

「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おり、本年度はTリンパ球におけるセレクトイ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 が重要な役割を演じていることを明らかにした。**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を明らかにした。**土肥グループ**はヒト消化器癌における糖鎖発現の異常をもたらす機構として、糖転移酵素の発現が DNA メチル化により抑制されていることを見出した。今後、癌組織で遺伝子メチル化を受けやすい糖関連遺伝子群を明らかにする。また、ヒト大腸粘膜で糖鎖認識蛋白(シグレック)を発現する免疫担当細胞の同定を試み、**CD33** 陽性細胞分画内で検出することができた。**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、大腸がん細胞の機能的な E-セレクトインリガンドが細胞膜マイクロドメインに存在していることが明らかになった。今後はこの機能的リガンドドメインに含まれる機能性リガンド分子の同定とその機能的な糖鎖を解析してゆく。

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、新規にその機能を同定した糖蛋白質 **SHPS-1/SIRPα**についても、癌浸潤転移における機能を明らかにしようと試みた。また**板野グループ**は乳癌の進展におけるヒアルロン酸の作用を明らかにするため、乳癌特異的にヒアルロン酸を過剰産生するコンディショナルトランスジェニック(**HAS2-cTg**)

マウスを作製した。ヒアルロン酸の腫瘍内蓄積に伴って腫瘍血管新生と腫瘍間質形成の促進が認められた。今後は HAS2-cTg マウスを進行性乳癌の病態モデルとして用い、乳癌の病態解明を更に進める。

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、セレクトイ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 の転写調節機構を検索し、Fuc-T VII の調節領域に CREB/ATF, Sp1, MZF-1 に加えて T-bet と GATA-3 の結合部位が存在することを明らかにした。T細胞の活性化時にシアリルルイスXが Th1 細胞でより強く発現するのは、Th1 細胞では Th1 細胞特異的転写因子 T-bet がヒストンアセチル化酵素 CBP/P300 を結合して Fuc-T VII の転写を促進し、Th2 細胞では Th2 細胞特異的転写因子 GATA-3 がヒストン脱アセチル化酵素 HDAC-3 および-5 を結合して Fuc-T VII の転写を抑制するためであることが判明した。また、転写因子 GATA-3 が HDAC-3 および-5 と結合するにあたっては、GATA-3 のリン酸化が重要な役割を演じていることが明らかになった。大部分のリンパ球は resting 状態ではシアリルルイスXを発現せず、活性化すると発現するようになる。以上の Fuc-T VII の転写調節機構は活性化リンパ球におけるシアリルルイスX発現誘導をよく説明する。一方、resting 状態でごく一部のT細胞にセレクトインリガンドが発現し、昨年我々はこれが皮膚ホーミング性のヘルパーメモリーT細胞であることを明らかにしたが、本年度の検索により、このT細胞サブセットは CCR4 陽性シアリル 6-スルホ Le^x陽性でありながら、CCR7 と L-セレクトインも陽性である事が明らかになり、皮膚ホーミング性のヘルパーメモリーT細胞のうち、エフェクターヘルパーメモリーT細胞ではなくてセントラルヘルパーメモリーT細胞であることが明らかになった。このサブセットが特別な活性化刺激なしでシアリル 6-スルホ Le^xを発現するについては、GATA-3 のリン酸化状態の変化が重要と推定される。

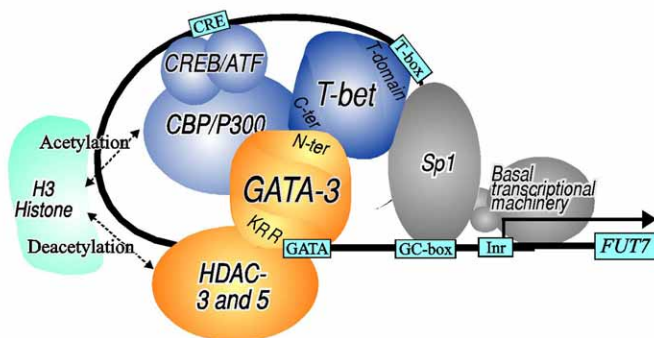


図. フコース転移酵素 Fuc-T VII の調節領域に結合する転写因子複合体(PNAS 103:16894-16899, 2006 より).

セレクトインの糖鎖リガンドであるシアリル 6-スルホ Le^x分子中のシアル酸は、脱アセチル化、さらに環状ラクタム化されて、セレクトインとの結合が制御される。**北島グループ**は、このようなシアル酸構造の変化による細胞接着の制御機構の生体内における普遍性の検証と、シアル酸構造の人為的改変による細胞接着機能の制御を目指して、(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った。(1)については、これまでにサイクリックシアル酸の普遍的存在証明のために、その残基のユニークな化学的性質を見いだすとともに、モデル化合物を用いて化学的検出法を考案した。今年度においては、微量検出法の更なる開発を進め、癌細胞での存在を確実に証明できた。(2)については、昨年度までに乳腺およびミクログリア細胞上の CD36 に新規にポリシアル酸構造をみだし、乳癌細胞でのポリシアル酸の検出を行った。また KDN、ジシアル酸構造、硫酸化シアル酸構造などユニークなシアル酸について、癌組織、培養細胞における存在検索を進めた。今年度は、ジシアル酸構造をもつ分子の同定研究が進展した。(3)について、まず、サイクリックシアル酸に対する特異的な検出および機能探求プローブの開発を推進して成果を得た。

土肥グループはこれまで正常消化管粘膜で発現がみられる Sd^a糖鎖が、胃癌・大腸癌では消失すること、癌細胞で Sd^a糖鎖合成酵素活性を回復させると転移を抑制できることを明らかにしてきた。本年度は、Sd^a糖鎖合成酵素のサイレンシング機構を解明することを目的とし、エピジェネティックな癌性変化を想定した実験を行った。DNA メチル化酵素阻害剤 5-Aza-deoxycytidine を 16 株の胃癌・大腸癌細胞に作用させると、9 株で Sd^a糖鎖合成酵素発現の回復が見られ、メチル化により活性抑制の起こっていることが明らかとなった。そこで、Sd^a糖鎖合成酵素のプロモーター領域に存在するメチル化標的部 CpG island におけるメチル化検出系(COBRA 法、bisulfite sequence 法)を作成し、胃癌・大腸癌組織を対象とした解析を現在進めている。また、Sd^a糖鎖合成酵素以外の糖鎖関連遺伝子 44 種についても、癌細胞でのサイレンシングの有無とメチル化状態について、5-Aza-dC 処理と定量 RT-PCR によって探索し、いくつかの糖転移酵素等が異常メチル化による発現低下を起こしていることを見出した。神奈木グループと連携して研究中の、糖鎖認識蛋白を発現する消化管免疫担当細胞の同定においては、フローサイトメトリーによりヒト大腸 CD33 陽性細胞分画内で正常型糖鎖(ジシアルルイス a)認識分子シグレック 7/9 発現細胞を検出することができた。

小島グループは E-セレクトインリガンド糖鎖の解析を行うため、本年度は大腸がん細胞株における細胞表面上の機能的な E-セレクトインリガンド分子の探索を行った。まず、E-セレクトイン-Fc を結合させた磁気ビーズを細胞と混合し、ビーズを結合した細胞を磁石で分離した。次に、この細胞を E-セレクトイン磁気ビーズとリガンド分子の結合を維持したまま、可溶化し、すぐにリガンド分子複合体を磁石で回収した。その後ビーズからリガンド複合体を溶出し、ショ糖密度勾配法で分離した。また別の方法として、細胞を最初に可溶化し、その後 E-セレクトイン磁気ビーズで全てのリガンド分子を回収した。このような 2 つの方法で得た E-セレクトインリガンドを比較した結果、可溶化後に回収したリガンドのシアリルルイス a 型糖鎖は低密度および高密度画分に存在していた。また高密度画分に分布するシアリルルイス x 型糖鎖もリガンドとして機能していた。しかし細胞表面から直接リガンドを単離した場合、シアリルルイス a 型糖鎖はほとんど全て低密度画分である界面活性剤に抵

抗性のマイクロドメインに分布していた。またシアリルルイス x 型糖鎖は高密度画分にもマイクロドメイン画分にもほとんど見いだすことができなかった。すなわち可溶化後には様々な分子がリガンドとして機能しうるが、実際の細胞表面上ではマイクロドメインに局在するシアリルルイス a 型糖鎖発現分子が機能的なリガンドとして働いており、これら機能性リガンドを含むマイクロドメインが機能的リガンドドメインを構成していると推察される。さらにこの機能的リガンドドメインには Src ファミリーキナーゼの一つである Lyn が共存していた。このリガンドドメインを E-セレクトイン-FC および抗 FC-抗体で架橋すると、機能的リガンドドメインの再編を通してシグナルが伝達され ERK のリン酸化が一時的に増加することも見いだした。すなわち、この機能的リガンドドメインは細胞表面で E-セレクトインとの接着を介したシグナル伝達のプラットフォームになっていることが示唆された。

Concanavalin A 刺激により、細胞はマトリックスの分解を触媒するマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) を産生する。その、明快な反応故に ConA 刺激による MMP 産生は、モデルとして幅広く解析されて来た。浜口グループは ConA の刺激を伝達する機能レセプターとして SIRP α が機能している証左をつかんだ。更に、その下流で、チロシンフォスファターゼの SHP-2 が機能している事を明らかにした。SHP-2 遺伝子を破壊した細胞では、ConA 刺激による MMP 産生が著しく低下していた。他方、この細胞に SHP-2 を導入すると MMP 産生が回復した。また、この系が実際のヒト癌細胞で機能しているかを明らかにする為に、乳癌細胞における MMP 産生過程における SHP-2 の機能をその siRNA を用いて調べ、乳癌細胞の浸潤過程に SHP-2 が重要な役割を果たす事を明らかにした。

また板野グループは乳癌においてヒアルロン酸を強発現するコンディショナルトランスジェニックマウスを作製し、乳癌の進展におけるヒアルロン酸の役割について、その作用機構の解明を試みた。その結果、ヒアルロン酸過剰産生群である HAS2^{ΔNeo} マウスでは、乳癌組織における HAS2 の発現とヒアルロン酸量共に対照群 (HAS2^{+/Neo}) よりも著明に上昇していた。腫瘍発生までの期間は、対照群に比べヒアルロン酸過剰産生群の HAS2^{ΔNeo} で短縮しており、腫瘍増殖速度も急速な増大を認めた。腫瘍の組織学的な検討から、HAS2^{ΔNeo} の腫瘍は低分化型腺癌の像を示し、一方、HAS2^{+/Neo} の腫瘍は間質の乏しい腺癌の像を示した。更に、HAS2^{ΔNeo} の腫瘍組織では、I 型コラーゲンとフィブロネクチン抗体陽性の間質構造が著明に観察された。また腫瘍内に CD31 抗体陽性の微小な血管が多数認められた。以上の結果から、腫瘍由来のヒアルロン酸マトリックスが、腫瘍間質の形成と血管新生の促進に働くことが示唆された。

3. 研究実施体制

(1)「神奈木」グループ

①研究者名

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

- ・セレクトイ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

(2)「北島」グループ

①研究者名

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

(3)「土肥」グループ

①研究者名

土肥 多恵子(国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部長)

②研究項目

- ・消化器癌の糖鎖不全現象におけるエピジェネティックな遺伝子抑制機構の解析

(4)「小島」グループ

①研究者名

小島 直也(東海大学 糖鎖工学研究施設 教授)

②研究項目

- ・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
- ・大腸がん細胞株の E-セレクトインリガンド分子の接着機能性糖鎖の同定

(5)「濱口」グループ

①研究者名

濱口 道成(名古屋大学医学系研究科腫瘍生物学専攻 教授)

②研究項目

- ・がん細胞の浸潤転移を制御するヒアルロン酸-CD44 シグナルの研究。
- ・癌細胞に浸潤転移と SIRP α /SHP-2 シグナル

(6)「板野」グループ

①研究者名

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

- ・ヒアルロン酸・CD44 による癌転移促進機構の解明
- ・ヒアルロン酸合成機構の解明と合成阻害剤の開発

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Chen, G.-Y., Osada, H., Santamaria-Babi, L.F., and Kannagi, R. Interaction of GATA-3/T-bet transcription factors regulates expression of sialyl Lewis X homing receptors on Th1/Th2 lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**: 16894–16899, 2006.
- Yin, J., Hashimoto, A., Izawa, M., Miyazaki, K., Chen, G-Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Furuhashi, K., Cheng, F-L., Lin, C-H., Sato, C., Kitajima, K., and Kannagi, R. Hypoxic culture induces expression of Sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells. *Cancer Res.*, **66**: 2937–2945, 2006.
- 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*, **107**: 3197–3204, 2006.
- Kyogashima, M., Tamiya-Koizumi, K., Ehara, T., Li, G., Hu, R., Hara, A., Aoyama, T., and Kannagi, R. Rapid demonstration of diversity of sulfatide molecular species from biological materials by MALDI-TOF MS. *Glycobiology*, **16**: 710–728, 2006.
- Kamiyama, S., Sasaki, N., Goda, E., Ui-Tei, K., Saigo, K., Narimatsu, H., Jigami, Y., Kannagi, R., Irimura, T., and Nishihara, S. Molecular cloning and characterization of a novel 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter, PAPST2. *J. Biol. Chem.*, **281**: 10945–10953, 2006.
- Zhuo, L., Kanamori, A., Kannagi, R., Itano, N., Wu, J., Hamaguchi, M., Ishiguro, N., and Kimata, K. SHAP potentiates the CD44-mediated leukocyte adhesion to the hyaluronan substratum. *J. Biol. Chem.*, **281**: 20303–20314, 2006.
- Akutagawa, A., Fukami, K., Banno, Y., Takenawa, T., Kannagi, R., Yokoyama, Y., Oda, K., Nagino, M., Nimura, Y., Yoshida, S., and Tamiya-Koizumi, K. Disruption of Phospholipase C δ 4 Gene Modulates the Liver Regeneration in Cooperation with Nuclear Protein Kinase C. *J. Biochem. (Tokyo)*, **140**: 619–625, 2006.
- Helal Uddin, B.M., Hasegawa, H.H., Aminur, R.M., Huang, P., Mon, N.N., Ruhul Amin, A.R., Senga, T., Kannagi, R., and Hamaguchi, M. SHP-2-Erk signaling regulates Concanavalin A-dependent production of TIMP-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **348**: 1145–1149, 2006.
- Kanoh, A., Seko, A., Ideo, H., Yoshida, M., Nomoto, M., Yonezawa, S., Sakamoto, M., Kannagi, R., and Yamashita, K. Ectopic expression of *N*-acetylglucosamine 6-*O*-sulfotransferase 2 in chemotherapy-resistant ovarian adenocarcinomas. *Glycoconj. J.*, **23**: 453–460, 2006.

- Sobue, S., Iwasaki, T., Sugisaki, C., Nagata, K., Kikuchi, R., Murakami, M., Takagi, A., Kojima, T., Banno, Y., Akao, Y., Nozawa, Y., Kannagi, R., Suzuki, M., Abe, A., Naoe, T., and Murate, T. Quantitative RT-PCR analysis of sphingolipid metabolic enzymes in acute leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **20**: 2042–2046, 2006.
- Koyama, H., Hibi, T., Isogai, Z., Yoneda, M., Fujimori, M., Amano, J., Kawakubo, M., Kannagi, R., Kimata, K., Taniguchi, S., and Itano, N. Hyperproduction of hyaluronan in *Neu*-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: Possible involvement of versican/PG-M. *Am. J. Pathol.*, **170**: 1086–1099, 2007.
- Li, G., Hu, R., Kamijo, Y., Nakajima, T., Aoyama, T., Inoue, T., Node, K., Kannagi, R., Kyogashima, M., and Hara, A. Establishment of a quantitative, qualitative, and high-throughput analysis of sulfatides from small amounts of sera by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **362**: 1–7, 2007.
- Kontani, K., Teramoto, K., Ozaki, Y., Sawai, S., Tezuka, N., Ishida, H., Kajino, K., Fujino, S., Yamauchi, A., Taguchi, O., Kannagi, R., Yokomise, H., and Ogasawara, K. Preparation of fully activated dendritic cells capable of priming tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with metastatic cancer using penicillin-killed streptococcus pyogenes (OK432) and anti-CD40 antibody. *Oncol. Rep.*, **17**: 895–902, 2007.
- Teramoto, K., Kontani, K., Fujita, T., Ozaki, Y., Sawai, S., Tezuka, N., Fujino, S., Itoh, Y., Taguchi, O., Kannagi, R., and Ogasawara, K. Successful tumor eradication was achieved by collaboration of augmented cytotoxic activity and anti-angiogenic effects following therapeutic vaccines containing helper-activating analog-loaded dendritic cells and tumor antigen DNA. *Cancer Immunol. Immunother.*, **56**: 331–342, 2007.
- Go, S., Sato, C., and Kitajima, K. Oral ingestion of mannose alters the expression level of deaminoneuraminic acid (KDN) in mouse organs. *Glycoconjugate J.* **23**: 409–419, 2006
- Yasukawa, Z., Sato, C., Sano, K., Ogawa, H. and Kitajima, K. Identification of disialic acid-containing glycoproteins in mouse serum: a novel modification of immunoglobulin light chains, vitronectin, and plasminogen. *Glycobiology* **16**: 651–665, 2006.
- Asahina, S., Sato, C., Matsuno, M., Matsuda, T., Colley, K., and Kitajima, K. Involvement of the α 2,8-Polysialyltransferases II/STX and IV/PST in the Biosynthesis of Polysialic Acid Chains on the O-Linked Glycoproteins in Rainbow Trout Ovary. *J. Biolchem. (Tokyo)* **140**: 687–701, 2006.
- Miyata, S., Sato, C., Kumita, H., Toriyama, M., Vacquier, V. D., and Kitajima, K. Flagelliasialin: a novel sulfated α 2,9-linked polysialic acid glycoprotein of sea urchin sperm flagella. *Glycobiology* **16**: 1229–1241, 2006.
- Inoue, S. and Kitajima, K. KDN (Deaminated neuraminic acid): Dreamful past and exciting future of the newest member of the sialic acid family. *Glycoconjugate J.* **23**: 277–290, 2006.

- Ikehara, Y., Niwa, T., Biao, L., Kabata-Ikehara, S., Ohashi, N., Kobayashi, T., Shimizu, Y., Kojima, N., Nakanishi, H.: A Carbohydrate Recognition-Based Drug Delivery and Controlled Release System using Intraperitoneal Macrophages as a Cellular Vehicle, *Cancer Res.* **66**, 8740-8748, 2006.
- Ito, S., Ito, Y., Senga, T., Hattori, S., Matsuo S. and Hamaguchi, M.. v-Src requires Ras signaling for the suppression of gap junctional intercellular communication. *Oncogene* 25(16):2420-2424, 2006.
- Mon, N. N., Hasegawa, H., Thant, A.A., Huang, P., Tanimura, Y., Senga, T. and Hamaguchi, M. A role for FAK signaling in tumor necrosis factor- α -dependent matrix metalloproteinase-9 production in a cholangiocarcinoma cell line, CCKS1. *Cancer Res.* **66**(13):6778-6784, 2006.
- Mon, N. N., Ito, S., Senga, T. and Hamaguchi, M. FAK signaling in neoplastic disorders: a linkage between inflammation and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1086: 199-212, 2006.

(2) 特許出願

平成 18 年度特許出願: 3 件 (CREST 研究期間累積件数: 7 件)