

平成21年 5月27日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590298
 研究課題名（和文） 低酸素誘導因子（HIF）により誘導される細胞接着関連遺伝子の転写クラスター解析
 研究課題名（英文） Analysis of Transcription Clusters Induced by Hypoxia Inducible Factor (HIF)
 研究代表者
 神奈木 玲児 (KANNAGI REIJI)
 愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・部長
 研究者番号：80161389

研究成果の概要：細胞接着に関与する遺伝子のうちに、低酸素誘導因子(HIF)により誘導されるものを検索し、多数の遺伝子を見いだした。これらの遺伝子のHIFによる誘導機構を解析し、一部の遺伝子群は調節領域に複数の低酸素反応エレメント(HRE, hypoxia-responsive-element)を持ち、HIF単独で有意な転写誘導が見られること、他の一群の遺伝子は単一のHREを持ち、HIF以外の転写因子と協同して転写を誘導することを明らかにした。後者については共役転写因子の同定を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：生体分子医学

1. 研究開始当初の背景

細胞接着は多くの疾患の病態生理に深く関連している。最近我々は低酸素(hypoxia)によって細胞接着が強く促進されることを見いだした。細胞-細胞外マトリックス間の接着としては、とくに細胞外マトリックス中のフィブロネクチンへの接着が低酸素により強く誘導される。また、細胞-細胞間の接着としては、セレクチンを介した細胞接着が低酸素により強く誘導される。

こうした低酸素によるフィブロネクチンやセレクチンを介した細胞接着の亢進は、心疾患や脳神経系の虚血性疾患をはじめとする多くの疾患の

病態生理を考える上で重要であると思われた。

2. 研究の目的

こうした細胞接着の亢進の分子生物学的メカニズムを知るために低酸素および正常酸素下での遺伝子発現の変化をDNAマイクロアレイによって検索したところ、低酸素によって α 5-インテグリン (*ITGA5*)およびシンデカン-4 (*SDCA4*)遺伝子の転写誘導が観察された。これらはいずれも、フィブロネクチンへの接着を媒介する分子である。また、低酸素によってフコース転移酵素 *FUT7*、シアル酸転移酵素 *ST3O*、UDP-ガラクトーストラ

ンスポーター *UGT1*、シアル酸トランスポーター *SIALIN* の転写の誘導が観察された。これらはセレクチンの特異的リガンド合成に関与する遺伝子である。

これらの低酸素による誘導の背景には、転写因子 hypoxia inducible factor (HIF) の働きがあると考えられる。これら一連の遺伝子の HIF による転写誘導機構を予備的に解析したところ、これらの遺伝子はおもに次の二つの転写クラスターに分かれることを示す成績が得られた。一つのグループは、調節領域に複数の HIF 結合部位(hypoxia responsive element, HRE)と考えられるシクエンスを持ち、低酸素によって強く誘導される。もう一つのグループは、調節領域に HRE が一つだけ存在するものからなるクラスターである。この場合は、条件によって、また用いる細胞によって、低酸素によってきわめて強く誘導される場合もあり、条件や細胞を変えると軽度～中等度の転写誘導にとどまる。この場合には、HIF は当該遺伝子の調節領域に結合部位を持つ他の転写因子と共同して転写を誘導していると考えられ、HIF のパートナーとなる転写因子の存在とその活性が、低酸素による誘導の程度を規定していると考えられる。

そこで本研究では、以上のようなこれまでの基盤の上に立ち、転写因子 HIF による細胞接着誘導の分子生物学的メカニズムの解明をさらに進めることを目的とした。具体的には、低酸素によって誘導される細胞接着分子に関連した遺伝子についてこれまでの検索より広範なスクリーニングを行ってさらに多数の遺伝子を見だし、またそれぞれの遺伝子について、HIF による転写誘導のメカニズムを明らかにする。HIF が他の転写因子と共同して転写を誘導している遺伝子の場合には、HIF と共役してはたらく転写因子の同定を進める。

3. 研究の方法

低酸素によって誘導される細胞接着に関連した遺伝子は我々がこれまでに明らかにしたものの以外にもいくつかあることが判明しつつある。これまでの検索より細胞の種類を広げ、DNA マイクロアレイおよび RT-PCR を用いてより広範なスクリーニングを行い、さらに多くの低酸素で誘導される細胞接着関連遺伝子をあらたに見いだした。低酸素によって誘導されることが明らかになった遺伝子については、調節領域を解析し、クロマチン免疫沈降法(ChIP 法)、ルシフェラーゼを用いたリポーターアッセイなどによって転写誘

導の機構を解析した。これらの遺伝子を、調節領域に HRE を複数持ち、低酸素によって強く誘導されるクラスターに属するか、HIF が他の転写因子と共同作用する遺伝子のクラスターに属するかを検討した。後者に属する遺伝子については、HIF のパートナーとなる転写因子の候補について、HIF と実際に結合能があるかどうかを免疫沈降法(IP 法)などにより解析した。低酸素によるこれら遺伝子発現の結果、細胞レベルでの変化が実際に生起するかどうかを、接着実験などの細胞生物学的実験により調査した。

4. 研究成果

低酸素で誘導される細胞接着関連遺伝子について、これまでより広範なスクリーニングを行ったところ、さらに多くの低酸素で誘導される細胞接着関連遺伝子をあらたに見いだした。そのなかには、細胞接着分子 CD44 の特異的リガンドであるヒアルロン酸の合成酵素遺伝子、ガラクトースおよび硫酸基の転移に関わる遺伝子などが含まれていた。ガングリオシドの脂質部分を構成するセラミド部分の修飾にかかわる遺伝子である *FA2H*、*DES1* なども低酸素で誘導されることが明らかになった。また、低酸素に伴いシアル酸の分子種が変化し、KDN が増量することが判明した。従来から KDN はシアル酸トランスポーター (*Sialin*) によっては輸送されないとされているので、このことは低酸素により、*Sialin* 以外のシアル酸関連遺伝子が変動していることを示す。背景因子としてシアル酸の *de novo* の生合成に関わる *N*-acetylneuraminic acid 9-phosphate synthetase (*NPS*) および phosphomannoisomerase (*PMI*) の低酸素による誘導が考えられた。これら遺伝子のうち一部のものについては調節領域を解析し、Luciferase を用いたリポーターアッセイや ChIP 法により HIF 結合部位を同定することが出来た。

低酸素によるこれら遺伝子の転写誘導機構の解析から、*UGT1* や *ST3O* に加え、ヒアルロン酸の合成酵素遺伝子の調節領域も複数の HRE を持ち、HIF 単独で十分な転写誘導がもたらされることが明らかになった。一方、HIF と他の転写因子の協調作用によってはじめて有意の転写が誘導される遺伝子については、*FUT7* について解析を進め、共役する他の転写因子の解析を進展させ、当該転写因子の HIF との結合を IP 法により確認した。

また、低酸素によるこれらの遺伝子の転写誘導が、実際に細胞表面での当該分子の発現の

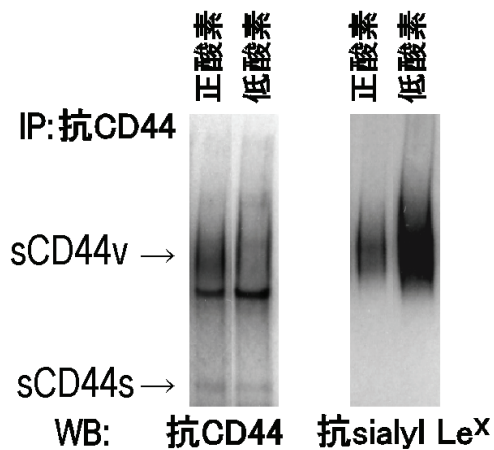


図. 低酸素により CD44 それ自体の発現には大きな変化がない(左)が、CD44 分子上のシアリルルイスX糖鎖の発現が著明に亢進する(右)ことを示す免疫沈降実験の一例。

亢進につながり、細胞接着能の変化を引き起こしているかどうかについて、細胞生物学的レベルの実験で確認を試み、フローサイトメトリーで実際の細胞表面での発現誘導を検出し、細胞接着実験で有意の接着亢進の結果を得た。低酸素状態では、これらの遺伝子の変化により細胞表面の糖鎖のうち接着能を持つものに大きな変動が起こるものと考えられた。

今回得られた実験結果で興味深いと考えられたのは、低酸素で CD44 分子の持つ糖鎖のうちにセレクチンのリガンドであるシアリルルイスaやシアリルルイスXが増加することである(図)。これにより、CD44 分子は一方でセレクチンのリガンドとしても機能し、しかもそのリガンド活性は低酸素で亢進することが明らかとなった。他方、CD44 はそれ自体が細胞接着分子であり、ヒアルロン酸糖鎖と結合するが、低酸素によりヒアルロン酸合成酵素が誘導され、リガンドの増量により CD44/ヒアルロン酸系の細胞接着も亢進することが観察された。このように、CD44 は一方ではセレクチン/糖鎖リガンドの結合を介した細胞接着を媒介し、他方で CD44/ヒアルロン酸の結合を介した細胞接着も媒介する、一個で二重の細胞接着活性を持つ分子であるが、その両方の接着活性が、低酸素でともに亢進し、その結果細胞接着が相乗的に亢進することは、興味深い現象であると考えられた。我々が見いだした低酸素で誘導される細胞接着関連遺伝子は、その遺伝子産物のレベルでも緊密に関連していることが示唆される。複数の細胞接着関連遺伝子が低酸素によって同期して転写誘導されることによって細胞接着分子に相乗的な機能変化を起こ

す現象は、これまでほとんど着目されることなかったものであり、今後さらに深く研究する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Chen, G.-Y., Sakuma, K., and Kannagi, R. Significance of NF- κ B/GATA axis in TNF- α -induced expression of 6-sulfated cell-recognition glycans in human T-lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, **283**: 34563-34570, 2008. [査読有]
2. Kannagi, R., Yin, J., Miyazaki, K., and Izawa, M. Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**: 525-531, 2008. [査読有]
3. Koyama, H., Kobayashi, N., Harada, M., Takeoka, M., Kawai, Y., Sano, K., Fujimori, M., Amano, J., Ohhashi, T., Kannagi, R., Kimata, K., Taniguchi, S., and Itano, N. Significance of tumor-associated stroma in promotion of intratumoral lymphangiogenesis. Pivotal role of a hyaluronan-rich tumor microenvironment. *Am. J. Pathol.*, **172**: 179-193, 2008. [査読有]
4. Lim, K.-T., Miyazaki, K., Kimura, N., Izawa, M., and Kannagi, R. Clinical application of functional glycoproteomics - dissection of glycotopes carried by soluble CD44 variants in sera of patients with cancers. *Proteomics*, **8**: 3263-3273, 2008. [査読有]
5. Zhang, H., Yoshioka, S., Miyazaki, M., Kannagi, R., and Suzuki, A. Core 2 GlcNAc modification and megalin ligand-binding activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**: 479-485, 2008. [査読有]
6. Go, S., Sato, C., Yin, J., Kannagi, R., and Kitajima, K. Hypoxia-enhanced expression of free deaminoneuraminic acid in human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **357**: 537-542, 2007. [査読有]
7. Hu, R., Li, G., Kamijo, Y., Aoyama, T., Nakajima, T., Inoue, T., Node, K., Kannagi, R., Kyogashima, M., and Hara, A. Serum sulfatides as a novel biomarker for cardiovascular disease in patients with end-stage renal failure. *Glycoconj. J.*, **24**: 565-571, 2007. [査読有]
8. Kimura, N., Ohmori, K., Miyazaki, K., Izawa, M., Matsuzaki, Y., Yasuda, Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Moriyama, A., and Kannagi, R. Human B-lymphocytes express α 2-6 sialylated 6-sulfo-N-acetyllactosamine serving as a preferred

ligand for CD22/siglec-2. *J. Biol. Chem.*, **282**: 32200-32207, 2007. [査読有]

[学会発表] (計 6件)

1. Kannagi R: Hypoxia-induced expression of cancer-associated glycoconjugates. The 27th Sapporo Cancer Seminar International Symposium "Glycomics: new perspectives in cancer cell behavior" Sapporo, July 12-14, 2007.
2. Kitajima K, Go S, Yin J, Kannagi R: *De novo* synthesis of free deaminoneuraminic acid (Kdn) is regulated by network of metabolisms of sialic acids and mannose 6-phosphate in normal and tumor cells. 19th International Symposium on Glycoconjugates (Glyco19). Cairns, Australia, July 15-20, 2007.
3. Yin J, Izawa M, Miyazaki K, Chen GY, Cheng FL, Lin CH, Kannagi R: *N*-glycolyl G_{M2}, a cancer-associated ganglioside on human breast and colon cancers induced by tumor hypoxia. 19th International Symposium on Glycoconjugates (Glyco19). Cairns, Australia, July 15-20, 2007.
4. Yin J, Izawa M, Miyazaki K, Kannagi R: Changes in molecular species of cancer-associated G_{M2} ganglioside induced by tumor hypoxia. Gordon Research Conferences 2008 "Glycolipid & Sphingolipid Biology" (Chaired by Gerrit Van Meer), Barga, Italy, Feb. 17-22, 2008.
5. Chen G-Y, Sakuma K, Kannagi R: Regulation of glycosyltransferase gene expression involved in lymphocyte homing. Sixth International Glycosyltransferase Conference (GlycoT2008), Atlanta, USA, May 17-21, 2008.
6. Kannagi R, Ohmori K, Sakuma K, Kimura N: Sialylated and sulfated ligands on human B-lymphocytes for CD22/Siglec2. The 12th International Conference on Biology and Chemistry of Sialic Acid (SialoGlycoT2008), St.Petersburg, Russia, July 21-26, 2008.

[図書] (計 2件)

1. Varki, A., Kannagi, R., and Toole, B.P. Glycosylation changes in cancer. In: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, G.W. Hart and J.D. Marth (eds.), *Essentials of Glycobiology 2nd Edition*, pp. 617-632, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008.
2. Kannagi, R., Miyazaki, K., Kimura, N., and Yin, J. Selectin-mediated metastasis of tumor cells: Alteration of carbohydrate-mediated cell-cell interactions in cancers

induced by epigenetic silencing of glycogenes. In: C. Sansom and O. Markman (eds.), *Glycobiology*, pp. 274-287, Oxfordshire, UK., Scion Publishing Ltd., 2007.

[その他]

ホームページ

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/400/420/421/421-07.html>

http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/english/s-report/06_07/07mp.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神奈木 玲児 (KANNAGI REIJI)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・部長

研究者番号 : 80161389

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

田口 修 (TAGUCHI OSAMU)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・室長

研究者番号 : 00142167

京ヶ島 守 (KYOGASHIMA MAMORU)

愛知県がんセンター・分子病態学部・主任研究員

研究者番号 : 50225091

佐久間 圭一郎 (SAKUMA KEIICHIRO)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・主任研究員

研究者番号 : 90402891

後藤 嘉子 (GOTO YOSHIKO)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・技師

研究者番号 : 30416169

安川 然太 (YASUKAWA ZENNTA)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・リサーチレジデント

研究者番号 : 60443454