

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591667

研究課題名（和文） 糖転移酵素の発現をコントロールすることによる乳癌の治療法の開発研究

研究課題名（英文） Research and development of cure methods for the breast cancer by expression level controlling of glycosyltransferases

研究代表者

近藤 昭宏（KONDO AKIHIRO）

京都工芸繊維大学・遺伝資源キュレーター教育研究センター・特任教授

研究者番号：60359841

研究成果の概要（和文）：

我々は、マウスの膵癌細胞（TGP-49）やヒト肝がん細胞（HepG2）を用いた実験で、RNAi の手法を用いることによりフコース転移酵素 VIII（FUT8）遺伝子をノックダウンさせ、TGP-49 や HepG2 の増殖が抑制されることを見出している。本研究で、この方法を乳がん細胞（MCF-7）に応用し、FUT8 遺伝子をノックダウンさせることにより乳がん細胞の増殖抑制が可能であるかどうかを検証し、予想通り MCF-7 の増殖が抑制されることを確認できた。

研究成果の概要（英文）：

We had found out that make a fucosyltransferase VIII (FUT8) gene knock down and multiplication of TGP-49 cells or HepG2 cells were controlled by using the technique of RNAi in the experiment which used TGP-49 cells and HepG2 cells. It has checked that applied this method to a breast cancer cell (MCF-7), verified whether down regulation control of a breast cancer cell multiplication is possible by making FUT8 gene knock down, and multiplication of MCF-7 was controlled as expected by this research.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：糖生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳腺外科

1. 研究開始当初の背景

癌はわが国の死因のトップを占める疾患であり、年間30万人以上の方が癌で死亡している。また、全死亡数の3割を超えており、実に亡くなった人の3人に1人は癌で死亡している。中でも乳癌は25人に1人が罹患するといわれており、その死亡率も年々増加しており、半世紀前の約5倍である。乳癌は、マンモグラフィや超音波等画像診断技術が進歩し、早期診断に寄与してきたが、30-59歳の若い働き盛りの女性の全癌腫の死亡率第1位であり、大きな社会問題となっている。

本研究者らは、ここ数年糖転移酵素と細胞増殖の関係を研究しており、糖転移酵素のうちアルファ1, 6-フコース転移酵素 (FUT8) の遺伝子ノックダウンすることにより癌細胞の増殖をコントロールする方法を見出し、特許申請している。

国内出願：特願 2008-502868

国際出願：PCT/JP2007/054035

2. 研究の目的

アルファ1, 6-フコース転移酵素 (FUT8) の遺伝子ノックダウンすることにより癌細胞の増殖をコントロールする方法を乳癌において応用し、糖転移酵素の発現をコントロールすることによる乳癌の治療法の開発研究をおこなう。

3. 研究の方法

FUT8 遺伝子欠損マウスはそのほとんどが生後数日以内に致死性を示し、少数のサバイバーは増殖遅滞の上、数週間で死に到るという重篤な表現形を示す。本研究者らは、この原因のひとつが TGF ベータの発現抑制と MMP の過剰産生が原因で発症した肺気腫様の傷害によるものであり、TGF ベータの母体への投与で肺気腫様の傷害を防ぐことを証明した。FUT8 遺伝子欠損マウスをより深く研究し、受精後 18.5 日の胎仔の遺伝子発現を解析し、生前の胎児マウスにおいてトリプシンの発現抑制を発見し、トリプシンと

Protenase-activated receptor (PAR-2) を介した細胞増殖制御の系との連携を証明した。

本研究者らは、これまでの FUT8 遺伝子を標的としてその機能を細胞レベルで行ってきた研究をより詳細に解明すべく独創的な研究を行った。つまり、マウス上皮細胞

(MODE-K)、マウスすい臓細胞 (TGP49) においてほぼ 100% に近く遺伝子の発現を抑制できた培養細胞における方法をもちいて乳が

んの研究に応用する方法を取った。レトロウイルスを用いた siRNA により、stable な FUT8 遺伝子のノックダウン細胞の作成を行う。

FUT8 ノックダウンによる乳癌細胞増殖抑制機構の解明および、アルファ1, 6-フコースを欠失させた場合、その受容体の活性測定と糖鎖分析、FUT8 ノックダウンの治療への応用検討等を主たる目標とする。

4. 研究成果

培養乳がん細胞を siRNA 法により mRNA の発現をノックダウンした。stable な FUT8 遺伝子のノックダウン細胞の作成は、実験に適した細胞の選別がポイントで、100%の導入効率ではない。これは、実際の遺伝子導入を治療法として開発する場合の大きな問題点である。乳がんの場合は、外から場所を特定し注入することが出来るため、他の内臓系のがんの治療に比して、DDS を考慮しなくて良い分、実用化への障壁が低いと思われる。研究に使用した、選別した siRNA 導入培養乳がん細胞は、FUT8 の活性が抑制されており、アルファ1, 6-フコースが欠失していた。ただし、これも細胞の選別が必要であり、細胞ごとに FUT8 の活性の抑制効率が違うことが、実用時に問題となる。つまり、実用化には今一層の医療技術の高度化が必要であり、このことは、本件のみならず遺伝子を使った治療を目標とした医療の共通困難事案のひとつである。

EGFR はアルファ1, 6-フコース残基が結合した N-結合型糖鎖を持つ糖タンパク質であるが、FUT8 遺伝子をノックダウンさせた培養細胞の EGFR にはほとんどアルファ1, 6-フコース残基が結合していない。本研究者らは、ほとんどフコースの結合が無い EGFR にはほとんどチロシンリン酸化活性が無いため、シグナルが伝わらないことを確認した。さらに、c-fos や c-jun の発現を調べるとやはり野性株の半分以下に抑制も確認された。つまり、EGFR と PAR-2 のクロストークが重要かつ興味深い。

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. Li W, Liu Q, Pang Y, Jin J, Wang H, Cao H, Li Z, Wang X, Ma B, Chi Y, Wang R, Kondo A, Gu J, Taniguchi N. Core fucosylation of μ heavy chains regulates assembly and intracellular signaling of precursor B cell

- receptors. *J Biol Chem.* 査読有、2012 Jan 20;287(4):2500-8.
2. Nakagawa T, Nishi Y, Kondo A, Shirai Y, Honda C, Asahi M, Tanimoto T. Preparation, characterization, and biological evaluation of 6(I),6(IV)-di-O-[α -1-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl]-cyclomaltoheptaose and 6-O-[α -1-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl]-cyclomaltoheptaose. *Carbohydr Res.* 査読有、2011 Sep 27;346(13):1792-800.
 3. Takama Y, Miyagawa S, Yamamoto A, Firdawes S, Ueno T, Ihara Y, Kondo A, Matsunami K, Otsuka H, Fukuzawa M. Effects of a calcineurin inhibitor, FK506, and a CCR5/CXCR3 antagonist, TAK-779, in a rat small intestinal transplantation model. *Transpl Immunol.* 査読有、2011 Jul;25(1):49-55.
 4. Wada Y, Dell A, Haslam SM, Tissot B, Canis K, Azadi P, Bäckström M, Costello CE, Hansson GC, Hiki Y, Ishihara M, Ito H, Kakehi K, Karlsson N, Kato K, Kawasaki N, Khoo KH, Kobayashi K, Kolarich D, Kondo A, Lebrilla C, Nakano M, Narimatsu H, Novak J, Novotny MV, Ohno E, Packer NH, Renfrow MB, Tajiri M, Taniguchi N. Comparison of Methods for Profiling O-glycosylation: HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative Multi-Institutional Study of IgA1. *Mol. Cell. Proteomics*, 査読有、9(4):719-27, 2010
 5. Yamamoto A, Nakatsu S, Kondo A, Asato T, Okabe M, Fukuzawa M, Miyagawa S. A newly cloned pig dolichyl-phosphate mannosyl-transferase for preventing the transmission of porcine endogenous retrovirus to human cells., *Transpl. Int.*, 査読有、23(4), 424-431, 2010
 6. Wang X, Fukuda T, Li W, Gao CX, Kondo A, Matsumoto A, Miyoshi E, Taniguchi N, Gu J. Requirement of Fut8 for the expression of vascular endothelial growth factor receptor-2: a new mechanism for the emphysema-like changes observed in Fut8-deficient mice. *J. Biochem.*, 査読有、145(5):643-51., 2009
 7. Zhongbin Bai, Haruko Hayasaka, Masayoshi Kobayashi, Wenzhe Li, Zijin Guo, Myoung Ho Jang, Akihiro Kondo, Byung-il Choi, Yoichiro Iwakura, Masayuki Miyasaka, : CXCL12 promotes CCR7-dependent naïve T-cell trafficking to lymph nodes and Peyer's patches. *J. Immunol.*, 査読有、182(3):1287-95., 2009
 8. Miyako Nakano, Daisuke Higo, Etsuo Arai, Takatoshi Nakagawa, Kazuaki Kakehi, Naoyuki Taniguchi, and Akihiro Kondo, : Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Rapid and Sensitive N-glycan Analysis of Glycoproteins as 9-Fluorenylmethyl Derivatives. *Glycobiology*, 査読有、19(2):135-43., 2009
- [学会発表] (計 3件)
1. 近藤昭宏、「糖質分析におけるMSの可能性について」、第29回日本糖質学会年会 (2009年9月9日、高山)
 2. Akihiro Kondo, Analysis of AFP-L3 in Hepatocellular Carcinoma Patients, Next Generation Summit 2009; Trends in Cancer Diagnostics - Impacting Patient Care, 2009, August 10-11, The Ritz-Carlton, Washington, DC, USA
 3. Akihiro Kondo, The EGFR-trypsin-PAR-2 Pathway in Cell Growth and the α 4 β 1 Integrin/VCAM-1 Interactions in Pre-B Cell, Repopulation Were Controlled by Fucosyltransferase, PepCon-2009 April 2-4, 2009 COEX, Seoul, South Korea
- [図書] (計 1件)
- Miyako Nakano, Kazuaki Kakehi, Naoyuki Taniguchi, Akihiro Kondo, : Chapter 9, Capillary Electrophoresis and Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for Structural Analysis of N-Glycans Derived from Glycoproteins, Capillary Electrophoresis of Carbohydrates, N. Volpi (ed.), Humana Press, pp.205-236. (2010)
- [産業財産権]

○取得状況 (計 1件)

名称 : Composition for suppressing the expression of fucosyltransferase

発明者 : Akihiro Kondo, Wenzhe Li, Takatoshi Nakagawa, Nobuto Koyama, Naoyuki Yaniguchi, Ikunoshin Kato

権利者 : Osaka University, Takara Bio Inc.

種類 : 特許

番号 : US 8003781 B2

取得年月日 : 2011年8月23日

国内外の別 : 国外 (米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 昭宏 (KONDO AKIHIRO)

京都工芸繊維大学・遺伝資源キュレーター

教育研究センター・特任教授

研究者番号 : 60359841

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

中川 孝俊 (NAKAGAWA TAKATOSHI)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 70359842