

「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) 臨床開発部 部長)

「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) 遺伝子の発現やメラノーマの実験的肺転移が抑制されることが報告されている。また、 α 1,6-フコース転移酵素 VIII (FUT8) は *N*-結合型糖鎖の Asn に隣接する GlcNAc にフコース (Fuc) を転移して core Fuc 構造を形成させる酵素であり、core Fuc 構造は抗体の antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) 活性と逆相関することが知られている。本研究は、bisecting GlcNAc 及び core Fuc 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。

肝幹細胞様の RLE 細胞が bisecting GlcNAc 構造を持つ糖タンパク質を多量に発現することを発見し、この糖鎖を認識するレクチンである E4-PHA を用いて Long-Evans Cinnamon (LEC) ラット肝臓から肝幹細胞様の LEC-HS 細胞を樹立した。ラット肝障害モデルを用いて、LEC-HS 細胞が肝障害治療効果を有することを示した。この結果は、再生医療への応用に向けた基礎的知見となると考えている。

FUT8 ノックアウトマウス及び FUT8 ノックダウンマウス腫がん細胞株の解析により、FUT8 遺伝子の発現を抑制すると epidermal growth factor 受容体 (EGFR) 及び protease-activated receptor 2 (PAR2) のシグナルが減弱することにより細胞増殖が抑制されることを明らかにした。これが FUT8 遺伝子のノックダウンによる細胞増殖抑制が他の細胞株においても共通の現象なのかを検討したところ、細胞種により様々であり、コア・フコース代謝に関与する他の遺伝子の関与が示唆された。これらの結果は、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。

GnT-III 遺伝子の発現を上昇させる物質を探索する目的で、過年度に発見した新規プロモーターの活性に影響を与える物質のスクリーニングを行った。千数百種類の微生物培養上清、植物抽出物等から数個の候補を得た。これらは、抗がん剤や健康食品の有効成分となる可能性がある。

腫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 (Fuc-Hpt)

が高率で検出されることを見出している。膵がん患者血清の Fuc-Hpt を更に詳細に検討したところ、CA19-9 との組合せで 85% の陽性率を得た。また、大腸がん患者において、がんの位置が肝臓に近い場合ほど血清中 Fuc-Hpt 陽性率が高いことを見出した。今後は臨床応用に向けて、ハイスループットな測定系を開発する予定である。

α -フェトプロテイン (AFP) の糖鎖構造の違いはがんの診断マーカーとして実用化されているが、含量が少ないために詳細な構造は未決定である。AFP を精製し、開発中の極微量糖鎖構造解析法により構造を解析中である。

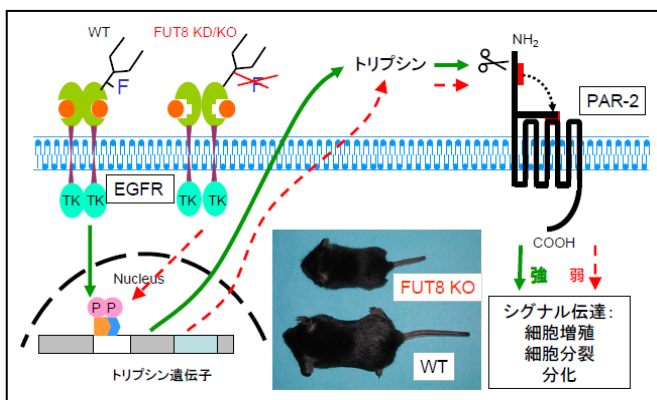
2. 研究実施内容

1. 糖鎖遺伝子による肝炎／肝がんの新しい治療薬開発のための基礎的検討

難治性肝疾患に対する新しい治療法として、肝臓の再生医療が注目されている。肝臓の幹細胞は胎性肝、成人肝、障害を受けた肝臓、骨髄、臍帯血など様々なところに存在すると言われているが、恐らく生体内に微量しか存在しないこと、有効なマーカーに乏しいことなどの理由から、その同定が難しい。我々は、肝幹様細胞 RLE が bisecting GlcNAc 構造を認識する E4-PHA と高い親和性を示すことを発見し、昨年までに肝炎・肝がん自然発症ラットである LEC ラットから E4-PHA カラムを用いて肝幹細胞様の LEC-HS 細胞の樹立に成功した。本年度は、LEC-HS の特徴とラット障害肝に対する細胞治療の有効性を検討した。

LEC-HS 細胞の糖鎖構造を質量分析法 (MS) により解析したところ、LEC-HS 細胞は RLE 細胞と類似の糖鎖構造を持っていた。また、RLE 細胞と同様に、肝細胞に分化させることにより細胞表面の bisecting GlcNAc 構造をもつ糖鎖構造が減少した。四塩化炭素投与によるラット急性肝障害のモデルにおいて、LEC-HS 細胞を脾臓から注射したところ、肝炎の組織学的な改善と肝逸脱酵素の低下を認めた。また、GFP で標識した LEC-HS 細胞は、脾臓において生着していることを確認した。

われわれは、 α 1,6-フコース転移酵素 VIII (FUT8) 遺伝子をノックアウトしたマウスの成育が顕著に低下することを発見した。マウス膵がん細胞株 (TGP-49) における RNAi の手法を用いた実験により、①FUT8 遺伝子の発現低下により epidermal growth factor 受容体 (EGFR) の core Fuc 構造が減少して EGFR のシグナルが減弱すること、②EGFR シグナルの減弱によりトリプシノーゲン遺伝子の発現が低下すること、③トリプシン活性の低下により proteinase activated receptor 2 (PAR-2) のシグナルが減弱することを見出し、細胞増殖抑制機構を解明した。更に、TGP-49 細胞以外にも、ヒト肝がん細胞株 (HepG2) 及びヒト子宮がん細胞株 (HeLa) の増殖が抑制された



(特許出願済)。

この増殖抑制効果が他のヒト肝がん細胞株 (Hep3B、Huh6、Huh7) においても見られるかどうかを検討した結果、FUT8 のノックダウンによる増殖抑制効果は細胞株ごとに異なることが観察された。糖鎖構造の形成には糖転移酵素だけでなく、転移反応に関わる分子の統合的な解析が必要であると思われたため、GDP-Fuc の生合成酵素である GDP-4-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase-4-reductase (FX) 及び GDP-mannose 4,6-dehydratase (GMD) 遺伝子のノックダウンを試みた。HepG2、Huh7 及びヒト肝がん由来細胞株 HB611 のノックダウン細胞の作製が完了し、現在細胞増殖との関係を検討中である。

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

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。新規ヒト GnT-III 遺伝子プロモーター (F2-1) を活性化する物質のレポーターアッセイ系を過年度に構築している。微生物の培養上清及び各種植物の水、含水エタノール又はエタノールによる抽出物、各々数百検体について、この系を用いてスクリーニングを行った。この結果、いくつかのサンプルが F2-1 プロモーターを活性化した。現在、これらの抽出物を用いて、GnT-III プロモーター中のサンプル応答部位の決定及び抽出物中の活性成分の分離を行っている。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. 糖鎖/レクチンシステムを用いたがんの血清診断法の開発

膵がんは代表的な難治がんであり、その最大の理由は早期診断が困難なことにある。本研究は、糖鎖構造の違いに基づいた新しい膵がんの腫瘍マーカーの開発と、その産生メカニズムの解明を目的とする。膵がん細胞が種々のフコシル化タンパク質を分泌することから、昨年度、Fuc-Hpt が膵がんの新しい血清マーカーとして有望であることを発見した。

今年度は膵がん症例数を増やすとともに、大腸がん患者血清を用いてその産生のメカニズムを解析した。80 症例以上の膵がん患者血清を検討したところ、従来から膵がんの腫瘍マーカーとして知られている CA19-9 とフコシル化ハプトグロビンの陽性率は各々 70% 前後であり、両者の組み合わせにより 85% の陽性率を得た。また、100 例の大腸がん患者血清を用いた検討により、がんの部位が肝臓に近い症例ではフコシル化ハプトグロビンの陽性率が高い傾向にあることがわかった。このことは、膵がんや大腸がんから分泌される因子が肝臓での Fuc-Hpt 産生を促す可能性を示唆する。現行の Fuc-Hpt 検出は電気泳動とレクチンブロッキングにより行っている。今後、臨床応用に向けて、操作が簡便でハイスループットかつ定量性に富む ELISA の系を構築する予定である。

4. α -フェトプロテイン (AFP) の糖鎖構造解析

AFP糖鎖における core Fuc はAFP-L3分画として肝がんの診断マーカーとなっているが、血清中のAFPの存在量が非常に少なく従来の方法では解析が困難であるために詳細な糖鎖構造が未決定である。今回、抗体カラムによる精製とレクチンカラムによる精製を組み合わせ、Huh7細胞由来のAFP-L3分画を精製した。現在開発中の極微量糖鎖解析法を応用して、この糖鎖構造を解析中である。

3. 研究実施体制

(1) 「タカラバイオ」グループ

①研究者名

小山 信人 (タカラバイオ (株) 部長)

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
- ・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／レクチンシステムを用いたがんの血清診断法の開発

(2) 「糖鎖治療学」グループ

①研究者名

近藤 昭宏 (大阪大学 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研究
- ・AFPの糖鎖構造解析

(3) 「糖鎖シグナル」グループ

①研究者名

三善 英知 (大阪大学 助教授)

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／レクチンシステムを用いたがんの血清診断法の開発

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

- Ishimura H, Takahashi T, Nakagawa H, Nishimura S, Arai Y, Horikawa Y, Habuchi T, **Miyoshi E**, Kyan A, Hagsiwa S, Ohyama C. (2006) N-acetylglucosaminyltransferase V and beta1-6 branching N-linked oligosaccharides are associated with good prognosis of patients with bladder cancer. *Clin Cancer Res.* **12(8)**, 2506-2511.

- 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.* **281(19)**, 13038-46.
- Ito Y, Akinaga A, Yamanaka K, Nakagawa T, **Kondo A**, Dickson RB, Lin CY, 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*. **16**:368-74.
- Miyagawa S, Nakatsu S, Hazama K, Nakagawa T, **Kondo A**, Matsunami K, Yamamoto A, Yamada J, Miyazawa T, Shirakura R. (2006) A novel strategy for preventing PERV transmission to human cells by remodeling the viral envelope glycoprotein. *Xenotransplantation*. **13**:258-63.
- 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* **16(6)**, 564-71.
- Nakagawa T, Uozumi N, Nakano M, Mizuno-Horikawa Y, Okuyama N, Taguchi T, Gu J, **Kondo A**, Taniguchi N, **Miyoshi E**. (2006) Fucosylation of N-glycans regulates secretion of hepatic glycoproteins into bile ducts. *J. Biol. Chem.* **281(40)**, 29797-29806.
- Li W, Nakagawa T, **Koyama N**, Wang XC, Jin J, Mizuno-Horikawa Y, Gu J, **Miyoshi E**, Kato I, Honke K, Taniguchi N, **Kondo A**. (2006) Down regulation of trypsinogen expression is associated with growth retardation in α 1,6-fucosyltransferase-deficient mice: attenuation of proteinase-activated receptor 2 activity. *Glycobiology* **16(10)**, 1007-19.
- Zhao Y, Nakagawa T, Ito S, Inamori K, Isaji T, Kariya Y, **Kondo A**, **Miyoshi E**, Miyazaki K, Kawasaki N, Taniguchi N, Gu J. (2006) N-Acetylglucosaminyl transferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on α 3 β 1 integrin-mediated cell migration. *J. Biol. Chem.* **281(43)**, 32122-30.
- Isaji T, Sato Y, Zhao Y, **Miyoshi E**, Wada Y, Taniguchi N, Gu J. N-Glycosylation of the β -propeller domain of the integrin α 5 subunit is essential for α 5 β 1 heterodimerization, expression on the cell surface and its biological function. *J. Biol. Chem.* **281(44)**, 33258-67.
- Suzuki T, Hara I, Nakano M, Shigeta M, Nakagawa T, **Kondo A**, Funakoshi Y, Taniguchi N. (2006) Man2C1, an alpha-mannosidase is involved in the trimming of free oligosaccharides in the cytosol. *Biochem J.* **400(1)**:33-41.
- Nakahara S, Saito T, Kondo N, Moriwaki K, Noda K, Ihara S, Takahashi M, Ide Y, Gu J, Inohara H, Katayama T, Tohyama M, Kubo T, Taniguchi N, **Miyoshi E**. (2006) A novel angiogenesis inducer, β 1, 6-N-Acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V), is processed as a secreted enzyme by γ -secretase. *FASEB J* **20(14)**, 2451-2459.

- Zhao Y, Ito S, Wang XC, Isaji T, **Miyoshi E**, Kariya Y, Miyazaki K, Kawasaki N, Taniguchi N, Gu J. (2006) Deletion of core fucosylation on $\alpha 3\beta 1$ integrin down-regulates its functions. *J. Biol. Chem.* **281(50)**, 38343-50.
- Ihara H, Ikeda Y, Toma S, Wang X, Suzuki T, Gu J, **Miyoshi E**, Tsukihara T, Honke K, Matsumoto A, Nakagawa A, and Taniguchi N. (2006) Crystal Structure of Mammalian $\alpha 1,6$ -Fucosyltransferase, FUT8. *Glycobiology* 2006 Dec 15; [Epub ahead of print].
- Yokoe S, Takahashi M, Asahi M, Lee S H, Osumi D, **Miyoshi E**, Taniguchi N. (2007) The Asn⁴¹⁸-linked *N*-glycan of ErbB3 plays a crucial role in preventing spontaneous heterodimerization and tumor promotion. *Cancer Res.* **67**, 1935-1942.
- Wada Y, Azadi P, Costello C, Dell A, Dwek RA, Geyer H, Geyer R, Kakehi K, Karlsson N, Kato K, Kawasaki N, Khoo KH, Kim S, **Kondo A**, Lattova E, Mechref Y, **Miyoshi E**, Nakamura K, Narimatsu H, Novotny M, Packer N, Perreault H, Peter-Katalini J, Pohlentz G, Reinhold V, Rudd M, Suzuki A, Taniguchi N. (2007) Comparison of the Methods for Profiling Glycoprotein Glycans: HUPO HGPI (Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/Proteome Initiative) Multi-institutional Study. *Glycobiology* 2007 Jan 12; [Epub ahead of print].

(2) 特許出願

平成18年度特許出願：1件（CREST研究期間累積件数：5件）