

平成 22 年 6 月 8 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2009

課題番号：20013047

研究課題名（和文） 形質膜シアリダーゼによるがん細胞死の制御機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of regulation of cancer cell apoptosis by plasma membrane-associated sialidase

研究代表者 宮城 妙子(MIYAGI TAEKO)

宮城県立がんセンター研究所・部長兼所長

研究者番号：50006110

研究成果の概要（和文）：がん化すると、細胞表層糖鎖に異常が起こる。とくに、酸性糖シアル酸の異常は、転移や浸潤と深く関わっている。本課題では、新規がん診断・治療法の開発をめざして、シアル酸量を調節する鍵酵素であるシアリダーゼについて研究を進めた。各種ヒトがんで異常亢進する形質膜局在型シアリダーゼは、がんの細胞死を抑制して、悪性度を増強していることを見いだした。そのひとつの機構として、増殖シグナルを過剰に活性化していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Aberrant sialylation is a characteristic feature associated with malignant properties, including invasiveness and metastatic potential. To elucidate the mechanism and provide valuable new information for diagnosis and therapy, our studies have focused on sialidase, a key enzyme for degradation of sialic acid-containing compounds. Our present study has revealed that plasma membrane-associated sialidase is markedly up-regulated in various human cancers and leads to suppression of apoptosis of cancer cells through activation of cell growth signaling pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,000,000	0	8,000,000
2009 年度	8,000,000	0	8,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	16,000,000	0	16,000,000

研究分野：がんの生化学、糖鎖生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：シアリダーゼ、糖鎖、酵素、遺伝子、ガングリオシド、情報伝達、がん治療

1. 研究開始当初の背景

酸性糖であるシアル酸は生体内では糖蛋白や糖脂質糖鎖の末端に位置し、多くの重要な細胞機能に関わっている。このシアル酸と

がんの深い関連性が従来から指摘されており、事実、腫瘍関連抗原にはシアル酸を多く含むものが多い。しかし、シアル酸変化をもたらす機構や意義についてはほとんどわかっていなかった。この長年の課題の解決をめ

ざして、われわれはこれまで、シアル酸の脱離によってシアル酸量調節に重要な役割を果たしているシアリダーゼに着目して研究を行ってきた。その結果、世界に先駆けて、2種のシアリダーゼの遺伝子クローニングに成功し、シアリダーゼが単に糖分解酵素であるだけでなく、多様な細胞機能に関わっていることを検証してきた。われわれが同定・解析してきたシアリダーゼ遺伝子のうち、細胞表層の形質膜に主に局在するシアリダーゼ(NEU3)については、膜マイクロドメインに在ってカベオリンと会合すること、種々のヒトがんでほとんど例外なく異常に発現亢進していること、過剰発現 NEU3 ががん細胞のアポトーシスを抑制することを見出した。一方、NEU3 をノックダウンすると、がん細胞がなんらの刺激もなく自ら細胞死に陥るが、正常細胞ではこの現象が見られないことがわかった。これらの結果は、NEU3 ががん細胞の生存に重要な役割を果たしていること、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。

2. 研究の目的

以上のように、形質膜局在シアリダーゼは、がん細胞の生存を左右する重要な因子であることが明らかになった。本課題では、NEU3 高発現により、細胞死が抑制され、逆に、ノックダウンにより細胞死をもたらす分子機構を明らかにする。その結果に基づいて、NEU3 発現を人工的に改変することにより、NEU3 を標的とした新しいがん治療法の開発に繋げたい。

3. 研究の方法

(1) 細胞死を誘導あるいは抑制する条件の設定

種々の条件下で、ヒト培養細胞を用いて、細胞死を誘導あるいは抑制し、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する。リアルタイム PCR や HPLC によるシアリダーゼ活性測定を行う。

(2) DNA ミクロアレイによる解析

NEU3cDNA 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による遺伝子変化を対照細胞と詳細に比較する。過剰 NEU3 発現が細胞死抑制を示す機構を検討する。一方、NEU3 に対する有効な siRNA を同細胞に導入し、シアリダーゼノックダウンによる遺伝子変化を対照細胞と比較し、細胞死が誘導される機構について、過剰発現の結果と合わせて、総合的に検討する。

(3) 蛋白アレイによる解析

NEU3cDNA を導入したヒト培養細胞を材料として、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。本研究では、得られた結果について詳細に検討し、NEU3 の標的分子の同定と相互作用の意義について明らかにする。

(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する。とくに、Ras を含む細胞死や増殖等のシグナル関連分子についての NEU3 特異的变化を調査する。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の観点からウェスタン解析や免疫沈降試験を行い、蛋白化学的検索も行う。

(5) シアリダーゼ機能に関わるガングリオシド糖鎖の解析

NEU3cDNA 導入および siRNA 導入ヒト培養細胞において、特異的基質であるガングリオシドの変化などについて薄層クロマトグラフィ分析や糖鎖化学分析を行う。NEU3 遺伝子改変に伴う細胞の糖脂質変化が細胞死にどのような影響をもたらしているかを培養細胞への添加実験等によって確認する。

(6) In vivo における解析

① NEU3 に関する TG マウスや Neu3 KO マウスを作成しているため、これらのマウスを用いて、シアリダーゼの生体内での細胞死に関する役割の解析を進める。個体や組織レベルで細胞死関連分子の変化を調べる。

② ノードマウスやスキッドマウスにヒトがん細胞を移植し、siRNA の導入や、モノクローン抗体処理によって、腫瘍抑制の程度を観察し、がんの遺伝子療法や抗体療法の可能性をさらに検討する。

(7) ヒトがん組織等における解析

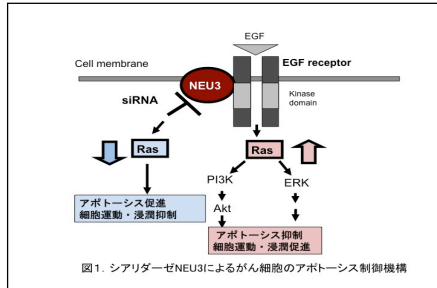
上記で得られた標的分子等の変化が、実際に NEU3 が高発現するヒトがんで認められるかを調査する。また、モノクローン抗体による免疫染色によって、種々のがん組織における NEU3 の発現状態を臨床的データと合わせて検討し、がん診断への応用を探る。

(8) 総合的検討

上記の結果をまとめて、ヒトがん細胞の生存に NEU3 が如何に関わっているかを総合的に検討する。とくに、NEU3 のがん細胞における標的分子の同定を完成させ、NEU3 が高発現する多くのがんの新しい治療法の開発に繋げたい。

4. 研究成果

(1) NEU3 ががんの細胞死を左右するひとつの機構として、EGFR (上皮成長因子受容体) のリン酸化を亢進させ、Ras の活性化をもたらし、ERK1/2 および Akt 経路の促進を導くことがわかってきた (図 1)。



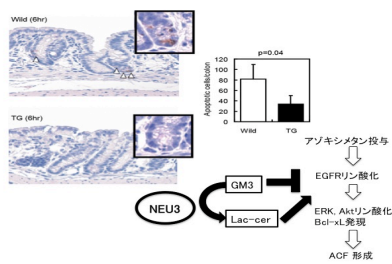
(2) このとき NEU3 は、酵素反応による糖グリコシドの修飾を介してリン酸化亢進をもたらすだけではなく、EGFR と会合することによっても影響を与えている証拠が得られた。

(3) NEU3 と EGFR のフラグメント解析によって、その部位が EGFR のキナーゼドメイン付近であることが推定された。この部位に変異をもつ肺がん細胞では、NEU3 と EGFR との会合は認められなかったため、この付近が生理的にも会合部位である可能性が高い。

(4) NEU3 発現が高い肺がん細胞ほど、ゲフィチニブ等のキナーゼ阻害剤に感受性が高く、NEU3 レベルの定量が肺がん等の治療薬選択等を目的としたオーダーメイド治療に応用できる可能性も出てきた。

(5) NEU3 は EGFR だけでなく、WNT シグナルを活性化することなど、がんの悪性度に関連する複数の分子の活性化をもたらすことが分かってきた。

(6) NEU3 のトランスジェニックマウスにがん原物質であるアゾキシメタンを投与すると、大腸がんの前がん病変とされる ACF (Aberrant crypt foci) 形成が対照マウスに比べて有意に促進することがわかった。ここでも、NEU3 が大腸粘膜の EGFR を活性化させ、細胞死抑制を招いていることが認められた。この結果は NEU3 ががんの進展のみではなく、発がん過程にも関与していることを示している (図 2)。



(7) ノドマウスに NEU3 発現が高いがん細胞を移植し、腫瘍形成部に NEU3siRNA を投与すると、対照と比べて、明らかな腫瘍縮小が観察された。

(8) NEU3 遺伝子発現機構の解明を目的として、遺伝子構造の決定と制御因子の同定を行ってきた。遺伝子構造の特徴として、2 つの転写開始領域があること、Sp1 と Sp3 が転写制御に深く関与していることがわかった。Sp/KLF ファミリー転写因子のがん化への関与が近年明らかにされてきており、がんにおける NEU3 の発現亢進機構のひとつが明らかになった。

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 16 件)

1. Yamaguchi, K., Koseki, K., Shiozaki, M., Shimada, Y., Wada, T., Miyagi, T.: Regulation of plasma membrane-associated sialidase NEU3 gene by Sp1/Sp3 transcription factors. *Biochem, J.* in press 2010
2. Katoh S, Maeda S, Fukuoka H, Wada T, Moriya S, Mori A, Yamaguchi K, Senda S, Miyagi T.: A crucial role of sialidase Neu1 in hyaluronan receptor function of CD44 in T helper type 2-mediated airway inflammation of murine acute asthmatic model. *Clin Exp Immunol.* in press 2010
3. Shiozaki K, Koseki K, Yamaguchi K, Shiozaki M, Narimatsu H, Miyagi T.: Developmental change of sialidase NEU4 expression in murine brain and its involvement in the regulation of neuronal cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 284, 21157-21164, 2009
4. Wang J, Wu G, Miyagi T., Lu ZH, Ledeen RW. : Sialidase occurs in both membranes of the nuclear envelope and hydrolyzes endogenous gd1a. *J Neurochem.* 111, 547-554, 2009
5. Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Sato, I., Miyagi, T.: Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) promotes formation of colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-treated transgenic mice. *Cancer Sci.* 100, 588-594, 2009
6. Uemura, T., Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Miyazaki, S., Satomi, S., Kato, K., Sakuraba, H., Miyagi, T.: Contribution of sialidase NEU1 to suppression of metastasis of human colon cancer cells through desialylation of integrin beta 4. *Oncogene* 28,

- 1218-1229, 2009.
7. Takahashi S, Takahashi R, Hongo Y, Koshino H, Yamaguchi K, Miyagi T: Synthesis of all possible isomers corresponding to the proposed structure of montanacin e, and their antitumor activity. *J Org Chem.* 74, 6382-6385, 2009
 8. Magesh S, Savita V, Moriya S, Suzuki T, Miyagi T, Ishida H, Kiso M.: Human sialidase inhibitors : design, synthesis, and biological evaluation of 4-acetamido-5-acylamido- 2-fluoro benzoic acids. *Bioorg Med Chem.* 17:4595-603, 2009.
 9. Sodeoka, M., Hirai, G., Watanabe, T., Miyagi, T.: A strategy for constructing C-sialosides based on Ireland-Claisen rearrangement and its application for synthesis of CF₂-linked ganglioside GM4 analogue. *Pure Applied Chem.* 81, 205-215, 2009
 10. Hata, K., Koseki, K., Yamaguchi, K., Moriya, S., Suzuki, Y., Yingsakmongkon, S., Hirai, G., Sodeoka, M., von Itzstein, M., Miyagi, T.: Limited Inhibitory Effects of Oseltamivir and Zanamivir on Human Sialidases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25, 3484-3491, 2008.
 11. Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Hata, H., Shiozaki, K.: Minireview, Plasma membrane - associated sialidase as a crucial regulator of transmembrane signaling. *J. Biochem.* 144, 79-285, 2008.
 12. Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Shiozaki, K., Sato, I., Yamanami, H., Kakugawa, Y., Fujiya, T.: Human sialidase as a cancer marker. *Proteomics* 8, 3303-3311, 2008.
 13. Watanabe, T., Hirai, G., Kato, M., Hashizume, D., Miyagi, T., Sodeoka, M. Synthesis of CH₂-Linked a(2,3)Sialylgalactose Analogue: on the stereoselectivity of the Key Ireland-Claisen rearrangement. *Org. Lett.* 10, 4167-4170, 2008.
 14. Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K.: Roles of plasma membrane-associated sialidase NEU3 in human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 532-537, 2008
 15. Miyagi, T.: Aberrant expression of sialidase and cancer progression. *Proc Jpn Acad Ser B* 84, 407-418, 80, 12-23, 2008.
 16. 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.

[学会発表] (計 29 件, その内、国際学会 4 件。以下は招待講演)

1. Miyagi T.: Sialidase Neu4 contributes to attenuation of E-selectin-derived signaling in colon cancer cells. Tohoku carbohydrate minisymposium, Fukushima, 2009, 3.
2. Miyagi T. : Role of sialidase NEU3 in prostate cancer progression and its potential utility as a novel; therapeutic target. Clinical and translational Research on cancer: Glycomics Applications. Toba, Mie, 2009, 3.
3. Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Hata, K., and Shiozaki, K.: Crucial roles of plasma membrane-associated sialidase in human cancer. 13th World Congress on advances in Oncology. Crete, Greece, 2008. 10

[図書] (計 3 件)

1. Miyagi, T.: Sialidase gene In Experimental Glycoscience. Glycobiology. Edited by Taniguchi, N., Suzuki, A. and Ito, Y., pp115-118. Springer Japan. 2008
2. Miyagi, T.: Aberrant expression of sialidase in cancer and diabetes. In Experimental Glycoscience. Glycobiology. Edited by Taniguchi, N., Suzuki, A. and Ito, Y., Springer Japan. 2008
3. 宮城妙子 : 糖鎖異常が招くがんの危険な性質-特にシアリダーゼ異常に着目して、第3の生命鎖、糖鎖の謎が今、解る (古川鋼一編) クバプロ、78-84、2009

[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
<http://www.pref.miyagi.jp/mcc/htdocs/kenkyu/seikagaku.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮城 妙子 (宮城県立がんセンター研究所、部長兼所長)

研究者番号：50006110

(2) 研究分担者

塩崎 一弘 (宮城県立がんセンター研究所、博士研究員)

研究者番号：70390896

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

山口 壹範 (宮城県立がんセンター研究所、副主任研究員)

和田 正 (宮城県立がんセンター研究所、研究員)

川村 貞文 (宮城県立がんセンター、医療部長)

佐藤 雅美 (宮城県立がんセンター、医療部長)