

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：糖鎖構造の制御によるがん及びウイルス疾患の予防法及び治療法の開発

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

小山 信人 (タカラバイオ(株) 臨床開発部 部長)

主たる共同研究者

近藤 昭宏 (大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座教授)

三善 英知 (大阪大学大学院医学系研究科 教授)

3. 研究内容及び成果

糖タンパク質の糖鎖構造は多様な生物機能に影響を及ぼす。我々は、糖鎖構造の制御によりがんやウイルス疾患を予防・治療する技術及び糖鎖構造に基づく新たな腫瘍マーカーの開発を目指し、*N*-結合型糖鎖の形成におけるキー酵素である *N*-acetylglucosaminyltransferase (GnT-、bisecting GlcNAc 構造を形成) 及び fucosyltransferase 8 (FUT8; 1-6FucT、コアフコース構造を形成) に注目して研究を進めた。

(1) GnT- 遺伝子の発現による HBs 抗原分泌抑制と糖鎖シグナル

B型肝炎ウイルス(HBV) 遺伝子を発現する HB611 細胞に GnT- 遺伝子を強制発現させることにより、HBs 抗原の分泌が選択的に抑制された。この細胞において bisecting GlcNAc 構造を持つ糖タンパク質として、インテグリン 5、6、1 及び LI カドヘリンを同定した。一方、HB611 及びその親株である Huh6 について、GnT- 遺伝子導入の有無による遺伝子発現パターンの違いを DNA マイクロビーズアレイ技術により網羅的に解析したところ、HBs 抗原の分泌抑制は特定の遺伝子の転写レベルが変化したためではないことが示唆された。この遺伝子発現解析により取得した遺伝子と糖鎖関連遺伝子等を搭載した DNA マイクロアレイを作製し、慢性骨髄性白血病(CML) 患者の末梢血単核球(PBMC) における遺伝子発現解析を行ったところ、慢性期と芽球転化期の間で遺伝子発現パターンに顕著な差が見られた。

Bisecting GlcNAc を認識するレクチンとして アネキシン が知られており、bisecting GlcNAc 構造を有する Hsp47 が アネキシン と特異的に結合することを発見した。HSP47 は分子シャペロンであり、HBs 抗原が bisecting GlcNAc 糖鎖を有する Hsp47 を介して アネキシン に結合することにより膜輸送装置にトラップされ、分泌が抑制されるというメカニズムが考えられた。

(2) GnT- 遺伝子発現誘導物質の探索

5'-RACE によって GnT- 及び GnT- 遺伝子の転写開始点を探索し、新規転写開始点を 4 個ずつ発見した。その上流部分から得られた GnT- F2-1 プロモーターは強い活性を有していた。約 800 株の微生物培養上清及び各種植物の抽出物(約 150 サンプル) についてスクリーニングしたところ、植物抽出物の 2 サンプルが F2-1 プロモーター活性を上昇させた。GnT- 遺伝子の発現を誘導することにより、がんの転移抑制や HBV 産生抑制に利用できる可能性がある。

(3) 新しい膵がんの腫瘍マーカー、フコシル化ハプトグロビンの開発

膵がんは最も予後不良ながんの一つであり、その最大の原因は早期発見が困難なことである。レクチンプロットングにより、膵がん患者の血清においてハプトグロビン 鎖がフコシル化(コアフコース及び末端フコース) されていることを発見した。多数の患者血清及び健常人血清についてフコシル化ハプトグロビン陽性率を測定したところ、健常人の陽性率が 3% であったのに対して、膵がん患者では 60%、大腸がん患者では 40%、肝がんと肝硬変患者では 25% と高い値を示した。CA19-9 の測定を組み合わせると、膵がん

患者の 85%において少なくともいずれか一方が陽性であった。ELISA 法によるフコシル化ハプトグロビンの簡便な測定キットを試作し、実用的なものを目指して改良中である。

#### (4)FUT8 の発現が細胞増殖・分化に及ぼす影響の解明

Fut8 ノックアウト(KO)マウスの発育が非常に不良であることから、FUT8 ノックダウン細胞を作製してそのメカニズムを解析した。その結果、EGF 受容体のコアフコースが欠損するとシグナルをうまく伝達できなくなり、トリプシンを介したプロテアーゼレセプター2(PAR2)のシグナルが低下し、それが細胞増殖の抑制を引き起こすという糖鎖シグナルの伝達経路を解明した。このことは、Fut8 の活性制御でがん細胞の増殖抑制ができるということを示している。

Fut8 KO マウスにおいて、B 細胞の初期分化過程に異常のあることを発見した。この分化異常は、FUT8 のターゲット分子である  $\alpha 4$  1 インテグリン及び VCAM-1 のコアフコースが欠損しているため、プロ B 細胞からプレ B 細胞へと分化するステップに異常が生じたことによるものであった。

#### (5)複合糖質の糖鎖構造解析法の開発

糖タンパク質から *N*-グリコナーゼで *N*-結合型糖鎖を遊離させ、Fmoc 標識の後、CE-ESI-MS により糖鎖構造を解析する方法を確立した。ヒドラジン又は酵素で糖鎖を切り出し、2-アミノピリジンを用いて蛍光標識し、HPLC 分析するという従来法が高度の手技と時間を要するのに対して、本法は操作が簡便なうえ、全工程を 4 時間程度で完了することができるという利点がある。

#### (6)糖鎖を用いた肝幹細胞の分離法の確立とその応用

肝幹細胞様の RLE 細胞は多量の bisecting GlcNAc 構造を持つことを発見し、劇症肝炎を発症した LEC ラットの肝臓からレクチンを用いて bisecting GlcNAc 高発現細胞を分離し、クローン化して LEC-HS 細胞を樹立した。LEC-HS 細胞を肝障害モデルラットに投与すると治療効果が得られ、生着を確認した。

各グループの研究内容及び成果は以下のとおりである。

タカラバイオグループ：上記研究項目(1)の網羅的遺伝子発現解析、DNA マイクロアレイ作製及びこれを用いた解析；(2)全般；(3)における ELISA キット開発。

糖鎖治療学グループ：(1)の HBs 分泌抑制の発見と糖タンパク質の解析；(4)全般；(5)全般。

糖鎖シグナルグループ：(1)のアネキシン /Hsp47相互作用の解析及びGnT- 遺伝子導入細胞の作製；(3)全般；(4)におけるKOマウス作製；(6)全般。

## 4. 事後評価結果

### 4 - 1 . 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

膵がん患者のフコシル化ハプトグロビンの陽性率が高いことを発見し、膵がんマーカーとなる可能性を見出した。B 型肝炎ウイルス遺伝子を発現する細胞に、GnT- 遺伝子を強制発現させることにより、HBs 抗原の分泌が抑制されることを見出した。また GnT- 遺伝子発現誘導物質を探索して、植物抽出物の 2 サンプルが F2-1 プロモーター活性を上昇させることを見出した。Fut8 ノックアウト(KO)マウスの発育が非常に不良であることから、そのメカニズムを解析した。コアフコースの機能解明を進めたことで、一定の評価はできる。糖タンパク質から *N*-グリコナーゼで *N*-結合型糖鎖を遊離させ、Fmoc 標識後、CE-ESI-MS により糖鎖構造を解析する方法を確立した。構造解析法では還元末端のラベル化剤の種類により感度を上昇させる手法は種々試みられている。Fmoc が最適なラベル化剤であるかどうか、今後の比較検討が待たれる。

研究代表者は企業所属であるため、そのグループは特許出願が主体であり論文発表は少ない。三善グループの論文発表数が際立って多い。

論文発表(国内 0件、国際 44件) 招待講演(国内 14件、国際 14件)

口頭発表(国内 48件、国際 3件) 特許出願(国内 5件、海外 2件)

#### 4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

フコシル化ハプトグロビンが膵がんマーカーとして利用可能であることを発見した。CA-19-9 の測定法と組み合わせると、膵がん患者の 85% において少なくともいずれか一方が陽性であった。膵がんマーカーとして実用を目指して測定キットを改良中であり、戦略目標に沿った成果である。HBs 抗原の分泌抑制機構の解明は、ウイルス学にとり、学術的に重要かつ解明すべき課題ではあるが、診断及び治療には更なる研究が必要である。肝幹細胞様の RLE 細胞は多量の bisecting GlcNAc 構造を持つことを発見し、クローン化して LEC-HS 細胞を樹立した。LEC-HS 細胞を肝障害モデルラットに投与すると治療効果が得られた。本成果も是非とも実用化を目指して欲しい。

「予防法および治療法の開発」という研究課題からすると、今後の研究の進展を期待したい。

#### 4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

本チームは糖鎖領域では唯一、企業が中核研究機関であるため、どのような体制で研究を展開するのが注目・期待された。しかし、途中研究目標を変更したこと等により、研究テーマが、がん診断、ウイルス研究、KOマウスによる糖鎖の機能解析、糖鎖の構造解析技術開発と広がったため、企業のリーダーシップが明確に発揮出来なかった。種々の研究テーマを遂行したが、海外の研究の追従でないところが評価できる。