

平成21年6月30日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2007～2008

課題番号：

研究課題名（和文）消化管正常型糖鎖 Sd^a を認識するレクチンの探索研究課題名（英文）Study to find lectins, ligands for Sd^a carbohydrate antigen, which is normally expressed in gastrointestinal tract

研究代表者

河村 由紀 (Kawamura I. Yuki)

国立国際医療センター（研究所）・消化器疾患研究部・研究員

研究者番号：10392391

研究成果の概要：Sd^a 合成酵素活性を導入することで作製した Sd^a 発現細胞を用い、既知の動物レクチンとの結合活性をスクリーニングしたが、Sd^a 認識レクチンは見出されなかった。ヒト組織ないし初代培養細胞を用いて更に検索した結果、Sd^a 認識レクチンを発現する正常臓器および細胞を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000		1,300,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	450,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器学（食道・胃・小腸・大腸）

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

消化管上皮細胞では癌化に伴い種々の糖鎖の発現パターンが変化することが知られている。申請者らはこれまでに、血液型糖鎖 Sd^a 抗原は正常消化管に発現するが、胃癌・大腸癌組織においては消失していること、Sd^a 糖鎖合成の鍵となる糖転移酵素活性も癌組織では早期から減少していることを明らかにしてきた。近年、申請者は Sd^a 合成酵素のクローニングを行い、その性状解析を行った結果、Sd^a 合成酵素活性を胃癌・大腸癌細胞に導入すると、癌抗原である CA19-9、SLX 糖鎖の合成が強力に競合阻害され、その結果、癌細胞の転移能が著しく低下す

ることを見出した。従って、Sd^a 合成酵素活性の導入による転移抑制は、効果的な治療となることが期待されたが、Sd^a 糖鎖を認識するリガンド分子は未同定であり、Sd^a 糖鎖の生理的機能も明らかとなっていないため、投与時の副作用が予測できないことが大きな問題であった。

2. 研究の目的

Sd^a 糖鎖を認識する未知のレクチン分子を同定し、その生理的機能を明らかにする。また、Sd^a 糖鎖-Sd^a 認識分子を介した細胞間相互作用を解明することで、消化管における免疫学的恒常性維持や、病原体感染防御における「正常型」糖鎖の機能的役割を明らかにし、

Sd^a 合成酵素遺伝子を転移抑制療法に用いる場合の Sd^a 糖鎖発現による副作用を予測する。

3. 研究の方法

胃癌・大腸癌細胞株に Sd^a 合成酵素活性を導入することにより、Sd^a 発現細胞を作製する。作製した Sd^a 発現細胞を用い、

(1) Sd^a 合成酵素遺伝子を導入していない対照細胞と比較することで、既知の動物レクチン（シグレック、ガレクチン等）との結合活性をスクリーニングする。

(2) Sd^a 発現細胞と対照細胞の比較により、Sd^a 認識レクチンを発現するヒト組織を検索する。Sd^a 発現細胞との接着性が認められた組織においては、該当組織由来初代培養細胞を用いて Sd^a 認識レクチン発現細胞を同定する。Sd^a 糖鎖はヒト正常消化管に発現しているため、Sd^a 糖鎖認識分子も正常組織に発現している可能性が高い。そのため、同定したヒト正常初代培養細胞に hTERT 遺伝子を導入することで不死化を試み、株化細胞として樹立する。

(3) (2) で不死化した Sd^a 認識分子発現細胞、または Sd^a 認識分子を発現する組織を用い、Sd^a 認識レクチンの分離、同定を行う。

(4) 炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎およびクローン病）等における Sd^a 糖鎖と Sd^a 認識レクチンの発現変化を調べ、病因・病態との関連を探る。

4. 研究成果

(1) 胃癌細胞株 KATO III および大腸癌細胞株 HT29、Caco 2 に Sd^a 合成酵素活性を導入することで Sd^a 発現細胞株を作製した。Sd^a 糖鎖構造末端にはシアル酸が含まれるため、既知のシアル酸結合性レクチン・シグレックに対する Sd^a 抗原の結合性を細胞を用いたフローサイトメトリー法と、細胞より抽出した糖脂質を用いた薄層クロマトグラフィー法により調べた。その結果、シグレック 3、シグレック 5、シグレック 7 およびシグレック 9 に対する Sd^a 糖鎖の特異的結合性は見出されなかった。

(2) Sd^a 発現細胞と用いた接着実験により、Sd^a 糖鎖認識分子を発現するヒト組織を検索した。その結果、Sd^a 糖鎖を発現していない対照細胞と比べて、Sd^a 発現細胞はヒト凍結大腸への接着性が高いことが明らかとなった。そこで、ヒト大腸より正常初代培養中皮細胞を単離・培養し、再度接着実験を行った結果、Sd^a 発現細胞株はヒト正常初代培養中皮細胞に対して強い接着性を有することが

明らかとなった。正常初代培養中皮細胞に hTERT 遺伝子を導入することで不死化し、株化細胞として樹立したが、不死化ヒト中皮細胞においては Sd^a 糖鎖との結合性は失われてしまった。Sd^a 発現細胞株と接着性を有していたヒト大腸初代培養中の細胞を、組織化学的に検討した結果、中皮細胞にだけでなく、混在しているマクロファージ様細胞にも Sd^a 糖鎖認識分子が発現している可能性が示唆された。

(3) Sd^a 糖鎖の生理的機能を明らかにするために、Sd^a 糖鎖を介したシグナルが細胞増殖にどのような影響を及ぼすかを、Sd^a 発現細胞株を用いて検討した。Sd^a 発現細胞株と Sd^a 糖鎖を発現していない親細胞株との間で *in vitro* での増殖性に差は認められなかったが、抗 Sd^a 抗体を添加した場合には Sd^a 発現細胞株においてのみ濃度依存的な増殖抑制が認められた。また、抗 Sd^a 抗体添加時の増殖抑制はヒト大腸癌細胞株に Sd^a 糖鎖を発現させた場合には認められたが、ヒト胃癌細胞株に Sd^a 糖鎖を発現させた場合には認められなかった。Sd^a 糖鎖はヒト大腸では主としてムチン型糖鎖として糖タンパク質上に発現が認められるのに対し、ヒト胃では主として糖脂質糖鎖として存在していることから、ヒト大腸においては、Sd^a 糖鎖の結合しているムチン型タンパクを介して上皮細胞の増殖制御が行われている可能性が示唆された。

(4) 正常消化管粘膜に限局して発現する Sd^a 糖鎖が、胃癌・大腸癌では消失していることは既に知られているが、癌以外の病態における Sd^a 糖鎖発現異常について検討した。その結果、消化管の慢性である潰瘍性大腸炎において Sd^a 糖鎖の発現が著しく低下していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- ① Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R, Dohi T, DNA hypermethylation contributes incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer, *Gastroenterology*, 135(1), 142-151, 2008, 査読有
- ② Dohi T, Kawamura YI, Incomplete synthesis of the Sd^a/Cad blood group carbohydrate in gastrointestinal cancer, *Biochim. Biophys. Acta*, 1780(3),

- 467-471、2008、査読有
- ③ Mizutani N, Sakurai T, Shibata T, Uchida K, Fujita J, Kawashima R, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Imai T, Dohi T, Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine, *J Immunol*, 179(11), 7478-7487, 2007、査読有
- ④ Hoshino A, Kawamura YI, Yasuhara M, Toyama-Sorimachi N, Yamamoto K, Matsukawa, A, Lira SA, Dohi T, Inhibition of CCL1-CCR8 interaction prevents aggregation of macrophages and development of peritoneal adhesions, *J Immunol*, 179(8), 5296-5304, 2007、査読有
- ⑤ 河村由紀, 消化管のがん性変化に伴い消失する血液型抗原Sd^a糖鎖, *生化学*, 80(5), 425-429, 2008、査読有
- ⑥ 土肥多恵子, 河村由紀, 消化器癌の糖鎖不全現象とエピジェネティックな遺伝子発現制御, *医学のあゆみ*, 225(8), 660-664, 2008、査読無
- ⑦ 河村由紀, COBRA法を用いたDNAメチル化検出, THE LUNG perspectives, *分子生物学basic technique*その54, 17(1), 92-94, 2009、査読無
- ⑧ 河村由紀, 豊田実, 土肥多恵子, 消化管癌における糖鎖不全現象のメカニズムとしてのDNA高メチル化, *分子消化器病*, 6(1), 99-101, 2009、査読無

[学会発表] (計10件)

- ① Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Kawamura YJ, Dohi T, DNA hypermethylation causes cancer-associated changes of carbohydrate determinants by silencing 'glyco-genes' in gastrointestinal cancer, *米国消化器病週間, サンディエゴ*, 2008、示説
- ② Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Saito Y, Miyake O, Takeshita E, Kawamura YJ, Konishi F, Kannagi R, Dohi T, Epigenetic mechanism for cancer-associated silencing of a gene encoding a β 1,4N-acetylgalactosaminyltransferase, which is exclusively expressed in normal gastrointestinal mucosa, *Glyco XIX, ケアーズ*, 2007、示説
- ③ Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Saito Y, Kawamura YJ, Konishi F, Kannagi R, Dohi T, Silencing of Sd^a carbohydrate-synthase gene by aberrant methylation in gastrointestinal cancer and ulcerative colitis, *国際粘膜免疫学会, 東京*, 2007、示説

- ④ 河村由紀, 豊田実, 川島麗, 萩原輝記, 河村裕, 小西文雄, 斉藤幸夫, 神奈木玲児, 今井浩三, 土肥多恵子, Inflammation-associated transcriptional silencing of Sd^a carbohydrate-synthase gene by DNA hypermethylation in ulcerative colitis, *日本生化学会, 神戸*, 2008、口演
- ⑤ 河村由紀, 豊田実, 川島麗, 河村裕, 小西文雄, 斉藤幸夫, 矢島知治, 日比紀文, 松本誉之, 神奈木玲児, 今井浩三, 土肥多恵子, 潰瘍性大腸炎および大腸癌におけるSd^a糖鎖合成酵素遺伝子のDNA異常メチル化による転写抑制, *日本癌学会, 名古屋*, 2008、口演
- ⑥ 河村由紀, 豊田実, 土肥多恵子, 消化器癌における糖鎖関連遺伝子のDNAメチル化によるサイレンシング, *日本消化器病学会, 東京*, 2008、示説
- ⑦ 河村由紀, 豊田実, 川島麗, 萩原輝記, 鈴木拓, 篠村恭久, 時野隆至, 今井浩三, 土肥多恵子, DNA異常メチル化により引き起こされる消化管の癌性糖鎖不全現象, *日本臨床分子医学会, 神戸*, 2008、口演
- ⑧ 河村由紀, 豊田実, 川島麗, 萩原輝記, 斉藤幸夫, 神奈木玲児, 土肥多恵子, Transcriptional silencing of glycosylation-related genes by DNA hypermethylation in gastrointestinal cancer, *日本生化学会, 横浜*, 2007、口演
- ⑨ 河村由紀, 川島麗, 水谷紀子, 反町典子, 神奈木玲児, 土肥多恵子, Siglecs, ligands for carbohydrate determinants on nonmalignant colonic epithelial cells, are expressed in the colonic lamina propria cells, *日本免疫学会, 東京*, 2007、示説
- ⑩ 河村由紀, 豊田実, 川島麗, 斉藤幸夫, 神奈木玲児, 土肥多恵子, Cancer-associated transcriptional silencing of glycosyltransferase by DNA hypermethylation, *日本癌学会, 横浜*, 2007、口演

[図書] (計0件)

- ①
②

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 由紀 (KAWAMURA I. YUKI)
国立国際医療センター（研究所）・消化器
疾患研究部・研究員
研究者番号：10392391

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書