は、インスリン刺激前後とも対照マウスに比べて、有意に増強していた。しかし、通常食、高脂肪食負荷とも肝 NEU3 過剰発現マウスの肝臓インスリン受容体 (IR) と Insulin receptor substrate 2 (IRS2) のチロシンリン酸化はインスリン刺激前、刺激後で対照マウスと比べて有意の差異を認めなかった。高脂肪食負荷の肝 NEU3 過剰発現マウス脂肪組織のインスリン刺激 IR チロシンリン酸化は、対照マウスと比べて有意に増加していた。肝 NEU3 過剰発現により、通常食 C57B/6N マウスのインスリン感受性と耐糖能改善、高脂肪食 C57B/6N マウスと KKAy マウスにおける耐糖能改善を認めた。肝 NEU3 過剰発現によるインスリン感受性と耐糖能改善の分子機序として、1) ガングリオシド GM3 の減少、2) PPAR γ シグナルの亢進という 2 つの機序が示唆された。

袖岡グループは NEU3 の特異的阻害剤の創製を種々の角度から検討した。NEU3 は、GM3、GM4 などのガングリオシドのシアル酸を選択的に加水分解するユニークなシアリダーゼである。Neu3 はガンや糖尿病などに関連していることが示唆されているが、その分子機構のほとんどが未解明で

ある。Neu3 阻害剤を開発することで Neu3 の機能解明のみならず、治療薬への応用も期待できる。そこで昨年に引き続き、Neu3 の高い基質特異性に着目した新規阻害剤の創製を検討した。

古川グループは、ガングリオシド糖鎖の異常発現とその癌性形質との関連を糖鎖合成系の観点から明らかにし、ガングリオシド合成系を介してシアリダーゼ異常の制御をめざしている。NEU3 の良い基質である GD3 を高発現ヒトメラノーマ細胞では、細胞増殖能および浸潤性の亢進が認められた。FCS 刺激により、GD3 発現細胞においては MAPK, Akt, FAK, p130Cas および paxillin のリン酸化が増強し、FAK および p130Cas は細胞増殖と浸潤性に、paxillin は浸潤性に関与することが明らかになった。また、FAK は p130Cas および paxillin の上流に位置した。src family member では、Yes が GD3 発現細胞の浸潤に関与していた。更に、Yes やチロシンリン酸化された p130Cas および paxillin は細胞膜ラフトに局在し、GD3 発現細胞ではラフトが癌性形質に関与するシグナル伝達に重要な役割を果たしていると推察された。

NEU3 の神経機能解明を分担している東グループは、昨年度までに、神経芽腫細胞株や繊維芽細胞株に細胞膜シアリダーゼ Neu3 を強発現させ、細胞内カルシウムイオンを上昇させるような刺激を行うと、細胞内カルシウムの定常レベルへの戻りが遅くなり、カルシウムシグナルが増強することをみだしている。その分子機構を調査する一方、本年度は、糖尿病とシアリダーゼの関連についてもカルシウムシグナルの観点から検討した。インシュリン分泌にもカルシウムシグナルが主要な情報伝達系となっていることから、カルシウムシグナル増強効果が関わっている可能性が予想された。そこで、インスリン分泌性の腫瘍細胞株に対して Neu3 高発現の効果を試した。マウスインスリノーマ MIN6 細胞は、高グルコース刺激に対して反応し、細胞内カルシウム濃度が上昇しインスリンを分泌する。この細胞に Neu3 を高発現したところ、予想どおり、同じグルコース刺激に対して細胞内カルシウムシグナルの強度が上昇した。しかしながら、インスリン分泌は、コントロールの MIN6 細胞に比べて有意に減少した。この結果は、NEU3 がカルシウムの上昇を増強する一方で、カルシウムシグナルとインスリン分泌機構のリンクを遮断していることを示唆している。MIN6 細胞は、カルシウムシグナルの増強作用とインスリン分泌阻害の病態を調べる上で有用な系であると考えられるので、今後、この細胞系を用いて、シアリダーゼと病態との関連を追求する。

3. 研究実施体制

「シアリダーゼの生理的・病理的機能解析」グループ

①研究分担グループ長：宮城 妙子（宮城県立がんセンター研究所、研究所所長）

②研究項目：

- (1) シアリダーゼNEU3の機能解明
- (2) NEU3のがんや糖尿病等における異常発現機構と意義の解析
- (3) NEU3の発現制御
- (4) NEU1やNEU4の生理機能とがんにおける発現異常について

「糖尿病におけるシアリダーゼの役割解明」グループ

①研究分担グループ長：鈴木 進（東北大学大学院医学研究科、分子代謝病態学、助教授）

②研究項目：

- (1) アデノウイルスベクターを用いたNEU3肝過剰発現マウスの解析
- (2) 2型糖尿病患者の遺伝子解析

「シアリダーゼ阻害剤創製」グループ

①研究分担グループ長：袖岡 幹子（理化学研究所 袖岡有機合成化学研究室、主任研究員）

②研究項目：ヒトシアリダーゼ Neu3 選択的阻害剤の設計と合成、および阻害活性評価

「ガングリオシド合成系によるシアリダーゼ異常の制御」グループ

①研究分担グループ長：古川 圭子（名古屋大学、講師）

②研究項目：ガングリオシド合成系によるシアリダーゼ異常の制御

「神経細胞におけるシアリダーゼの役割解明」グループ

①研究分担グループ長：東 秀好（理化学研究所、研究員）

②研究項目：神経組織におけるシアリダーゼの機能と病態について/

シアリダーゼによる細胞内カルシウムシグナルの制御とその病態

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- Yamaguchi, T., Hata, K., Koseki, K., Shiozaki, K., Akita, H., Wada, T., Moriya, S., and Miyagi, T.: Evidence for Mitochondrial Localization of a Novel Human Sialidase (NEU4). **Biochem. J.** 390, 85-93, 2005
- Kato, K., Shiga, K., Yamaguchi, K., Hata, K., Kobayashi, T., Miyazaki, K., Saijo, S. and Miyagi, T. : Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) differentially regulates integrin-mediated cell proliferation through laminin- and fibronectin- derived signaling. **Biochem. J.** 394, 647-656, 2006
- Ueno, S., Saito, S., Wada, T., Yamaguchi, K., Satoh, M., Arai, Y., and Miyagi, T.: Plasma membrane-associated sialidase is up-regulated in renal cell carcinoma and promotes the interleukin-6 -induced apoptosis suppression and cell motility. **J. Biol. Chem.** 281, 7756-7764, 2006
- Magesha, S., Suzukib, T., Miyagi, T., Ishidaa, H. and 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. **J Mol. Graphics Modelling** 2006. in press
- Valaperta, R., Chigorno, V., Basso, L., Prinetti, A., Bresciani, R., Preti, A., Miyagi, T., and Sonnino,

S.: Plasma membrane production of ceramide from ganglioside GM3 in human fibroblasts.

FASEB J 2006 in press

- Katoh, S., Fukushima, K., Matsumoto, N., Ehara, N., Matsumoto, K., Yamauchi, A., and Hirashima, M. Accumulation of CXCR3-expressing eosinophils and Increased concentration of its ligands (IP10 and Mig) in bronchoalveolar lavage fluid of patients with chronic eosinophilic pneumonia. **Int. Arch. Allergy Immunol.** 137 • 229-235 • 2005
- Dai S.Y., Nakagawa R., Itoh A., Murakami H., Kashio Y., Abe H., Katoh S., Kontani K., Kihara M., Zhang S. L., Hatat., Nakamura T., Yamauchi A. and Hirashima M.: Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells. **J. Immunol.** 175 • 2974-2981 2005
- Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y, Yamada T, Yoshizumi S, Suzuki C, Satoh J, Oka Y. WRN gene 1367 Arg allele protects against development of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract.** 69(3): 287-92, 2005.
- Satoh J, Takahashi K, Takizawa Y, Ishihara H, Hirai M, Katagiri H, Hinokio Y, Suzuki S, Tsuji I, Oka Y. Secondary sulfonylurea failure: comparison of period until insulin treatment between diabetic patients treated with gliclazide and glibenclamide. **Diabetes Res Clin Pract.** 70(3): 291-7, 2005.
- Park KS, Chan JC, Chuang L-M, Suzuki S, Araki E, Nanjo K, Kim JH, Cho YM, Lee HK, Asia OboTSGoMDi: The mitochondrial DNA 16189 variant is associated with type 2 diabetes mellitus In Asians. **Diabetes**, in press, 2006.
- Hamamura, K., Furukawa, K., Hayashi, T., Hattori, T., Nakano, J., Nakashima, H., Okuda, T., Mizutani, H., Hattori, H., Ueda, M., Urano, T., Lloyd, K. O., and Furukawa, K. : Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102, 11041-11046, 2005
- Aixinjueluo, W., Furukawa, K., Zhang, Q., Hamamura, K., Tokuda, N., Yoshida, S., Ueda, R., and Furukawa, K. : Mechanisms for the apoptosis of small cell lung cancer cells induced by anti-GD2 monoclonal antibodies: Roles of anoikis. **J. Biol. Chem.** 280, 29828-29836, 2005
- Handa, Y., Ozaki, N., Honda, T., Furukawa, K., Tomita, Y., Inoue, M., Furukawa, K., Okada, M., and Sugiura, Y.: GD3 synthase gene knockout mice exhibit thermal hyperalgesia and mechanical allodynia but decreased response to formalin-induced prolonged noxious stimulation. **Pain.** 117, 271-279, 2005
- Sugiura, Y., Furukawa, K., Tajima, O., Mii, S., Honda, T. and Furukawa, K. : Sensory nerve-dominant nerve degeneration and remodeling in the mutant mice lacking complex gangliosides. **Neuroscience** 135, 1167-1178, 2005
- Goodfellow, J., Bowes, Tyrone, S., Kazim, Odaka, M., Halstead, S.K., Humphreys, P.D., Wagner, E., Yuki, N., Furukawa, K., Furukawa, K., Plomp, J.J., Willison, H.J.: Over-expression of GD1a ganglioside sensitizes motor nerve terminals to anti-GD1a antibody mediated injury in a model of acute motor axonal neuropathy. **J. Neurosci.** 25, 1620-1628, 2005

- Tsuchida, A., Ogiso, M., Nakamura, Y., Furukawa, K., Furukawa, K.: Molecular cloning and expression of human ST6GalNAc III: Restricted tissue distribution and substrate specificity. **J. Biochem.(Tokyo)** 138, 237-243, 2005
- Kamimura Y, Furukawa, K., Kittaka, D., Nishio, M., Hamamura, K., Fukumoto, S., and Furukawa, K.: Differential enhancing effects of α 2,8-sialyltransferase on the cell proliferation and mobility. **Int. J. Oncol.** 26, 337-344, 2005
- Kitamura, M., Igimi, S., Furukawa, K., and Furukawa, K.: Different response of the knockout mice lacking b-series gangliosides against botulinum and tetanus toxina. **Biochim. Biophys. Acta.** 1741, 1-3, 2005