

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 5 月 31 日現在

機関番号：31305

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～2011

課題番号：22659082

研究課題名（和文） シアリダーゼ異常による癌および糖尿病発症機構の解明

研究課題名（英文） Pathogenesis of cancer and diabetes caused by aberrant expression of sialidase

研究代表者

宮城 妙子 (MIYAGI TAEKO)

東北薬科大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号： 50006110

研究成果の概要（和文）：形質膜シアリダーゼは、大腸がんを含むヒト各種がんで異常に発現亢進し、がんの悪性度を増強している。このトランスジェニック（TG）マウスにおいては、膵β細胞肥大を起こし、インスリン抵抗性の糖尿病を発症する一方、発がん剤アゾキシメタン投与により、前がん病変 ACF 形成の促進が起こる。このふたつの異なった病態への NEU3 の関与機構を解析した結果、NEU3 による Wnt シグナルの活性化がふたつの病態に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Plasma membrane-associated sialidase is up-regulated in various human cancers including colon cancer. The transgenic mice develop hyperinsulinemia and subsequently insulin resistance, and also are susceptible to induction of colonic aberrant crypt foci by a carcinogen, azoxymethane. Analysis of the pathogenesis revealed that NEU3 activates Wnt signaling, which is thought to be important for cancer progression and also for beta cell growth in pancreatic islets, suggesting an influence of NEU3 on the two diseases probably via Wnt activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	0	1,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	330,000	3,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、シアリダーゼ、癌、糖尿病

1. 研究開始当初の背景

本課題では、現在まで同定・解析されている4種のシアリダーゼのうち、われわれ

が世界に先駆けてクローニングに成功し、性状解析をしてきた形質膜局在型シアリダーゼ(NEU3)を対象としている。NEU3 につい

では、これまで、同じ局在をもつ基質であるガングリオシドの発現を制御する主役であること、シグナル分子の集合するカベオラに存在して、カベオリンと会合することを見だし、細胞情報伝達に深く関わっていることを検証してきた。一方、NEU3は各種のヒトがんで異常に高発現すること、そのトランスジェニック (TG) マウスが、予想を超えてインスリン抵抗性の糖尿病を発症すること、さらに、発がん剤アゾキシメタン投与により、前がん病変 aberrant crypt foci (ACF) の形成を促進することがわかってきた。糖尿病とがんの発症に深く関与するこのNEU3分子の生理的病的役割について細胞や遺伝子改変マウスを用いて解析し、最近の臨床で重要な話題の「がんと糖尿病」の関連性について明らかにする。

2. 研究の目的

最近、糖尿病患者にがんの発症頻度が高いという疫学的な研究成果がいくつか報告されている。しかし、その実体については未だ不明の点が多い。本課題は、シアル酸を脱離することにより、シアル酸量調節の重要な一端を担うシアリダーゼに着目して、糖尿病とがんの関連性について検討しようとするものである。シアル酸は、多くの重要な細胞機能に関わっており、また、がん関連抗原に多く含まれるなど、がんとの深い関連性が従来から指摘されている。われわれが世界に先駆けて同定・解析してきた形質膜局在型シアリダーゼ (NEU3) がヒト各種がんで発現が異常亢進していること、このTGマウスががんおよび糖尿病発症に関わっていることを見出した。ふたつの異なる病態にNEU3が如何に関わっているのか、そのクロストークと発症機構について検

討する。

3. 研究の方法

がん発症モデルとして作成したNEU3のTGマウスが、予想を超えてインスリン抵抗性の糖尿病を発症すること、さらに、発がん剤アゾキシメタン投与により、前がん病変 ACF の形成を促進すること、そこではEGFRの活性化が起こっていることが明らかとなった。細胞およびこれらのモデルマウスにおいて、NEU3に焦点を当て、糖尿病とがんの関連性を解析する。

(1) NEU3 シアリダーゼによる細胞応答変化の解析

NEU3 過剰発現細胞および siRNA 導入ノックダウン細胞によって、主にアポトーシスやインスリンシグナルに対する細胞応答の変化を調べる。

(2) 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よって、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。

(3) プロテインチップによる網羅的相互作用解析

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する。NEU3 の標的分子について、遺伝子レベルの変化と合わせて検討する。

(4) 18-22週後のTGマウスにおいて、耐糖能試験や血中インスリン値の測定により、明らかに糖尿病を発症しているマウスを選択し、アゾキシメタン等の発がん剤を投与し、ACF 前発がん病変形成過程を詳細に観察する。

(5) NEU3 ノックアウト (KO) マウスおいは、

高脂肪食を与えて、糖尿病発症の程度を観察する。

(6) また、KO マウスにアゾキシメタン等の発がん剤を投与し、ACF 前発がん病変形成過程を生化学的に、病理学的に調べる。

(7) 細胞レベルの実験で得られた関連分子の変化について、それぞれのマウスから採取した組織を用いて調査する。とくに、大腸がん、前立腺がん、すい臓がんなどに疫学的に高いがん発症リスクが報告されているので、大腸や前立腺組織を主に観察する。

(8) 明らかになった NEU3 異常による分子変化のうち、糖尿病とがん化で互いにクロストークが見られるものを調査し、その変化の意義を探る。とくに、Wnt や TOR シグナリング 経路について、また IGF レセプターの経路の異常活性化などについて検討する。

(9) ヒトがん組織等における解析

上記で得られた分子等の変化が、実際に NEU3 が高発現するヒトがんで認められるかどうかをがん患者の手術摘出標本において、臨床科医師との協力のもとに調査する。

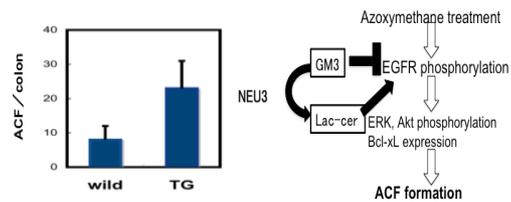
(10) 研究成果の総合的解析

以上の結果を総合的に解析し、NEU3 の活性化やシグナル伝達異常における糖尿病およびがんの標的分子の同定とその役割を総合的に決定する。

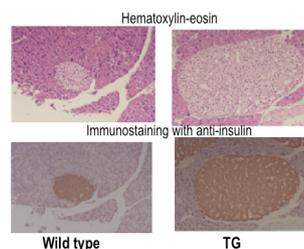
4. 研究成果

先に、シアリダーゼ NEU3 の TG マウスの解析によって、NEU3 ががんおよび糖尿病発症に関わっていることを見出した。NEU3 遺伝子過剰発現によるシグナル異常に基づいている可能性が高い。NEU3 は形質膜に主に局在し、シグナル分子として、各種シグナリングを制御する。そこで、NEU3 亢進をもたらすアポトーシスおよびインスリンシグナル異常を中心に *in vitro* および *in vivo*

における解析を進めた。がん細胞では、NEU3 ノックダウンによって、浸潤や運動能の低下やアポトーシスの促進など、がんの悪性形質の低下が起こる。これらの現象における NEU3 の標的分子のひとつは EGFR であることがわかってきた。NEU3 が EGFR のリン酸化を修飾して Akt/ERK 経路を制御していることが検証された。NEU3 の TG マウスにおける糖尿病発症の機構にはインスリンレセプターリン酸化阻害、また、発がん剤投与に



による ACF 形成促進機構については、EGR レセプターのリン酸化亢進がひとつの要因であること(上図)がこの度新たに検証された。一方、KO マウスでは対照に比べて、高脂肪食投与による耐糖能およびインスリン産生異常の発生頻度が低い傾向が観察され、アゾキシメタンおよびデキストラン硫酸投与による腫瘍形成実験では、有意に抑制されることを見出した。これらの結果は、KO と TG マウスが逆のフェノタイプを有することを示し、NEU3 のふたつの病態への重要な関与が検証された。さらに、*in vitro* 系において、NEU3 発現亢進が Wnt シグナルを活性化させ、NEU3 によるがんの悪性進展にこの活性化が大きく影響している可能性が認められた。一方、NEU3 の TG マウスでは、膵β



細胞の増殖とラ
氏島肥大および
その後のインス
リン抵抗性の出
現を観察してい
たが(左図)、

最近、これらの現象には、Wnt シグナルの活

性が必要であるという報告がなされている。NEU3 ががんと糖尿病というふたつの病態にここでクロストークしている可能性が強く示唆された。今後、この観点から詳細に検討を進める。

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 9 件)

- ① Kawamura, S., Sato, I., Wada, T., Yamaguchi, K., Li, Y., Li, D., Zhao, X., Ueno, S., Aoki, H., Tochigi, T., Kuwahara, M., Kitagawa, T., Takahashi, K., Moriya, S., Miyagi, T.: Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) regulates progression of prostate cancer to androgen-independent growth through modulation of androgen receptor signaling. *Cell Death Differ* 19, 170-179, 2012.
- ② Miyagi, T., Yamaguchi, K.: Mammalian sialidases: physiological and pathological roles in cellular functions, *Glycobiology* 22, 880-896, 2012
- ③ Miyata, M., Kambe, M., Tajima, O., Moriya, S., Sawaki, H., Hotta, H., Kondo, Y., Narimatsu, H., Miyagi, T., Furukawa, K., Furukawa, K.: Membrane sialidase NEU3 is highly expressed in human melanoma cells promoting cell growth with minimal changes in the composition of gangliosides. *Cancer Sci.* 102: 2139-2149, 2011
- ④ Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Takahashi, K., Moriya, S., Miyagi, T. Regulation of sialyl Lewis antigen expression in colon cancer cells by sialidase NEU4. *J. Biol. Chem.* 286, 21052-21061, 2011.
- ⑤ 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.* 430, 107-117, 2010
- ⑥ 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.* 161, 233-241, 2010

⑦ Miyagi T.: Mammalian sialidases and their functions. *Trends In Glycoscience and Glycotechnology* 22, 162-172, 2010

〔学会発表〕(計 15 件)

- ① Miyagi, T.: Aberrant expression of sialidase and cancer progression. US-JAPA Conference: Inflammation, Diabetes, And Cancer. City of Hope, Duarte, CA, USA, 2011, 8. 4. (国際会議招待講演)
- ② Miyagi, T., Yamaguchi, K., Shiozaki, K., Takahashi, K., Wada, T., Hata, K., Moriya, S., Yamamoto, K.: Distinct functional roles between ganglioside sialidases Neu3 and Neu4. The 31st Naito Conference :Glycan Expression and Regulation [II]: Metabolites, Stress Response, Microdomains, and Beyond. Sapporo, Japan, 2011. 9. 14 (国際会議招待講演)
- ③ Miyagi, T., Takahashi, K., Moriya, S., Hata, K., Wada, T., Yamaguchi, K., Shiozaki, K.: Altered expression of sialidases in human cancer. IXth International Symposium (IXth ISCSM, 2011) on "Biochemical Roles of Eukaryotic Cell Surface Macromolecules" Trivandrum, India, 2011, 1. 28. (国際会議招待講演)

〔図書〕(計 2 件)

- ① Monti, E. and Miyagi, T.: Structure and function of mammalian sialidases. in *Topics in Current Chemistry : Sialoglyco-Biology and -Chemistry*, (eds Gerardy-Schahn R, Delannoy P, von Itzstein M) Springer, in press
- ② Miyagi T., Takahashi K., Moriya S., Hata K., Wada T, Yamaguchi K., Shiozaki K. Altered expression of sialidases in human cancer. *Proceedings of the 9th ISCSM* (ed. Sudhakaran PR), Springer Publishers in press

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/ganseigyoo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮城 妙子 (MIYAGI TAEKO)
東北薬科大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：50006110

(2) 研究分担者

佐藤 郁郎 (SATO IKUROU)
宮城県立がんセンター・病理部・部長
研究者番号：50225918
(H23：連携研究者)

塩崎一弘 (SIOZAKI KAZUHIRO)
鹿児島大学・水産学部・助教
研究者番号：70390896
(H23：連携研究者)

(3) 連携研究者