

「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

先に、形質膜シアリダーゼ(NEU3)が各種ヒトがんで発現が異常に亢進し、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。本研究では、この異常発現の意義や制御機構の解明を進めてきた。その結果、NEU3 が細胞運動や浸潤、細胞死を制御し、がん細胞の悪性を助長する方向に働いていることが明らかとなった。また、NEU3 ノックダウンががん細胞では細胞死をもたらすが、正常細胞には影響しないことが分かった。この現象の治療への応用の可能性を検討している。今後、がんや糖尿病等の病態にシアリダーゼがどのように関わっているかをさらに詳細に解析し、生理的シアル酸変化の全貌解明をめざして、阻害剤の合成等を含めたシアリダーゼを標的とした新しい診断・治療法の開発に繋げる。

2. 研究実施内容

研究目的

形質膜型シアリダーゼ 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。これらの疾患における NEU3 の病理的役割を解明し、その制御法の探索を通じて、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した。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た。

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、18年度、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, Shc, integrin β 4 等のシグナル分子の活性化や IL-6 シグナリングを促進し、がんの悪性形質を助長していることを明らかにした。また、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。このシアリダーゼによる活性化機構は、触媒反応によるガングリオシドの修飾を介して、さらに、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起こっている可能性が強く示唆された。例えば、NEU3 による EGF レセプターのリン酸化の促進は、反応産物であるラクトシルセラミドの蓄積によるのみではなく、NEU3 膜結合ドメインと EGF レセプターとの結合によっても起こることが検証された。一方、香川大の加藤らは、CD44 のヒアルロン酸 (HA) 結合性におけるシアル酸およびシアリダーゼの関与について研究を進めた。T 細胞をシアリダーゼ処理し、HA 結合性をフローサイトメトリーにて検討したところ、一部の細胞に HA 結合性が誘導された。Neu3 トランスジェニックマウス脾臓 CD4T 細胞はヒアルロン酸および PNA 結合性が亢進していた。マウス喘息モデルにおいて脾臓細胞を *in vitro* で抗原再刺激することで CD4T 細胞の HA 結合性および脾臓細胞のシアリダーゼ発現が誘導された。また、マウス肝炎モデルにおいても脾臓の CD4T 細胞の HA 結合性および脾臓細胞のシアリダーゼ発現が誘導された。今後シアリダーゼ欠損マウスを用いた検討を予定している。

鈴木グループは、糖尿病におけるシアリダーゼの役割について解析を進めた。NEU3 アデノウイルスベクターを用いた解析やヒト遺伝子多型の臨床解析により、インスリン抵抗性と耐糖能異常と NEU3、ガングリオシド糖鎖異常の関連性がより明確になってきた。アデノウイルスベクターを用いて、NEU3 を肝臓に過剰発現させた実験では、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、ガングリオシド GM3 の減少、PPAR γ シグナルの亢進という2つの機序が示唆された。この解析により、肝臓におけるインスリン感受性を規定する NEU3 の役割が明らかになった。また、2型糖尿病患者において NEU3 遺伝子の変異を検索したところ、見いだされた多型の頻度が2型糖尿病患者で正常者に比べて有意に高く ($p < 0.001$)、かつインスリン抵抗性と高い相関を示した。SIAT9 遺伝子で同定された多型については、GTT 時インスリン分泌能が有意に低値であり ($p < 0.001$)、かつ *insulinogenic index* も有意に低値を示した ($p < 0.01$)。ガングリオシド糖鎖合成遺伝子多型と2型糖尿病との関連について、初めて明らかになった。

袖岡グループは昨年引き続き、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。シアリダーゼ阻害剤として代表的なインフルエンザ治療薬のザナミビルやリン酸オセタナビル (タミフル) といったシアリダーゼ阻害剤は、Neu3 に対する効果が低いことがわかっているため、Neu3 の特異な基質選択性を考慮し、加水分解されない CF_2 -シアロシド結合をもつ新規シアリルガラクトース誘導体を設計し、その合成に初めて成功した。本合成法を生かし、さまざまな炭素連結型シアリルガラクトースを合成し、Neu3 阻害能との構造活性相関を検討していく予定である。

古川グループは、GD3 発現によるメラノーマの悪性形質形成におけるインテグリンの役割について、及び GD3 発現抑制によるメラノーマの癌性形質の低下機構の解明を目的として、ヒト Neu3 発現メラノーマ細胞株の Neu3 酵素活性と細胞表面 GD3 の発現変化について検討した。第一の課題については、GD3 非発現ヒトメラノーマ細胞に GD3 合成酵素遺伝子を導入し、インテグリン $\beta 1$ をノックダウンした結果、GD3 発現細胞において細胞増殖及び浸潤性の顕著な低下を認めた。GD3 発

現細胞ではI型およびIV型コラーゲンに対する接着性が増加していた。また、IV型コラーゲンによる接着刺激では、GD3発現細胞においてFAK、p130Cas及びpaxillinのリン酸化レベルの増強が認められた。一方、FAKのノックダウンにより、GD3発現細胞で細胞増殖能および浸潤性の低下が認められた。さらにこの際、FCS刺激によるp130Casおよびpaxillinのリン酸化の抑制が認められたことより、FAKがこれらのアダプター分子の上流に位置すると推察された。今後、GD3によるインテグリン依存的細胞増殖および浸潤性の増強メカニズムを検討する。さらに、第二の課題については、GD3発現ヒトメラノーマ細胞株にヒトNeu3遺伝子を導入した細胞についてNeu3活性を検討した結果、期待通り著明な酵素活性の増強が認められた。しかし、細胞表面のGD3およびGD2の発現レベルには明らかな変化が認められなかった。今後、Neu3発現細胞の糖脂質を抽出してTLCにより解析し、Neu3発現による糖脂質の変化について検討する。

東グループはNEU3の神経機能解明を分担している。これまでに、Neu3を強発現した細胞において、細胞内カルシウムイオンの上昇を引き起こすと、細胞内カルシウムイオン濃度の高い時間の延長がおこることを見出している。この現象は、細胞膜カルシウムポンプ活性化作用のあるGD1bなどのガングリオシドがNeu3の作用でGM1などに変換されたためと予想している。また、マウスのインスリノーマ細胞MIN6は、細胞内カルシウムイオンの上昇によってインスリンを分泌するが、Neu3を強発現したMIN6細胞では、カルシウムイオン濃度の上昇時間が延長されるにもかかわらず、インスリンの分泌はむしろ阻害された。Neu3は細胞膜上のいくつかのタンパク質と相互作用をすることが報告されているので、以上の現象にはNeu3の膜タンパク質との相互作用が関与している可能性もある。今後、これらの現象が、Neu3のガングリオシドに対する分解作用によるものか、タンパク質に対する相互反応によるものかを検証するため、酵素活性のないNeu3変異体を用いて解析したい。さらに、Neu3に感受性のあるガングリオシドであるGD1b、GT1bが神経細胞の糖鎖受容体に認識されることで樹状突起の伸展が増強されることを見出した。GD1bやGT1bの受容体が膜7階貫通Gタンパク質共役受容体(GPCR)のひとつであるブラジキニンB2受容体であることを示唆するデータを得ているが、酵母のフェロモン受容体GPCRをほ乳類のB2受容体に取り換えた酵母リポーターアッセイを実施したところ、GQ1b、GT1b、GD1bの順でB2受容体を活性化した。一方で、GM1やGD1aは、ほとんど活性化しなかった。このことから、b-シリーズガングリオシドで、シアリダーゼ感受性のシアリル基を多く持つガングリオシドが、より活性が強いことが分かった。今後、Neu3による軸索伸展とB2受容体を介した軸索・樹状突起分化の制御の関連を調べたい。

3. 研究実施体制

(1)「シアリダーゼの生理的・病的機能解析」グループ

①研究者名

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

- ・シアリダーゼNEU3の機能解明
- ・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

- NEU3の発現制御法の検
- NEU1やNEU4のがんにおける発現異常とNEU3発現との関連について

(2)「Ⅱ型糖尿病におけるシアリダーゼ解析」グループ

①研究者名

鈴木 進(東北大学大学院医学系研究科分子代謝病態学 助教授)

②研究項目

- 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型糖尿病患者の NEU3, SIAT9 遺伝子解析
- 変異NEU3, SIAT9の機能解析

(3)「シアリダーゼ NEU3 阻害剤創製」グループ

①研究者名

袖岡 幹子 ((独) 理化学研究所 主任研究員)

②研究項目

- ヒトシアリダーゼ Neu3 の特異な基質選択性を考慮した選択的阻害剤の開発

(4)「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研究者名

古川 圭子(中部大学 教授)

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

(5)「神経細胞におけるシアリダーゼの役割解明」グループ

①研究者名

東 秀好(東北薬科大学 教授)

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. 研究成果の発表等

(1)論文発表(原著論文)

- Yamaguchi K, Hata K, Wada T, Moriya S, Miyagi T. Epidermal growth factor-induced mobilization of a ganglioside-specific sialidase (NEU3) to membrane ruffles. *Biochem Biophys Res Commun.* 346, 484-490, 2006
- Yamanami, T., Shiozaki, K., Wada, T., Yamaguchi, K., Uemura, T., Kakugawa, Y., Fujiya T., and Miyagi, T. Down-regulation of sialidase NEU4 may contribute to invasive properties of

- human colon cancers. *Cancer Sci.* 98, 299–307, 2006
- Yoshizumi, S., Suzuki, S., Hirai, M., Hinokio, Y., Yamada, T., Yamada, T., Tsunoda, U., Aburatani, H., Yamaguchi, K., Miyagi, T., Oka, Y.: Increased hepatic expression of ganglioside-specific sialidase, NEU3, improves insulin sensitivity and glucose tolerance in mice. *Metabolism* 56, 420–429, 2007
- Hasagawa, T., Sugeno, N., Takeda, A., Matsuzaki-Kobayashi, M., Kikuchi, A., Furukawa, K., Miyagi, T., and Itoyama, Y.: Role of Neu4L sialidase and its substrate ganglioside GD3 in neuronal apoptosis induced by catechol metabolites. *FEBS Lett.* 581, 406–412, 2007
- Wada, T., Hata, K., Yamaguchi, K., Shiozaki, K., Koseki, K., Moriya, S., Miyagi, T.: A crucial role of plasma membrane-associated sialidase (NEU3) in the survival of human cancer cells. *Oncogene* 26, 2483–2490, 2007
- Iiboshi, H., Ashitani, J., Katoh S., Sano, A., Matsumoto, N., Mukae, H., Nakazato, M. : Long-term Treatment with Theophylline Reduces Neutrophils, Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor- α in the Sputum of Patients with Chronic Obstructive. Pulmonary Disease. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 20: 46–51, 2007. 2007.
- Okuda, T., Tokuda, N., Numata, S., Ito, M., Ohta, M., Kawamura, K., Wiels, J., Urano, T., Tajima, O., Furukawa, K., and Furukawa, K.: Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins. *J. Biol. Chem.* 281, 10230–10235, 2006
- Ko, K., Furukawa, K., Takahashi, T., Urano, T., Sanai, Y., Nagino, M., Nimura, Y. and Furukawa, K.: Fundamental study of small interfering RNAs for ganglioside GD3 synthase gene as a therapeutic target of lung cancers. *Oncogene* 25, 6924–6935, 2006
- Tokuda, N., Zhang, Q., Yoshida, S., Kusunoki, S., Urano, T., Furukawa, K., and Furukawa, K.: Genetic mechanisms for the synthesis of fucosyl GM1 in small cell lung cancer cell lines. *Glycobiology* 16, 916–925, 2006
- Zhang, Q., Furukawa, K., Chen, H.-H., Sakakibara, T., Urano, T., and Furukawa, K.: Metastatic potential of mouse Lewis lung cancer cells is regulated via ganglioside GM1 by modulating the matrix metalloprotease-9 localization in lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 281, 18145–18155, 2006
- Zhang, Q., Furukawa, K., Chen, H.-H., Fujinawa, R., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Urano, T., and Furukawa, K.: Down-regulation of caveolin-1 in mouse Lewis lung cancer P29 is a causal factor for the malignant properties in a high-metastatic subline. *Oncol. Rep.* 16, 289–294, 2006
- Nakashima, H., Hamamura, K., Mitsudo, K., Tohnai, I., Ueda, M., Urano, T., Furukawa, K., and Furukawa, K.: Overexpression of caveolin-1 in a human melanoma cell line resulted in the dispersion of ganglioside GD3 from lipid rafts and the alteration of leading

edge formation, leading to the attenuation of malignant properties. *Cancer Sci.* **in press**

○Senda, M., Ito, A., Tsuchida, A., Nakamura, Y., Kasama, K., Kiso, M., Katagiri, Y., Yoshikawa, K., Ono, Y., Ogiso, M., Urano, T., Furukawa, K., Oshima, S., and Furukawa, K.: Identification and expression of a sialyltransferase responsible for the synthesis of disialylgalactosylgloboside in normal and malignant kidney cells: Down-regulation of ST6GalNAc VI in renal cancers. *Biochem. J.* 402, 459-470, 2007

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:0 件 (CREST 研究期間累積件数:1 件)