

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」  
研究課題「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」

## 研究終了報告書

研究期間 平成 15 年10 月～平成 21 年3 月

研究代表者:宮城 妙子  
(宮城県立がんセンター研究所  
所長／生化学部長)

## § 1 研究実施の概要

従来からシアル酸と癌の深い関連性が指摘されてきた。その実体解明をめざして、シアル酸量調節を担うシアリダーゼの研究を進めてきた。その結果、先に遺伝子単離に成功した形質膜局在型シアリダーゼ (NEU3) が各種ヒトがんで発現がほとんど例外なく異常に亢進していること、この遺伝子導入マウスに糖尿病が発症することを見出した。これらの成果に基づき、本研究では、形質膜局在シアリダーゼ (Neu3) を主な対象として、その生理的機能および癌や糖尿病等におけるシアリダーゼ異常発現の機構・意義について解析を進め、制御法を探索し、本遺伝子をターゲットとした新しい診断・治療法の開発をめざしてきた。

本研究は、5グループから構成され、平成15年10月に開始された。各グループの共同研究の円滑化を図るため、平成17年までは宮城県立がんセンター研究所で年に一回の研究打ち合わせ会が持たれ、18-19年度には全体会議において、互いの研究成果と問題点を紹介し討議した。

研究実施内容としては、大別すると次の3項目になる。(1) シアリダーゼの生理的機能の解析、(2) がんや糖尿病発症におけるシアリダーゼ異常発現機構とその意義の解明、(3) シアリダーゼ異常発現を制御する方法の探索で、(1) については宮城、加藤、東グループ、(2) については宮城、鈴木グループ、(3) については古川、袖岡グループが担当した。平成18年度までは、宮城、鈴木、東、古川、袖岡の5グループで構成されていたが、19-20年度は、鈴木グループの研究環境の変化により、鈴木グループが宮城グループに組み込まれる形で研究を継続する形となり、代わりに、宮城グループに入っていた加藤グループが独立した形でシアリダーゼの機能について、免疫機能に関する課題を担当した。以下に、各グループによる研究実施概要を記述する。

宮城グループは、第一に、がんにおけるヒト型形質膜シアリダーゼ NEU3 の発現異常亢進の意義を解明し、NEU3 を標的としたがん治療の可能性を示した。NEU3 ががん細胞の運動や浸潤を亢進、細胞死を抑制することによって、がん細胞の悪性度を助長する方向に働いていることを大腸がん、腎がん、前立腺がん等において手術摘出標本や培養細胞で明らかにした。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。第二に、NEU3 分子の生理機能について解析を進め、シグナル伝達の制御に関わっていることを見出した。その機構として、NEU3 がガングリオシドをほぼ特異的に水解するという酵素反応によるガングリオシド修飾機構に加え、他のシグナル分子との相互作用を介した制御も行うという2つの機構の存在が明らかとなった。また、NEU3 がホスファチジン酸と結合し、活性化や細胞内局在を変化させていること等、NEU3 の生理的活性化機構の興味深い一端もわかってきた。第三に、がんにおいて、他の3種のシアリダーゼとの関連性についても調査した結果、異常亢進を示す NEU3 とは逆に、NEU1 や NEU4 は発現低下を示し、それらの低下による生理機能からの逸脱ががんの悪性形質発現に関わっていることがわかった。第四に、NEU3 異常亢進ががんと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。アズ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 NEU3 トランスジェニックで対照マウスに比べて有意に高く、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が示唆された。第五

に、インフルエンザウイルスシアリダーゼの阻害剤で、インフルエンザ治療薬であるタミフルを服用した10代の患者の異常行動や死亡事件が報じられたが、この原因のひとつとして、3次構造に類似性をもつヒトシアリダーゼ、とくに神経組織に発現が高いNEU3活性に影響を与える可能性が指摘された。これらの薬剤のヒトシアリダーゼ4種に対する阻害効果を調べた結果、ウイルスシアリダーゼに比べ、ヒトシアリダーゼには阻害効果が非常に低いことがわかった。今後、種々の観点から、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て行きたい。

鈴木グループはシアリダーゼ (NEU3) トランスジェニックマウスが著明なインスリン抵抗性を伴う糖尿病のフェノタイプを示すことを研究基盤として、2型糖尿病の成因におけるNEU3の役割を明らかにすることをめざした。アデノウイルスベクターを用いて、肝臓にNEU3を過剰発現させて、*In vivo*におけるインスリン感受性と耐糖能へのNEU3の関与を検討し、さらに、2型糖尿病患者において、ガングリオシド代謝酵素のうち、NEU3とSIAT9の遺伝子多型、変異を検索し、臨床像との関連を解析した。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。変異体は酵素反応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。

加藤グループは、先に、CD44 のヒアルロン酸 (HA) 結合性において糖鎖、特にシアル酸が重要な役割を果していること、ヒト単球系細胞においては内因性シアリダーゼが関与していること、マウス喘息モデルに抗 CD44 抗体を投与することにより CD44 が活性化 T 細胞 (Th2 細胞) の肺への集積に促進的に作用していることをみいだした。そこで、マウス T 細胞に着目し、CD44 の活性化におけるシアリダーゼの関与を調べるために、マウス喘息モデルの T 細胞あるいは T 細胞クローンを用いて抗原あるいは抗 CD3 抗体刺激後の CD44 の HA 結合性およびシアリダーゼ発現に関して検討した。ダニ抗原誘発マウスアトピー型急性喘息モデルを作製し、CD44 の喘息病態形成への関与を検討すると、この喘息モデルにおいて抗 CD44 抗体の前処置により気道への活性化 T 細胞 (Th2 細胞) の集積が抑制され、気道炎症および気道過敏性の亢進が抑制された。マウス喘息モデルにおいて生体内に HA 結合性 CD4 陽性 T 細胞が存在し、この CD44-HA 結合にシアル酸が抑制的に関与していた。この系において、抗原再刺激により脾臓細胞のシアリダーゼ (Neu1, Neu3) の発現が亢進し、CD4 陽性 T 細胞の HA 結合性が誘導された。T 細胞クローンにおいて T 細胞受容体を介する刺激によりシアリダーゼ (Neu-1) の発現が亢進し、CD44 の HA 結合性が誘導された。これらの成果により喘息の病態形成へのシアリダーゼの関与が示唆されたので、今後、シアリダーゼ欠損マウスを用いた喘息モデルを解析し、喘息の新規治療薬の開発へと発展させて行くことを考えている。

東グループは、形質膜シアリダーゼ (Neu3) が初代培養海馬神経細胞で軸索の伸展再生を促進するという先に宮城らが明らかにした現象を基に、その機構の解明をめざした。この機構として、神経細胞膜のガングリオシドが Neu3 により分解された結果生じた GM1 ガングリオシドが神経成長因子 (NGF) の受容体である TrkA を活性化することによることが推察されていたが、解析の結果、シアリダーゼ感受性の GD1b, GT1b が細胞膜表面受容体によって認識され、細胞内の CaMKII の活性化を経てフィロポディアの形成、樹状突起の伸展を促進することを見出した。一方、シアリダーゼ抵抗性のもうひとつのガングリオシドである GM2 も同様の細胞膜表面受容体によって認識されて、樹状突起伸展にいたるシグナルを活性化していることを見出したが、その経路では PKA が用いられていた。ガングリオシドは、脳の発生過程でその分子種が変化するとともに、部域により特定のガングリオシド分子種が発現される。Neu3 シアリダーゼは、ガングリオシド分子種を細胞膜表面において変換する

機構の一つとして働いていると考えられた。本研究では、Neu3感受性、抵抗性のガングリオシドが神経細胞間の情報伝達にどのように関わっているのかを東らの見出したガングリオシド情報伝達系の機能解析から明らかにすることを一つの目的とした。研究期間中、Neu3はシアリダーゼ活性以外に膜タンパク質としての別の機能を併せ持っていることが、チーム内のいくつかの研究から示唆されたので、その機構を解明することをもう一つの目的とした。その結果、Neu3感受性のガングリオシドGT1b, GD1bはブラジキニンB2受容体を活性化するリガンドであるが、Neu3抵抗性のGM1はそうではないことが明らかになった。また、Neu3と相同性の高い細胞質シアリダーゼNeu2とのキメラタンパク質の解析から、ガングリオシド基質を認識すると考えられるドメインを見いだした。

古川グループは、ガングリオシド GD3 が高率に発現するヒトメラノーマを用いて、(1) GD3 発現に基づく癌性形質誘導の分子メカニズムの解明、及び、(2) メラノーマにおける糖鎖合成系と糖脂質の脱シアリ化酵素である NEU3 シアリダーゼの発現を解析し、メラノーマにおける NEU3 の機能を明らかにし、NEU3 の発現変化による糖鎖異常を人為的に制御し、その治療法開発への応用をめざした。(1) メラノーマにおける GD3 による癌性形質誘導の機構を明らかにする為に、GD3 非発現メラノーマ細胞 SK-MEL-28-N1 に GD3 合成酵素遺伝子を導入して GD3 発現細胞を樹立し、解析した。その結果、GD3 の高発現により細胞の増殖および浸潤能の亢進が認められ、FCS 刺激により、MAPK、Akt、FAK、p130Cas 及び paxillin のリン酸化が増強した。GD3 発現細胞では、p130Cas 及び paxillin は細胞の浸潤能に、p130Cas は増殖能に関与していた。更に、GD3 発現により細胞接着性も増大した。インテグリンを介した接着刺激により細胞増殖や浸潤性が亢進し、p130Cas 及び paxillin も顕著に活性化した。(2) NEU3の遺伝子発現と機能解析については、GD3発現メラノーマ細胞において、NEU3の発現レベルの検討、Neu3遺伝子の強発現によるガングリオシド組成への影響および発現変化の癌性形質への関与について検討した。その結果、ヒトメラノーマ細胞は大腸がん細胞と同等のNeu3遺伝子発現が認められた。Neu3遺伝子を強発現させたメラノーマ細胞では著明なガングリオシド組成および細胞形質の差異は認められなかった。現在、Neu3遺伝子のノックダウンによりその機能を検討すると共に、癌性形質の低下したメラノーマ細胞にNeu3遺伝子を導入した発現細胞株を樹立して、NEU3活性および形質変化について検討中である。

袖岡グループは、ヒトシアリダーゼ NEU3 の阻害剤の設計と合成を行ってきた。NEU3 の特異的阻害剤は、NEU3 の機能解明に貢献するツールとなるだけでなく、NEU3 が関与するがんや糖尿病などの疾患治療薬のリード化合物となりうることから、その創製研究は重要な課題である。これまでに、ウィルスやバクテリアのシアリダーゼに対する効果的な阻害剤が知られているものの、それらの NEU3 阻害活性は低く、新しいタイプの阻害剤が必要であった。また NEU3 は、ガングリオシドを特異的に基質とする特徴があり、ガングリオシドと NEU3 の関連性にも興味をもたれていた。そこで、NEU3 によって加水分解を受けないガングリオシドのアナログ分子を創製すれば、シアリダーゼ阻害活性を有しながらもガングリオシド機能も維持できるユニークなプローブ分子となると考えた。このアイデアを実現するプローブとして、C-sialoside 結合を有するガングリオシドアナログ分子を考案した。その際、O 原子のバイオイソスターとして知られる CF<sub>2</sub> 基を sialoside 結合に組み込んだ CF<sub>2</sub>-連結型ガングリオシドアナログを設計した。これら分子の合成を目指し、まず中心構造となる炭素連結型の α(2,3)-sialylgalactose 骨格の構築法の開発を検討した。構築が極めて困難な部分構造であったが、詳細な検討の結果、Ireland-Claisen 転位反応を利用した効率的、かつ立体選択的な CF<sub>2</sub>-sialoside 結合合成法を確立できた。さらに、CF<sub>2</sub>-連結型 α(2,3)-sialylgalactose および CF<sub>2</sub>-連結

型ガングリオシド GM4 アナログへの誘導に成功し、世界で初めて炭素連結部を有するガングリオシドアナログの創製に成功した。本アナログは、ヒトシアリダーゼの中でも、ガングリオシドを基質とする NEU2, NEU3, NEU4 に対して弱いながら阻害活性を示し、NEU1 は阻害しないことも見出した。また、破傷風毒素抗原の刺激によるヒトリンパ球増殖抑制効果を調べた結果、同じ炭素鎖のセラミドを有する GM4 とほぼ同等の阻害活性をした。以上の結果から、CF<sub>2</sub>-連結型 GM4 が優れたガングリオシドミミック分子として機能する事が確かめられた。本合成法を機軸として、新たに設計した CH<sub>2</sub>-, および CHF-sialoside の合成にも成功し、Ireland-Claisen 転位反応を用いる本合成法が極めて一般性の高い手法であることを示すことが出来た。

## § 2 研究構想及び実施体制

### (1) 研究構想

がんの糖鎖研究領域で長い間の懸案事項であった「がん細胞のシアル酸変化の機構と意義の解明」を具体的目標として、シアリダーゼに着目して研究を進め、その成果のがん臨床への応用をめざしてきた。シアリダーゼの機能について、免疫や神経機能など、多角的に検討する一方、とくに、形質膜シアリダーゼ NEU3 が各種ヒトがんで異常に亢進する意義とその制御機構を解析してきた。その結果、本研究のこれまでの成果は、がんの新しい診断・治療法の開発に繋がることが期待される。また、NEU3 の発現亢進したマウスではインスリン抵抗性糖尿病の発症が見られたことから、糖尿病モデルとしての利用価値の検討、およびヒト糖尿病の病態と NEU3 の関連性の解析を進めた。

研究分担項目としては、平成18年度までは、シアリダーゼの機能解明およびシアリダーゼのがんや糖尿病等における異常発現機構と意義の解析を研究項目とした宮城グループ、シアリダーゼと糖尿病の関連について担当する鈴木グループ、シアリダーゼ NEU3 の阻害剤の設計と合成については袖岡グループ、ガングリオシド合成系によるシアリダーゼ異常の制御を担当する古川グループ、神経細胞におけるシアリダーゼの機能と異常について解析する東グループから構成されていたが、19-20年度は、事情により、鈴木グループの代表者が宮城グループの一員として研究を継続することとなり、代わりに、宮城グループに入っていた加藤グループが独立した形で免疫細胞のシアリダーゼに関する課題を推進した。

これまでの研究成果を簡潔にまとめると、以下のような10項目となる。

- (1) がんや糖尿病で異常発現が認められたシアリダーゼ NEU3 は、生理的にはシグナル分子として機能していること。
- (2) NEU3 はがん細胞の運動や浸潤を亢進、細胞死を抑制することによって、がん細胞の悪性度を助長する方向に働いていること。
- (3) 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、正常細胞には影響せず、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。
- (4) がんと糖尿病という全く異なる二つの病態において、NEU3 分子がクロストークしている可能性があること。
- (5) 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、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あること。
- (6) インフルエンザ治療薬タミフルやリレンザはヒトシアリダーゼに

- は活性阻害効果が低く、ほとんど無視できるようであること。
- (7) CD44 のヒアルロン酸 (HA) 結合性において、シアリダーゼ (Neu1, Neu3) が CD4 陽性 T 細胞の HA 結合性を誘導する可能性が示唆され、喘息の病態形成へのシアリダーゼの関与が示唆されたこと。
  - (8) 神経細胞の軸索の伸展再生を促す機構のひとつとして、ガングリオシドの関与が考えられているが、その働きがシアリダーゼ Neu3 抵抗性と感受性で異なるので、Neu3 シアリダーゼは、ガングリオシド分子種を細胞膜表面において変換する機構の一つとして働いていることが示唆されたこと。
  - (9) メラノーマ細胞における NEU3 の役割が解析されつつあること。
  - (10) NEU3 阻害剤の設計・合成において、新規な CF<sub>2</sub>-シアロシド結合をもつシアリルガラクトース誘導体の合成に成功したこと。

以上の成果は、シアリダーゼ NEU3 ががんや糖尿病のみではなく、免疫や神経疾患の病態にも関わっている可能性を示し、その異常発現機構の解析結果は臨床応用に繋がる可能性が改めて確認された。特に、がんにおける NEU3 を標的とした診断・治療法の開発が次の具体的な課題である。

## (2)実施体制

≪研究チームの構成が簡単に分かるように記載してください。各研究グループの研究機関・部署名は必ず分かるように明記してください。途中で抜けたグループも忘れずに記載してください≫

(記載例)

グループ名	研究代表者又は主たる共同研究者氏名	所属機関・部署・役職名	研究題目
宮城グループ	宮城妙子	宮城県立がんセンター研究所・生化学部・所長	シアリダーゼの生理的・病理的機能解析
鈴木グループ	鈴木 進 (平成18年12月まで)	東北大学医学系大学院・糖尿病代謝科・助教授	糖尿病におけるシアリダーゼの役割
加藤グループ	加藤茂樹 (平成19年から)	香川大学医学部細胞制御医学・客員助教授	シアリダーゼの免疫機能
東グループ	東 秀好	東北薬科大学・生体膜研究所・教授	神経細胞におけるシアリダーゼの役割
古川グループ	古川圭子	中部大学・教授	ガングリオシド合成系によるシアリダーゼ異常の制御
袖岡グループ	袖岡 幹子	(独) 理化学研究所・主任研究員	シアリダーゼ阻害剤創製

## § 3 研究実施内容及び成果

### 3.1 シアリダーゼの生理的・病理的機能解析(宮城県立がんセンター研究所、宮城グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

がんの糖鎖研究領域で長い間の懸案事項であった「がん細胞のシアル酸変化の機構と意義の解明」をめざして、シアリダーゼに着目して研究を進めてきた。その結果、先に遺伝子単離した形質膜局在型シアリダーゼ(NEU3)が各種ヒトがんで発現がほとんど例外なく異常に亢進していること、この遺伝子導入マウスに糖尿病が発症することを見出した。これらの成果に基づき、形質膜局在シアリダーゼ(Neu3)を主な対象として、その生理的機能および癌や糖尿病等におけるシアリダーゼ異常発現の機構・意義について解析を進め、本遺伝子をターゲットとした新しい診断・治療法の開発をめざしてきた。

研究実施法：

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、転写や蛋白レベルで解析し、同時にその酵素反応産物である糖脂質の分析を行った。また、他の3種のシアリダーゼについても、NEU3 発現との関連において、発現の変化やそれぞれの機能的役割分担を検討した。

#### 1. 細胞死や細胞増殖を誘導する条件の検討

種々の条件下で、ヒト培養細胞を用いて、細胞死や増殖を誘導し、内因性 NEU3 シアリダーゼ発現の変化や細胞死との関連性を観察した。リアルタイム PCR や HPLC によるシアリダーゼ活性測定を行った。NEU3cDNA や NEU3siRNA 導入により、NEU3 発現を人工的に制御し、その影響について調べた。

#### 2. DNA ミクロアレイによる解析

NEU3cDNA や siRNA を複数のヒト培養がん細胞や正常細胞に導入することによって、シアリダーゼの過剰発現あるいはノックダウンによる遺伝子変化を対照細胞と比較し、とくに、NEU3 による細胞死の制御機構を検討した。

#### 3. 蛋白アレイによる解析

レコンビナント NEU3 蛋白を精製し、蛋白アレイを行い 網羅的に蛋白相互作用を解析した。

#### 4. 蛋白分子の比較解析

NEU3cDNA 導入および siRNA 導入したヒト培養細胞を用いて、上記遺伝子変化や蛋白間相互作用の結果に基づいて、蛋白レベルで比較解析した。とくに、細胞死や増殖等を誘導する系において、シグナル関連分子の NEU3 特異的变化を調査した。リン酸化やグリコシル化による翻訳後修飾、既知のシグナル分子との相互作用等について、TwoHybrid 法、免疫沈降法、表面プラズモン共鳴法等によって検討した。

#### 5. NEU3 遺伝子改変マウスによる in vivo 解析

NEU3 ノックアウトマウスやトランスジェニックにおいて、糖尿病病変の分子解析やアゾキシメタン等の発ガン剤投与による大腸粘膜の前がん病変を観察した。

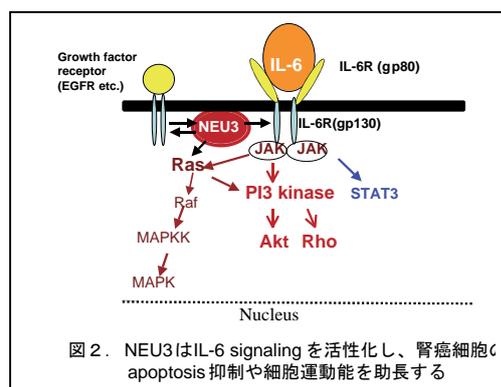
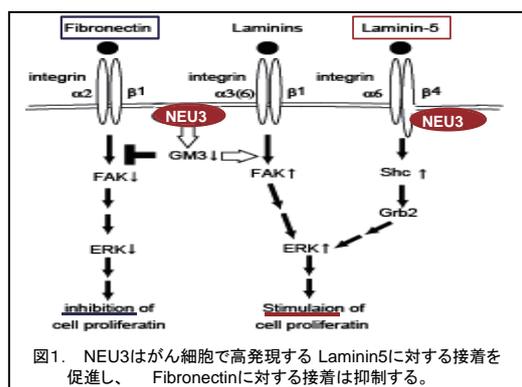
実施内容・成果：

#### 1. NEU3の生理機能について

がんや糖尿病で異常発現が認められたシアリダーゼNEU3は、生理的にはシグナル分子として機能していること、その機構として、酵素作用のほかに、シグナル分子との蛋白間相互作用によってシグナリングを制御していることがいくつかの例で検証されてきた。とくに、EGFレセプターとの会合に関して調べた結果では、レセプターのキナーゼドメインに結合している可能性が示唆された。さらに、NEU3がホスファチジン酸 (PA) と結合し活性化されていること、PAとの結合によって細胞表層、とくにleading edgeに集積すること等、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。

## 2. がんや糖尿病における NEU 3 異常の意義と機構

NEU3 はがん細胞の接着、運動や浸潤を亢進、細胞死を抑制することによって、がん細胞の悪性度を助長する方向に働いていることがわかった。インテグリン $\beta 4$ 、FAK、Shc、Me t、EGF レセプター等、がんで活性化を受ける分子の機能を促進していることは興味深く、NEU3 ががんの悪性化と深く関わっていることを示している。例えば、NEU3 は細胞接着や浸潤・運動等のシグナリングについても制御しており、がんで高発現するラミニン5との接着時には、がんで活性化する FAK, ILK, Shc, integrin  $\beta 4$  等のシグナル分子の活性をさらに促進するが、がんで発現が抑制されるフィブロネクチンとの接着の際には、むしろ、FAK や ILK の活性化を抑制すること (図1)、また、腎がん等では転移能や悪性度と相関する IL-6 の発現が亢進することが知られているが、この IL-6 発現と NEU3 発現が有意な相関関係を示し、IL-6 のシグナリングをさらに活性化することがわかった (図2)。また、最近、前立腺がんではアンドロゲンレセプター (AR) のシグナリングを AR 依存性に、あるいは非依存性に亢進している EGR-1 分子の発現を上昇させ、前立腺癌の悪性度を増強していることも明らかとなった。



さらに、図3に示すように、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をみいだした。シアリダーゼが触媒反応によるガングリオシドの修飾を介して、あるいは、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、積極的に関わっている可能性が強く示唆された。以上の結果は、NEU3 ががん細胞の生存に重要な役割を果たしていることを示しており、NEU3 の亢進は大腸がん、頭頸部がん、前立腺がん等各種がんで認められている現象であるので、がんの本質に迫る事実が明らかになる可能性がある。最近のヌードマウスによるがん移植実験では、NEU3siRNA の投与により、有意な腫瘍の退縮が認められた。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。

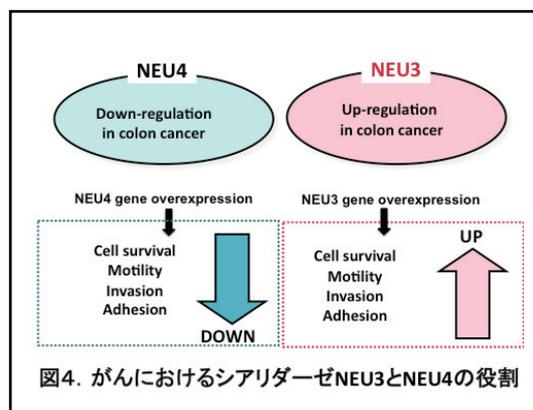
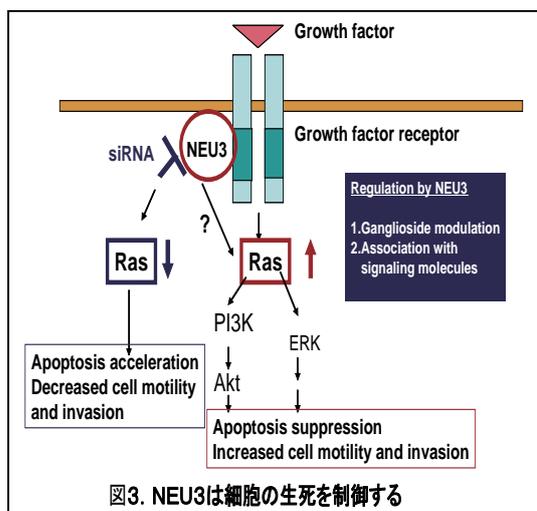
一方、先に、2型糖尿病患者において見いだされたNEU3遺伝子の多型の頻度が2型糖尿病患者で正常者に比べて有意に高く ( $p < 0.001$ )、かつインスリン抵抗性と高い相関を示したので、これらのNEU3変異体を作成して、Min6などのインスリンノーマ由来の細胞や肝細胞に導入して、wild typeとの比較を行った。変異体は酵素反力学的に

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はなく、NEU3がふたつの病態間でクロストークする分子である可能性もある。

### 3. がんにおける他のシアリダーゼの役割について

ヒト組織では4種のシアリダーゼのうち、NEU1>NEU3、NEU4>NEU2の順に発現が高く、NEU2は実際にはほとんど検出できないほど低いことがわかった。NEU3との関連性において、NEU1およびNEU4のがん性変化を調べた。先に、がん一般に発現低下を示し、そのレベルが転移能と逆相関することを見出していたNEU1について、その標的分子を検索した。NEU1がインテグリンβ4からシアル酸を脱離して細胞接着や浸潤・運動能を低下させているひとつの証拠が得られた。

新規シアリダーゼNEU4についても、NEU3との関連においてがん性変化を調べた。NEU4は大腸がんではNEU3とは逆に発現低下を示した。糖蛋白および糖脂質の両方を水解するが、細胞表面のシアリルLe<sup>a</sup>やシアリルLe<sup>x</sup>を良い基質とした。NEU4を高発現すると、E-セレクトインに対する接着能が有意に低下し、E-セレクトイン刺激による運動能の上昇を抑制した。NEU4はp38とERKのリン酸化を抑制していた。従って、NEU4は大腸粘膜の維持に関与していることが推察されるが、がん化によるその発現低下により、接着や運動能が障害をうけることが示唆され、NEU3とは逆の働きをしていることがわかった(図4)。



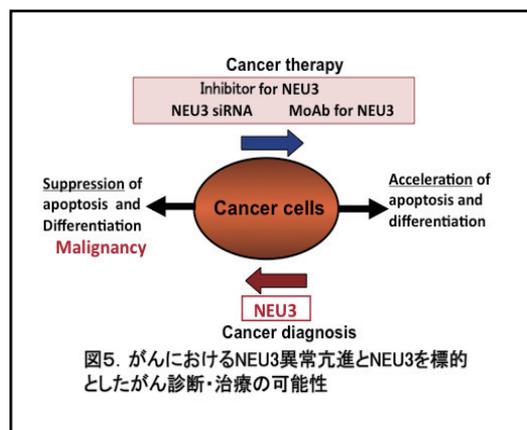
### 4. インフルエンザ治療薬のヒトシアリダーゼに対する影響の検討

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。その結果、これらの薬剤はヒト由来シアリダーゼに非常に低い阻害効果を示し、服用後の異常行動や神経症状への関わりは殆ど無視できることがわかった。

### (2)研究成果の今後期待される効果

以上のように、がんや糖尿病におけるNEU3発現異常の機構とその意義の解析結果は、NEU3がこれらの病態に深く関わっていることを示し、臨床応用に繋がる可能性が改めて確認された。

NEU3の生理的機能やがんにおける役割についての現在の重要な知見は殆どわれわれの成果に基づいている。NEU3について世界の他の研究グループによる報告も最近、複数見られるようになったが、われわれの結果を追試している状況である。図5に示すように、NEU3を標的としたがんの診断・治療法の開発が次の具体的な課題である。特異的NEU3阻害剤の創製に加え、siRNAや抗体を利用した非臨床試験に進めて行きたい。



### 3.2 シアリダーゼの免疫機能に関する研究:接着分子CD44の機能(ヒアルロン酸結合性)におけるシアリダーゼの役割を中心に(香川大学 加藤グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

実施方法:

##### ①マウス喘息モデルを用いた研究

(1) ダニ抗原誘発マウスアトピー型喘息モデルの作製及び病態形成におけるCD44の役割に関する検討

BALB/cマウスにダニ抗原をアラムと混合し1週おきに2回腹腔内投与し感作を成立させた。4週目に経気道的に抗原チャレンジを行い、抗原チャレンジの24時間後にメサコリン吸入後の気道抵抗を測定し気道過敏性を評価した。さらに気管支肺胞洗浄を行い、炎症細胞及びサイトカインを検討した。炎症細胞の中でも特に病態形成に重要とされているCD4陽性ヘルパーT細胞に関してはタイプ1(Th1)細胞をCXCR3、タイプ2(Th2)細胞をT1/ST2の発現でフローサイトメトリー法にて解析した。抗原チャレンジの12時間前に抗CD44抗体を投与し、気道過敏性および気道炎症に及ぼす影響を検討した。

##### (2) マウス喘息モデルにおけるCD4陽性T細胞のHA結合性の検討

喘息モデルマウスの脾臓細胞及び胸腔内リンパ節細胞のCD4依存性HA結合をフローサイトメトリー法にて検討した。さらに、これらの細胞をin vitroでシアリダーゼ処理し、HA結合におけるシアル酸の影響を検討した。

##### (3) 抗原刺激によるHA結合性及びシアリダーゼ発現の検討

喘息モデルマウスの脾臓細胞をin vitroで抗原再刺激し、経時的にCD44のHA結合性をフローサイトメトリーで、シアリダーゼ発現をRT-PCR法にて検討した。この培養系にシアリダーゼ阻害剤を共存させ、脾臓T細胞のHA結合性における内因性シアリダーゼの関与について検討した。

##### (4) T細胞受容体刺激によるHA結合性及びシアリダーゼ発現の検討

マウスT細胞クローンをin vitroでシアリダーゼ処理し、HA結合におけるシアル酸の影響を検討した。また、このT細胞クローンをin vitroで抗CD3抗体刺激し、経時的にHA結合性及びシアリダーゼ発現を検討した。この培養系にシアリダー

ゼ阻害剤を共存させ、T細胞のHA結合性における内因性シアリダーゼの関与について検討した。

## ②マウス肝炎モデルを用いた研究

### (1)抗CD3抗体誘発モデル

活性化T細胞に発現するCD44はヒアルロン酸結合性を有することが報告されている。そこで、抗CD3抗体をマウスに腹腔内投与することによりin vivoでT細胞を活性化させ、経時的に脾臓を採取し、脾臓細胞のCD44依存性HA結合をフローサイトメトリー法にて、シアリダーゼ発現をRT-PCR法にて調べた。また、血中サイトカインについてもELISA法にて測定した。

### (2) Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) 誘発モデル

Staphylococcal Enterotoxin B (SEB)をマウスに腹腔内投与することでT細胞を活性化し、経時的に脾臓を採取し、脾臓細胞のCD44のHA結合性及びシアリダーゼ発現の変化を調べた。

### ③ Neu3 トランスジェニック (TG) 及び欠損 (KO) マウスを用いた検討

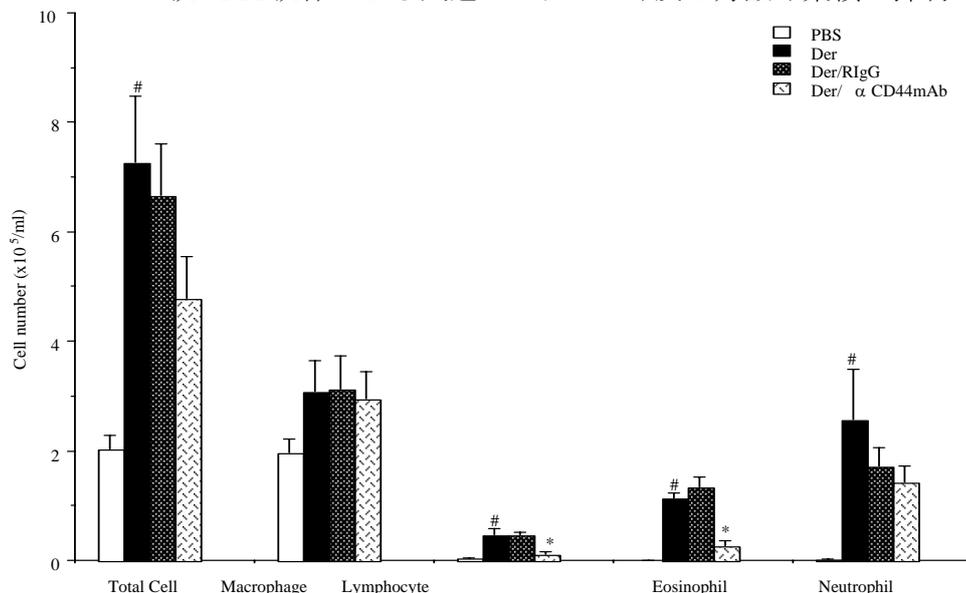
Neu3TGマウス及びNeu3KOマウスの脾臓CD4陽性T細胞のCD44依存性ヒアルロン酸結合をフローサイトメトリーにて検討し、CD44のHA結合性におけるシアリダーゼ (Neu3) の関与を調べた。

実施内容・成果:

### ①マウス喘息モデルを用いた研究

(1) 抗原感作、チャレンジによる気道過敏性の亢進及びリンパ球と好酸球の気道への集積が抗CD44抗体の前処置により抑制された (図1)。さらにBALF中のTh2サイトカイン (IL-5, IL-13)濃度も抗CD44抗体の前処置により低下した。これらの結果よりCD44は喘息における肺でのTh2細胞性好酸球性炎症において重要な役割を果していると考えられた。

抗CD44抗体による気道へのリンパ球及び好酸球集積の抑制 (図1)



(2) マウス喘息モデルにおいて生体内にCD44依存性HA結合性CD4陽性T細胞が存在し、このCD44-HA結合にシアリ酸が抑制的に関与していた。

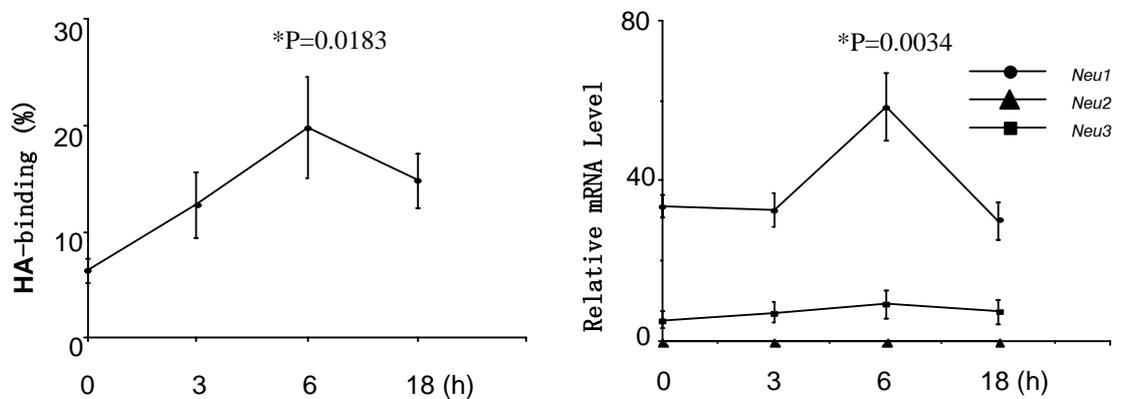
(3) マウス喘息モデルの脾臓細胞をin vitroで抗原再刺激し、CD4陽性T細胞

の HA 結合性を経時的に検討したところ 18 時間をピークとした HA 結合性が誘導された。さらに、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。また、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、18 時間をピークとしたシアリダーゼ発現 (Neu1 および Neu3) が誘導された。Neu3 の発現量は Neu1 に比べると微量であった。

(4) マウス T 細胞クローンはシアリダーゼ処理により CD44 依存性 HA 結合が誘導された。また、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 (図 2)。さらに、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。

これらの結果より T 細胞の活性化による CD44 の HA 結合性の誘導は内因性シアリダーゼ (Neu1) が関与していることが示唆された。

マウス T 細胞クローンにおける抗 CD3 抗体刺激による HA 結合性及びシアリダーゼ発現の検討 (図 2)



## ②マウス肝炎モデルを用いた研究

(1) 抗 CD3 抗体投与 2~6 時間後に Neu1 および Neu3 発現が増加傾向にあった。24 時間後に CD4 陽性 T 細胞中のヒアルロン酸結合性細胞の比率が上昇した。2 時間後に血中 IL-4, IFN- $\gamma$  の上昇を認めた。

(2) SEB 投与 24 時間後に CD4 陽性 T 細胞中のヒアルロン酸結合性細胞の比率および脾臓細胞のシアリダーゼ (Neu1, Neu3) 発現が亢進した。

## ③ Neu3 トランスジェニック (TG) 及び欠損 (KO) マウスを用いた検討

Neu3TG の脾臓 CD4 陽性 T 細胞はヒアルロン酸および PNA 結合性が亢進していた。シアリダーゼ (Neu3) の高発現により脾臓 CD4 陽性 T 細胞表面の糖鎖中のシアル酸の付加が減少し、CD44 依存性 HA 結合が亢進している可能性が示唆された。Neu3KO マウスの脾臓 CD4 陽性 T 細胞は野生型マウスに比べてヒアルロン酸および PNA 結合性に関して違いを認めなかった。恐らく他のシアリダーゼ (Neu1) によって代償されているものと推測された。

## (2)研究成果の今後期待される効果

T 細胞クローンをを用いた *in vitro* の実験及び複数のマウスの疾患モデルの T 細胞を用いた実験より、CD4 陽性 T 細胞は細胞の活性化により CD44 の HA 結合性が誘導され、この機序の少なくとも 1 つは細胞表面のシアル酸が除去されることによると考えられた。さらに、この過程にシアリダーゼ (Neu1) の関与が強く示唆された。

特に喘息モデルにおいてはその病態にCD44が深く関与しており、シアリダーゼの作用を制御することにより間接的に、あるいは直接CD44のHA結合性を制御することにより、喘息の病態を改善できる可能性がある。今後、Neu1欠損マウスを用いた喘息モデルにおけるCD44の機能解析が必要である。これまで、Neu1がIL-4の産生を介して喘息の病態形成に関与しているとの報告があるが、今回の研究ではCD44を介する新しい機序によるNeu1の喘息病態への関与が証明されるものと思われる。さらに、本研究を進展させ新規喘息治療薬の開発へつなげたいと考えている。

### 3. 3 シアリダーゼの神経機能に関する研究: (東北薬科大学 東グループ)

#### 1. 細胞膜シアリダーゼNeu3の機能と構造

海馬神経細胞の初代培養で細胞膜シアリダーゼ(Neu3)を強発現すると、軸索の伸展再生が促進されることを宮城らが明らかにしている。この機構として、神経細胞膜のガングリオシドがNeu3により分解された結果生じたGM1ガングリオシドが神経成長因子(NGF)の受容体であるTrkAを活性化することによることが提唱されている。神経系のガングリオシドの研究は、その多くがGM1を用いて行われてきているが、GM1はシアリダーゼに抵抗性で、GM1以外の脳の主要なガングリオシドであるGD1a, GD1b, GT1bはこのシアリダーゼによってGM1へと変換される。我々は、シアリダーゼ感受性のGD1b, GT1bが細胞膜表面受容体によって認識され、細胞内のCaMKIIの活性化を経てフィロポディアの形成、樹状突起の伸展を促進することを見出している。一方、シアリダーゼ抵抗性のもうひとつのガングリオシドであるGM2は成体の脳では少量しか存在しないが、その蓄積病や胎児期の特定の部位で発現され、その箇所では樹状突起の伸展が活発である。我々は、GM2も同様の細胞膜表面受容体によって認識されて、樹状突起伸展にいたるシグナルを活性化していることを見出したが、その経路ではCaMKIIではなく、PKAが用いられている。ガングリオシドは、脳の発生過程でその分子種が変化するとともに、部域により特定のガングリオシド分子種が発現される。Neu3は、このようなガングリオシド分子種を細胞膜表面において変換する機構の一つとして働いていると考えられる。

本研究プロジェクトでは、Neu3感受性、抵抗性のガングリオシドが神経細胞間の情報伝達にどのように関わっているのかを我々の見出したガングリオシド情報伝達系の機能解析から明らかにすることを一つの目的とした。その過程で、Neu3はシアリダーゼ活性以外に膜タンパク質としての別の機能を併せ持っていることが、当研究チームの研究から示唆され、我々の研究でもそのようなことが示されたので、その機構を解明することをもう一つの目的とした。

我々が見いだしたGT1b, GD1bの情報伝達系では、糖鎖受容体の下流にGタンパク質が関与したPLCの活性化による細胞内ストアからのカルシウムイオンの流出によって、細胞内カルシウムイオン濃度の一時的な上昇があるが、この場合、GM1ガングリオシドではその効果は非常に小さい。ところが、細胞膜シアリダーゼを高発現した細胞においては、細胞外から与えたGT1bによる細胞内カルシウムイオン濃度上昇は妨げられる一方で、ブラジキニンや脱分極など別の刺激による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。このことは、以下の二つの可能性を示していた。

- 1) Neu3は、細胞外から与えたガングリオシドを基質として分解する。
- 2) Neu3は、細胞内カルシウムイオン上昇を増幅または持続させる。

1) については、イタリアのグループが別の細胞膜上のガングリオシドをも基質にすることを報告している。2) については、細胞膜カルシウムポンプ(Ca<sup>2+</sup>-ATPase)の活性が、GD1bなどでは増強されるのに対して、GM1にはほとんど増強効果がないことから、

Neu3によるGD1bの分解による効果と予想した。しかし、シアリダーゼ活性を持たない細胞膜シアリダーゼを高発現した細胞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ガングリオシド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Ca<sup>2+</sup>-ATPaseに作用することによる効果であると考えられた。宮城らはまた、細胞膜シアリダーゼを過剰に発現するトランスジェニックマウスが糖尿病を発病することを見出している。我々は、マウスのインスリノーマ細胞MIN6にNeu3を高発現したところ、グルコースによる細胞内カルシウムイオン濃度上昇の促進とインスリン分泌の亢進が認められた。この効果もシアリダーゼ活性を持たないNeu3の発現によって現れたので、Neu3タンパク質分子が細胞膜の他の分子に作用した結果であると考えられた。

そこで、Neu3がガングリオシドを基質とするために必要な構造と細胞膜に発現されるために必要な構造を特定するために、Neu3と構造がきわめて似ているが細胞質に存在するNeu2との比較を行い、一部を欠損したNeu3タンパク質やNeu2とNeu3のキメラ分子を作製し、その活性と局在を比較することにした。現在、この実験は進行中であるが、Neu3のN-末またはC-末から50アミノ酸残基を欠損したタンパク質は、両者ともシアリダーゼ活性を喪失したので、両末端はシアリダーゼ活性に必須であることが示唆された。また、Neu2-Neu3間でホモロジーが極めて低い20-30アミノ酸残基からなる二つのドメインが存在する。そのうち一つのドメインをNeu2のアミノ酸配列に入れ替えたNeu3では、ガングリオシドに対するシアリダーゼ活性を喪失した。一方、もう一つのドメインをNeu2のアミノ酸配列に入れ替えたNeu3では、ガングリオシドに対するシアリダーゼ活性の低下は認められなかった。一方はガングリオシドを基質として認識するために必要で、もう一方は細胞膜局在に必要である可能性があると考えられるので、キメラタンパク質の細胞局在などを調べるとともに、Neu2にNeu3の対応するドメインを組み替えたキメラ分子を作製してこれらのことを証明する計画が進行中である。

## 2. Neu3感受性糖鎖をリガンドとする受容体の本体と機能

上述のように神経細胞に特徴的に存在する糖鎖をもった脂質であるガングリオシドであるGT1bやGD1bは、神経細胞の培養系に加えると、糖鎖の種類によりCa<sup>2+</sup>/CaMKII系の活性化を引き起こし、cdc42の活性化によるfilopodia形成や樹状突起伸展という形態変化を導く。糖鎖は細胞間の認識に関与していると考えられることから、糖鎖認識分子の同定を行った。cdc42を活性化する情報伝達に関わる膜受容体として唯一知られていたブラジキニンB2受容体のアンタゴニストを用いたところ、上記の反応が阻害されたので、B2が糖鎖受容体としても機能していることが示唆された。そこで、出芽酵母を使ったレポーターアッセイ系を用いて、B2と糖鎖の結合を解析した。ほ乳類はB2の様なGタンパク質共役受容体(GPCR)を300種類以上有し、それらがヘテロ2量体を構成することもあるのに対し、酵母は2種類のGPCRを有するのみで、そのうち一つをB2に置き換えたこのレポーターアッセイ系は、ほ乳類細胞を用いるよりもはるかに単純な系である。酵母レポーターアッセイにおいても動物細胞で活性を有するガングリオシド糖鎖が活性を示した。すなわち、GT1b、GD1bは活性があったが、Neu3に抵抗性のGM1はほとんど活性を示さなかった。したがって、GT1b、GD1bの糖鎖がB2の機能的なリガンドであるということが証明された。

## 3. 栄養源受容体候補分子

上述のごとく、糖鎖を認識するGPCRを見いだしたことから、糖や糖鎖をリガンドとするGPCRの検索を行った。インスリノーマ細胞にオルファンGPCRを強制発現し、グルコースによるインスリン分泌を測定したところ、あるGPCRでグルコースに対する反応の増強が認められた。この受容体の相同分子種を欠損したショウジョウバエ

は、小型であり、体液中の糖分が高値を示し、飢餓に対する不耐性を示した（理化学研究所・平林義雄先生）。そこで、このGPCRを発現しなくしたマウスを作製したところ、このマウスは誕生時から小型で、野生型と摂食量が同じであるにも関わらず、継続して野生型より小型のままで生育した。以上の結果は、このGPCRが、糖、もしくは、それに関連する栄養物質の受容体として機能していることを示唆している。このGPCRの真のリガンドとなる分子の検索を進めている。

### **3. 4. ガングリオシド合成系によるシアリダーゼ異常の機構解明と制御(中部大学 古川圭子グループ)**

#### (1) 研究実施内容及び成果

##### ① 研究目的

酸性糖脂質ガングリオシドの糖鎖異常が、がんの増殖や転移などの悪性形質の発現に深く関与していると考えられている。従って、その分子メカニズムを解明し、がんの治療応用に進展させることが重要である。近年、メラノーマは世界中で最も急激に増加している悪性腫瘍で、増殖能が高いこと加えて転移性が高いことが特徴的である。従来から、ヒトメラノーマでは、ガングリオシド GD3 が高率に発現することが認められており、抗体療法の分子標的として注目されている。本研究では、(I)神経外胚葉由来の腫瘍であるメラノーマにおけるガングリオシド GD3 発現に基づく癌性形質誘導の分子メカニズムを明らかにする。更に、(II)メラノーマにおける糖鎖合成系と糖脂質の脱シアリ酸酵素である NEU3 シアリダーゼの発現を解析し、メラノーマにおける NEU3 の機能を明らかにするとともに、NEU3 の発現変化による糖鎖異常を人為的に制御する可能性およびその治療法開発への応用について検討する。

##### ② 研究実施方法と結果

#### (I) ヒトメラノーマにおける GD3 による癌性形質誘導の分子メカニズムの解明

ヒトメラノーマにおける GD3 による癌性形質誘導の分子メカニズムを明らかにする為に、GD3 非発現メラノーマ細胞 SK-MEL-28-N1(N1)に GD3 合成酵素遺伝子を導入して GD3 強発現細胞を作製した。MTT アッセイおよび BrdU アッセイによりその増殖能を、マトリゲルをコートした Boyden chamber を用いて浸潤性を検討した。また、GD3 発現細胞において、FCS 刺激によるチロシンリン酸化が増強されるタンパク質分子の同定を、PY20 抗体を用いた western immuno-blotting により行った。更に、RNAi 法により、これらの分子の細胞増殖及び浸潤性亢進への関与について検討した。また、インテグリンを介した細胞接着刺激による癌性形質への関与についても検討した。その結果を以下に示す。

#### 1. GD3 発現による癌性形質誘導の検討

GD3 発現ヒトメラノーマ細胞では、GD3 非発現 N1 細胞に比較して著明な増殖と浸潤性の亢進が認められた。また、GD3 発現細胞において、各種シグナル分子のリン酸化レベルについて検討した結果、FCS 刺激によって MAPK、Akt および FAK のリン酸化の増強が認められた。

#### 2. 癌性形質に関与するシグナル伝達分子群の解析

GD3 発現細胞において、FCS 刺激により強くチロシンリン酸化されるタンパクとして、p130Cas および paxillin を同定した。また、siRNA による p130Cas および paxillin の knockdown 実験により、細胞浸潤性の亢進には p130Cas 及び paxillin が、細胞増殖性には p130Cas が関与する

ことが明らかになった。更に、GD3 と p130Cas、または GD3 と paxillin が leading edge に共局在していた。

### 3. GD3 発現による細胞外マトリックス (ECM) に対する細胞接着性の検討 (Fig. 1)

GD3 発現細胞においては、CEM、特に I 型コラーゲンに対する接着性が増していた。但し、ファイブロネクチンについては明らかな差異は認められなかった。

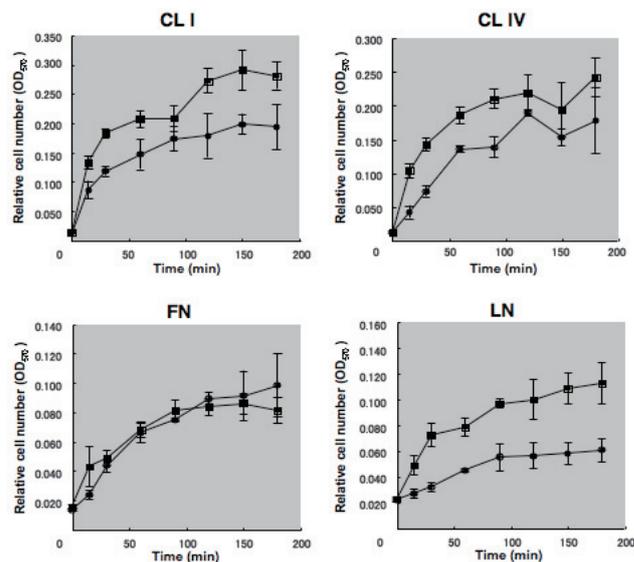
### 4. GD3 発現細胞におけるインテグリンの癌性形質への関与の検討

GD3 発現細胞およびコントロール細胞表面では、integrin  $\alpha 2\beta 1$  及び integrin  $\alpha 3\beta 1$  の強い発現が認められる。そこで、インテグリンの癌性形質との関連を検討するために、siRNA 法により integrin  $\beta 1$  を knock down した結果、増殖能も浸潤性も顕著に減少した。

### 5. インテグリンを介した接着刺激による p130Cas 及び paxillin の活性化 (Fig. 2)

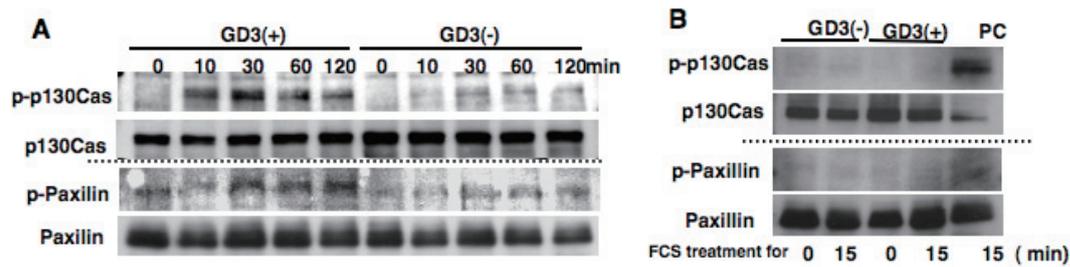
I 型コラーゲンを用いて接着刺激による p130Cas 及び paxillin のチロシンリン酸化を検討した結果、GD3 非発現細胞に比べて GD3 発現細胞で、p130Cas 及び paxillin のチロシンリン酸化が顕著であった。しかし、GD3 発現細胞を浮遊状態にして FCS 刺激を加えても、p130Cas 及び paxillin のチロシンリン酸化は認められなかった。従って、FCS 存在下においても、接着刺激は上記のアダプター分子の活性化に必須のものと推察された。

以上より、ヒトメラノーマ細胞に GD3 を高発現させると、細胞の増殖および浸潤能の亢進が認められ、FCS 刺激により、MAPK、Akt、FAK、p130Cas および paxillin のリン酸化が増強した。また、GD3 発現メラノーマ細胞では、p130Cas および paxillin は細胞の浸潤能に、p130Cas は増殖能に関与することを明らかにした。更に、GD3 発現により細胞の接着性も増大し、インテグリンを介した接着刺激により細胞増殖性や浸潤性が亢進した。また、p130Cas および paxillin も顕著に活性化した。



(Fig. 1) GD3+細胞 (■) 及び GD3-細胞 (●) の細胞接着性

CL I; I 型コラーゲン、CL IV; IV 型コラーゲン、FN; ファイブロネクチン、LN; ラミニン



(Fig. 2)

A. I型コラーゲンを用いた接着刺激による p130Cas 及び paxillin のチロシンリン酸化

B. 浮遊状態のメラノーマ細胞における FCS 刺激による p130Cas 及び paxillin のチロシンリン酸化

## (II) ヒトメラノーマにおける NEU3 の遺伝子発現レベルと機能の解析

ヒト大腸癌や腎細胞癌では Neu3 シアリダーゼが異常に発現上昇し、Neu3 の強発現により癌細胞の運動性や浸潤性が亢進する。また、大腸癌細胞ではアポトーシスも抑制する。そこで、ガングリオシド GD3 が高率に発現しているメラノーマ細胞(神経外胚葉由来)において、NEU3 の発現レベルの検討、Neu3 遺伝子の強発現によるガングリオシド組成への影響および発現変化が癌性形質に及ぼす影響について検討した。その結果を以下に示す。

### 1. ヒトメラノーマ細胞株の酸性糖脂質の組成

各種ヒトメラノーマ細胞株の酸性糖脂質を TLC により分析した結果、GD3 および GD2 が主要なガングリオシドであった。

### 2. メラノーマおよび大腸癌細胞株における Neu3 遺伝子の発現レベル (Fig. 1)

リアルタイム PCR により Neu3 遺伝子の発現量を検討した結果、メラノーマ細胞株においても大腸癌細胞株と同等の Neu3 遺伝子発現が認められた。

### 3. メラノーマ細胞における NEU3 活性 (Fig. 2)

メラノーマ細胞株においても大腸癌細胞株と同等の NEU3 活性(基質:ガングリオシド)が認められた。

### 4. Neu3 遺伝子導入メラノーマ細胞における Neu3 遺伝子発現レベル

NEU3 の mRNA レベルをリアルタイム PCR により検討した結果、ベクターコントロール細胞(V1, V2, V11, V12, V20)に比べて、Neu3 遺伝子導入細胞の Neu27 では30-40倍の、Neu22 と Neu29 では5-6倍の発現増強が認められた。

### 5. Neu3 遺伝子導入メラノーマ細胞におけるシアリダーゼ活性 (Fig. 3)

Neu3 遺伝子の発現がコントロール細胞の30-40倍あった Neu27 クローンでのみ、顕著な酵素活性(基質:ガングリオシド)の上昇が認められた。

### 6. Neu3 遺伝子導入メラノーマ細胞における細胞表面 GD3 の発現

顕著なシアリダーゼ活性の上昇を認めた Neu27 細胞においても、細胞表面の GD3 発現においては明らかな差異が認められなかった。

### 7. Neu3 遺伝子導入メラノーマ細胞におけるガングリオシド組成 (Fig. 4)

顕著なシアリダーゼ活性の上昇を認めた Neu27 細胞においても、顕著なガングリオシド組成の差異が認められなかった。

### 8. Neu3 遺伝子導入細胞における細胞増殖と浸潤性

コントロール細胞と NEU3 強発現細胞の間で、細胞増殖能に差異は認められなかった。

### 9. Neu3 遺伝子発現抑制のための siRNA の検討 (Fig. 5)

メラノーマにおける Neu3 の機能を明らかにするために、siRNA を用いて Neu3 遺伝子のノックダウンを行う。その為に、メラノーマ細胞に効果的な Neu3 遺伝子に対する siRNA を検討した。その結果、siRNAste3 により、ヒトメラノーマ細胞 MeWo では 80~90% のノックダウン効果が、SK-MEL-28-c5 では 50~60% のノックダウン効果が認められた。

#### 10. Neu3 遺伝子安定抑制細胞株の樹立

Neu3 遺伝子安定抑制細胞株を樹立する為に、ヒトメラノーマ細胞,SK-MEL-28-c5 に shNeu3 ベクターを導入して puromycin により耐性株を選択した。Neu3 遺伝子低発現細胞株は 4 クローン樹立できたが、その中で継続的に抑制効果が認められたものは、1 クローン (SK-MEL-28-c5/shNeu3-22) のみであった。

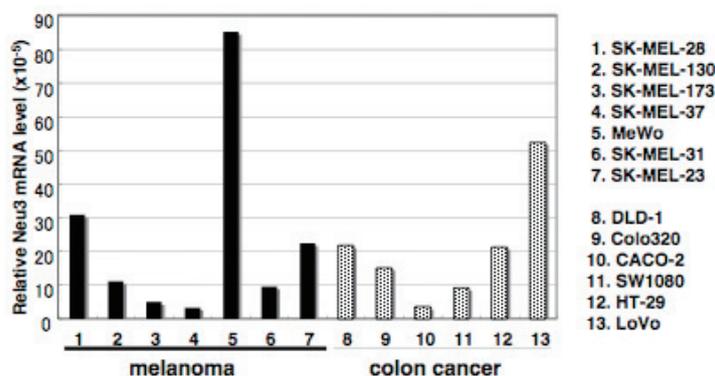
#### 11. Neu3 遺伝子ノックダウン細胞における Neu3 活性の検討 (Fig. 6)

siRNAste3 を用いて一過性に Neu3 遺伝子をノックダウンしたヒトメラノーマ細胞 MeWo では、コントロールに比べて 1/3 のシアリダーゼ活性 (基質:GM3) が認められた。Neu3 遺伝子安定抑制細胞株, SK-MEL-28-c5/shNeu3-22 では 1/2 の活性が認められた。

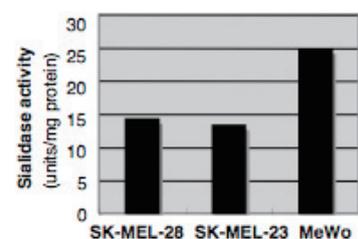
#### 12. GD3 非発現メラノーマ細胞 SK-MEL-28-N1 を用いた Neu3 強発現細胞株の樹立

ヒトメラノーマ細胞 SK-MEL-28 の亜株で GD3 発現が殆ど認められない SK-MEL-28-N1 は細胞増殖能や浸潤能が低く、癌性形質が低下している。そこで、h-Neu3 遺伝子を導入した Neu3 遺伝子安定発現細胞株を樹立し、その形質変化を検討する。現在までに、10 クローンの Neu3 遺伝子高発現細胞株が樹立できた。これらの細胞株は、ベクターコントロール細胞株に比べて、100~200 倍の遺伝子発現の増強が認められた。

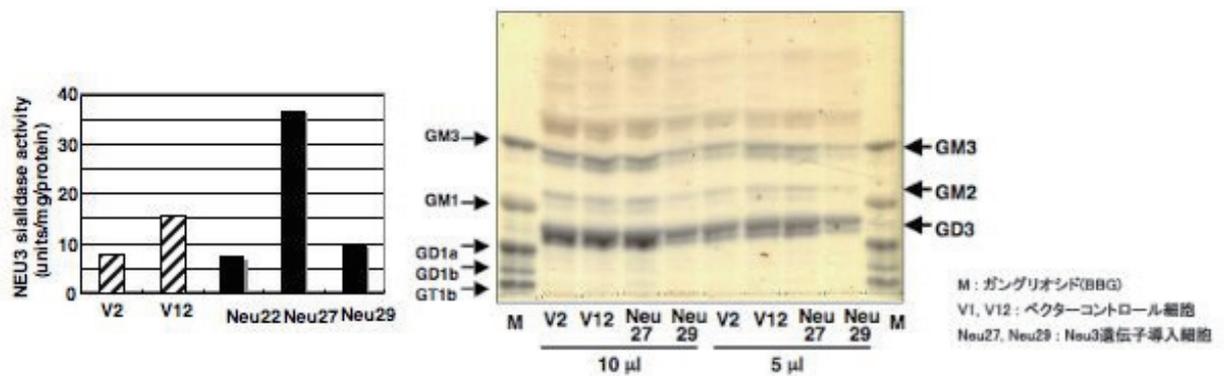
以上より、ヒトメラノーマ細胞株は大腸癌細胞株と同等の Neu3 遺伝子発現が認められた。Neu3 遺伝子を安定強発現させたメラノーマ細胞株は、コントロール細胞と比べて著明なガングリオシド組成および細胞形質の差異は認められなかった。そこで、Neu3 遺伝子発現および NEU3 活性が非常に高いメラノーマ細胞、MeWo の Neu3 遺伝子をノックダウンした。その結果、細胞増殖能が低下し、NEU3 が細胞増殖能の亢進に参与することが示唆された。また、細胞増殖性および浸潤性の低いメラノーマ細胞 SK-MEL-28-N1 に Neu3 遺伝子を導入して安定発現細胞株を樹立した。現在、それらの細胞株の NEU3 活性および形質変化について検討中である。



(Fig. 1) メラノーマ細胞および大腸癌細胞の Neu3 遺伝子発現

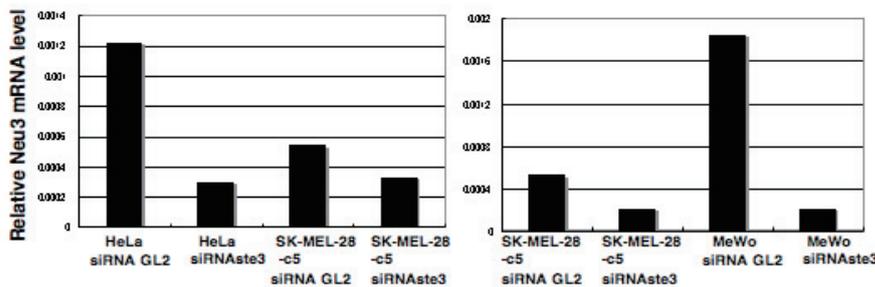


(Fig. 2) メラノーマ細胞の NEU3 活性

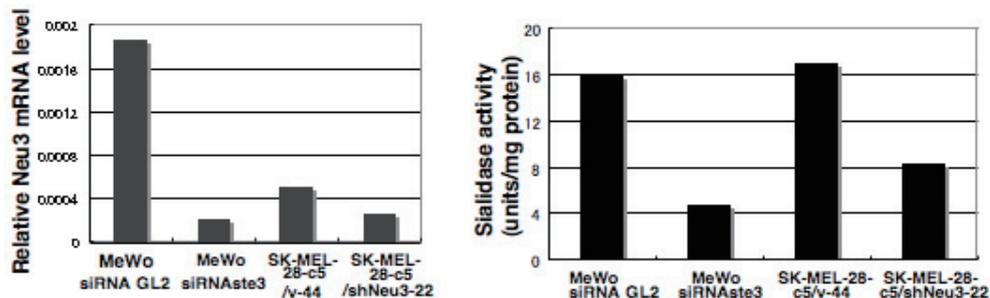


(Fig. 3) Neu3 遺伝子導入メラノーマ細胞の NEU3 活性

(Fig. 4) Neu3 遺伝子導入メラノーマ細胞における ガングリオシド組成



(Fig. 5) Neu3 遺伝子に対する siRNA, siRNAste3 の遺伝子ノックダウン効率



(Fig. 6) siRNAste3 の Neu3 遺伝子ノックダウン効率とシアリダーゼ活性

(2)研究成果の今後期待される効果

従来から、ヒトメラノーマ細胞では、ガングリオシド GD3 が高率に発現することが認められており、抗体療法の分子標的として注目されてきた。本研究では、GD3 合成酵素遺伝子導入により GD3 高発現細胞株を樹立して、GD3 の癌性形質に及ぼす影響とその分子メカニズムについて検討した。

一方、ガングリオシドの脱シアル酸酵素である NEU3 シアリダーゼは、大腸癌や腎癌において高率に発現し、また、癌性形質にも関与することが、宮城らにより報告されてきた。そこで、神経外胚葉由来のメラノーマにおいても、NEU3 が同様の機能を有するかについて検討をした。

本研究により、ヒトメラノーマ細胞において、GD3 は癌性形質を誘導し、各種シグナル伝達関連分子の活性化を増強することを明らかにした。また、インテグリンを介した接着刺激がシグナル伝達関連分子の活性化には必須であることも示した。今後、インテグリンと GD3 の相互作用について、分子レベルで解析することにより、更に本質的な GD3 の細胞表面での役割が明らかになるものと

期待される。また、メラノーマ細胞における NEU3 の機能の解析を進めることにより、NEU3 の癌性形質に対する関与が、上皮系のみならず神経系においても同様な役割を果たしているのか、あるいは組織特異性を有しているのかを明らかにすることができる。メラノーマにおいても NEU3 が癌性形質を増強するならば、今後、NEU3 もメラノーマ治療の標的分子として、診断、治療応用のための基盤的研究へと展開が期待できる。

### 3. 5. Neu3 阻害剤の設計と合成(理化学研究所 袖岡グループ)

#### (1)研究実施内容及び成果

ganglioside は、1 つ以上のシアル酸を有するスフィンゴ糖脂質の一種である。主に細胞膜表層に存在し、細胞の分化・増殖、細菌・ウイルスなどの感染、神経系の修復、細胞間ネットワークなど、その機能は多岐にわたっている。GM3 (1) は、上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合してチロシンキナーゼ活性を抑制し、細胞増殖を負に制御していることが知られている。ganglioside は、シアリダーゼによって加水分解を受ける。エキソ型  $\alpha$ -グリコシダーゼの一種であるシアリダーゼは、複合糖質やオリゴ糖の非還元末端のシアル酸を加水分解する酵素である。ヒトシアリダーゼは、Neu1 から Neu4 まで同定されており、中でも形質膜に局在するヒトシアリダーゼ NEU3 は、ganglioside を選択的に基質とするユニークなシアリダーゼである。NEU3 は GM3 (1) を加水分解し、LacCer (2) を与え、GM4 (3) も基質となることが知られている (Figure

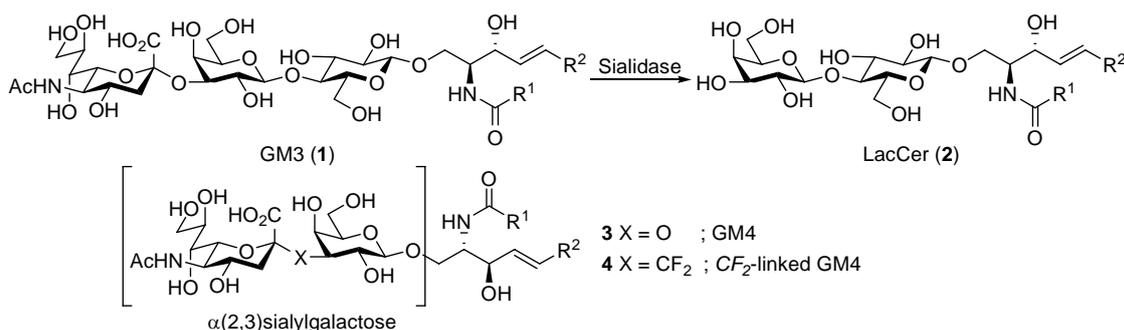
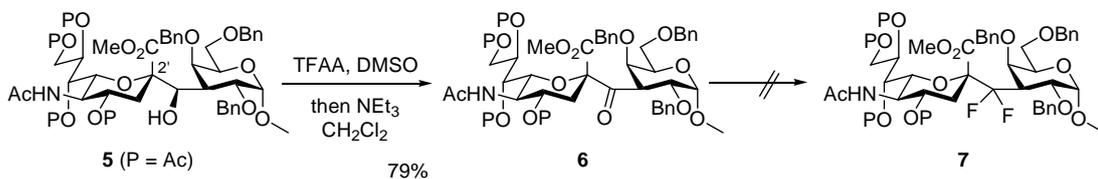


Figure 1. ganglioside の構造と新規ganglioside GM4アナログ

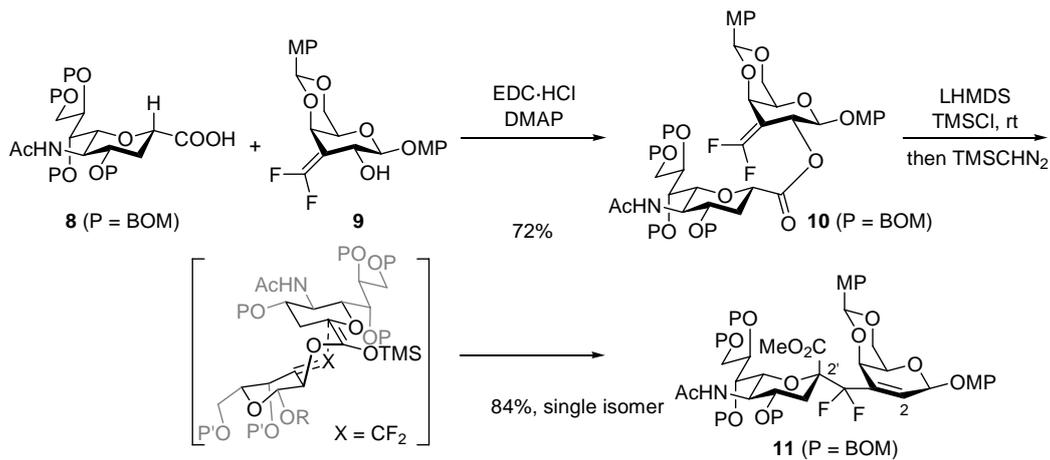
1)。

袖岡グループでは、NEU3 阻害剤創製を目指し、NEU3 によって加水分解を受けないganglioside アナログを合成し、阻害剤として利用することをまず計画した。長谷川、木曾らによって合成されたganglioside の *S*-sialoside アナログが、同様の目的で合成されており、ウイルスに対するシアリダーゼ阻害活性などの生物活性が報告されている。しかし *S*-glycoside 結合は、合成の簡便性、酸素原子と硫黄原子の共通性などの利点はあるものの、培地、細胞内での安定性に関しては未知のままである。より安定と考えられる *C*-sialoside 結合をもつ  $\alpha(2,3)\text{sialylgalactose}$  誘導体もこれまでに Linhardt ら、Schmidt らによって合成されている。しかし生物活性に関しては、Linhardt らの合成した CH(OH)-連結型  $\alpha(2,3)\text{sialylgalactose}$  誘導体 (5) のバクテリアシアリダーゼに対する阻害活性が報告されるのみで、合成された *C*-sialoside のほとんどは、その生物活性が未知のままである。我々は、ホスファターゼ阻害剤として酸素原子のよいバイオイソスターとなることが知られていた CF<sub>2</sub> 基に着目した。*O*-sialoside の O 原子を CF<sub>2</sub>-基に置き換えれば、元の *O*-sialoside の性質をより模倣できると考え、NEU3 の基質の一つとして知られているもっともシンプルな構造のganglioside GM4 (3) のアナログ 4 を考案した。

CF<sub>2</sub>-連結型 $\alpha$ (2,3)sialylgalactose は、2' 位が 4 置換炭素となり、また立体的に込み入った部位にフッ素原子を導入しなくてはならないため、その合成は困難であると考えられた。実際、Linhardt らによって報告されていた **5** から CF<sub>2</sub>-連結体 **7** への誘導を検討したが、ケトン **6** へのフッ素化反応はまったく進行しなかった (Scheme 1)。研究を開始した時点ではこの Linhardt 法は、 $\alpha$ -C-sialoside を選択的に合成できる唯一の方法であったが、2' 位の 4 置換炭素構築後ではフッ素原子が困難であったことから、フッ素原子をあらかじめ有した化合物を用いて C-sialoside 結合を $\alpha$ 選択的に構築できる手法を新たに確立する必要があった。種々検討した結果、2-デオキシシアル酸誘導体 **8** と 3 位にジフルオロメチレン基を有するガラクトース誘導体 **9** とを縮合してエステル **10** とした後、LHMDS, TMSCl と処理すると Ireland-Claisen 転位が室温下速やかに進行し、望む $\alpha$ -CF<sub>2</sub>-シアロシド **11** を立体選択的に得ることが出来た (Scheme 2)。本立体選択性は、転位反応の遷移状態がイス型配座を経ると仮定すると合理的に説明できる。

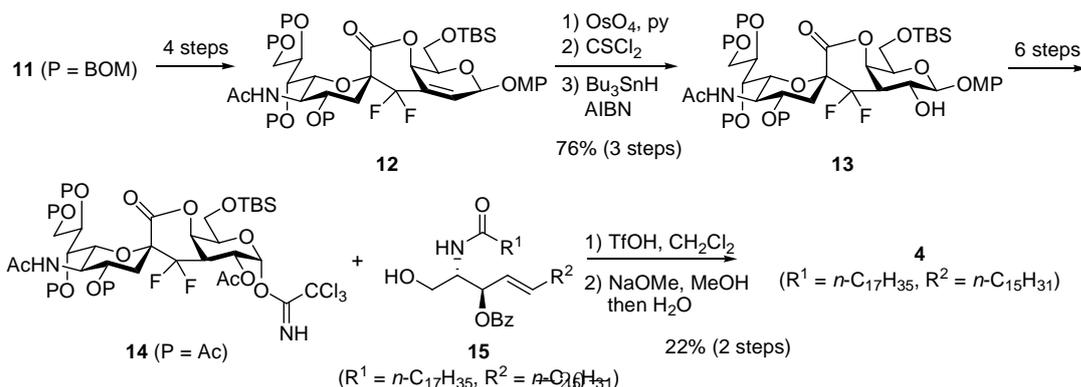


Scheme 1. CF<sub>2</sub>-連結型 $\alpha$ (2,3)-sialylgalactose誘導体 (**7**)の合成の試み



Scheme 2. Ireland-Claisen転位反応を利用したC-シアロシド結合構築法

$\alpha$ -CF<sub>2</sub>-シアロシド **11** から CF<sub>2</sub> 連結型 GM4 (**4**) への誘導を検討した。Ireland-Claisen 転位の際に消失したガラクトース 2 位水酸基は、ラクトン体 **12** から 3 工程で立体選択的に再導入でき **13** を高収率で得た。6 工程でドナー **14** へと誘導した後、セラミド誘導体 **15** とのグリコシル化、脱保護により **4** を得ることに成功した。本合成は、炭素連結部をグリコシド結合に有するガングリオシドの初めての合成例である (Scheme 3)。



Scheme 3. CF<sub>2</sub>-連結型GM4 (**4**)の合成

C F<sub>2</sub> 連結型 GM4 (4) のヒトシアリダーゼ阻害活性について検討した。その結果、ガングリオシドを基質とするシアリダーゼ NEU2 (IC<sub>50</sub> = 754 mM) や NEU4 (IC<sub>50</sub> = 930 mM) に対して弱いながらも阻害活性を示し、NEU3 に対してもわずかながら阻害活性を示すことがわかった。また、ヒトリンパ球増殖抑制活性について検討したところ、GM4 (3) と同程度のリンパ球増殖抑制活性を示すことを見出した。これらのことから、4 はガングリオシドミミックとして機能することが示され、CF<sub>2</sub>-sialoside 結合は O-sialoside のバイオイソスターとして有用であることがわかった。

これまでに C-グリコシド結合構築の方法論が多く報告されているが、複合糖質へ導いた例がほとんどない。ごく最近 Mootoo らによって、sialyl-Le<sup>x</sup> のアナログ分子に存在するグリコシド結合を CF<sub>2</sub> 基に置き換えたアナログの合成が報告され、フッ素置換 C-グリコシドの注目度は高まってきている。しかし、Mootoo らの例はアナログのアナログであり、GM4 などの複合糖質で CF<sub>2</sub>-連結型アナログを合成し活性評価した例は、我々の報告のみであり、本研究成果は今後の糖鎖アナログ分子をリードするものであると考えている。

NEU3 は GM4 を加水分解するものの、その反応性はもっとも反応性の高い基質の1つである GM3 (1) に比べるとはるかに劣る。従って、CF<sub>2</sub>-連結型 GM3 (16) を合成すれば、NEU3 との親和性が高くなり阻害活性が向上すると期待している (Figure 2)。まだプレリミナリーな結果ではあるが、ごく最近 CF<sub>2</sub>-連結型の α(2,3)sialylgalactose 骨格を有するドナー基質とグルコースアクセプターとのグリコシル化によって、CF<sub>2</sub>-連結型 sialyllactose 誘導体の合成に成功した。現在、グリコシル化の収率改善とセラミド鎖の導入による CF<sub>2</sub>-連結型 GM3 アナログへの誘導に挑戦している。

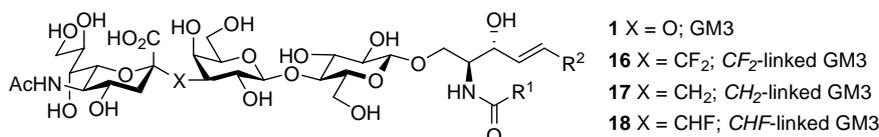


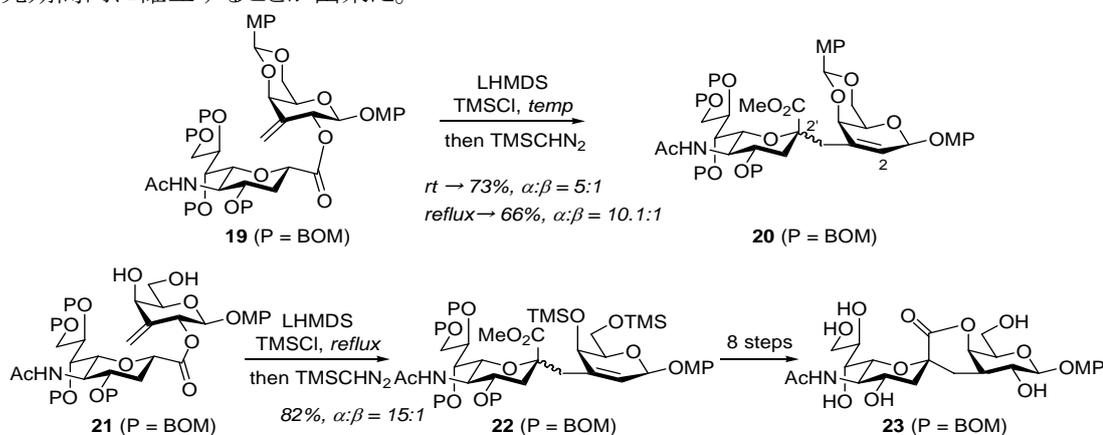
Figure 2. ガングリオシドGM3アナログ

一方、NEU3 の GM2 など分岐型のガングリオシドに対する反応性は極めて低く、NEU3 は基質となる GM3 (1) などの特定のガングリオシドの機能の制御に重要な働きをしているものと考えられる。本研究で設計している分子は、NEU3 によって分解を受けないガングリオシドアナログであり、CF<sub>2</sub>-sialoside 分子が厳密に O-sialoside を模倣できれば、NEU3 が高発現した細胞でもガングリオシド活性を発揮できる可能性が高い。

優れたガングリオシドミミックとなるためには、天然型の O-sialoside のコンホメーションや電子的な性質を再現する必要がある。しかし、現在までに糖鎖の安定アナログとして CF<sub>2</sub>-連結型アナログが生体に存在する O-連結型分子をきちんと模倣するか否か、特にフッ素原子の寄与に関する情報は少ない。そこで、O-sialoside のもっともふさわしい模倣体を探索し、CF<sub>2</sub>-sialoside 分子のフッ素原子の寄与を明らかにするため、CH<sub>2</sub>-連結型および CHF-連結型の GM3 (17, 18) を設計し、CF<sub>2</sub>-連結型 GM3 (16) および 1 との活性を比較することを計画した。

本研究で開発した Ireland-Claisen 転位反応を利用する α-C-sialoside 構築法が、CH<sub>2</sub>-sialoside や CHF-sialoside にも適応可能であるかを検証するため、まず CH<sub>2</sub>-連結型 α(2,3)sialylgalactose アナログ (23) の合成を検討した。転位前駆体 19 を合成し CF<sub>2</sub>-連結型と同様の反応条件に付したところ、転位反応は良好に進行し 20 を与えたが、望まない b 体が a:b = 5:1 の比で生成することが分かった (Scheme 4)。選択性の改善を目指し種々検討した結果、本転位反応には興味深い温度依存性があることが分かった。すなわち、19 の転位反応温度を -20 ° C にすると選択性が低下するが THF 還流条件下では、α:β = 10:1 まで向上した。また、ガラクトース側の 4, 6 位保護基を除去し

た **21** の転位反応を検討したところ、THF 還流条件で a:b の比が 15:1 まで向上した。化合物の安定性の問題から **20** から **23** への誘導は困難であったが、**22** から 8 段階で **23** を合成できることを見出した。Ireland-Claisen 転位を用いる本手法は、電子状態が異なる CF<sub>2</sub>-および CH<sub>2</sub>-連結体の両方に利用できることを示すことが出来、一般性の高い手法であることがわかった。また、Schmidt らも同様の CH<sub>2</sub>-連結型  $\alpha(2,3)$ -sialylgalactose アナログを合成しているが、彼らの手法は CH<sub>2</sub>-体にものみ適応可能な方法であり、また 30 工程以上の合成段階を必要としていた。本手法では 20 工程程度で **23** を合成できることから、効率面でも優れていると考えている。また、CHF-連結体の合成も検討している。CHF-連結体には 2 種類の異性体が存在するので、これらの選択的合成は有機合成化学的にも興味深い。ごく最近我々は、Ireland-Claisen 転位反応を用いて、CHF-sialoside の両異性体を、収率面で課題を残すものの選択的に合成できる手法を確立した。現在、収率の改善と **18** への誘導を検討している。以上のように、設計したすべての分子の合成を行うための方法論は本研究期間内に確立することが出来た。



**Scheme 4.** CH<sub>2</sub>-連結型  $\alpha(2,3)$ -sialylgalactose アナログ (**4**) の合成

## (2) 研究成果の今後期待される効果

我々はこれまでの研究から、C-sialoside 結合を有するガングリオシド GM3 アナログ合成のための必要な合成戦略をすべて整えている。GM3 までの合成に約 30 工程を必要とするが、改良点は少し残されており、あと数工程の短縮は可能であると考えている。本手法によって、これまで合成の困難さから進展が遅れていた C-sialoside 研究を大きく進展させることが可能であると期待している。C-連結型 GM3 アナログは、本研究内で合成した CF<sub>2</sub>-連結型 GM4 に比べその NEU3 阻害活性は向上すると考えられる。CHF-sialoside の立体異性体を含む 4 つのタイプの GM3 アナログをすべて合成し、その阻害活性を評価することで、どの C-sialoside が NEU3 阻害活性に重要であるかが判断できるものと考えている。また、GM3 は上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合してチロシンキナーゼ活性を抑制し、細胞増殖を抑制していることが明らかになっている。他にも GM3 の活性は多岐にわたっており、アナログのガングリオシド活性を評価する方法はいくつかすでに構築されている。したがって NEU3 阻害活性とは別に、NEU3 で分解されない GM3 アナログとしてどの連結部が重要であるかも判断できると考えている。これまで C-連結型糖鎖アナログは数多く合成されてきたが、機能に関する情報はほとんど得られていない。本研究によって、C-連結型糖鎖がどのくらい有用であるかをはっきり示すことが出来、結果次第では糖鎖研究の合成化学的アプローチを変えうる重要な研究になると考えている。

糖鎖は生体内ではその構造が不均一であり、またダイナミックに構造が変化していることから、生命現象と糖鎖構造を結びつけることはそう容易ではない。しかし、NEU3 のように基質特異性の高い酵素の真の機能解明には、基質の機能と酵素の機能の両方を解明できるプローブ分子が必要であると考えられ、NEU3 に加水分解されない GM3 アナログはその要求を満たす分子となると考えている。

さらに我々の分子で、NEU3 の機能阻害ががん細胞の増殖抑制や細胞死を引き起こすことが示されれば、NEU3 は新たな抗がん剤の標的分子となり、創薬戦略に貢献できると考えられる。

## § 4 研究参加者

### ① 宮城グループ(シアリダーゼの機能およびがんや糖尿病等の異常発現機構と意義の研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	宮城 妙子	宮城県立がんセンター研究所	研究所長	研究総括	H15.10～H21.3
	山口 壹範	宮城県立がんセンター研究所	副主任研究員	シアリダーゼの機能解析	H15.10～H21.3
	和田 正	宮城県立がんセンター研究所	研究員	シアリダーゼの異常発現機構と意義の解析	H15.10～H21.3
*	秦 敬子	宮城県立がんセンター研究所	共同研究員	シアリダーゼの機能解析	H15.10～H21.3 (H17.3 まで CREST 研究員)
*	塩崎 一弘	JST	博士研究員	シアリダーゼの機能と異常発現	H16.4～H21.3
*	森谷 節子	宮城県立がんセンター研究所	共同研究員	シアリダーゼの機能と異常発現	H15.10～H21.3 (H18.3 まで CREST 実験補助員)
	小関 弘恵知	宮城県立がんセンター研究所	共同研究員	シアリダーゼの発現制御	H16.4～ H20.9
	塩崎 桃	宮城県立がんセンター研究所	共同研究員	シアリダーゼの発現制御	H16.4～ H21.3
	鈴木 進	宮城県立がんセンター研究所	共同研究員	II 型糖尿病におけるシアリダーゼ解析	H19.4～ H21.3

### ② 鈴木グループ(糖尿病におけるシアリダーゼ解析)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	鈴木 進	東北大学大学院 医学研究科 分子代謝病態学	助教授	2型糖尿病患者の遺伝子解析	H15.10～H19.3
	檜尾好徳	東北大学附属病院糖尿病代謝科	講師	2型糖尿病患者の遺伝子解析	H15.10～H19.3
	平井完史	同上	助手	2型糖尿病患者の遺伝子解析	H15.10～H17.3
	善積信介	同上	大学院生	NEU3 肝過剰発現マウスの解析	H15.10～H19.3
	鈴木千登世	同上	実験助手	NEU3 肝過剰発現マウスの解析	H16.10～H19.3
	菅波貴子	同上	実験助手	2型糖尿病患者の遺伝子解析	H18.10～H19.3
	山田 高弘	同上	大学院生	2型糖尿病患者の遺伝子解析	H16.4～H18.3
	角田 宇衣子	同上	大学院生	2型糖尿病患者の遺伝子解析	H17.10～H19.3

② 加藤グループ(シアリダーゼの免疫機能解析)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	加藤 茂樹	香川大学	客員准教授	CD44 機能におけるシアリダーゼの役割	H15.1～H21.3
*	前田 幸枝	香川大学	研究補助員	CD44 機能におけるシアリダーゼの役割	H18.4～H21.3
*	福岡ひさ子	香川大学	研究補助員	CD44 機能におけるシアリダーゼの役割	H19.4～H20.3

④ 東グループ(神経細胞におけるシアリダーゼの解析)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	東 秀好	東北薬科大学	教授	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	H15.10～H21.3
	三苦純也	東北薬科大学	講師	インスリン分泌と細胞膜シアリダーゼ	H18.4～H21.3
	中川哲人	東北薬科大学	助手	インスリン分泌と細胞膜シアリダーゼ	H18.4～H21.3
	金津嘉徳	JST	研究補助員	インスリン分泌と細胞膜シアリダーゼ	H18.6～H20.3
	小出さおり	JST	研究補助員	神経細胞分化と細胞膜シアリダーゼ	H18.6～H21.3
	太田潤一	東北薬科大学	大学院生	神経細胞分化と細胞膜シアリダーゼ	H19.4～H20.3
	松岡 拓郎	東北薬科大学	大学院生	神経細胞分化と細胞膜シアリダーゼ	H20.4～H21.3
	大柳恵理子	東北薬科大学	大学院生	神経細胞分化と細胞膜シアリダーゼ	H20.4～H21.3

⑤ 古川グループ(ガングリオシド合成系によるシアリダーゼ異常の制御)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	古川 圭子	中部大学	教授	研究全般、研究の総括	H15.10～H21.3
	田島 織絵	中部大学	講師	遺伝子発現の解析	H19.4～H21.3
	神戸 真理子	中部大学	CRES 研究補助員	実験準備、実験補助	H19.4～H20.3
*	神戸 真理子	中部大学	研究補助員	実験準備、実験補助	H20.4～H21.3

⑥ 袖岡グループ(Neu3 阻害剤の設計と合成)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	袖岡 幹子	理化学研究所	主任研究員	Neu3 阻害剤の設計と合成	H15.10～H21.3

	平井 剛	理化学研究所	研究員	Neu3 阻害剤の設計	H15.10～H21.3
	渡邊 亨	東北大学大学院工学研究科・理化学研究所	大学院 生 研修生	Neu3 阻害剤の合成	H16.10～H21.3
*	久米田 綾子 (通称：土屋 綾子)	JST	CREST 研究員	化合物の評価	H18.4～H20.3
*	閻闔 孝介	JST	CREST 研究員	化合物の評価	H16.4～H16.9
	濱島 義隆	理化学研究所	研究員	含フッ素化合物合成法の検討	H17.4～H19.3
	加藤 麻理依	東京医科歯科大学・理化学研究所	大学院 M1 研修生	GM3 ミミックの合成	H20.4～H21.3

## § 5 招聘した研究者等

氏名 (所属役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Sonnino S. (イタリア・ミラノ大学・教授)	Sendai Glycolipid Symposium での講演	仙台	平成 16 年 7 月 30 日～8 月 1 日
Li Y-T. (米国デュレン大学・教授)	Sendai Glycolipid Symposium での講演	仙台	平成 16 年 7 月 29 日～8 月 1 日
Tettamanti G. (イタリア・ミラノ大学・教授)	Sendai Glycolipid Symposium での講演	仙台	平成 16 年 7 月 30 日～8 月 1 日
Hakomori S. (米国ワシントン大学・教授)	Sendai Glycolipid Symposium での講演	仙台	平成 16 年 7 月 30 日～8 月 1 日
Monti E. (イタリア・ブレシア・教授)	Sendai Glycolipid Symposium での講演	仙台	平成 16 年 7 月 30 日～8 月 1 日
山下 匡 (米国・NIH・研究員)	Sendai Glycolipid Symposium での講演	仙台	平成 16 年 7 月 30 日～8 月 1 日
李 揚 (中国・吉林 大学・教授)	共同研究打ち合わせ	名取・仙台・ 横浜	平成19年12月10日～17日

## § 6 成果発表等

### 宮城グループ

(1) 原著論文発表 (国内誌  0  件、国際誌  21  件)

1. Papini, N., Anastasia, L., Tringali, C., Croci, G., Bresciani, R., Miyagi, T., Yamaguchi, K., Preti, A., Prinetti, A., Prioni, S., Sonnino, S., Tettamanti, G., Venerando, B. and Monti, E.: The plasma membrane-associated sialidase Neu3 modifies the cell surface ganglioside pattern through cell-to-cell interactions. *J. Biol. Chem.* 279, 16989-16995, 2004
2. Da Silva, J.S., Hasegawa, T., Miyagi, T., Dotti, C.J. and Avad-Rodriguez, J.: A symmetric membrane ganglioside sialidase activity specifies axonal fate. *Nat. Neurosci.* 8, 606-615, 2005.
3. Yamaguchi, T., Hata, K., Koseki, K., Shiozaki, K., Akita, H., Wada, T., Moriya, S., and Miyagi, T.: Evidence for Mitochondrial Localization of a Novel Human Sialidase (NEU4). *Biochem. J.* 390, 85-93, 2005
4. Kato, K., Shiga, K., Yamaguchi, K., Hata, K., Kobayashi, T., Miyazaki, K., Saijo, S. and Miyagi, T.: Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) differentially regulates integrin-mediated cell proliferation through laminin- and fibronectin- derived signaling. *Biochem. J.* 394, 647-656, 2006
5. Ueno, S., Saito, S., Wada, T., Yamaguchi, K., Satoh, M., Arai, Y., and Miyagi, T.: Plasma membrane-associated sialidase is up-regulated in renal cell carcinoma and promotes the interleukin-6 -induced apoptosis suppression and cell motility. *J. Biol. Chem.* 281, 7756-7764, 2006
6. Magesha, S., Suzukib, T., Miyagi, T., Ishida, H. and Kiso, M.: Homology modeling of human sialidase enzymes NEU1, NEU3 and NEU4 based on the crystal structure of NEU2: Hints for the design of selective NEU3 inhibitors. *J. Mol. Graph. Model.* 25, 196-207, 2006
7. Valaperta, R., Chigorno, V., Basso, L., Prinetti, A., Bresciani, R., Preti, A., Miyagi, T., and Sonnino, S.: Plasma membrane production of ceramide from ganglioside GM3 in human fibroblasts. *FASEB J* 20, 1227-1229, 2006
8. 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
9. 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.
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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.
15. Hasegawa, 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
16. Watanabe, T., Hirai, G., Kato, M., Hashizume, D., Miyagi, T., and Sodeoka, M.: Synthesis of CH<sub>2</sub>-Linked (2,3)sialylgalactose analogue: on the stereoselectivity of the key Ireland-Claisen Rearrangement *Org. Lett.* 10, 4167-4170, 2008.
17. Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Shiozaki, K., Sato, I., Yamanami, H., Kakugawa, Y., and Fujiya, T.: Human sialidase as a cancer marker. *Proteomics* 8, 3303-3311, 2008.
18. Hata, K., Koseki, K., Yamaguchi, K., Moriya, S., Suzuki, Y., Yingsakmongkon, S., Hirai, G.,

- Sodeoka, M., von Itzstein, M., and Miyagi, T.: Limited Inhibitory Effects of Oseltamivir and Zanamivir on Human Sialidases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25, 3484-3491, 2008.
19. Sodeoka, M., Hirai, G., Watanabe, T., and Miyagi, T.: A strategy for constructing C-sialosides based on Ireland-Claisen rearrangement and its application for synthesis of CF<sub>2</sub>-linked ganglioside GM4 analogue. *Pure Applied Chem.* 81, 205-215, 2009.
  20. Uemura, T., Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Miyazaki, S., Satomi, S., Kato, K., Sakuraba, H., and Miyagi, T.: Contribution of sialidase NEU1 to suppression of metastasis of human colon cancer cells through desialylation of integrin b4. *Oncogene* 2009, in press
  21. Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Sato, I., and Miyagi, T.: Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) promotes formation of colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-treated transgenic mice. *Cancer Sci.* 2009, in press

(2) 口頭発表 (国際学会発表及び主要な国内学会発表)

招待講演 (国内会議 7件、国際会議 6件)

1. 宮城妙子：新規シアリダーゼ NEU4: その性状とがん性変化、文科省重点領域研究シンポジウム-糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節。千葉、2004、8。
2. Miyagi, T., Kato, K., Yamaguchi, K., and Moriya, S.: Regulation of integrin-mediated cell adhesion by plasma membrane-associated sialidase. The 18th International Symposium Glycoconjugates Satellite Symposium. Sialidases: from molecular biology to diseases, Brescia, Italy, 2005.9.
3. Miyagi, T., Hata, K., Koseki, K., Yamaguchi, K., and Moriya, S.: Regulation of cellular signaling by a sialidase localized in lipid membrane domains. The 18th International Symposium Glycoconjugates Satellite Symposium. Glycobiology of lipid membrane domains: from membrane organization to biological function. Siena, Italy, 2005. 9.
4. 宮城妙子；膜マイクロドメインに局在するシアリダーゼのヒト癌における発現亢進とその意義、第126年会日本薬学会シンポジウム-生体膜研究に置ける糖鎖生物学の重要性、仙台、2006、4
5. 宮城妙子、和田 正、山口壹範：がんで異常発現するシアリダーゼを標的とした創薬、生体機能と創薬シンポジウム2006福岡、2006、9
6. Miyagi, T., Wada, T., Hata, K., Yamaguchi, K., Kato, K., and Ueno S.: Functional role of plasma membrane-associated sialidase (NEU3) in expression of malignant properties of human cancers. Mishima, Japan, 2006, 8.
7. Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Hata, K., and Shiozaki, M.: Plasma membrane-associated sialidase as a crucial regulator for transmembrane signaling in human cancer, Sapporo Cancer, The 27<sup>th</sup> Sapporo Cancer Seminar International Symposium, Sapporo, Japan, 2007, 7.
8. Miyagi T., Wada T., Yamaguchi K., Sato I., Kawamura S., Tochigi, T., Kuwahara M., Yang Li, Danan Li, and Xuejian Zhao: Up-regulation of plasma membrane-associated sialidase (NEU3) in human prostate cancer and its potential utility as a novel therapeutic target. The first international symposium on prostate cancer. Changchun, China, 2007, 7.
9. 宮城妙子：シアリダーゼによるがん悪性度制御の分子機構、東北薬科大学学術フロンティアシンポジウム。仙台、2007、10。
10. 宮城妙子：糖鎖異常が招くがんの危険な性質、文科省重点領域研究公開シンポジウム-第3の生命鎖：糖鎖の謎今、解る。東京、2008、1。
11. Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Hata, K., and Shiozaki, K.: Crucial roles of plasma membrane-associated sialidase in human cancer. 13<sup>th</sup> World Congress on advances in Oncology. Crete, Greece, 2008.10
12. 宮城妙子：癌の浸潤・転移における糖鎖の役割、第4回産業医科大学大学院シンポジウム、北九州、2008、10
13. 宮城妙子、和田 正、山口壹範、塩崎一弘：がんの新規診断・治療法開発に向けたシアリダーゼ研究、第67回日本癌学会総会、シンポジウム、2008、10。

② 口頭講演（国内会議 23 件、国際会議 3 件）

1. 山口壹範、秦敬子、森谷節子、和田正、宮城妙子：NEU3 シアリダーゼの細胞内局在と細胞運動能への関与、第 71 回生化学会東北支部会、仙台、2005、5.
2. Miyagi, T., Wada, T., Moriya, S., Ueno S., Kato, K., and Yamaguchi, K.: A crucial role of plasma membrane-associated sialidase (NEU3) in the survival of human cancer cells. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. Honolulu, HI, USA, 2004, 11.
3. Miyagi, T., Wada, T., Hata, K., Yamaguchi, K., Moriya, S.: Pathological implications of up-regulation of plasma membrane-associated sialidase (Neu3) in human cancer. The 18th International Symposium Glycoconjugates. Florence, Italy, 2005.9.
4. 上村卓嗣、宮崎修吉、里見進、和田正、宮城妙子：ヒト大腸癌細胞におけるリソソームシアリダーゼ (NEU1) の発現と浸潤能の関連について、日本がん転移学会、大阪、2005.
5. 加藤健吾、山口壹範、志賀清人、西條 茂、小林俊光、宮城妙子：形質膜シアリダーゼ (NEU3) ラミニン選択的がん細胞接着・増殖の促進、第 64 回日本癌学会総会、札幌、2005. 9.
6. 上村卓嗣、宮崎修吉、里見進、山口壹範、和田正、宮城妙子：リソソームシアリダーゼ (NEU1) 過剰発現によるヒト大腸癌細胞の浸潤・運動能の抑制とその機構、第 64 回日本癌学会総会、札幌、2005. 9.
7. 塩崎一弘、山並秀章、和田 正、山口壹範、藤谷恒明、宮城妙子、大腸がんにおけるシアリダーゼ NEU4 の発現低下とその意義、Down-regulation of sialidase NEU4 in human colon cancer and its pathological significance. 第 78 回日本生化学会大会、神戸、2005、10.
8. 塩崎一弘、山並秀章、和田 正、山口壹範、宮城妙子：新規シアリダーゼ (NEU4) によるヒト大腸癌細胞の接着・運動能の制御、第 72 回生化学会東北支部会、弘前、2006、5.
9. 塩崎一弘、小関弘恵知、山口壹範、塩崎 桃、宮城妙子：Expression of sialidase Neu4 in mouse brain development and its functional significance. 第 79 回日本生化学会大会、京都、2006、6.
11. 上村卓嗣、山口壹範、宮崎修吉、里見進、宮城妙子：Suppression of motility and invasion by sialidase NEU4 overexpression in human colon cancer. 第 79 回日本生化学会大会、京都、2006、6.
12. 山並秀章、和田 正、角川陽一郎、山口壹範、宮城妙子：ヒト大腸癌におけるシアリダーゼ NEU4 の発現低下とその意義、第 65 回日本癌学会総会、横浜、2006. 9.
13. 川村貞文、和田 正、栃木達夫、桑原正明、青木大志、佐藤育郎、山口壹範、宮城妙子：前立腺がんにおける形質膜シアリダーゼの異常発現上昇とその意義、第 65 回日本癌学会総会、横浜、2006. 9.
14. 上村卓嗣、宮崎修吉、里見進、和田正、宮城妙子：リソソームシアリダーゼがヒト大腸癌細胞の運動能・浸潤能を抑制する機構の解明、第 65 回日本癌学会総会、横浜、2006. 9.
15. 山口壹範、秦敬子、塩崎 桃、森谷節子、和田正、宮城妙子：シアリダーゼ NEU3 とシグナル関連分子の相互作用、第 26 回日本糖質学会年会、2006、8.
16. 川村貞文、和田 正、青木大志、栃木達夫、桑原正明、佐藤郁郎、山口壹範、宮城妙子：前立腺癌で異常亢進するシアリダーゼは癌細胞の分化を抑制する。第 95 回日本泌尿器科学会総会、東京、2007、7.
17. 上村卓嗣、宮崎修吉、里見進、和田正、宮城妙子；シアリダーゼ NEU1 によるインテグリン・4 の脱シアリル化は大腸がん細胞の浸潤・転移を抑制する。第 16 回日本がん転移学会総会、富山、2007、7.
18. Miyagi T., Wada T., Yamaguchi K, Sato I., Kawamura S., Tochigi, T., and Kuwahara M. Up-regulation of plasma membrane-associated sialidase (NEU3) in human prostate cancer and its close relation to pathological malignant grade, XIXth International Symposium on Glycoconjugates, Cairns, Australia, 2007, 7.
19. 川村貞文、和田 正、青木大志、栃木達夫、宮城妙子：前立腺癌で異常亢進する形質膜局

- 在型シアリダーゼは癌細胞の分化を抑制する。第18回前立腺がんワークショップ、東京、2007. 8.
20. 山口壹範、小関弘恵知、塩崎 桃、宮城妙子：ヒトシアリダーゼ NEU3 遺伝子のプロモーター領域の解析。第27回日本糖質学会年会、福岡、2007、8.
  21. Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Sato, I. and Tateno H.: Plasma membrane-associated sialidase as a novel therapeutic target in various human cancers. 第66回日本癌学会総会、横浜、2007、10.
  22. Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Sato I. and Miyagi, T.: Increased incidence of aberrant crypt foci (ACF) in mice overexpressing plasma membrane-associated sialidase NEU3. 第80回日本生化学会大会、横浜、2007、12
  23. 山口壹範、小関弘恵知、塩崎 桃、塩崎一弘、宮城妙子：ヒト NE3 シアリダーゼ遺伝子のプロモーター領域の解析、第74回生化学会東北支部会、盛岡、2008、5.
  24. 上村卓嗣、塩崎一弘、山口壹範、宮城妙子。シアリダーゼ NEU1 によるがん細胞の浸潤・転移抑制機構。第28回日本糖質学会年会、つくば、2008、8.
  25. 秦 敬子、小関弘恵知、山口壹範、森谷節子、鈴木康夫、平井剛、袖岡幹子、宮城妙子：インフルエンザ治療薬タミフルおよびリレンザのヒトシアリダーゼ阻害効果に関する検討。第2回東北糖鎖研究会、弘前 2008. 9
  25. Wada, T., Yamaguchi, K., Miyagi, T. Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by plasma membrane-associated sialidase (NEU3). 第67回日本癌学会総会、名古屋、2008、10
  26. Shiozaki, K., Hata, K., Shiozaki, M., Yamaguchi, K., Miyagi, T.: A possible mechanism of NEU3 activation at plasma membrane. BMB 2008 (第81回日本生化学会). 神戸、2008、12

③ポスター発表 (国内会議 25 件、国際会議 8 件)

1. Hata, K., Moriya, S., Yamaguchi, K., Wada, T., Uemura, T., Miyagi, T.: The functional role of plasma membrane-associated sialidase (NEU3) in epidermal growth factor signaling. 第77回日本生化学会大会、横浜、2004、8.
2. Yamaguchi, K., Wada, T., Hata, K., Moriya, S., Shiozaki, K., Koseki, K., and Miyagi T.: Characterization of the NEU4 sialidase. 第77回日本生化学会大会、横浜、2004、
3. 加藤健吾、山口壹範、志賀清人、西條 茂、小林俊光、宮城妙子：形質膜シアリダーゼによるがん細胞インテグリンシグナル伝達系の制御、第63回日本癌学会総会、福岡、2004. 9.
4. 上野誠司、和田 正、斎藤誠一、佐藤 信、荒井陽一、宮城妙子：形質膜シアリダーゼ発現上昇による腎細胞癌の悪性形質変化と IL-6 シグナリング。第63回日本癌学会総会、福岡、2004. 9.
5. 山並秀章、和田 正、角川陽一郎、宮城妙子：ヒト大腸癌における NEU4 遺伝子の発現異常。第63回日本癌学会総会、福岡、2004. 9.
6. 玉田 裕、野村弘行、青木大輔、鈴木 直、鈴木 淳、進 伸幸、宮城妙子、入村達郎、野沢志朗：卵巣癌腹膜播種におけるシアリダーゼの役割。第63回日本癌学会総会、福岡、2004. 9.
7. Yamaguchi, K., Hata, K., Wada, T., Moriya, S., and Miyagi, T.: EGF-induced mobilization of Neu3 sialidase in membrane ruffles in A 431 cells. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. Honolulu, HI, USA, 2004, 11.
8. 上野誠司、斎藤誠一、佐藤 信、青木大志、荒井陽一、和田 正、宮城妙子：腎癌における形質膜シアリダーゼ発現上昇の IL-6 関与機構とその意義、第93回日本泌尿器科学会総会、東京、2005. 4.
9. 上野誠司、斎藤誠一、和田 正、宮城妙子：形質膜シアリダーゼ発現上昇による腎癌細胞の運動能亢進と IL-6 シグナル経路の活性化、日本がん転移学会、大阪、2005. 6.
10. 川村貞文、和田 正、李 揚、李 大男、山口壹範、佐藤育郎、栃木達夫、桑原正明、趙 俊、宮城妙子：前立腺がんにおける形質膜シアリダーゼの異常発現上昇とその意義、日中国際シンポジウム 2005 SENDAI 2005. 6.
11. 佐藤郁郎、和田正、山並秀章、川村貞文、和田 正、尾形幸彦、栃木達夫、桑原正明、

- 立野紘雄、宮城妙子：形質膜シアリダーゼ遺伝子 (NEU3) に対する siRNA を用いた前立腺癌治療の可能性の検討、第 64 回日本癌学会総会、札幌、2005. 9.
12. 和田正、山口壹範、山並秀章、佐藤郁郎、宮城妙子：形質膜シアリダーゼ遺伝子 (NEU3) によるがん細胞生死決定の分子機構、第 64 回日本癌学会総会、札幌、2005. 9.
  13. Wada, T., Hata, K., Yamaguchi, K., Moriya, S., and Miyagi, T.: Molecular mechanism of apoptosis suppression by plasma membrane-associated sialidase (NEU3) in human cancer cells. The 2nd Netherlands-Japan Glycobiology Workshop. Amsterdam, Holland, 2005.4.
  14. Suzuki, S., Hinokio, Y., Hirai, M., Miyagi, T., and Oka, Y.: The role of plasma membrane-type sialidase gene NEU3 and GM3 synthase gene GM3S on the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus in Japanese. The 18th International Symposium Glycoconjugates. Florence, Italy, 2005.9.
  15. Yamaguchi, K., Hata, K., Wada, T., Moriya, S., and Miyagi, T.: Epidermal growth factor-induced mobilization of a ganglioside-specific sialidase (NEU3) to membrane ruffles. The 18th International Symposium Glycoconjugates. Florence, Italy, 2005.9.
  16. 小関弘恵知、武藤多津郎、山口壹範、宮城妙子：形質膜シアリダーゼ (Neu3) による Trk レセプター機能の制御、Regulation of Trk receptor function by plasma-membrane-associated sialidase (Neu3). 第 78 回日本生化学会大会、神戸、2005, 10.
  17. Shiozaki, K., Koseki, K., Yamaguchi, K., Shiozaki, M., and Mitagi, T.: Developmental change of Neu4 expression in mouse brain and its involvement in neuronal cell differentiation. Sialoglycoscience 2006. Mishima, Japan, 2006, 8.
  18. Shiozaki, K., Yamanami, H., Uemura, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Miyagi, T.: Novel sialidase NEU4 suppresses cell motility of colon cancer cells through attenuation of E-selectin-derived signaling. The 11<sup>th</sup> International Congress of Metastasis Research Society Joined with the 15<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Association for Metastasis. Tokushima, 2006, 9.
  19. 小関弘恵知、武藤多津郎、山口壹範、和田正、宮城妙子：形質膜シアリダーゼによる Trk レセプター機能制御とそのシグナル解析、第 26 回日本糖質学会年会、2006, 8.
  20. Yamaguchi, K., Shimada, Y., Shiozaki, M., and Miyagi, T.: Gene organization and transcriptional control of the human *NEU3* gene. XIXth International Symposium on Glycoconjugates, Cairns, Australia, 2007, 7.
  21. Shiozaki, K., Yamanami, H., Yamaguchi, K., Wada, T., and Miyagi, T.: Down-regulation of sialidase NEU4 in colon cancer and its involvement in expression of malignant properties. XIXth International Symposium on Glycoconjugates, Cairns, Australia, 2007. 7.
  22. Wada, T Yamaguchi, K and Miyagi, T.: Aberrant expression and its pathological role of plasma membrane-associated sialidase in human cancer. 第 66 回日本癌学会総会、横浜、2007、10.
  23. Yamaguchi, K, wada, T., and Miyagi, T.: Gene structure and transcriptional regulation of the human *NEU3* gene. 第 66 回日本癌学会総会、横浜、2007, 10.
  24. Shiozaki, M., Yamaguchi, K., Hata, K., Shiozaki, K., and Miyagi, T.: Plasma membrane-associated sialidase NEU3 interacts with EGF receptor in specific domains. 第 80 回日本生化学会大会、横浜、2007, 12
  25. Koseki, K., Wada T., Yamaguchi, K., Moriya S., Shiozaki, M., and Miyagi, T.: cDNA cloning, tissue distribution and possible function of human cytosolic sialidase NEU2. 第 80 回日本生化学会大会、横浜、2007, 12
  26. Hata, K., Moriya, S, Koseki, K., Yamaguchi, K., Wada, T., Suzuki, Y., Hirai, G., Sodeoka, M., von Itzstein, M. and Miyagi, T.: Effects of two influenza sialidase inhibitors, oseltamivir and zanamivir, on the activities of four types of human sialidases. 第 80 回日本生化学会大会、横浜、2007, 12、27.
  27. Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Miyagi, T.: Activation of Met receptor-derived signaling by plasma membrane-associated sialidase (NEU3). 第 67 回日本癌学会総会、名古屋、2008、10
  28. 小関弘恵知、和田正、秦敬子、山口壹範、宮城妙子、ヒト細胞質型シアリダーゼ NEU2 の生理機能解析。第 28 回日本糖質学会年会、つくば、2008、8.
  29. 渡辺亨、平井剛、宮城妙子、袖岡幹子：C-結合型シアリルガラクトースを含むガングリオシ

ドアナログの合成. 第 27 回日本糖質学会年会、福岡、2007. 8. 1-3.

30. Furukawa, K., Tajima, O., Kanbe M., Miyata, M., Miyagi, T., Furukawa, K.: Implication of expression of Neu3 gene in human melanoma cells.第 67 回日本癌学会総会、名古屋、2008、10.
31. Shiozaki, M., Shiozaki, K., Moriya, S., Yamaguchi, K., Miyagi, T.: NEU3 possibly interacts with EGFR at cytoplasmic side of plasma membrane. BMB 2008. 神戸、2008、12.
32. Hata, K., Wada, T., Moriya, S., Yamaguchi, K., Miyagi, T.: Involvement of plasma-membrane associated sialidase NEU3 in Wnt/beta-catenin signaling. BMB 2008. 神戸、2008、12.
33. Yamaguchi K., Koseki, K., Shiozaki, M., Miyagi, T. : Gene structure and transcriptional control of human NEU3 gene. BMB 2008. 神戸、2008、12.

### (3) 特許出願

“CRESTの成果に係わるものを、出願者(研究機関、JST、その他)に係わらず記載。権利化に支障を来す恐れのあるものは含めない。”

①国内出願 ( 1 件)

②海外出願 ( 1 件)

シアリダーゼ siRNA についての特許

出願番号：特願 2004-335774

発明者 宮城妙子、和田 正、山口壹範

発明の名称：がんまたは糖尿病治療のための医薬組成物

### (4) 受賞等

なし

### (5) その他特記事項

総説等：

1. Miyagi, T., Kato, K., Ueno, S., and Wada, T.: Aberrant expression of sialidase in cancer, Trends In Glycoscience and Glycotechnology 16, 371-381, 2004
2. Miyagi, T., Wada, T., and Yamaguchi, K., Hata, K.: Sialidase and malignancy: A minireview. Glycoconjugate J. 20, 189-198, 2004.
3. 鈴木進, 檜尾好徳, 佐々木明徳, 秦 敬子, 宮城妙子: シアリダーゼと糖尿病、遺伝子医学、遺伝子医学MOOK、3、24-29、2005
4. Miyagi, T. and Yamaguchi, K.: Biochemistry of Glycans: Sialic acids In Comprehensive Glycoscience. Edited by Kamerling, J.P., Boons, G., Lee, Y.C., Suzuki A., Taniguchi, N., and Voragen, A.G.J.. Elsevier BV. Amsterdam, The Netherlands. 297-322, 2007
5. 宮城妙子、塩崎一宏、上村卓司、山口壹範: 癌の浸潤・転移と糖鎖、実験医学、25 1042-1048、2007.
6. 宮城妙子: シアリダーゼによる細胞機能の制御とその異常、生化学、80、13-23、2008.
7. 山口壹範、宮城妙子: ミクロドメインにおけるシアリダーゼ機能、蛋白質・核酸・酵素、53、1570-1574、2008..
- 8... Miyagi, T. Wada, T., Yamaguchi, K.: Roles of plasma membrane-associated sialidase NEU3 in human cancers. Biochim. Biophys. Acta 1780, 532-537, 2008
9. Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Hata, H., and Shiozaki, K. : Minireview; Plasma membrane-associated sialidase as a crucial regulator of transmembrane signaling. J. Biochem. 144, 279-285, 2008.
10. Miyagi, T.: Aberrant expression of sialidase and cancer progression. Proc Jpn Acad 84, 407-418, 2008

## 鈴木グループ(平成18年まで)

- (1) 論文発表(国内誌 2 件、国際誌 1 件)  
“著者、発表論文名、掲載誌(巻、号、発行年)等”

檜尾好徳, 鈴木進, 平井完史, 鈴木千登世, 石原寿光, 高橋和眞, 佐藤譲, 片桐秀樹, 佐々木明德, 秦敬子, 和田正, 山口壺範, 宮城妙子, 岡芳知. ガングリオシド特異的形質膜シアリダーゼ遺伝子(NEU3)とインスリン抵抗性. *Diabetes Frontier* 15(4): 562, 2004.

鈴木進, 檜尾好徳, 佐々木明訓, 秦敬子, 宮城妙子. シアリダーゼと糖尿病. *遺伝子医学MOOK3*, p24-29, 2005.

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.

- (2) 口頭発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)  
“発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日等”

- ①招待講演 (国内会議        件、国際会議 1 件)  
②口頭講演 (国内会議 4 件、国際会議 2 件)  
③ポスター発表 (国内会議        件、国際会議 3 件)

Suzuki S, Yoshizumi S, Hirai M, Hinokio Y, Yamada T, Yamaguchi K, Miyagi T, Oka Y. Hepatic overexpression of plasma membrane-associated sialidase (NEU3) by adenoviral transduction improves insulin sensitivity and glucose tolerance in mice fed a high-fat diet and KKAY mice. The 66th scientific session of American Diabetes Association, 6.9-6.13, 2006, Washington DC

善積信介、鈴木進、角田宇衣子、山田高弘、平井完史、檜尾好徳、荻原健英、片桐秀樹、岡芳知、山口壺範、宮城妙子. 肝特異的なガングリオシド糖鎖改変によるインスリン感受性と耐糖能改善の分子機序. 第49回日本糖尿病学会年次学術集会. 平成18年5月 25日～5月27日, 東京

Suzuki, S., Y. Hinokio, Hirai, M, Miyagi, T, Oka, Y. The Role of Plasma Membrane Type Sialidase Gene NEU3 and GM3 Synthase Gene GM3S on the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus in Japanese. 18th International symposium on glycoconjugates. September 4-9, 2005, Florence, Italy.

Suzuki, S., S. Yoshizumi, Hirai, M., Hinokio, M., Yamada, T., Yamaguchi, K., Miyagi, T, Oka, Y. Increased Hepatic Levels of plasma membrane-associated sialidase, NEU3, Induce insulin sensitivity and glucose tolerance." 41st Annual Meeting of the European Association for the study of Diabetes, September 11-15, 2005, Athens, Greece.

善積信介, 鈴木進, 山田高弘, 沖本久志, 平井完史, 檜尾好徳, 荻原健英, 片桐秀樹, 岡芳知, 山口壺範, 宮城妙子. 肝へのガングリオシド特異的シアリダーゼNEU3遺伝子導入によるインスリン感受性と耐糖能改善の分子機序. 第48回日本糖尿病学会年次学術集会, 2005年5月12日～14日, 神戸市.

善積信介, 鈴木進, 山田高弘, 沖本久志, 平井完史, 檜尾好徳, 荻原健英, 片桐秀樹, 山口壺範, 宮城妙子, 岡芳知. 肝へのガングリオシド特異的シアリダーゼNEU3遺伝子導入によるインスリン感受性と耐糖能改善の分子機序. 第17回 分子糖尿病シンポジウム, 平成17年12月3日, 京都市.

Hinokio, Y., S. Suzuki, Hirai, M., Yoshizumi, S., Yamada, T., Oka, Y., Sasaki, A., Miyagi, T. The Role of Ganglioside GM3 on Insulin Resistance; Human GM3 Synthase (SIAT9) Gene Polymorphisms. The 64rd scientific sessions of American Diabetes Associations. 6.4-6.8, 2004, Orlando.

Suzuki, S. The role of plasma membrane type sialidase gene, NEU3 and GM3 synthase gene GM3S(SIAT9) on the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus in Japanese." Sendai Glycolipid Symposium, Sendai, July 31, 2004.

Suzuki, S. The role of plasma membrane type sialidase gene, NEU3 and GM3 synthase gene GM3S(SIAT9) on the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus in Japanese. The 6th Symposium on Molecular Diabetology in Asia, Taipei, Taiwan, December 10-11, 2004.

檜尾好徳, 鈴木進, 平井完史, 鈴木千登世, 石原寿光, 高橋和眞, 佐藤譲, 片桐秀樹, 佐々木明德, 秦敬子, 和田正, 山口壱範, 宮城妙子, 岡芳知. ガングリオシド特異的形質膜シアリダーゼ遺伝子(NEU3)とインスリン抵抗性. 第15回分子糖尿病学シンポジウム, 2003年12月6日, 熊本市産業文化会館.

(3) 特許出願

“CREST の成果に係わるものを、出願者（研究機関、J S T、その他）に係わず記載。権利化に支障を来す恐れのあるものは含めない。”

①国内出願 ( 0 件)

1. “発明の名称、発明者、出願人、出願日、出願番号”

②海外出願 ( 0 件)

(4) 受賞等

なし

(5) その他特記事項

なし

## 加藤グループ

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 2件)

1. KATO, S., FUKUSHIMA, K., MATSUMOTO, N., EHARA, N., MATSUMOTO, K., YAMAUCHI, A., HIRASHIMA, M. Accumulation of CXCR3-expressing eosinophils and increased concentration of its ligands (IP10 and Mig) in bronchoalveolar lavage fluid of patients with chronic eosinophilic pneumonia. Int. Arch. Allergy Immunol. 137;229-235:2005.
2. KATO, S., ISHII, N., NOBUMOTO, A., TAKESHITA, K, DAI, S.Y., SHINONAGA, R., NIKI, T., NISHI, N., TOMINAGA, A., YAMAUCHI, A., 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.

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 0件、国際会議 0件)

② 口頭発表 (国内会議 8件、国際会議 0件)

1. 加藤茂樹、松元信弘、山内清明、平島光臣 マウスダニ喘息モデルにおける抗 CD44 抗体投与の効果、第 34 回日本免疫学会総会、横浜、2004 年 12 月
2. 加藤茂樹 好酸球性気道炎症における CD44 の役割、第 45 回日本呼吸器学会総会、千葉、2005 年 4 月
3. 加藤茂樹、福島喜代康、松元信弘、江原尚美、松本 亮、平島光臣 慢性好酸球

- 性肺炎における BALF 中好酸球の CXCR3 発現および CXCR3 リガンドの検討、第 55 回日本アレルギー学会総会、盛岡、2005 年 10 月
4. 加藤茂樹 ダニ抗原誘発マウス喘息モデルにおける抗 CD44 抗体投与による治療効果、第 46 回日本呼吸器学会総会、東京、2006 年 6 月
  5. 加藤茂樹、平島光臣 ガレクチン 9 による CD44 機能抑制およびマウスダニ喘息モデルの治療効果に関する検討、第 55 回日本アレルギー学会総会、東京 2006 年 11 月
  6. 加藤茂樹、平島光臣 ガレクチン 9 によるダニ抗原誘発マウスアトピー型急性喘息モデルの抑制効果、第 57 回日本アレルギー学会総会、横浜 2007 年 11 月
  7. 加藤茂樹、延本篤也、竹下慶亮、山内清明、平島光臣 Galectin-9 inhibits CD44-hyaluronan interaction and suppresses a murine model of allergic Asthma. 第 37 回日本免疫学会総会 東京 2007 年 11 月
  8. 加藤茂樹 ガレクチン 9 による CD44 機能抑制およびダニ抗原誘発マウスアトピー型急性喘息モデルの治療効果に関する検討 第 48 回日本呼吸器学会総会 神戸 2008 年 6 月

③ ポスター発表 (国内会議 0 件、国際会議 6 件)

1. KATO S., MATSUMOTO N., TOMINAGA A. A role for CD44 in an antigen-induced murine model of pulmonary eosinophilia. 12<sup>th</sup> International Congress of Immunology. カナダ・モントリオール、2004 年 7 月
2. KATO S., FUKUSHIMA K., MATSUMOTO N., EHARA N., YAMAUCHI A., HIRASHIMA M. The accumulation of CXCR3-expressing eosinophils and increased concentration of its ligands (IP10 and Mig) in bronchoalveolar lavage fluid of patients with chronic eosinophilic pneumonia. ドイツ・ミュンヘン、2005 年 6 月
3. KATO S., YAMAUCHI A., HIRASHIMA M. Galectin-9 negatively regulates CD44-hyaluronic acid interaction and its role in murine model of bronchial asthma. XXV Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI) 、ウィーン、オーストリア 2006 年 6 月、
4. KATO S., NOBUMOTO A., TAKESHITA K., YAMAUCHI A., HIRASHIMA M. Galectin-9 negatively regulates CD44-hyaluronic acid interaction and its role in murine model of bronchial asthma. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 京都 2006 年 6 月
5. KATO S., YAMAUCHI A., HIRASHIMA M. Galectin-9 inhibits CD44-hyaluronan interaction and suppresses a murine model of allergic asthma. 20th World Allergy Organization Congress タイ、バンコク 2007 年 12 月
6. KATO S., MAEDA S., FUKUOKA H., WADA T., YAMAGUCHI K., MIYAGI T. A role of sialidase in the hyaluronic acid binding ability of CD4+ T cells in a murine model of allergic asthma. 27th Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, EAACI スペイン、バルセロナ 2008 年 6 月

(3)特許出願

- ①国内出願 (0 件)
- ②海外出願 (0 件)

(4)受賞等

- ①受賞 なし。
- ②新聞報道 なし。
- ③その他 なし。

(5)その他特記事項

なし。

## 東グループ

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 1件、国際(欧文)誌 0件)

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

④ 招待講演 (国内会議 2件、国際会議 0件)

東 秀好、細胞表面糖鎖受容体を介した神経細胞の分化と機能の調節, 第143回日本獣医学会学術集会 比較薬理学・毒性学会企画シンポジウム, つくば, 2007年4月

東 秀好、糖鎖シグナルによる神経細胞分化, 東北薬科大学生涯教育講演会、仙台, 2007年11月17日

⑤ 口頭発表 (国内会議 4件、国際会議 0件)

東 秀好(理研・脳研、CREST JST)

細胞膜表面糖鎖受容体を介した糖鎖シグナルによる神経細胞機能の調節、第126年会日本薬学会、仙台、3月28日(2006)

東 秀好、糖鎖受容体を介した神経細胞の分化調節, 平成19年度 東北薬科大学分子生体膜研究所 学術フロンティアシンポジウム「がんと糖鎖」, 仙台, 2007年10月

東 秀好、糖鎖受容体を介した糖鎖シグナルによる神経分化制御, 第1回東北糖鎖研究会, 仙台, 2007年12月

渡辺俊, 東秀好(東北薬大・生体膜情報学)、疼痛関連物質としてのスフィンゴ糖脂質、第2回東北糖鎖研究会, 弘前, 2008年9月

⑥ ポスター発表 (国内会議 2件、国際会議 0件)

東 秀好、平林義雄(理研・脳研、CREST JST)

コンドロイチン硫酸糖鎖による神経分化に関わるガングリオシド糖鎖シグナル系の活性化、第25回日本糖質学会年会、大津、7月21日(2006)

東 秀好、宮城妙子、平林義雄(東北薬大、宮城がんセ、理研BSI、CREST JST)

細胞膜シアリダーゼNeu3によるカルシウムシグナル増強とインスリン分泌調節  
第26回日本糖質学会年会、仙台、2006年8月23-25日

(3)特許出願

無し

(4)受賞等

無し

(5)その他特記事項

無し

## 古川グループ

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 2件)

- 1) 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* 98, 512-520, 2007
- 2) Zhang, Q., Furukawa, K., Chen, H. H., Sakakibara, T., Urano, T., and Furukawa, K. : Metastatic potential of mouse Lewis lung cancer cells in regulated via ganglioside GM1 by modulating the matrix metalloprotease-9 localization in lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 281, 18145-18155, 2006

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

⑦ 招待講演 (国内会議 0 件、国際会議 0 件)

⑧ 口頭発表 (国内会議 3 件、国際会議 2 件)

- 1) Furukawa, F., Hamamura, K., Tsuji M., Miyazaki, S., Nakashima, H., Furukawa, K.: Mechanisms for the enhancement of malignant signals with ganglioside GD3 in human melanoma cells, 14<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium, Germany (September 2-7, 2007)
- 2) Ohkawa, Y., Miyazaki, S., Hamamura, K., Miyata, M., Tajima, O., Urano, T., Furukawa, K., Furukawa, K.: Involvement of integrins in the malignant phenotypes of human melanomas enhanced by ganglioside GD3: 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama (2007 年 10 月 3 日～5 日)
- 3) 大川祐樹、宮崎清香、浜村和紀、宮田麻衣子、大海雄介、田島織絵、古川圭子、古川鋼一: Ganglioside GD3 enhances integrin functions in human malignant melanomas: 第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜(2007 年 12 月 11 日～15 日)
- 4) Furukawa K., Miyazaki S., Tsuji M., Furukawa K.: Involvement of integrins in the malignant phenotypes enhanced by ganglioside GD3 expression in human melanoma cells. *Glycobiology and Sphingobiology 2007 (GS2007)- Hakomori Commemorative Forum - Tokushima*, (February27- March 1, 2007)
- 5) Furukawa, K., Hamamura, K., Nakashima, H., and Furukawa, K.: Fuctional implication of intracellular lo-calization of ganglioside GD3 in malignant melanoma cells. XVIII International Symposium on Glycoconjugates. Firenze, Italy (Sept. 2005)

⑨ ポスター発表 (国内会議 24 件、国際会議 6 件)

- 1) 古川圭子、田島織絵、神戸真理子、宮田麻衣子、宮城妙子、古川鋼一:ヒトメラノーマ細胞におけるシアリダーゼ Neu3 の癌性形質への関与。第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋 (2008 年 10 月 28～30 日)
- 2) Furukawa, K., Tsuji, M., Hamamura, K., Nakashima, H., Furukawa, K.: Roles of Src family kinases in the malignant properties of melanomas enhanced by ganglioside GD3: 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama (2007 年 10 月 3 日～5 日)
- 3) 山内祥生、宮崎清香、古川圭子、辻桃子、浜村和紀、古川鋼一:メラノーマ細胞におけるガングリオンド GD3 依存的な脂質代謝制御。第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜(2007 年 12 月 11 日～15 日)
- 4) 古川圭子、田島織絵、神戸真理子、古川鋼一、森谷節子、宮崎妙子:ヒトメラノーマにおける Neu3 過剰発現の効果。第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜(2007 年 12 月 11 日～15 日)
- 5) 辻桃子、浜村和紀、中島英行、古川圭子、宮崎清香、浦野健、古川鋼一: GD3 によるヒトメラノーマの細胞浸潤機能増強における Src family kinase の関与。第 65 回日本癌学会学術総会、横浜 (2006 年 9 月)
- 6) 宮崎清香、古川圭子、浜村和紀、中島英行、辻桃子、古川鋼一: 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。第 65 回日本癌学会学術総会、横浜 (2006 年 9 月)
- 7) 中島英行、浜村和紀、古川圭子、光藤健司、藤内祝、上田実、浦野健、古川鋼一:Caveolin-1 遺伝子発現によるメラノーマの癌形質抑制とその機構。第 65 回日本癌学会学術総会、横浜 (2006 年 9 月)
  - 8) Hamamura, K., Tsuji, M., Nakashima, H., Ueda, M., Furukawa, K., Furukawa, K.: Important roles of Src family kinase Yes in the signal enhancement with GD3 in malignant melanoma cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan, June 2006
  - 9) Furukawa, K., Hamamura, K., Miyazaki, S., Furukawa, K.: Interaction of GD3 with functional molecules in the vicinity of the cell membrane, leading to the malignant phenotypes of human melanomas. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan, June 2006
  - 10) Nakashima, H., Hamamura, K., Furukawa, K., Tohnai, I., Ueda, M., Urano, T., Furukawa, K.: Overexpression of caveolin-1 attenuates signals by altering raft-localization of ganglioside GD3 in malignant melanoma cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan, June 2006
  - 11) 古川圭子、浜村和紀、清水賢三、林 高則、章 青、中野純二、古川鋼一:GD3発現によるヒト・メラノーマ細胞の増殖および浸潤性の亢進メカニズム。第78回日本生化学会大会、神戸 (2005年10月)
  - 12) 浜村和紀、古川圭子、林 高則、中島英行、上田 実、浦野 健、古川鋼一:メラノーマでは、ガングリオシドGD3がlipid raft を介して、p130Casおよびpaxillinのリン酸化を亢進する。第78回日本生化学会大会、神戸(2005年10月)
  - 13) 中島英行、浜村和紀、古川圭子、光藤健司、藤内 祝、上田 実、浦野 健、古川鋼一: Caveolin-1遺伝子発現によるメラノーマの癌形質抑制とその機構。第64回日本癌学会学術総会、札幌(2005年9月)
  - 14) 大海雄介、中島英行、浜村和紀、中野純二、浦野 健、古川圭子、古川鋼一:ヒトメラノーマにおける酸性糖脂質GD2の分子機能の解析。第64回日本癌学会学術総会、札幌 (2005年 9月)
  - 15) 浜村和紀、古川圭子、林 高則、中島英行、中野純二、上田 実、古川鋼一:メラノーマでは GD3がphosphatidylinositol 3-Kinase を介して細胞増殖および浸潤能を促進する。第64回日本癌学会学術総会、札幌(2005年9月)
  - 16) 高 賢樹、古川圭子、高橋 隆、浦野 健、椰野正人、二村雄次、古川鋼一:糖鎖合成酵素遺伝子を標的にした肺癌治療の基礎的検討。第64回日本癌学会学術総会、札幌 (2005年9月)
  - 17) 古川 鋼一、浜村和紀、古川圭子:メラノーマ治療の標的分子としてのガングリオシド。第64回日本癌学会学術総会、札幌(2005年 9月)
  - 18) Furukawa, K., Hamamura, K., Hayashi, T., Nakashima, H., and Furukawa, K.: Mechanisms for accelerated cell growth and invasion activity with GD3 expression in human melanomas. XVIII International Symposium on Glycoconjugates. Firenze, Italy, Sept. 2005
  - 19) Hamamura, K., Furukawa, K., Hayashi, T., Nakashima, H., Ueda, M., and Furukawa, K.: Lipid raft is involved in the enhanced phosphorylation of p130Cas and paxillin induced by ganglioside GD3 in malignant melanoma cells. XVIII International Symposium on Glycoconjugates. Firenze, Italy, Sept. 2005
  - 20) Nakashima, H., Hamamura, K., Furukawa, K.,Tohnai, I., Ueda, M., Urano, T., and Furukawa, K.: Overexpression of caveolin-1 attenuates signals by altering raft-localization of ganglioside GD3 in malignant melanoma cells. XVIII International Symposium on Glycoconjugates.

Firenze, Italy, Sept. 2005

- 21) 古川圭子: スフィンゴ糖脂質による癌性形質獲得の分子メカニズム。糖鎖科学名古屋拠点シンポジウム、名古屋(2005年3月)
- 22) 愛親覚羅 維、吉田祥子、古川圭子、章 青、浜村和紀、原 和志、古川鋼一: 抗GD2抗体により誘導される小細胞性肺癌細胞のアポトーシスのメカニズム。第77回日本生化学会大会、横浜(2004年10月)
- 23) 林 高則、古川圭子、浜村和紀、服部武志、中野純二、古川鋼一: GD3 発現に基づくメラノーマ悪性形質における p130Cas 及び paxillin の役割。第77回日本生化学会大会、横浜(2004年10月)
- 24) 古川圭子、浜村和紀、林 高則、服部武志、中野純二、章 青、古川鋼一: メラノーマにおける GD3 の増殖・浸潤能亢進の分子機構。第63回 日本癌学会学術総会、福岡(2004年9-10月)
- 25) 浜村和紀、古川圭子、林 高則、中島英行、中野純二、奥田徹哉、水谷英樹、服部 宇、上田 実、古川鋼一: GD3 メラノーマの悪性化の分子機構。第63回 日本癌学会学術総会、福岡(2004年9-10月)
- 26) 中島英行、浜村和紀、古川圭子、藤内 祝、上田 実、浦野 健、古川鋼一: Cveolin-1 遺伝子発現による細胞増殖の抑制機構。第63回 日本癌学会学術総会、福岡(2004年9-10月)
- 27) 高 賢樹、古川圭子、高橋 隆、椰野正人、二村雄次、古川鋼一: 糖鎖合成酵素遺伝子を標的にした小細胞性肺癌治療の基礎的検討。第63回 日本癌学会学術総会、福岡(2004年9-10月)
- 28) 西尾将史、福本敏、古川圭子、浦野健、古川鋼一: 酸性糖脂質 GM1 による PC12 細胞の分化・生存の制御機構。第26回日本分子生物学会年会シンポジウム、神戸(2003年12月)
- 29) 浜村和紀、古川圭子、中野純二、小木曾学、奥田徹哉、西尾将史、服部宇、上田実、古川鋼一: GD3 合成酵素遺伝子発現による細胞増殖亢進のメカニズムの検討。第62回日本癌学会総会、名古屋(2003年9月)
- 30) 古川圭子、土田明子、岡島徹也、吉田有人、中村曜子、神奈木玲児: シアル酸転移酵素 ST6GalNAcVI によるヒト大腸癌細胞株における Disialyl Lewis a の合成。第62回日本癌学会総会、名古屋(2003年9月)

(3) 特許出願

- ①国内出願 (0件)
- ②海外出願 (0件)

(4) 受賞等

- ①受賞: 無し
- ②新聞報道: 無し
- ③その他: 無し

(5) その他特記事項

関連論文等: 8編

- 1) Furukawa, K., Hamamura, K., Nakashima H., Furukawa K.: Molecules in the signaling pathway activated by gangliosides can be targets of therapeutics for malignant melanomas. *Proteomics.*, 8(16), 3312-3316, 2008
- 2) Ohkawa, Y., Miyazaki, S., Miyata, M., Hamamura, K., Furukawa, K., and Furukawa, K.; Essential roles of integrin-mediated signaling for the enhancement of malignant properties of melanomas based on the expression of GD3. *Biochem Biophys Res Commun.* 373(1):14-19., 2008

- 3) 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
- 4) 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
- 5) Hamamura, K., Furukawa, K., Hayashi, T., Hattori, T., Nakano, J., Nakashima, H., Okuda, T., Mizutani, H., Hattori, H., Ueda, M., Urano, T., Lloyd, K. O., and Furukawa, K. : Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11041-11046, 2005
- 6) Aixinjueluo, W., Furukawa, K., Zhang, Q., Hamamura, K., Tokuda, N., Yoshida, S., Ueda, R., and Furukawa, K. : Mechanisms for the apoptosis of small cell lung cancer cells induced by anti-GD2 monoclonal antibodies: Roles of anoikis. *J. Biol. Chem.* 280, 29828-29836, 2005
- 7) Kamimura Y, Furukawa, K., Kittaka, D., Nishio, M., Hamamura, K., Fukumoto, S., and Furukawa, K.: Differential enhancing effects of  $\alpha$ 2,8-sialyltransferase on the cell proliferation and mobility. *Int. J. Oncol.* 26, 337-344, 2005
- 8) Nishio, M., Fukumoto, S., Furukawa, K., Ichimura, A., Miyazaki, H., Kusunoki, S., Urano, T., Furukawa, K.: Over-expressed GM1 suppresses NGF signals by modulating the intra-cellular localization of NGF receptors and membrane fluidity in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 279, 33368-33378, 2004

## 袖岡グループ

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 4件、国際(欧文)誌 4件)

- 1) Go Hirai, Toru Watanabe, Kazunori Yamaguchi, Taeko Miyagi, and Mikiko Sodeoka  
Stereocontrolled and Convergent Entry to  $CF_2$ -Sialosides: Synthesis of  $CF_2$ -linked Ganglioside GM4  
*J. Am. Chem. Soc.* 129, 15420-15421, 2007.
- 2) Toru Watanabe, Go Hirai, Marie Kato, Daisuke Hashizume, Taeko Miyagi, and Mikiko Sodeoka  
Synthesis of  $CH_2$ -Linked (2,3)-Sialylgalactose Analogue: On the Stereoselectivity of the Key Ireland-Claisen Rearrangement  
*Org. Lett.* 10, 4167-4170, 2008.
- 3) Keiko Hata, Koichi Koseki, Kazunori Yamaguchi, Setsuko Moriya, Yasuo Suzuki, Sangchai Yingsakmongkon, Go Hirai, G. Mikiko Sodeoka, Mark von Itzstein, and Taeko Miyagi:  
Limited Inhibitory Effects of Oseltamivir and Zanamivir on Human Sialidases.  
*Antimicrob. Agents Chemother.* 25, 3484-3491, 2008.
- 4) Mikiko Sodeoka, Go Hirai, Toru Watanabe, and Taeko Miyagi  
A strategy for constructing C-sialosides based on Ireland-Claisen rearrangement and its application for synthesis of  $CF_2$ -linked ganglioside GM4 analogue  
*Pure Applied Chem.* 81, 205-215, 2009

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

《発表者、タイトル、学会名、場所、月日等》

①招待講演 (国内会議 0件、国際会議 2件)

Mikiko Sodeoka

Design and Synthesis of Probe Molecules for Biological Research  
17th International Conference on Organic Synthesis (ICOS-17)

Daejeon, Korea, 6.22-6.27 (2008)

Mikiko Sodeoka

Stereoselective synthesis of bioactive fluorine-containing molecules

236th ACS National Meeting (Symposium on Fluorinated Biologically Active Compounds: Synthesis and Properties)

Philadelphia, USA, 8.17-8.19 (2008)

②口頭発表 (国内会議 7件、国際会議 0件)

1) 渡邊亨、平井剛、宮城妙子、袖岡幹子

シアリダーゼ阻害剤を志向した  $CF_2$ -linked Sialylgalactose の合成  
日本化学会第 87 春季年会、関西大学、2007.3.25-28.

2) 渡邊亨、平井剛、宮城妙子、袖岡幹子

C-グリコシド結合を有するシアリルガラクトース類の系統的合成法の開発  
第 91 回有機合成シンポジウム、東京工業大学、2007.6.12-13..

3) 平井剛

ヒトシアリダーゼ Neu3 阻害剤開発に向けた炭素連結型ガングリオシドアナログの合成  
第 42 回天然物化学談話会、仙台-秋保、2007.7.11-13.

4) 渡邊亨、平井剛、加藤麻理依、宮城妙子、袖岡幹子

Ireland-Claisen 転位反応を鍵とする含フッ素炭素連結型シアリルガラクトースの合成  
日本化学会第 88 春季年会、立教大学、2008.3.26-30.

5) 平井剛、渡邊亨、加藤麻理依、袖岡幹子

新規 C-シアロシド構築法の開発と  $CF_2$ -連結型 GM4 アナログの合成  
第 6 回次世代を担う有機化学シンポジウム、東京、5.30-5.31 (2008)

6) 平井剛、渡邊亨、加藤麻理依、山口壹範、森谷節子、宮城妙子、袖岡幹子

$CF_2$ -連結型 GM4 の合成と活性  
第 28 回日本糖質学会年会、筑波、2008.8.18-20

7) 平井剛、渡邊亨、加藤麻理依、岡田光晶、袖岡幹子

含フッ素ガングリオシドアナログの合成  
シンポジウム分子アンサンブル 2008、和光、2008.12.3.

③ポスター発表 (国内会議 2件、国際会議 0件)

1) 渡邊亨、平井剛、宮城妙子、袖岡幹子

C-結合型シアリルガラクトースを含むガングリオシドアナログの合成  
第 27 回日本糖質学会年会、福岡、2007.8.1-3.

2) 平井剛、加藤麻理依、渡邊亨、岡田光晶、袖岡幹子

Synthesis of C-linked(2,3)-sialylgalactose analogues  
システム糖鎖生物学国際シンポジウム、東京、2008.12.5.

(3) 特許出願

なし

(4) 受賞等

なし  
(5)その他特記事項  
なし

## §7 研究期間中の主な活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成16年7月31日	Sendai Glycolipid Symposium	仙台	約50名	ガングリオシド代謝に関する国際ワークショップ
平成18年8月23-25日	第26回日本糖質学会年会	仙台	約700名	糖質および複合糖質に関する年会
平成15年1月29日	第一回 CTREST 研究打ち合わせ会	名取	18名	研究打ち合わせ
平成16年2月21日	第二回 CTREST 研究打ち合わせ会	名取	21名	研究打ち合わせ
平成17年2月9日	第二回 CTREST 研究打ち合わせ会	名取	20名	研究打ち合わせ

## §8 結び

これまでの約5年間、CREST研究を進めて来たが、がんのシアリダーゼ研究に関して、歩みは遅いものの、ある程度の進展が見られた。臨床応用の可能性を探り、実際に臨床試験等に進めたいと願っている。

最近、前立腺癌のNEU3についてまた新しい知見が得られつつあり、NEU3の生理機能についても非常に興味ある結果が得られているので、本年度内にこれらに関する論文投稿までこぎ着け、CRESTによる成果としたい。しかし、糖尿病に関しては、鈴木グループの事情により、シアリダーゼに関する検討が遅れているが、現在、糖尿病患者で認められたNEU3遺伝子の多型と機能との関連性を示す可能性のある有意義な結果が出たので、こちらも論文作成中である。

CREST研究は、ある程度、課題に沿った形で具体的に進めることと理解しているが、それが容易ではない状況にあるグループもある。しかし、実際にはすべてのグループに何らかの形で努力していただいております、成果に必ずしも結びつかないグループもあるが、感謝申し上げます。

