

「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、ヒト形質膜シアリダーゼ(NEU3)が各種がんで発現が異常亢進し、この遺伝子導入マウスがインスリン抵抗性糖尿病を発症することを見いだした。本課題では、これら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 ががん細胞の運動や浸潤、細胞死を制御し、その悪性度を助長する方向に働いていることが明らかとなった。逆に、NEU3 をノックダウンすると、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。このことは NEU3 ががん治療の優れた標的分子である可能性が高いことを示している。

また、NEU3 異常亢進ががんや糖尿病という全く異なる病態にどのように関わっているのか、その分子機構を解析してきた結果、二つの病態が NEU3 を中心にクロストークしている可能性が得られてきた。今後、種々の観点から、このシアリダーゼの生理的および病理的役割について詳細に解析を進め、阻害剤の合成等を含めて、その制御法を見いだすことによって、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たい。

## 2. 研究実施内容

### 研究目的

これまでの結果を踏まえて、形質膜型シアリダーゼ NEU3 の生理的役割や性質についても新たな視点から解析を加えた。また、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ので、これらの疾患における NEU3 の病理的役割を解明し、その制御法の検索を通じて、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。

## 研究方法

培養細胞や遺伝子改変マウス等を用いて、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、あるいは新規阻害剤の開発により、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。

## 研究結果

宮城グループは、18年度に見いだしたがん細胞に対するNEU3siRNA効果、即ち、NEU3をノックダウンすると、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を種々の細胞で検証した。このことは NEU3siRNA ががんの分子標的治療薬として非常に有望であることを示している。今後、前臨床試験に進めることを計画している。一方、先に、2型糖尿病患者において見いだされた NEU3 遺伝子の多型の頻度が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ので、これらの NEU3 変異体を作成して、Min6 などのインスリンノーマ由来の細胞や肝細胞に導入して、wild type との比較を行った。変異体は酵素反力学的には大きな差は認められないようであったが、インスリン分泌能や蛋白自身の安定性等が変化している可能性が示唆された。さらに、NEU3トランスジェニックマウスにアゾキシメタンを投与すると、前がん病変である Aberrant crypt foci の発生率が対照マウスに比べて有意に高いことがわかった。このことは、NEU3 異常亢進によるがんと糖尿病発症が密接に関連した現象であることを示唆しているだけでなく、NEU3 がクロストークするふたつの病態に関連する分子の存在も分かってきた。また、NEU3 の生理的機能解析の一環として、NEU3 がホスファチジン酸と結合し、活性化されていること等、NEU3 の生理的活性化機構の興味深い一端が明らかになった。以上の結果を詳細に検討し、NEU3 の生理的病理的役割の全容解明を試みている。

インフルエンザの治療薬であるリレンザやタミフルが NEU3 活性に影響を与えるかどうかを検討した。これら薬剤の投与後にみられている精神神経異常行動などが、その副作用である可能性が示唆されている。この状況下で、脳・神経組織に比較的高く発現している NEU3 がその標的である可能性も否定できないので、NEU3 や他の 3 種のヒトシアリダーゼについて、リレンザやタミフルの活性阻害効果を調査した。

加藤グループは、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してきた。CD44 は血液細胞を始めとして広範に発現を認める接着分子で、その多くはリガンドであるヒアルロン酸(HA)との結合性を有しない不活性型である。我々はこれまでシアル酸がこの機能を抑制的に調節していることを報告してきた。今回、喘息の発症に重要である活性化T細胞に着目し、CD44のHA結合性におけるシアル酸及びシアリダーゼの関与について検討した。その結果、以下の2点について明らかとなった。(1)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た。抗原感作脾臓細胞をin vitroで抗原再刺激し、CD4T細胞中のHA結合性及び脾臓細胞のシアリダーゼ発現を経時的に検討したところ、HA結合性及びシアリダーゼ発現(Neu1およびNeu3)が誘導された。さらに、(2)マウスT細胞クローンは抗CD3抗体刺激により6時間後をピークとしたHA結合

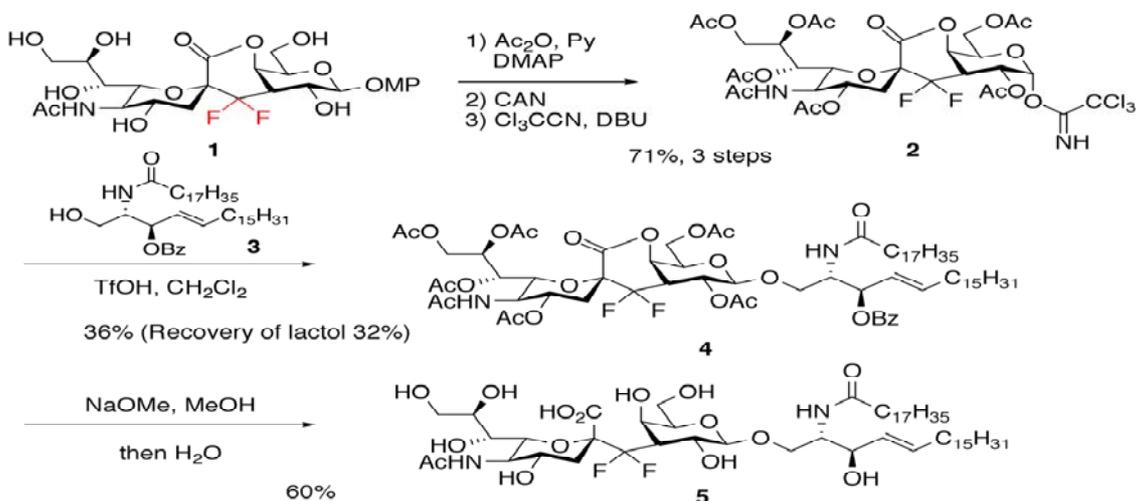
性及びシアリダーゼ発現 (Neu1) が誘導された。この HA 結合性誘導はシアリダーゼ阻害剤の共存により抑制された。

東グループは、カルシウムシグナルが関与する神経分化および糖代謝系の調節に対する Neu3 の役割について解析してきた。細胞膜シアリダーゼ高発現によって細胞興奮時のカルシウム上昇の持続時間が延長されることを見出したが、シアリダーゼ活性を持たない細胞膜シアリダーゼの高発現のみでも同様の効果が認められたので、この効果はシアリダーゼ活性による細胞膜表面の ganglioside の分解によるものではなく、シアリダーゼタンパク質分子が細胞膜の他の分子、おそらくはカルシウムポンプ ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) に作用することによる効果であると考えられた。最近、シアリダーゼに感受性の高い ganglioside が、コンドロイチン硫酸糖鎖と異なる方向に神経細胞の分化を調節していることを見出した。また、糖鎖や糖の受容体として機能する膜 7 回貫通 G-タンパク質共役受容体 (GPCR) を見出し、この中の一つは膵臓  $\beta$  細胞からのインスリン放出に関わる可能性を示すデータを得た。

古川グループは、ganglioside を高発現するヒトメラノーマ細胞について、ganglioside 糖鎖の脱シアル化酵素である NEU3 シアリダーゼの発現と酵素活性を分析して、NEU3 の人為的発現増強および抑制による糖鎖制御の可能性と癌性形質への関与を検討した。ganglioside GD3 が高率に発現するヒトメラノーマについて NEU3 の遺伝子発現を検討した結果、多くの場合、NEU3 の明らかな遺伝子発現が認められた。また、NEU3 酵素活性も大腸癌細胞株と同等の活性が認められた。更にメラノーマに NEU3 遺伝子を導入した NEU3 高発現細胞を樹立し、脂質の分析を行った結果、ganglioside 組成には明らかな違いが認められず、細胞増殖能と浸潤性も差異が認められなかった。この結果を踏まえて、メラノサイトとメラノーマにおいて NEU3 遺伝子の発現レベル及び酵素活性を比較検討し、メラノーマにおいても癌化に伴い NEU3 発現が増強するかどうかを検討する。また、メラノーマにおいて NEU3 遺伝子をノックダウンして、癌性形質の変化やアポトーシスの誘導等について検討をする。

袖岡グループでは、ヒトシアリダーゼ NEU3 に対する特異的、効果的阻害剤を創製することを目的として研究を進めてきた。この特異的阻害剤の創製は NEU3 の機能解明に役立つだけでなく、医薬品のリード化合物となることが期待される。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) といった代表的な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おり、あらたな概念での阻害剤創製が必要であると考えた。そこで、NEU3 の特異な基質選択性を考慮し、加水分解されない  $\text{CF}_2$ -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。本合成法を生かして、様々な ganglioside 誘導体を合成し、その生物活性を評価して NEU3 の機能解明に役立てようと考えている。昨年度までに合成した、 $\text{CF}_2$ -連結型シアリルガラクトース誘導体 **1** から、ganglioside GM4 誘導体 **5** への変換を検討した。セラミド誘導体 **3** とドナー **2** とのグリコシル化は、反応性が低く中程度の収率にとどまったものの、目的とする **5** の合成に成功した。GM4 誘導体 **5** のヒトシアリダーゼ阻害活性を評価したところ、ganglioside を基質とするヒトシアリダーゼ NEU2, NEU3, NEU4 に対して弱いながらも阻害活性を示した。また、ヒトリンパ球の増殖抑制活性を示したことから、**5** は ganglioside ミミックとして働いて

いることが示唆された。現在は、 $CH_2$ -や  $CHF$ -シアロシドの合成と GM3 への変換を検討している。



### 3. 研究実施体制

#### (1)「宮城」グループ (シアリダーゼの生理的・病理的役割解析)

① 研究者名: 宮城 妙子 (宮城県立がんセンター研究所)

② 研究項目

・がんや糖尿病発症におけるシアリダーゼの役割とその臨床応用

1. シアリダーゼの機能解明。
2. シアリダーゼの形質膜におけるトポロジーの解析。
3. シアリダーゼのがんや糖尿病等における異常発現と意義の解析。
4. シアリダーゼ異常の人為的制御法の検索。
5. シアリダーゼ研究の臨床応用の可能性

#### (2)「加藤」グループ (シアリダーゼの生理的・病理的役割解析、特に CD44 との関連)

① 研究者名: 加藤 茂樹 (香川大学)

② 研究項目

・接着分子 CD44 の機能 (ヒアルロン酸結合性) におけるシアル酸及びシアリダーゼの関与に関する研究

#### (3)「東」グループ (シアリダーゼの生理機能解析グループ、特に神経スリン分泌との関連)

① 研究者名: 東 秀好 (東北薬科大学)

② 研究項目

- ・神経細胞分化およびインスリン分泌と細胞膜シアリダーゼ

(4)「古川」グループ(がんにおけるシアリダーゼ異常の制御法解析グループ、ガングリオシド合成系から)

① 研究者名: 古川 圭子(中部大学)

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)「袖岡」グループ (シアリダーゼ阻害剤の開発)

① 研究者名: 袖岡 幹子(理化学研究所)

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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Miyagi, T., Wada<sup>a</sup> T., Yamaguchi, K., Shiozak, K., Sato, I., Yamanami, H., Kakugawa, Y., Fujiya, T.: Huan sialidase as a cancer marker. *Proteomics*. in press.
- Furukawa, K., Aixinjueluo, W., Kasama, T., Ohkawa, Y., Yoshihara, M., Ohmi, Y., Tajima, O., Suzumura, A., Kittaka, D., Furukawa, K.: Disruption of GM2/GD2 synthase gene resulted in overt expression of 9-O-acetyl GD3 irrespective of Tis21. *J. Neurochem.* in press.
- Nomura, H., Tamada, Y., Miyagi, T., Suzuki, A., Taira, M., Suzuki, N., Susumu, N., Irimura, T., Aoki, D.: Expression of NEU3 (plasma membrane-associated sialidase) in clear cell adenocarcinoma of the ovary: its relationship with T factor of pTNM classification. *Oncol Res.* 16, 289-97, 2006.
- Magesh, S, Moriya, S, Suzuki, T, Miyagi, T, Ishida, H, Kiso, M.: Design, synthesis, and biological evaluation of human sialidase inhibitors. Part 1: selective inhibitors of lysosomal sialidase (NEU1). *Bioorg. Med.Chem. Lett.* 18, 532-537. 2007.
- Hirai, G., Watanabe, T., Yamaguchi, K., Miyagi, T., and Sodeoka, M: Stereo-controlled and convergent entry to CF2-sialoside: synthesis of CF2-linked ganglioside GM4. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 15420-15421. 2007.
- Katoh, S., Ishii, N., Nobumoto, A., Takeshita, K, Dai, S.Y., Shinonaga, R., Niki, T., Nishi, N.,

Tominaga, A., Yamauchi, A., And Hirashima, M. :Galectin-9 Inhibits CD44-Hyaluronan Interaction and Suppresses a Murine Model of Allergic Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care.Med.* 176, 27-35, 2007.

- Susuki, K., Baba, H., Tohyama, K., Kanai, K., Kuwabara, S., Hirata, K, Furukawa, K., Furukawa, K., Rasband, M.N., Yuki, N et al.: Gangliosides contribute to stability of paranodal junctions and ion channel clusters in myelinated nerve fibers. *Glia* 55, 746-757, 2007.
- Hamamura, K., Tsuji, M., Nakashima, H., Miyazaki, S., Urano, T., Yamamoto, N., Ueda, M., Furukawa, K., and Furukawa, K.: Focal adhesion kinase as well as p130Cas and paxillin is crucially involved in the enhanced malignant properties under expression of ganglioside GD3 in melanoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1780(3), 513-519, 2008.