

を検討するための準備が整った。またラット ES 細胞による発がんモデル動物の作成に向けて、遺伝子改変のための基礎データや胚操作の基本技術が整備されつつある。

F. 健康危惧情報：

本実験計画においては、倫理に関わるようなヒトに関する受精卵等は全く扱うことはない。ヒト間葉系幹細胞の培養、分化操作に関する実験は倫理審査委員会に承認を得ている。また、動物の操作は、すべて国立がんセンター研究所動物倫理委員会の定める規則に基づいて行われた。

G. 研究発表：

1. 論文発表

1. Kurokawa Y, Honma K, Takemasa I, Nakamori S, Kita-Matsuo H, Motoori M, Nagano H, Dono K, Ochiya T, Monden M, Kato K. Central genetic alterations common to all HCV-positive, HBV-positive and non-B, non-C hepatocellular carcinoma: A new approach to identify novel tumor markers. *Int J Oncol*, in press.
2. Fukasawa M, Morita S, Kimura M, Horii T, Ochiya T, Hatada I, Genomic imprinting in *Dicer1*-hypomorphic mice. *Cytogenet Genome Res.* in press.
3. Banas A, Quinn G, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. "Stem cells into liver"-Basic research and potential clinical application. *Adv. Exp. Med. Mol. Biol*, in press.
4. Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, Honma K, Sasaki H, Hirai K, Teratani T, Namatame N, Yamamoto Y, Hanai K, Kato T, Sano A, Ochiya T. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 12177-12182, 2005.
5. Yanagihara K, Takigahira M, Tanaka H, Komatsu T, Fukumoto H, Koizumi F, Nishio K. Ochiya T, Ino Y, Hirohashi S. Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhus stomach cancer. *Cancer Sci.* 96: 323-332, 2005.
6. Saito S, Honma K, Kita-Matsuo H, Ochiya T, Kato K. Gene expression profiling of cerebellar development with high-throughput functional analysis. *Physiol Genomics.* 22: 8-13, 2005.
7. Teratani T, Quinn G, Yamamoto Y, Sato T, Yamanokuchi H, Asari A, Ochiya T. Long-term maintenance of liver-specific functions in cultured ES cell -derived hepatocytes with hyaluronan sponge. *Cell Transplant*,

14: 629-635, 2005.

8. Yamamoto Y, Teratani T, Yamamoto H, Quinn G, Murata S, Ikeda R, Kinoshita K, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from embryonic stem cells, *Hepatology*, 42: 558-567, 2005.
9. Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, Sasaki H, Asari A, Quinn G, Sasaki H, Terada M, Ochiya T. Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology*. 41: 836-846, 2005.

2. 学会発表

(海外)

- 1) The 2nd International Conference on Tissue Engineering, Greece, May 22-27 2005, Ochiya T., Yamamoto Y., Teratani T. Title: Long-term maintenance of ES cell - derived hepatocytes with hyaluronan sponge. 招待講演
- 2) American Society of Gene Therapy, Minneapolis, June 1-5 2005, Nagahara S, Takeshita F, Honma K, Minakuchi Y, Sano A, Ochiya T. Title: Efficient inhibition of bone metastasis via systemic delivery of siRNA using atelocollagen-mediated delivery system.

- 3) 64th Annual Meeting of Society for Developmental Biology, San Francisco, June 27- August 1 2005, Yamamoto Y., Teratani T., Quinn G., Kato T., Ochiya T., Title: Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from mouse embryonic stem cells. March 12-18 2006.

(国内)

- 1) Atelocollagen-mediated delivery system for nucleic meducunes. Nagahara S., Takeshita F, Honma K., Hanai K., Sano A. and Ochiya T., 第5回レトロメタボリズムカンファレンス (2005. 5. 8-11 神奈川)
- 2) 切片担体上でES細胞を肝細胞へ分化誘導する培養システムの開発、竹内朋代、落谷 孝広、竹澤 俊明、第12回肝細胞研究会 (2005. 7. 8 東京)
- 3) 同所性移植モデルを用いたヒトスキルス胃がんの腹膜播種進展過程の解析、柳原五吉、落谷孝広、西尾和人、廣橋説雄 (ポスター)、第64回日本癌学会学術総会

- (2005.9.14 札幌)
- 4) 胚性幹細胞由来の膵・肝細胞の遺伝子発現解析、Gary Quinn、寺谷工、Agnieszka Banas、上田しのぶ、山本華子、落谷孝広 (ワークショップ)、第64回日本癌学会学術総会 (2005.9.14 札幌)
- 5) ヒト間葉系幹細胞由来成熟肝細胞の肝疾患研究への応用、寺谷工、玉谷卓也、落谷孝広 (ワークショップ)、第64回日本癌学会学術総会 (2005.9.14 札幌)
- 6) アテロコラーゲンセルトランスフェクションアレイによる抗がん剤耐性関連遺伝子の機能解析、本間紀美、小泉恭子、竹下文隆、阿蘇雄、伊藤博、加藤菊也、落谷孝広 (ポスター)、第64回日本癌学会学術総会 (2005.9.14 札幌)
- 7) HST-1/FGF-4高発現による脳の発達異常、上田しのぶ、高濱靖、朝元誠人、竹下文隆、坂本裕美、寺田雅昭、落谷孝広 (ポスター)、第64回日本癌学会学術総会 (2005.9.15 札幌)
- 8) 変異型Hrasトランスジェニックラットを用いた発がん物質短期検索法の開発、深町勝巳、大嶋浩、上田しのぶ、高須賀信夫、落谷孝広、津田洋幸 (ポスター)、第64回日本癌学会学術総会 (2005.9.15 札幌)
- 9) ヒト肝細胞のソースとしての間葉系肝細胞の有効性、Agnieszka Banas、寺谷工、徳原真、Gary Quinn、落谷孝広 (ポスター) 第64回日本癌学会学術総会 (2005.9.15 札幌)
- 10) HPV18型のE6, E7遺伝子を標的とした small interference RNAの腫瘍増殖抑制効果に関する検討、藤井多久磨、林茂徳、落谷孝広、武井佳史、塚崎克己、久布白兼行、青木大輔、野澤志朗 (ワークショップ) 第64回日本癌学会学術総会 (2005.9.16 札幌)
- 11) 白血病関連遺伝子MOZの造血における役割、勝本拓夫、相川祐規子、落谷孝広、北林一生 (ポスター) 第64回日本癌学会学術総会 (2005.9.16 札幌)
- 12) siRNA/アテロコラーゲンデリバリーシステムの腫瘍組織特異性の検討、竹下文隆、

永原俊治、本間紀美、落谷孝
広 (ワークショップ) 第64
回日本癌学会学術総会
(2005. 9. 16 札幌)

13) Dicer1-hypomorphicマウ
スのゲノムインプリンティン
グ、深澤正幸、森田純代、木
村美香、堀居拓郎、落谷孝広、
畑田出穂 (ポスター) 第28
回日本分子生物学会年会
(2005. 12. 7 福岡)

14) Argonaute family-
e1F2C2は胚体外胚葉の発生に
必要であり、epigenetic
silencingに必要でない、森
田純代、堀居拓郎、木村美香、
落谷孝広、畑田出穂 (ポスタ
ー) 第28回日本分子生物学
学会年会 (2005. 12. 7 福岡)

15) サイクリンD1過剰発現に
よる腫瘍形成促進に関与する
遺伝子の検索、生田目奈知、
竹下文隆、加藤尚志、落谷孝
広 (ポスター) 第28回日本
分子生物学会年会 (2005. 12. 7
福岡)

16) アテロコラーゲンsiRNA導入
技術による薬剤耐性関連遺伝子
の機能解析、本間紀美、小泉恭
子、竹下文隆、根本一樹、小野
寺純、阿蘇雄、伊藤博、加藤菊
也、落谷孝広 (ポスター) 第2

8回日本分子生物学会年会
(2005. 12. 8 福岡)

17) ヒストンアセチル化酵素
MOZの造血における役割、勝本拓
夫、相川祐規子、市川仁、落谷
孝広、北林一生 (ポスター) 第
28回日本分子生物学会年会
(2005. 12. 9 福岡)

18) ヒト骨髄細胞由来間葉系幹
細胞の加齢に伴う肝細胞分化へ
の影響、寺谷工、山本雄介、玉
谷卓也、落谷孝広 (ポスター)
第28回日本分子生物学会年会
(2005. 12. 9 福岡)

19) ES細胞のin vitro肝細胞
分化誘導系における肝幹細胞の
探索、山本雄介、寺谷工、野川
奈美、石田貴子、加藤尚志、落
谷孝広 (ポスター) 第28回日
本分子生物学会年会 (2005. 12. 9
福岡)

20) 再生肝組織より作製した切
片担体上で培養したES細胞の特
性解析、竹内朋代、寺谷工、落
谷孝広、竹澤俊明 (ポスター)
第28回日本分子生物学会年会
(2005. 12. 9 福岡)

21) siRNA/アテロコラーゲン複
合体の全身投与における臓器・
腫瘍組織特異性の検討、竹下文
隆、生田目奈知、水口佳子、本
間紀美、加藤尚志、落谷孝広 (ポ

- スター) 第28回日本分子生物学会年会 (2005.12.9 福岡)
- 22) バイオ人工肝臓の新しい細胞ソースとしてのステム細胞の評価、落谷孝広 (シンポジウム) 第5回日本再生医療学会総会 (2006.3.8)
- 23) 移植医療としての間葉系幹細胞由来ヒト肝細胞の評価、寺谷 工、山本雄介、Gary Quinn、Agnes Banas、玉谷卓也、落谷孝広 (口演) 第5回日本再生医療学会総会 (2006.3.8)
- 24) レーザーテクノロジーによる組織マイクロデバイスの開発、山本雄介、寺谷 工、加藤尚志、落谷孝広 (口演) 第5回日本再生医療学会総会 (2006.3.9)
- 25) Human adipose stem cells as a source of functional hepatocytes、Agnes Banas、徳原 真、寺谷 工、Gary Quinn、山本雄介、大河内仁志、落谷孝広 (ポスター) 第5回日本再生医療学会総会 (2006.3.8)
- 26) アテロコラーゲンナノ粒子によるsiRNAの全身性投与、落谷孝広 (シンポジウム) 日本薬学会第126年会 (2006.3.28 仙台)
- 27) マイクロ化学懇話会 (科学技術振興機構主催)、落谷孝広、
- 講演：光の不思議が拓く臓器再生の未来 (2005.5.20 上野)
- 28) 第2回マイクロナノ・バイオデバイスの実用化を探る研究会 (東京大学大学院医学系研究科・疾患生命工学センター主催)、落谷孝広、講演：生体の代謝機能を模倣するヒト肝細胞チップの開発 (2005.8.9 駒場)
- 29) 第40回今堀フォーラム (今堀和友東大名誉教授主催)、落谷孝広、講演：アテロコラーゲンDDSによるsiRNAのがん治療への応用、(2005.10.14 渋谷)
- 30) 2005年キリン腎臓シンポジウム (キリンビール(株)主催)、落谷孝広、講演：医学研究の最前線：病態解明と新規治療薬の創薬にむけて (2005.10.29 本郷)
- 31) 16回フォーラム・イン・ドージン RNA干渉—その可能性 ((株) 同人化学研究所主催)、落谷孝広、講演：アテロコラーゲンによる生体へのsiRNAデリバリーとがん転移抑制への応用 (2005.12.2 熊本)
- 32) ポスト・ゲノムと分子イメージングの先端テクノロジー講演：第3回若手研究交流会 (2006.1.10 蔵王)
- 33) siRNAの全身性デリバリーに

よる骨転移腫瘍の治療解析、講
演：第3回日本癌学会カンファレ
ンス（2006. 3. 11 蓼科）

H.知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

出願中：「ヒト肝細胞様細胞及びその
利用」特許出願番号2005-042364

EPC出願準備中

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

蛋白質リン酸化を介する運動能・接着能の調節機構とその分子経路の解明

分担研究者 堀 隆一 国立がんセンター研究所 細胞増殖因子研究部 部長

研究要旨 腫瘍組織特異的なチロシンリン酸化蛋白質の解析から、腫瘍の進展における悪性形質の獲得に、特定のチロシンキナーゼと基質の組み合わせが関わっていることが明らかになった。肺癌細胞からその足場非依存性と関わる新たな Src キナーゼの基質分子を精製により同定し、RNAi 法でその発現を抑制すると浮遊状態のアポトーシスが誘導されることを確認した。また神経芽腫細胞において高頻度でチロシンリン酸化を受けているドッキング分子 ShcC は、Grb2 を介した増殖やアポトーシスの制御とは別に、SH2 ドメインに結合する分子群による Src ファミリーキナーゼの制御を介して、分化や細胞運動に関わる新規のシグナルを媒介していることが示唆された。骨肉腫細胞株 Hu09 の亜株群の高転移性と関連して見いだされたパキシリンは、Src ファミリーのキナーゼ Fyn と協調的に作用してチロシンリン酸化を介して骨肉腫の転移性と関わることを示された。以上のようなチロシンリン酸化基質のシグナルの選択的阻害は、腫瘍の転移・浸潤・血管増生などの特定の形質を狙って抑制することに応用可能であると考えられる。

A. 研究目的

腫瘍の足場非依存性増殖能や転移能獲得などにチロシンキナーゼの活性化とその基質のチロシンリン酸化が関わっていることが明らかになっている。腫瘍特性に関わるチロシンリン酸化蛋白質群を同定し、その機能を解析することにより、蛋白質チロシンリン酸化を介したシグナルが固形腫瘍の進展においてどのような役割をしているのかを明らかにすることを本研究の目的とする。さらには腫瘍特異的なチロシンリン酸化シグナルのブロックにより、腫瘍の悪性化に関わる転移・浸潤・血管増生などの特性を選択的に阻害する系を確立する。

B. 研究方法

(1) 肺癌の足場非依存性増殖に関わるチロシンリン酸化蛋白質の同定

足場非依存性増殖は腫瘍の転移・浸潤の過程に関わる腫瘍特性の一つと考えられるが、肺癌細胞株を材料に用いて、その足場非依存性増殖に関わるリン酸化蛋白質群の解析を行う。具体的には非接着性のプレートの上で増殖させた場合と、接着性のプレートの上で培養した場合に見られるチロシンリン酸化蛋白質群を比較し、非接着状態でインテグリンシグナルを遮断した場合にもチロシンリン酸化が残存する蛋白質群を精製し、質量分析により同定する。このような浮遊状態で OFF にならないシグナルを媒介するチロシンリン酸化蛋白質がどのような役割をしているかを RNAi 法などに

よる機能解析により明らかにする。

(2) 神経芽腫進展における ShcC の役割

神経系特異的に発現する ShcC ドッキング蛋白質は、神経芽腫を中心とする神経系腫瘍細胞株の多くで発現のみならず顕著なチロシンリン酸化を認める。また最近その発現量が神経芽腫の予後と強く相関することが示された。神経芽腫の分化・増殖制御における ShcC の役割を明らかにするため、ShcC 全長及びその変異体の発現や RNAi 法による発現抑制が、神経芽腫細胞の増殖能、運動能、足場非依存性などの特性に与える影響を解析する。また神経芽腫細胞において ShcC の各ドメインに結合する蛋白質群を精製により同定し、神経芽腫における ShcC 特異的なシグナルの伝達機構を明らかにする。これまで解析されてきた ShcA と ShcC の間で神経芽腫における役割がどのように異なるかを明らかにするとともに、ShcC のシグナルを介して神経芽腫の進展を抑制するモデルを樹立する。

(3) 骨肉腫細胞の接着能、運動に関わるチロシンリン酸化蛋白質の解析

骨肉腫細胞株 Hu-09 の運動能や接着能を制御している鍵となる分子を、チロシンリン酸化蛋白質の解析により明らかにする。これらの蛋白質のリン酸化に関わるチロシンキナーゼキナーゼを推定するとともに、過剰発現や RNAi による発現抑制の系を用いてこれらの分子の接着・運動能への関わりを明らかにする。

ヒト試料の解析研究を行うにあたっては国立が

んセンターの倫理委員会の承認を得、資料等の提供者、その家族・血縁者その他関係者の人権及び利益の保護の取り扱いについて充分配慮する。動物実験は国立がんセンター研究所の動物委員会の定める動物実験倫理規定に従って進める。

C. 研究結果

1 2種類の肺癌細胞株を、ソフトアガーアッセイによる足場非依存性増殖能と浮遊・接着状態におけるチロシンリン酸化蛋白質の違いにより4つのグループに分類した。A549細胞などを含むグループにおいては、浮遊状態においてむしろチロシンリン酸化が増強するような135kDと80kDの特徴的なチロシンリン酸化蛋白質を観察し、Srcキナーゼの阻害剤や、SrcファミリーのRNAiにより、この細胞の足場非依存性増殖能が落ちると同時にこの2つの蛋白質のチロシンリン酸化が著明に低下することがわかった。これらの蛋白質はSrcファミリーに属するFynなどと細胞内で強く結合していたため、Fynに対する親和性とチロシンリン酸化の2つの特性から精製することに成功し、質量分析で同一蛋白質の全長とプロセスされた形であることが明らかになった。RNAiを用いてこの分子の発現を抑えると、浮遊状態におけるアポトーシスが亢進することから足場非依存性に関わる新たな分子であることが示唆され、解析を進めている。

神経芽腫において、ShcCのGrb2結合部位を欠損した変異体で下流シグナルをブロックすると、Erk経路やPI3K-Akt経路が抑制され、細胞増殖能には有意な変化が見られない一方で、細胞運動能・浸潤能の低下やレチノイン酸による分化誘導後の突起形成能の消失などが認められた。また正常型ShcCの過剰発現により造腫瘍能や足場非依存性増殖能に対し著明な抑制効果を持つことが明らかになり、この作用にSrcファミリーの活性の抑制が関わることが示された。このようなShcCの腫瘍に対する抑制的な作用はShcAやSH2ドメインを欠損したShcCでは見られず、SH2ドメインを介したShcC特有の作用であることが示唆された。

転移性の骨肉腫細胞において著明にチロシンリン酸化が亢進している70kDの蛋白質パキシリンは、活性が上昇したFynと協調して骨肉腫細胞の運動能・転移能を制御していることが示された。

D. 考察

正常細胞においてはインテグリンを介した細胞

外基質との接着情報を伝えたり、増殖因子刺激による細胞増殖情報を伝えたりするチロシンキナーゼとその基質を介したシグナルが、腫瘍細胞においてはその時間的・空間的コントロールが破綻し、そのことが腫瘍の無秩序な増殖や転移をもたらすと考えることが出来る。今回の研究は、このようなチロシンリン酸化蛋白質の変化に焦点を絞り、それぞれの臓器特異的に腫瘍細胞の足場非依存性増殖能や転移能などの特性異常に関わる新規分子や、パキシリン、ShcCなどの既知のキナーゼ基質の関わりを明らかにしたことで、チロシンリン酸化の腫瘍進展との深い関わりをさらに鮮明にした。腫瘍における異常なチロシンリン酸化のシグナルを総合的に理解することにより、腫瘍の増殖以上の本体に迫ることが可能であり、さらには新たにこのような分子の恒常的なチロシンリン酸化のシグナルをブロックすることによって腫瘍の異常な特性のみを効果的な抑制できることが示唆された。

E. 結論

腫瘍におけるチロシンリン酸化蛋白質の研究から、腫瘍の組織系に対応して特定のチロシンキナーゼと基質の組み合わせがその腫瘍細胞の転移・浸潤能、足場非依存性増殖能に関わっていることが明らかになった。骨肉腫におけるFyn-パキシリン経路、悪性黒色腫におけるFyn-コルタクチン経路といった、特定のチロシンキナーゼと基質の結合を阻害するあるいは基質のリン酸化部位をマスクするような分子は、キナーゼ活性化が伝える多くのシグナルのうち特定のものを特異的にブロックするため、腫瘍の組織系に合わせた分子標的治療の絶好のターゲットとなりうる。神経芽腫においても分化と増殖の切り替えをチロシンキナーゼ基質が行っている可能性がある。これから、治療への応用の前段階としてマウスの尾錠脈注射による転移能の測定やウイルスベクターを併用した局所発現で既に生成された腫瘍組織に対する効果などのデータをとっていくことにより、現在開発中のチロシンキナーゼ阻害剤よりも腫瘍の組織系と腫瘍の特性に照準を合わせた副作用の少ない治療に応用可能であると考えられる。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyake, I., Hakomori, Y., Misu, Y., Nakadate, H., Matsuura, N., Sakamoto, M. & Sakai, R. Domain-specific function of ShcC docking protein in neuroblastoma cells. *Oncogene* **24**: 3206-3215, 2005

Azuma, K., Tanaka, M., Uekita, T., Inoue, S., Yokota, J., Ouchi, Y. & Sakai, R. Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene* **24**: 4754-4764, 2005

Miyamoto, Y., Chen, L., Sato, M., Sokabe, M., Nabeshima, T., Pawson, T., Sakai, R. & Mori, N. Hippocampal synaptic modulation by the phosphotyrosine adapter protein ShcC/N-Shc via interaction with the NMDA receptor. *J. Neurosci.* **25**: 1826-1835, 2005

Osajima-Hakomori, Y., Miyake, I., Ohira, M., Nakagawara, A., Nakagawa, A. & Sakai, R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am. J. Pathol.* **167**: 213-222, 2005

Seo, S., Asai, T., Saito, T., Suzuki, T., Morishita, Y., Nakamoto, T., Ichikawa, M., Yamamoto, G., Kawazu, M., Yamagata, T., Sakai, R., Mitani, K., Ogawa, S., Kurokawa, M., Chiba, S. & Hirai, H. Crk-associated substrate lymphocyte type is required for lymphocyte trafficking and marginal zone B cell maintenance. *J. Immunol.* **175**: 3492-3501, 2005

Tanaka, M., Kamata, R. & Sakai, R. Phosphorylation of ephrin-B1 via the interaction with claudin following cell-cell contact formation. *EMBO J* **24**: 3700-3711, 2005.

Tanaka, M., Kamata, R. & Sakai, R. EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of claudin-4 and mediates paracellular permeability. *J. Biol. Chem.* **280**: 42375-42382, 2005

2. 学会発表

堺隆一、上北尚正、田中正光、浅輪珠恵：Cas ド

ッキング蛋白質の C 末端領域による腫瘍特性の制御 (2005.9.14-16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)

三宅泉、上北尚正、堺隆一：神経芽腫における野生型 ShcC の腫瘍抑制効果の解析 (2005.9.14-16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)

上北尚正、堺隆一：がん細胞の足場非依存性増殖における Src 型キナーゼ及び、その基質群を介した新規シグナル伝達機構の解析 (2005.9.14-16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)

田中正光、鎌田礼子、佐々木一樹、堺隆一：ephrin-B1 の shedding による細胞外ドメインの分泌機序の解析 (2005.9.14-16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)

二見仁康、梶村直子、堺隆一：RNA 干渉による活性化 Ret 蛋白の機能解析 (2005.9.14-16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

細胞接着糖鎖を介する運動能・接着能・血管新生能の調節機構と その分子経路の解明

分担研究者 神奈木 玲児 愛知県がんセンター・研究所分子病態学部・部長

研究要旨：局所進行がんでは、一部のがん細胞が低酸素状態に陥り、体細胞変異などの遺伝子変化によって低酸素抵抗性を獲得した細胞が選択的に生き残り増殖する。こうしたがんのプログレッションをとおして悪性度のより高いがん細胞が選択され、これらのがん細胞が血行性転移を起こす。我々は昨年度、血行性転移においてがん細胞の血管内皮への接着を媒介するシアリルルイス_x糖鎖やシアリルルイス_a糖鎖の発現が低酸素によって亢進し、血行性転移を準備する状態となることを見いだした。本年度はさらに低酸素によるがん細胞表面糖鎖の変化を検索し、低酸素によってN-グリコリル型のシアル酸(NeuGc)を有する糖鎖が増加すること、その背景には、低酸素によるシアル酸トランスポーター(*sialin*)遺伝子の転写誘導があることを明らかにした。N-グリコリル型のシアル酸を有する糖鎖、とくにNeuGc-GM2は、低酸素抵抗性を獲得したがん細胞の治療においてターゲットとすべき分子の良い候補と考えられた。

A. 研究目的

細胞ががん化すると細胞表面の糖鎖に大きな変化が生じる。がん細胞に特有の糖鎖の一部は細胞接着活性を持ち、浸潤・転移において重要な役割を演じる。本研究では悪性細胞における糖鎖、とくに細胞接着機能を有する糖鎖の発現亢進をもたらす遺伝子発現調節機構とその分子経路を明らかにすることを目的とする。がんにおける細胞接着糖鎖の発現異常は、血管外浸潤・血行性転移および腫瘍血管形成に関与しており、こうした糖鎖異常を導く機構を遺伝子レベルから明らかにすることによって、細胞の分化・がん化のバイオマーカーとなる新たな糖鎖分子を同定し、適切な診断および治療法を樹立することを目指す。

我々は昨年度、がん細胞と血管内皮細胞との接着を誘導するセレクチンの糖鎖リガンドであるシアリルルイス_{a/x}系糖鎖のがん細胞での発現の低酸素による亢進を見だし、その背景に転写因子HIF-1(低酸素誘導因子)による糖関連遺伝子の発現誘導があることを明らかにした。その過程で、低酸素による糖鎖関連遺伝子の転写誘導をDNAアレイなどで解析した結果から、低酸素による変化がより広汎な糖鎖に起こる事を示す予備的成績を得た。

本年度は以上の予備的成績を元に、低酸素によって誘導される糖鎖をさらに広く検索し、低酸素抵抗性を獲得したがん細胞に選択的に出現する糖鎖を見だし、その発現誘導機構を明らかにすることを研究目的とした。

B. 研究方法

がん細胞が増殖し局所進行がんの段階になると、がん病巣の一部は低酸素状態となり、遺伝子変異の結果、低酸素抵抗性を獲得したがん細胞が選択的に生き残り、これによりがん細胞のいっそうの悪性化が進行する。このように、低酸素抵抗性の獲得はがんのプログレッションを起こす大きな要因である。そこで我々は、低酸素(1% O₂)下で上皮細胞を培養し、細胞表面における糖鎖変化の誘導を検索した。

(倫理面への配慮)

研究に使用する臨床材料は、材料を得る各施設での倫理委員会を経たものを用いた。

C. 研究結果

1) ヒトが合成酵素を欠くシアル酸分子種、NeuGcの患者がん組織における発現

N-グリコリル型のシアル酸(NeuGc)は、その合成酵素を欠くヒトでは本来合成されず、ヒト

以外のほとんどの動物種で合成されるシアル酸分子種である。NeuGc含有糖鎖をヒトに投与すると免疫応答が惹起され、NeuGc含有糖鎖にはHanganutziu-Deicher抗原という別名が与えられている。本来ヒト組織には存在しないはずのNeuGcが、ヒトがんにはしばしば出現する。しかしCMAH遺伝子はヒトではエキソンの部分欠失を起こして不活化しており、ヒトがんでの出現のメカニズムは未解明であった。

我々はNeuGc残基を含有するGM2ガングリオシドと、NeuGcのかわりにヒトの通常のシアル酸であるNeuAc残基を含有するGM2ガングリオシドのそれぞれに対する特異抗体を樹立し、これらを用いて患者手術材料の検索を進めた。その結果、大腸がん組織16例中6例(37.5%)、乳がん組織12例中6例(50.0%)にNeuGc含有GM2ガングリオシドが強発現していた。正常上皮細胞にはほとんど発現が認められなかった。

2) NeuGcのがん細胞への取り込みとNeuGc含有異常糖鎖の発現誘導

通常の培養条件下でNeuGc含有GM2ガングリオシドおよび通常のNeuAc含有GM2ガングリオシドの両者を発現するヒト大腸癌細胞を培養液にNeuGcを含まない合成培地やニワトリ血清培地で飼うと、NeuGc含有GM2ガングリオシドのみが消失し、培地にNeuGcを加えて培養すると再び発現が復活することから、NeuGcは細胞内で合成されるのではなく、細胞外から取り込まれることが明らかとなった。

3) 低酸素培養によるNeuGc含有GM2ガングリオシドの発現誘導と、シアル酸輸送体sialinの転写誘導

通常のNeuAc含有GM2ガングリオシドを発現するが、NeuGc含有GM2ガングリオシドを発現しないヒト大腸癌細胞CaCo-2あるいは乳癌細胞ZR-75-1を低酸素(1% O₂)下で培養すると、細胞表層にNeuGc含有GM2ガングリオシドの発現が誘導されることが判明した。

このNeuGc含有GM2ガングリオシドの発現誘導は、¹⁴C-NeuGcの培地からがん細胞への取り込みの増加を伴っており、その見かけ上のKm値はシアル酸トランスポーターsialinの文献上のKm値とほぼ一致した。また、低酸素培養

により、CaCo-2においてもZR-75-1においても共通してsialinのmRNAの著明な上昇が観察された。

以上の結果から、低酸素培養によるNeuGc含有GM2ガングリオシドの発現は、低酸素によってシアル酸トランスポーターsialinの転写が増大し、これによって培地中のNeuGcのがん細胞への輸送が増大するためと考えられた。確認のためCaCo-2細胞にsialin遺伝子を導入したところ、sialin高発現細胞は、通常酸素濃度下の培養においてNeuGc含有GM2ガングリオシドを発現するようになった。

D. 考察

がんのプログレッションに伴って低酸素抵抗性を獲得したがん細胞は、放射線療法や化学療法に抵抗性であるので、低酸素抵抗性を獲得したがん細胞の治療のターゲットを見いだすことは重要である。これまで低酸素によって誘導される変化としては、嫌氣的解糖系への代謝偏倚、VEGFなど体液性因子の分泌などが良く報告されているのに対し、低酸素に伴う細胞表層抗原の変化はあまり知られていなかった。本研究は低酸素に伴う細胞表層糖鎖の変化を明らかにしたという意義を持っている。

E. 結論

低酸素抵抗性の獲得はがんのプログレッションの重要な要因である。今年度の成果は、低酸素がシアル酸のトランスポーター遺伝子の転写を誘導し、その結果がん細胞においてNeuGc含有GM2ガングリオシドをはじめとするNeuGc含有糖鎖の発現が誘導されることを示した。このことは、低酸素抵抗性を獲得した、より悪性度の高いがん細胞では、必然的にNeuGc含有糖鎖が強く発現することを示す。とくにNeuGc含有GM2は、GM2骨格それ自体ががん関連性糖鎖であり、これがさらに上記のメカニズムで異常シアル酸NeuGcを含有するに至ったものであることから、低酸素抵抗性ががん細胞の治療の良いターゲットと考えられる。

F. 健康危険情報

現在のところ、特記すべきものはありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yin, J., Hashimoto, A., Izawa, M., Miyazaki, K., Chen, G.-Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Furuhashi, K., Cheng, F.-L., Lin, C.-H., Sato, C., Kitajima, K., and Kannagi, R. Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells. *Cancer Res.*, **66**: 2937-2945, 2006.
2. Ohmori, K., Fukui, F., Kiso, M., Imai, T., Yoshie, O., Hasegawa, H., Matsushima, K., and Kannagi, R. Identification of cutaneous lymphocyte-associated antigen as sialyl 6-sulfo Lewis x, a selectin ligand expressed on a subset of skin-homing helper memory T cells. *Blood*, in press.
3. Kamiyama, S., Sasaki, N., Goda, E., Ui-Tei, K., Saigo, K., Narimatsu, H., Jigami, Y., Kannagi, R., Irimura, T., and Nishihara, S. Molecular cloning and characterization of a novel 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter, PAPST2. *J. Biol. Chem.*, in press.
4. 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*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, in press.
5. Otsubo, N., Ishida, H., Kannagi, R., and Kiso, M. Design and synthesis of a novel neo-glycolipid containing sialyl Lewis X determinant carried on the mucin GlcNAc β 1-6GalNAc α core structure. *Tetrahedron Asymmetry*, **16**: 1321-1327, 2005.
6. Satoh, T., Kanai, Y., Wu, M.H., Yokozeki, H., Kannagi, R., Lowe, J.B., and Nishioka, K. Synthesis of α (1,3)fucosyltransferases IV- and VII-dependent eosinophil selectin ligand and recruitment to the skin. *Am. J. Pathol.*, **167**: 787-796, 2005.
7. Tjew, S.L., Brown, K.L., Kannagi, R., and Johnson, P. Expression of N-acetylglucosamine 6-O sulfotransferases (GlcNAc6STs) -1 and -4 in human monocytes: GlcNAc6ST-1 is implicated in the generation of the 6-sulfo N-acetylglucosamine/Lewis x epitope on CD44 and is induced by TNF- α . *Glycobiology*, **17**: 7C-13C, 2005.
8. Uchimura, K., Gauguier, J.M., Singer, M.S., Tsay, D., Kannagi, R., Muramatsu, T., Von Andrian, U.H., and Rosen, S.D. A major class of L-selectin ligands is eliminated in mice deficient in two sulfotransferases expressed in high endothelial venules. *Nat. Immun.*, **6**: 1105-1113, 2005.
9. Yagi, H., Takahashi, N., Yamaguchi, Y., Kimura, N., Uchimura, K., Kannagi, R., and Kato, K. Development of structural analysis of sulfated N-glycans by multi-dimensional HPLC mapping methods. *Glycobiology*, **15**: 1051-1060, 2005.
10. Yamaguchi, M., Ishida, H., Kanamori, A., Kannagi, R., and Kiso, M. 6-O-Sulfo sialylparagloboside and sialyl Lewis X neo-glycolipids containing lactamized neuraminic acid: Synthesis and antigenic reactivity against G159 monoclonal antibody. *Glycoconj. J.*, **22**: 95-108, 2005.

2.学会発表

1. 神奈木玲児: がんの転移・増悪と糖鎖. 第43回日本癌治療学会総会教育講演, (蔵本博行 司会) 名古屋, 10月 25-27日, 2005.
2. 神奈木玲児: クロマチンリモデリングと糖鎖遺伝子: がん治療の観点から. 第64回日本癌学会総会シンポジウム, 「糖鎖研究とがん治療」(谷口直之 座長) 札幌, 9月14-16日, 2005.
3. 殷 軍、宮崎敬子、橋本彩子、田口 修、竹松 弘、小堤保則、鈴木明身、佐藤ちひろ、北島 健、神奈木玲児: *N-glycolyl*型シアル酸含有糖鎖の癌選択的発現とシアル酸トランスポーターSialinの関与. 第64回日本癌学会総会, 札幌, 9月 14日-16日, 2005.
4. 河村由紀、川島 麗、反町典子、神奈木玲児、土肥多恵子: 正常消化管粘膜に発現する β 1,4*N*-アセチルガラクトサミン転移酵素遺伝子の癌化に伴うエピジェネティックな発現抑制機構. 第64回日本癌学会総会, 札幌, 9月 14日-16日, 2005.
5. 井澤峯子、殷 軍、宮崎敬子、石田廣次、中村栄男、神奈木玲児: ヒト癌組織における*N-Glycolyl GM2*ガングリオシドの特異的発現と分布. 第64回日本癌学会総会, 札幌, 9月 14日-16日, 2005.
6. 京ヶ島守、小泉恵子、江原孝史、原 厚、青山俊文、神奈木玲児: アポトーシス惹起性フィトスフィンゴシン含有糖脂質のMALDI-TOF MSによる検出. 第64回日本癌学会総会, 札幌, 9月 14日-16日, 2005.
7. 後藤嘉子、上田 大、宮崎敬子、小池哲史、井澤峯子、丁 剛、中井 茂、久 育男、神奈木玲児: 扁平上皮癌および正常keratinocyteにおけるケモカインリセプターCCR7の発現. 第64回日本癌学会総会, 札幌, 9月 14日-16日, 2005.
8. 宮崎敬子、陳 国云、大森勝之、山地俊之、橋本康弘、鈴木明身、神奈木玲児: ジシアルルイスa糖鎖と一連のSiglec分子との結合を介した消化管粘膜内の細胞間相互作用の解析. 第64回日本癌学会総会, 札幌, 9月 14日-16日, 2005.
9. 陳 国云、平岩 望、長田啓隆、浜窪隆雄、児玉龍彦、神奈木玲児: T-betおよびGATA-3を含んだ転写因子複合体によるヒトリンパ球系細胞のフコース転移酵素VII遺伝子の転写調節. 第64回日本癌学会総会, 札幌, 9月 14日-16日, 2005.
10. 橋本彩子、陳 国云、小池哲史、藪田智範、陳 健、小林正伸、神奈木玲児: Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)による癌細胞のセレクトイン糖鎖リガンド発現の転写誘導機構. 第64回日本癌学会総会, 札幌, 9月 14日-16日, 2005.
11. 木村尚子、大森勝之、宮崎敬子、橋本彩子、加藤宏一、森山昭彦、神奈木玲児: 糖鎖認識蛋白質セレクトインおよびSiglecを介した細胞間相互作用に対する糖鎖6-硫酸化およびシアル酸環状化反応の効果. 第64回日本癌学会総会, 札幌, 9月 14日-16日, 2005.
12. 神奈木玲児、陳 国云、浜窪隆雄、児玉龍彦: T-betとGATA-3を含む転写因子複合体による細胞接着糖鎖シアルルイスx発現の調節機構. 第28回日本分子生物学学会年会, ワークショップ「免疫グロブリン・スーパーファミリー細胞接着分子による細胞運動性の制御とがん浸潤」(世話人 佐谷秀行, 村上善則), 12月 7日-10日, 2005.
13. 井澤峯子、木村尚子、内村健治, Fathy El-Fasakhany, 門松健治, 村松 喬, 田口 修, 神奈木玲児: 硫酸基転移酵素ダブルKOマウスを用いたL-セレクトインリガンドにおける糖鎖6-硫酸化の意義の検討. 第35回日本免疫学会総会・学術集会, 横浜, 12月 13日-15日, 2005.

H.知的財産権の出願・登録状況
特にありません。