

## 研究課題別事後評価結果

### 1. 研究課題名： 癌の進展における細胞接着性機能糖鎖の解明

### 2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

#### 研究代表者

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)

#### 主たる共同研究者

北島 健 (名古屋大学生物機能開発利用研究センター 教授)

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 部長) (平成18年4月～)

小島 直也 (東海大学糖鎖工学研究施設 教授)

浜口 道成 (名古屋大学大学院医学系研究科 教授)

板野 直樹 (信州大学大学院医学研究科 准教授)

### 3. 研究内容及び成果

本研究では、糖鎖が機能性分子としてがんの進展で主役を演じる局面を解明し、新しい利用技術を開発してがんの診断・治療に応用することを目指した。セレクトインと糖鎖リガンドを介したがん細胞の接着においては糖鎖の細胞識別・接着機能が良く発揮されており、がん細胞の CD44-ヒアルロン酸シグナル伝達系においては糖鎖のシグナル分子としての機能が良く発揮されている。本研究ではこれらの糖鎖を介した二つの細胞接着系のがん進展との関わりを研究した。

セレクトインの特異的リガンドであるシアリル Le<sup>x/a</sup> 糖鎖の発現は、がんの発生源である正常上皮細胞とくらべ、癌化した細胞では著しく亢進している。本研究ではその発現誘導機構を研究し、次のような結果を得た。

- (1) 白血病細胞、とくに成人T細胞性白血病ではセレクトインの特異的リガンドであるシアリル Le<sup>x</sup> 糖鎖の発現が著しく亢進するが、これが成人T細胞性白血病のウイルスである HTLV-1 ウイルスによってコードされる Tax 蛋白質が、シアリル Le<sup>x</sup> 糖鎖の合成糖転移酵素遺伝子の転写を強く誘導することによることを明らかにした。シアリル Le<sup>x</sup> 糖鎖の正常白血球、特にTリンパ球における発現は、合成糖転移酵素遺伝子の転写のレベルで精密に調節されていることを明らかにした。
- (2) 固形がんにおいては、がんの発生源である正常上皮細胞にはシアリル Le<sup>x/a</sup> 糖鎖と合成系を共通にしながら、シアリル Le<sup>x/a</sup> 糖鎖よりさらに複雑な構造を有する糖鎖が発現していることを明らかにした。がん化に伴ってこれら複雑な糖鎖の合成が不全となり、これによってがん細胞にシアリル Le<sup>x/a</sup> 糖鎖の発現が誘導されることが明らかとなった。すなわち、「糖鎖不全現象」の機構が早期がんにおけるシアリル Le<sup>x/a</sup> 糖鎖の発現誘導に関与している。その背景には、正常細胞において複雑な構造を有する糖鎖を合成する糖鎖関連遺伝子の DNA メチル化などによるエピジェネティックな発現抑制があることを明らかにした。
- (3) 局所進行癌の段階では、がん細胞におけるシアリル Le<sup>x/a</sup> 糖鎖の発現はさらに亢進する。その背景には、局所進行癌病巣において低酸素抵抗性を獲得したがん細胞のもつ転写因子 hypoxia inducible factor による一連の糖鎖関連遺伝子の転写誘導があることを明らかにした。DNA マイクロアレイと RT-PCR を用いて、低酸素による遺伝子誘導が、多数の糖鎖関連遺伝子の転写を誘導し、多彩な糖鎖変化を引き起こすことを明らかにした。
- (4) 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<sup>x</sup> 分子中のシアル酸は、脱アセチル化の後、さらに環状ラクタム化されてサイクリックシアリル 6-スルホ Le<sup>x</sup> となり、この変化によってセレクトインとの結合が制御される。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た。サイクリックシアル酸については、そ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。さらにその方法を正常および癌細胞に適用するための種々の質量分析法を駆使しながら微量検出法の開発に取り組み、その目処を得るとともに、様々な正常および癌細胞での質量分析による定量法の基盤をほぼ確立した。サイクリックシアル酸特異的分解酵素活性を天然に見いだした。この酵素は微弱な活性であり、大量調製に適した精製法を検討した結果、現在ようやく目処がたった。今後、酵素の精製を成功させてこの酵素の利用を目指している。また、乳腺、ミクログリア細胞、乳癌にポリシアル酸構造をみいだした。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、いくつかの担体分子の同定に成功した。特に、癌における KDN 量の増大が低酸素順応の結果であることを明らかにした。

- (5) 癌における糖鎖異常のメカニズムとして糖鎖不全現象に着目し、癌組織でその発現が著明に低下する Sd<sup>a</sup> 血液型糖鎖の合成酵素 Sda-4GalNAcT の発現低下のメカニズムを解明するため、癌細胞株のメチル化阻害剤処理やメチル化酵素欠損細胞を用いた解析を行い、Sda-4GalNAcT 遺伝子のプロモーター領域にある CpG 配列が DNA 高メチル化を受けているため遺伝子サイレンシングがおこっていることを見いだした。また、実際の胃がん、大腸癌組織でも強い DNA メチル化がおこっていることが明らかとなった。さらに、糖鎖関連遺伝子の中に Sda-4GalNAcT と連動して DNA メチル化を受けている遺伝子を見いだした。これらの一群の遺伝子は、胃がん患者組織でも Sda-4GalNAcT と同時に DNA メチル化サイレンシングがみられた。
- (6) 細胞や組織から得られる多様なオリゴ糖鎖を人工糖脂質化した糖鎖ライブラリーとして調製するために、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE) とパラアミノ安息香酸 (ABA) とを縮合させて蛍光脂質プローブを合成し、このプローブと市販オリゴ糖とを縮合して定量的に蛍光人工糖脂質へと導く方法を確立した。また細胞表面上でマイクロドメインに局在するシアリル Le<sup>a</sup> 糖鎖発現分子がセレクトインの機能的なリガンドとして働き、これら機能性リガンドを含むコレステロール非依存的な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、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となることを示唆する成績を得た。
- (7) CD44 とヒアルロン酸の研究においては、ヒアルロン酸合成酵素 (HAS1, HAS2, HAS3) に対する特異抗体を作成し、これを用いて v-Src が STAT3 依存的にヒアルロン酸合成酵素特に HAS2 の発現を活性化する事を明らかにした。さらにヒアルロン酸合成と CD44 発現の腫瘍特異的活性化機構の解析とそれを標的とする癌細胞浸潤阻害法を研究し、FAK, Stat3, Ras/MAPK/AP-1 がシグナル伝達因子として機能し、HAS,1 HAS2 の転写を活性化、ヒアルロン酸合成を活性化する事を明らかにした。また BATF による癌浸潤転移の抑制については、Stat3 の下流で AP-1 と拮抗する因子として、BATF を見いだした。ヒアルロン酸合成が亢進している癌細胞に条件依存性に BATF を発現させる系を確立し、BATF の発現がヒアルロン酸の合成を抑制する事を確認した。
- (8) また、ヒアルロン酸と CD44 の相互作用を SHAP が増強する機構があることを世界に先駆けて証明した。これまでセレクトインを介する細胞接着の解析に利用されてきたフローシステムによる細胞接着の測定法を CD44-ヒアルロン酸を介した接着にも応用し、CD44-ヒアルロン酸を介した接着が細胞の rolling のみならず arrest 型の接着も引き起こすことを明らかにした。この実験結果は、本研究の対象とするセレクトインを介した細胞接着と、CD44-ヒアルロン酸を介した細胞接着が、共に協調して癌の血行性転移に関与する可能性を示すものである。ヒアルロン酸合成酵素 2 (HAS2) 遺伝子を誘導性に発現するトランスジェニックマウスを作製し、乳癌特異的にヒアルロン酸を過剰に産生するモデルマウスを樹立して、ヒアルロン酸の過剰産生が腫瘍内に顕著な間質反応を惹起すること、血管やリンパ管の著しい腫瘍内新生を導くことを明らかにした。また、ヒアルロン酸無細胞合成系の確立を目指して、バキュロウイルス発現系によるヒト HAS2 蛋白質の大量発現と可溶化並びに部分精製に成功し、ヒアルロン酸糖鎖合成阻害剤のハイスループット探索のための技術基盤を確立した。

これらの成果のうち、(1),(2)および(3)は主として神奈木グループの成果であり、(4)は北島グループ、(5)は

土肥グループ、(6)は小島グループ、(7)は浜口グループ、(8)は板野グループが主に分担した研究成果である。

#### 4. 事後評価結果

##### 4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

がんにおける糖鎖生物学的な背景を分子レベルで明らかにした。固形がんにおいては、早期がんの糖鎖変化は「糖鎖不全現象」によりシアリルルイス x/a の発現増加が起こるが、その背景には糖転移酵素のエピジェネティックな発現抑制があることを明らかにした。局所進行がんでは、がん細胞におけるシアリルルイス x/aの発現がさらに亢進するが、その背景には Hypoxia inducible factor (HIF) による一連の糖鎖関連遺伝子の転写誘導があることを明らかにした。また低酸素条件によるがんのプロGRESSIONに伴ない、シアリン遺伝子の転写が増大し、これにより、N-グリコシル型のシアル酸NeuGcの発現が、がん細胞で誘導されることを明らかにした。CD44-ヒアルロン酸シグナル伝達系においても、SHAPがヒアルロン酸とCD44の相互作用を増強することを見出す等、進展がみられた。これらの研究成果はPNAS等インパクトファクターの高い論文に発表されており、特許の出願数も多い。

論文発表(国内 0件、国際 73件) 招待講演(国内 20件、国際 25件)

口頭発表(国内 76件、国際 11件) 特許出願(国内 8件、海外 2件)

##### 4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

国内外で比較しても非常に独創性の高い研究成果である。とくにHIFによる転写誘導機構の解析で、FUT7やST3Gal1などが誘導され、がん細胞の転移機構に重要な役割を果たしていることを明らかにしたのは今後の転移機構を考える上で大変重要な発見である。がん細胞を用いた詳細な糖鎖解析、共焦点レーザースキャン観察装置による動的ながん細胞接着の可視化など、戦略目標に沿った研究成果は非常にインパクトの高いものとなっている。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、がんの浸潤転移を抑制する新たな遺伝子治療法を開発するための基盤が整ったと考えられる。これらの成果は、がんの診断および治療に向けての戦略的アプローチの中の一つとして位置づけられる。

##### 4 - 3. その他の特記事項(受賞歴など)

研究代表者が多くの研究成果をあげた。共同研究グループの研究課題に対する寄与度は、多少差があったが全体的にすぐれた共同研究を展開したといえる。

がんの進行に伴なう細胞接着に関与する糖鎖の研究で、従来のセクチンリガンドのがん性変化の研究からリガンド糖鎖合成酵素の系統的な遺伝子制御のレベルに進展させた功績は大きい。国際会議への招待講演も25件と本領域中最も多く、研究成果が新聞にも数回掲載されている。

CRESTの研究を通して共同研究者である北島 健および小島直也が助教授から教授に、板野直樹が愛知医科大学の講師から信州大学の准教授に昇進した。