

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」  
研究課題「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」

## 研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成19年10月

研究代表者：小山信人  
(タカラバイオ(株)、臨床開発部部長)

## 1 研究実施の概要

*N*-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III)は糖タンパク質の *N*-結合型糖鎖にバイセクティング *N*-アセチルグルコサミン (bisecting GlcNAc)を、fucosyltransferase 8 (FUT8;  $\alpha$  1-6FucT)はコアフコースを付加する酵素であり、いずれも糖鎖構造が形づくられる際のキー酵素のひとつである。

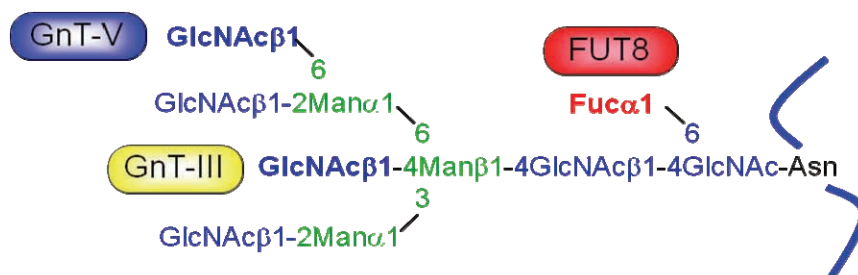


図1 GnT-III、GnT-V及びFUT8により形成される糖鎖構造

GnT-VやGnT-IVにより形成される多分岐糖鎖を有するがん細胞は転移しやすいことが知られている。Bisecting GlcNAcを持つ糖鎖はGnT-Vの基質とはならないので、GnT-III遺伝子を強制発現させたがん細胞は、親株に比べて糖鎖の分岐度が低く、転移が抑制される。また、肝芽種細胞株Huh6にB型肝炎ウイルス(HBV)ゲノムDNAをトランスフェクトして作製されたHBV産生細胞株(HB611)にGnT-III遺伝子を導入すると、HBV遺伝子の発現が特異的に抑制される。多くのがん細胞はフコシル化糖タンパク質を分泌しており、 $\alpha$ フェトプロテインL3分画や尿中遊離フコースといったフコース関連腫瘍マーカーが既に実用化されている。また、IgG糖鎖のコアフコースを除去することにより抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)が飛躍的に上昇することが知られており、コアフコースは免疫系に深く関わっている。これらの知見をもとに、糖鎖遺伝子の導入又は発現調節によって糖鎖構造を制御し、がんやウイルス疾患を予防・治療する技術の開発を目指して研究を実施した。以下、各研究項目の構想、実施及び成果を概説する。

### 1.1 GnT-III遺伝子の発現によるHBs抗原分泌抑制と糖鎖シグナル

GnT-III遺伝子の発現によりHB611細胞においてHBV遺伝子の転写が抑制されるメカニズムを網羅的な遺伝子発現解析及びプロテオーム解析の手法を用いて解明し、そのシグナル伝達経路を形成する分子を標的としたHBV感染症治療法の開発を目的として研究を開始した。GnT-III遺伝子を導入したHB611細胞の多数のクローンを解析した結果、HBV mRNAの転写よりもむしろHBs抗原の分泌が選択的に抑制されていたことから、分泌抑制機構の解析を行うことにした。HB611細胞とGnT-III遺伝子を導入したHB611細胞のタンパク質の発現の違いを二次元電気泳動で調べたが、タンパク質の発現の差を検出することができなかった。このような現象は、網羅的解析法において時として見られる現象である。そこで、もう少し糖鎖構造に注目し、レクチンカラムによる精製を試みた。GnT-III遺伝子導入HB611細胞の培養液から、bisecting GlcNAc構造を認識するレクチンであるE4-PHAを固定化したアガロースに結合する分子を抽出し、SDS-PAGE後in-gelトリプシン消化、MALDI-TOF MS分析、及びMS/MS分析を行った。その結果、インテグリン $\alpha$ 5、 $\alpha$ 6、 $\beta$ 1及びLIカドヘリンを同定した。

細胞内レクチンは糖鎖によるシグナル伝達や膜輸送に関与していると考えられる。脾臓におけるbisecting GlcNAc認識レクチンの候補としてアネキシンVが同定されており、これがGnT-III遺伝子発現によるHBs抗原分泌抑制に関与している可能性が考えられる。ラット肝がん細胞株mRLN-31からアネキシンVに結合する分子を検索したところ、分子シャペロンの一つであるHsp47を同定した。BIA Core法や免疫沈降法により、Hsp47とアネキシンVの結合には糖鎖中のbisecting GlcNAcが必須であることを証明した。このことから、HBs抗原がbisecting GlcNAc糖鎖を有するHsp47を介してアネキシンV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可能性が考えられる。

HB611 及び親株である Huh6 について、GnT-III 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解析した。その結果、HB611 と Huh6 の間では多くの遺伝子の発現に差が見られたのに対して、HB611 において GnT-III 遺伝子発現により有意に発現変動を示す遺伝子はなかった。このことから、HBs 抗原の分泌抑制は特定遺伝子の転写レベルの変化を介するものではないことが示唆された。

一方、Huh6 細胞への GnT-III 遺伝子導入により発現変動を示す遺伝子を DNA マイクロビーズアレイ技術により網羅的に取得し、これらに糖鎖関連遺伝子等を加えた約 2,400 遺伝子を搭載した DNA マイクロアレイを作製した。これを用いて慢性骨髄性白血病 (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。

## 1.2 GnT-III 遺伝子発現誘導物質の探索

GnT-III 遺伝子の発現を誘導することにより、その対象ががん細胞であれば転移を抑制し、HBV に感染した肝細胞であればウイルス産生を抑制できる可能性がある。このような活性を有する物質をスクリーニングすべく、GnT-III 及び GnT-V 遺伝子のプロモーターを解析した。

5'-RACE によってこれら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。転写開始点直上流のヒトゲノム DNA をクローニングし、ルシフェラーゼアッセイによってプロモーター活性を測定した。その結果、GnT-III 遺伝子のプロモーターの一つ (F2-1 プロモーター) がヒト肝がん細胞株 Huh7 において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。

## 1.3 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。膵がんのマーカーとされている CA19-9 は早期発見には使用できず、病気の進行度合いの指標となるに過ぎない。今までの実験結果から膵がん細胞の多くがフコシル化タンパク質を分泌していることがわかったので、本研究ではフコシルを標的にした新規腫瘍マーカーの開発を試みた。

フコシルを認識するレクチン AAL (*Aleuria aurantia* lectin) を用いたウェスタンブロットにより膵がん患者の血清を分析すると、分子量 40 kd のタンパク質がフコシル化されていた。N 末端アミノ酸配列からこのタンパク質をハプトグロビン  $\beta$  鎖と同定した。質量分析法によりハプトグロビンの糖鎖構造を解析したところ、健康人の糖鎖にはフコシルがほとんど検出されなかったのに対して、患者の糖鎖にはコアフコシルや末端フコシルが検出された。

多数の患者血清及び健康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、健康人の陽性率が 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。

## 1.4 FUT8 の発現が細胞増殖・分化に及ぼす影響の解明

Fut8 のノックアウトマウスは、そのほとんどが生後数日以内に致死性を示し、少数の生存マウスも野生型に比べて発育が非常に不良であり、数週間で死に到るものも多いという重篤な表現形を示す。これまでに我々は、Fut8 ノックアウトマウスの肺組織において TGF- $\beta$  受容体を介したマトリックスメタロプロテアーゼの発現抑制ができなくなるために、肺組織の細胞外マトリックス生合成と分解の均衡が破れ、肺気腫様の疾患になることを発見した。またこの欠損マウスはこの TGF- $\beta$  を大量に投与することによりその症状が改善することも確かめられた。

一方、Fut8 のノックアウトマウスの EGF 受容体は、 $\alpha$ 1,6 コアフコシルが欠損しているため、シグナルをうまく伝達されなくなり、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ことを遺伝子発現解析から見出した。さらに、Fut8 をノックダウンしたマウス膵がん細胞の解析により、EGFR-トリプシン-PAR2 シグナル経路が存在し、この経路は細胞増殖に深く関与していることを解明した。しかもこの経路は、Fut8 の活性制御でがん

細胞の増殖抑制ができることを示している。

Fut8 ノックアウトマウスにおいて、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、ターゲット分子の  $\alpha$  1,6 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。

また、Fut8 をノックダウンしたプレ B 細胞 (70Z/3) 上の  $\alpha$  4  $\beta$  1 インテグリン及びストローマ細胞 (ST2) 上の VCAM-1 による細胞接着活性は、 $\alpha$  1,6 コアフコースが欠損することによって低下することを証明した。

#### 1.5 複合糖質の糖鎖構造解析法の開発

糖タンパク質のアスパラギン型糖鎖を解析するために、現在最も広く使われている方法は、糖鎖を糖タンパク質からヒドラジンもしくは酵素で切断し、その後蛍光標識 (例えば 2-アミノピリジンを使った PA 化) を行い、HPLC にて解析するという方法である。本研究では、キャピラリー電気泳動 (CE)-ESI-MS を用いた簡便迅速な方法を検討した。誘導体化法としては、糖タンパク質から *N*-グリコナーゼで切り離された糖鎖がグリコシルアミン型で遊離されることを利用する方法を応用し、ラベル化後 CE-ESI-MS で分析を行う方法の確立を行った。この分析法は糖鎖の切断からの全工程を 4 時間程度で完了することができる。本法は、MS/MS 解析を行うことにより糖鎖の構造情報も得ることができる優れた方法である。

## 2 研究構想及び実施体制

### (1) 研究構想

糖鎖構造が生命現象に及ぼす影響を分子、細胞、個体レベルで解明するとともに、疾病の予防及び治療に応用可能な糖鎖構造制御法の開発を目的とし、以下の2つを研究の柱として本研究を開始した。

#### 1. GnT-III 遺伝子導入によるウイルス性肝障害の修復

GnT-III 遺伝子の発現から HBV 遺伝子の転写抑制に至る情報伝達の経路を解明するために、網羅的なプロテオーム解析及び遺伝子発現解析の手法によりこの経路に関与するタンパク質及び遺伝子を同定する。これらの遺伝子又は GnT-III 遺伝子を肝幹細胞に導入する技術及び遺伝子導入肝幹細胞をマウス又はラット肝臓に生着させる技術を開発する。この系は、ウイルス性肝障害に対する遺伝子治療・再生医療のモデルとなりうる。タカラバイオグループが遺伝子発現解析、糖鎖治療学グループがプロテオーム解析、糖鎖シグナルグループがレクチンを介した糖鎖シグナルの研究を主に担当する。

#### 2. GnT-III 遺伝子発現誘導物質及び GnT-V 遺伝子発現抑制物質の探索

GnT-III 遺伝子及び GnT-V 遺伝子の新規プロモーターを解析するとともにレポーターアッセイ系を構築し、GnT-III 遺伝子発現誘導物質及び GnT-V 遺伝子発現抑制物質を探索する。このような物質はがん細胞の糖タンパク質糖鎖の  $\beta$  1,6 分岐を減少させることによりがんの転移を抑制し、GnT-III 遺伝子発現誘導物質は HBV の増殖を抑制する可能性がある。タカラバイオグループが担当する。

本研究により GnT-III 遺伝子を発現させた HB611 細胞の多数のクローンを解析したところ、HBV mRNA の転写よりも HBs 抗原の分泌が抑制される場合が多いことがわかった。一方、B 型肝炎治療薬としてラミブジンに加えてアデフォビルが開発されたことにより、症例を選べば B 型肝炎の 80% が治癒可能となった。このような研究結果及び臨床現場の状況を考慮し、研究の中心をウイルス疾患からがんへと変更するとともに網羅的解析に加えて特定の糖鎖標的分子とその糖鎖構造の解析に照準を合わせて以下の研究を行うことにした。

#### 1. GnT-III 遺伝子発現誘導物質の探索

研究開始当初の方針を継続する。タカラバイオグループが担当する。

#### 2. がんの新しいバイオマーカーの開発

膵がん患者血清においてハプトグロビンのフコシル化が起きていることを発見したので、これを応用したバイオマーカーを開発する。また、フコシル化ハプトグロビンの産生メカニズムを解析するとともに簡便な測定法を開発する。主に糖鎖シグナルグループが担当し、タカラバイオグループが測定系の開発を担当する。

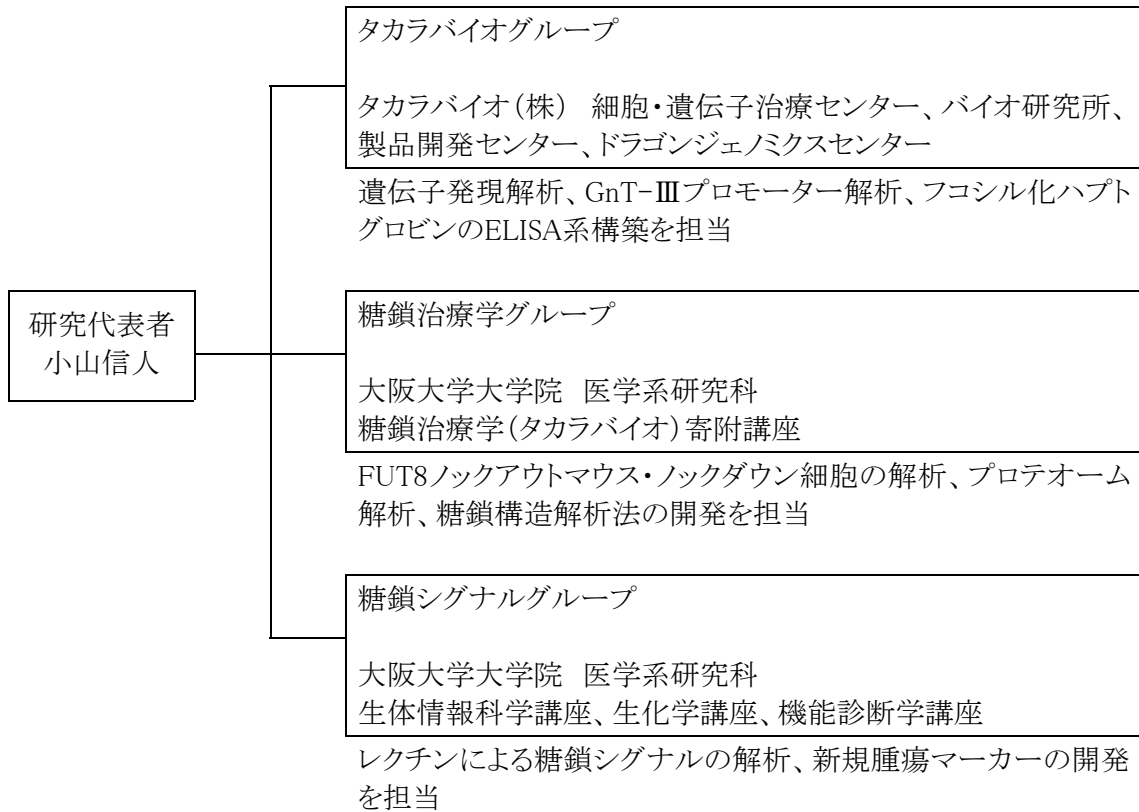
#### 3. FUT8 の発現が細胞増殖・分化に及ぼす影響の解明

FUT8 ノックアウトマウスは発育が不良であり、肺気腫様の症状を呈する。FUT8 ノックアウトマウス及びノックダウン細胞における細胞増殖抑制メカニズムを解明してがん治療への可能性を探る。また、FUT8 遺伝子発現の抑制が血球系細胞の分化に及ぼす影響を研究し、そのメカニズムを解明する。糖鎖治療学グループが担当する。

#### 4. 複合糖質の糖鎖構造解析法の開発

従来、糖鎖構造分析には大量のサンプルと専門的な知識が必要であった。糖鎖の標識法や質量分析法を改良し、サンプルの微量化及び糖ペプチドへの応用を目指す。糖鎖治療学グループが担当する。

(2) 実施体制



### 3 研究実施内容及び成果

#### 3.1 GnT-III 遺伝子の発現による HBV 遺伝子発現抑制機構の解明

(タカラバイオ(株) タカラバイオグループ、大阪大学大学院 糖鎖治療学グループ、大阪大学大学院 糖鎖シグナルグループ)

##### (1) 研究実施内容及び成果

HB611 細胞は、ヒト肝芽腫細胞株である Huh6 細胞に HBV ゲノム DNA をトランスフェクトして作製された細胞株であり、HBV 粒子を恒常的に産生する。Huh6 細胞では GnT-III 遺伝子が発現しているのに対して HB611 細胞では発現が見られないこと (*Cancer Res* **54**(7), 1854-8, 1994)、及び HB611 細胞に GnT-III 遺伝子をトランスフェクトすると HBV mRNA の転写及び HBs 抗原の分泌が抑制されることが報告されている (*J Biol Chem* **270**(47), 28311-28315, 1995)。GnT-III 遺伝子の発現から HBV 遺伝子発現の抑制に至るシグナル伝達経路を形成する遺伝子の候補を、遺伝子発現解析及びタンパク質・糖鎖発現解析の両面から絞り込み、詳細に解析することを基本戦略として本研究を開始した。

GnT-III 遺伝子を導入した HB611 細胞クローンを作製したところ、一部のクローンで HBV mRNA の抑制は観察されたものの、継代を繰り返すと HBV mRNA の発現が回復する傾向にあった。その一方、培地中の S 抗原 (HBs) の量に差が見られるクローンを得た。このため、当初の目的である GnT-III 遺伝子の発現による HBV 遺伝子発現抑制機構の解明から、HBs 分泌抑制機構の解析に方針を変更した。

まず、この分泌抑制が HBs 特異的かどうかを調べるため、GnT-III 遺伝子導入 HB611 細胞の培養液中のアルブミン (ALB)、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン ( $\alpha$ 1AT)、 $\alpha$  フェトタンパク質 (AFP) 及び HBs の分泌量を抗体染色法で調べた。ALB、 $\alpha$ 1AT、AFP の量は HB611 細胞と変わらなかったが、HBs の分泌量のみ低下していることが分かった (図)。つまり GnT-III が HBs の分泌機構を制御していることが確認された。次に、この作用に関与する分子の同定を試みた。HB611 細胞と GnT-III 遺伝子を導入した HB611 細胞のタンパク質の発現の違いを二次元電気泳動で調べたが、タンパク質の発現の差を検出することができなかった。このような現象は、網羅的解析法において時として見られる現象である。そこで、もう少し糖鎖構造に注目しその構造特異的な調べ方を行うべく、レクチンカラムによる精製を試みた。GnT-III 遺伝子導入 HB611 細胞の培養液から E4-PHA アガロースに結合する分子を抽出し、SDS-PAGE 後 in-gel トリプシン消化、MALDI-TOF MS 分析、及び MSMS 分析を行った。その結果インテグリン  $\alpha$ 5、 $\alpha$ 6、 $\beta$ 1 及び LI カドヘリンを同定した。(図 3)。

GnT-III の過剰発現によってがん細胞の転移が

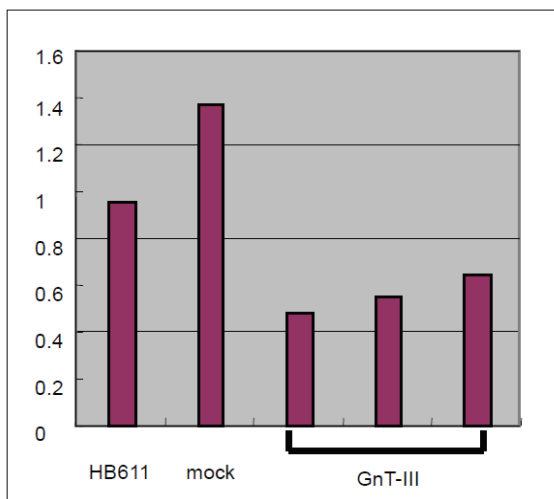


図 2 GnT-III 遺伝子の発現による HBs 抗原の分泌抑制

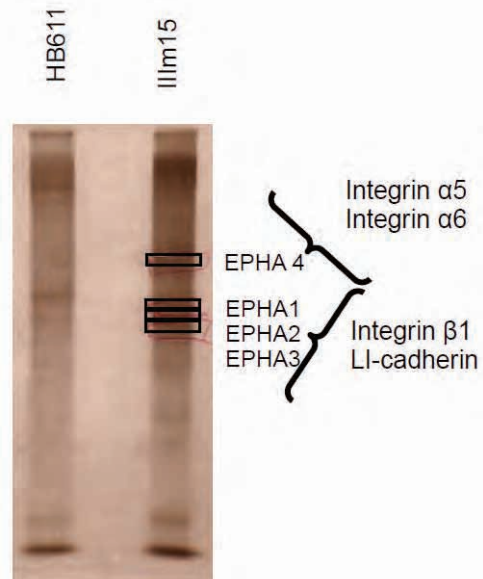


図 3 E4-PHA に結合するタンパク質の同定

抑制されること、HBV の発現抑制が見られること、がん細胞が NK 細胞からの攻撃に耐性機構を持ち脾臓へ集積すること等から、GnT-III 及びその産物である bisecting GlcNAc 糖鎖は様々な生物機能を持つことが予想される。しかし、GnT-III を強制発現させると多くのタンパク質の糖鎖が改変されるため、特定の分子における bisecting GlcNAc 糖鎖と生物機能を直接証明した研究は少ない。ラット肝がん細胞株 mRLN-31 に cAMP の誘導因子であるホルスコリン処理を行うと、数時間で GnT-III の発現が増加し、その産物である bisecting GlcNAc 糖鎖が増加した。ところが、フローサイトメトリーで解析したところ、細胞表面での bisecting GlcNAc 糖鎖は逆に減少していた (*J Biol Chem* **272**, 2866-2872, 1997)。この実験結果から、肝がん細胞内に bisecting GlcNAc 糖鎖を認識するレクチン様分子が存在して糖蛋白質をトラップする可能性が考えられる。アネキシン V は、脾臓において bisecting GlcNAc 糖鎖を認識するレクチンの候補として我々のグループが同定したものである (*Glycobiology* **10**, 1209-16, 2000)。肝細胞においても、このようなレクチン様分子が細胞内シグナルに影響を及ぼすものと考えられる。逆に、このアネキシン V に結合する糖タンパク質もまた、肝がん細胞内で特定の分子と相互作用している可能性がある。

そこで、アネキシン V をカラムに固相化し、GnT-III を過剰発現させた mRLN-31 細胞のライゼートを材料として、アネキシン V が結合する肝がん細胞内分子を探索した。この結果、アネキシン V と結合するタンパク質は少数であり、N 末端アミノ酸配列からその一つがコラーゲンのフォールディングに必須な分子シャペロンである Hsp47 と同定した (図 4, *Glycobiology*, **15**(11), 1067-1075, 2005)。Bisecting GlcNAc 構造をもつ Hsp47 はアネキシン V と結合するが、この構造をもたない Hsp47 はアネキシン V と結合しないこと、及びこの両者の結合は bisecting GlcNAc 構造を持つ糖鎖や E4-PHA により阻害されることを BIA Core 法や免疫沈降法によって証明した (図 5)。また、アネキシン V と Hsp47 及びアネキシン V と bisecting GlcNAc 糖鎖は、mRLN-31 細胞内において共局在していた (図)。

アネキシン V と Hsp47 が GnT-III を発現する HB611 細胞における HBs 抗原の分泌抑制に関係するかどうかはまだ不明である。Hsp47 が分泌過程にある HBs 抗原に結合するとすれば、この複合体にアネキシン V が結合し、膜輸送装置にトラップすることによって HBs 抗原の分泌を抑制している可能性が考えられる。

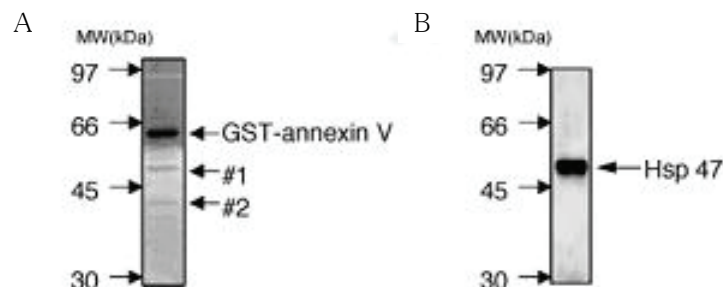


図 4 GST-アネキシン V カラムを用いた Hsp47 の精製と同定  
A: アネキシン V カラムからの溶出物。#1 が Hsp47 と同定された。  
B: 抗 Hsp47 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、#1 のタンパク質が Hsp47 であることを確認した。



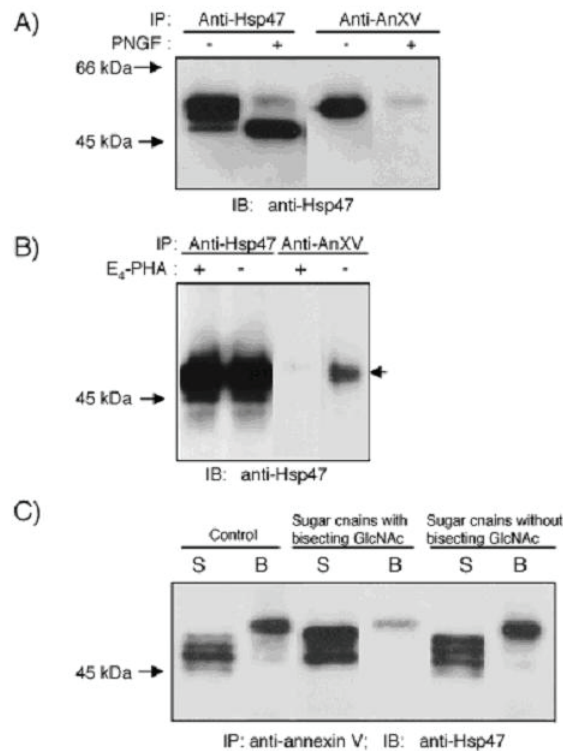


図5 免疫沈降法によるアネキシン V と Hsp47 の結合の確認と糖鎖の重要性

- A: 抗 Hsp47 抗体で mRLN31 細胞の可溶性画分を免疫沈降したところ、アネキシン V が共沈した。N-グリコナーゼで前処理するとアネキシン V が共沈しなかった。
- B: 抗 Hsp47 抗体で mRLN31 細胞の可溶性タンパクを免疫沈降するとき E<sub>4</sub>-PHA を添加すると、アネキシン V は共沈しなかった。
- C: 抗アネキシン V 抗体で mRLN31 細胞の可溶性画分を免疫沈降したところ、Hsp47 が共沈した。免疫沈降時に bisecting GlcNAc 構造を持つ遊離糖鎖を加えると Hsp47 が共沈しなかった。S は免疫沈降の上清、B は免疫沈降物を示す。

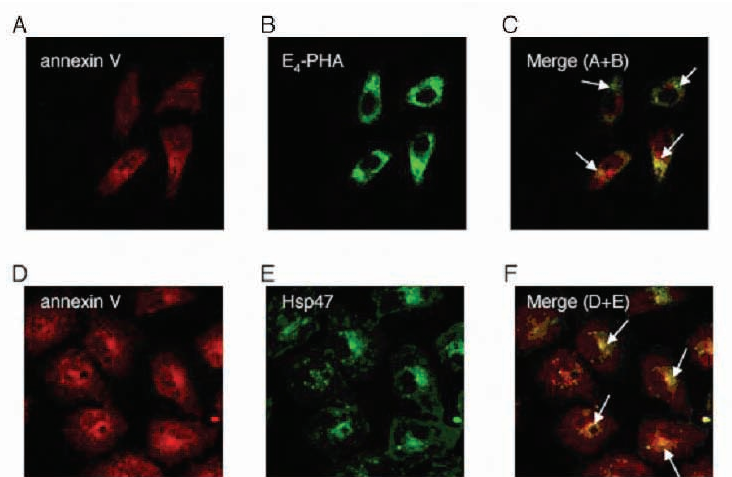


図6 アネキシン V、bisecting GlcNAc 及び Hsp47 の細胞内局在  
Con-focal microscopy によって、アネキシン V と bisecting GlcNAc 糖鎖 (E<sub>4</sub>-PHA) 及びアネキシンと Hsp47 が共局在していることを、それぞれ確認した。

網羅的な遺伝子発現解析によるアプローチとして、DNA マイクロビーズアレイ技術を用いた。DNA マイクロビーズアレイ技術とは、単一配列の cDNA を固定化した直径約 5  $\mu\text{m}$  のプラスチックビーズのライブラリー ( $10^6$  オーダーのクローン数) を作製し (Megaclone)、これを用いて遺伝子発現解析を行う技術である。2 つのサンプルから調製した mRNA を異なる蛍光色素で標識し、Megaclone ビーズ上で競合ハイブリダイゼーションを行い、目的の発現変動を示す遺伝子が固定化されたビーズをセルソーターにより分離する技術が Megasort (*Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 1665-1670, 2000) である。また、Megaclone ビーズをフローセルに 2 次元的に敷きつめ、そこでアダプターのライゲーションや蛍光プローブによるハイブリダイゼーション等の反応を行い、蛍光顕微鏡画像を解析して一度に約  $10^6$  個の約 20 塩基からなる配列 (Signature 配列) を決定する技術が Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS, *Nat Biotechnol* **18**, 630-634, 2000) である。Signature 配列から遺伝子を同定し、出現頻度からその遺伝子の発現量を知ることができる。

ヒト GnT-III 遺伝子導入 HB611 細胞クローン (HB611/GnT-III) 及びベクタープラスミドのみ導入したクローン (HB611/mock) の MPSS による遺伝子発現プロファイリングを行った。また、ヒト GnT-III 遺伝子及びマーカーであるネオマイシン耐性遺伝子をレトロウイルスベクターにより Huh6 細胞に導入し、G418 で選択して得た遺伝子導入細胞 (Huh6/GnT-III) と、GnT-III 遺伝子を持たないベクターを用いて同様の方法により得た遺伝子非導入細胞 (Huh6/mock) についても同様の MPSS 解析を行った。

この結果、HB611 と Huh6 の間では多くの遺伝子の発現量に差が見られたのに対して、HB611/GnT-III と HB611/mock、Huh6/GnT-III と Huh6/mock の間では発現変動を示した遺伝子の数は少なかった。Significance analysis of microarray (SAM) 及び U-test の手法により有意差を検定したところ、特に、HB611/GnT-III と HB611/mock の間には有意に変動している遺伝子がなかった。この結果から、GnT-III 遺伝子の発現による HBs 選択的な分泌抑制は、特定の遺伝子の転写レベルの変化を介するものではないことが示唆された。

一方、GnT-III 遺伝子を発現させることにより発現量に変動する遺伝子及び糖鎖に関連する遺伝子について遺伝子発現解析を行う目的で、DNA マイクロアレイを以下のようにして作製した (図)。Huh6/GnT-III 及び Huh6/mock からポリ (A) RNA を調製し、それをもとに Megaclone ビーズを調製した。Huh6/GnT-III から Cy5、Huh6/mock から FAM 標識した cRNA プローブを調製し、マイクロビーズ上の cDNA との競合ハイブリダイゼーションを行った後、両サンプル間で発現量に差のある遺伝子が結合したマイクロビーズをセルソーターにより分離した。ソーティングされたマイクロビーズ上の cDNA を鋳型に PCR を行い、その産物をプラスミドベクターにクローニングして配列を決定した。その結果、4,283 個の配列が得られ、このうち 3,501 配列が 441 個のクラスターに分類された。こうして得られた遺伝子に加えて、糖転移酵素、グリコシダーゼ、増殖因子、サイトカイン等、合計約 2,400 遺伝子を搭載した DNA マイクロアレイを作製した。

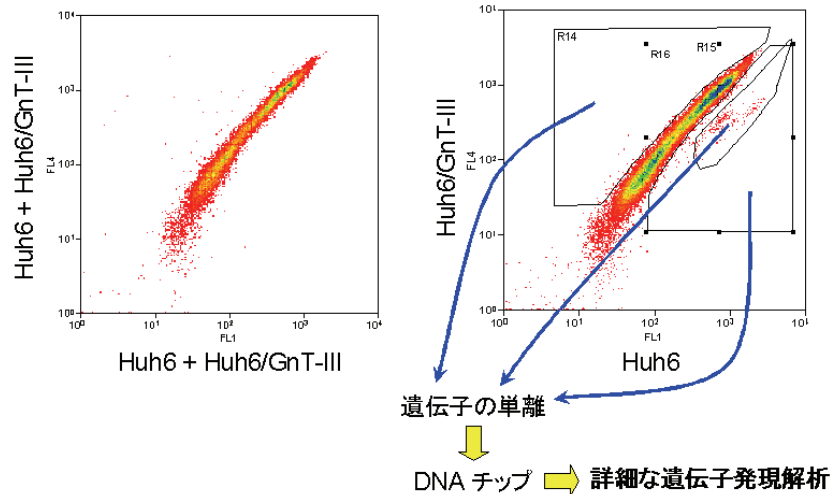


図7 GnT-III遺伝子の発現により発現変動を示す遺伝子の単離

このマイクロアレイを用いて CML 患者の PBMC における遺伝子発現を解析した。CML の芽球転化期(BC)には GnT-IIIの発現が上昇することが知られている(*Int J Cancer* **60**, 443-449, 1995)。健常人 3 名の PBMC 由来 RNA から調製したプローブを Cy3、慢性期(CP)患者及び BC 患者の RNA から調製したプローブを Cy5 で標識して競合ハイブリダイゼーションを行った。CP 1 例、BC 4 例の解析を行ったところ、BC 各サンプル間では発現パターンに相関があった(相関係数 0.404~0.696)のに対して、CPとBC各サンプルとの間には相関がなかった(相関係数<0.1)(図8)。

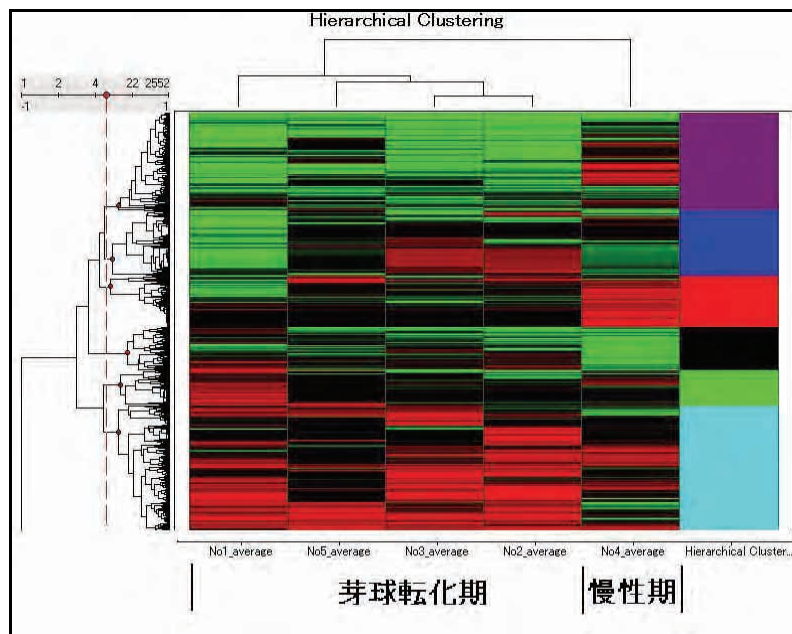


図8 CML 患者 PBMC の遺伝子発現解析

(2) 研究成果の今後期待される効果

GnT-III遺伝子の発現による HBV 遺伝子発現抑制メカニズムの解明という当初の目的は達せられなかったが、GnT-III遺伝子の発現が HBsの分泌を特異的に抑制することを発見し、これに関わる可能性のある分子として bisecting GlcNAc 構造を有する糖タンパク質を同定した。

Bisecting GlcNAc 構造の有無によって細胞内輸送が変化する分子は多数存在すると予想したが、

意外にその数は少なかった。GnT-III 遺伝子の発現による HBs 抗原の分泌低下のメカニズムは、糖タンパク質糖鎖が bisecting GlcNAc を持つことによるほか、ゴルジ装置という限られたスペースに GnT-III を過剰発現させた影響も否定できない。また、HBV 遺伝子の転写レベルで抑制が見られるケースと、遺伝子発現パターンにさほど変化がなく HBs 抗原の分泌が抑制される場合があって、GnT-III の直接あるいは間接的な影響を検討するには、現時点のグライコミクス技術では困難かもしれない。

糖鎖関連遺伝子を搭載したマイクロアレイで CML 患者 PBMC の遺伝子発現解析を行った結果は、現時点では解析数が少ないので個々の遺伝子の発現変動について言及できる段階ではないが、糖鎖構造の変化が芽球転化に関係する可能性を示唆する。糖鎖構造や糖鎖遺伝子の発現パターンから芽球転化を早期に予測できれば治療上のメリットが得られるし、もし糖鎖構造の変化が芽球転化を引き起こすのであれば創薬のターゲットとしても有用である。

### 3.2 GnT-III 遺伝子発現誘導物質の探索(タカラバイオ(株) タカラバイオグループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

細胞表面に 3 分岐、4 分岐の糖鎖を持つがん細胞は転移しやすく、悪性度が高いことが知られている (*Science* **236**, 582-585, 1987)。大腸がんにおける GnT-V の発現レベルが高いほど予後は悪いこと (*Clin Cancer Res* **6**, 1772-1777, 2000)、がんが浸潤するときに発現が増加する転写因子 Ets-1 により GnT-V 遺伝子は転写されていること (*J Biol Chem* **271**, 26706-26712, 1996) なども、GnT-V により形成される糖鎖ががんの悪性度と密接に関連していることを示唆している。GnT-III によりバイセクティング GlcNAc を付加された糖鎖は GnT-V の基質とはならないので、がん細胞に GnT-III 遺伝子を過剰発現させると転移能が低下する (*Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 8754-8758, 1995)。一方、GnT-V タンパク質は酵素活性とは関係なくがんの血管新生を促進する (*J Biol Chem* **277**, 17002-17008, 2002)。したがって、がん細胞において GnT-III 遺伝子の発現を増加させること及び GnT-V 遺伝子の発現を減少させることは、がんの転移や増殖の抑制に効果を示す可能性がある。

GnT-III 及び GnT-V 遺伝子の発現を調節する物質をスクリーニングする目的で転写開始点を探索した。ヒト腎臓、脳及び胎盤由来ポリ(A) RNA を鋳型に両遺伝子の 5'-RACE を行ったところ、GnT-III 遺伝子では 6 個(うち、4 個は新規、2 個は既知 (*Eur J Biochem* **238**, 853-861, 1996 の H15 及び H204 プロモーター))、GnT-V 遺伝子では 7 個(うち、4 個は新規、3 個は既知 (*Eur J Biochem* **233**, 18-26, 1995 のクローン (b)、(e) 及び (f))) の転写開始点が得られ、これらの上流のゲノム配列がプロモーター候補として挙げられた。これらの転写開始点は、GnT-III 遺伝子については開始コドンから上流約 33 kb、GnT-V 遺伝子については開始コドンから上流約 135 kb の範囲にマッピングできた(

図)。

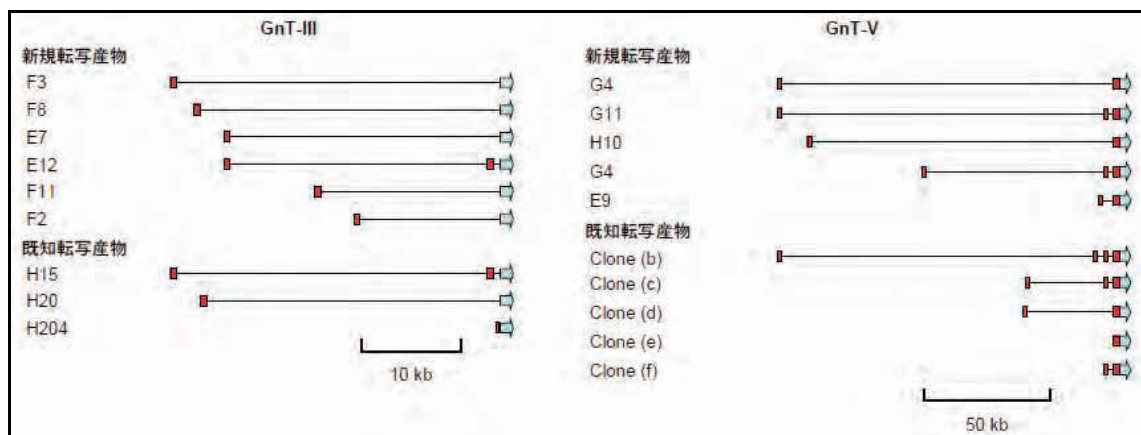


図 9 GnT-III 及び GnT-V 遺伝子の転写産物

これらのプロモーター候補配列を取得するために、ヒトゲノム DNA の公開配列をもとにプライマーを設計し、ヒトゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。上記 33 kb 又は 135 kb の領域を約 6 kb ごとに分割して増幅を試みたところ、GnT-III については 4 個 (うち、2 個は新規)、GnT-V については 4 個 (うち、2 個は新規) の転写開始点の上流域が増幅できた。

こうして取得したプロモーター候補配列をルシフェラーゼアッセイにより測定した。その結果、GnT-III の新規プロモーター候補のうち 1 個 (F2-1) が強いプロモーター活性を示した。これ以外の新規プロモーター候補は微弱な活性しか示さなかった。そこで、F2-1 プロモーターを 5'側から順次欠失させ、3.2 kb から 135 bp のゲノム配列のプロモーター活性を測定したところ、111 bp のエクソンを含む 191 bp の断片がヒト肝がん細胞株である Huh7 細胞において活性を示した (図 10 図)。また、GnT-V の既知プロモーターであるエクソン 1 上流域 (クローン (e) に対応) については 26 bp のエクソンを含む 147 bp 断片が、イントロン 1 (クローン (f) に対応) については 142 bp のエクソン 2 を含む 326 bp 断片が Huh7 細胞においてプロモーター活性を示した。

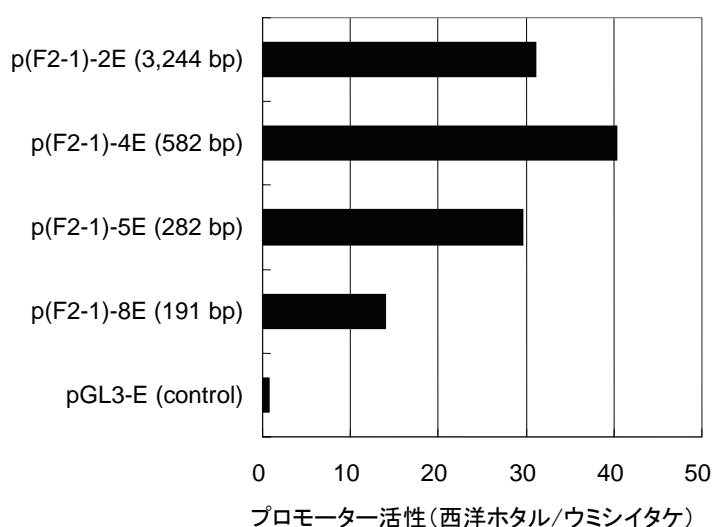


図 10 GnT-III F2-1 プロモーターの各断片の転写活性

GnT-III 及び GnT-V 遺伝子発現調節物質のスクリーニング系を組むにあたり、転写された mRNA が翻訳効率の低い 5'-非翻訳領域 (UTR) を持つようなプロモーターを用いても糖鎖構造に与える影響は少ないと考えられる。そこで、5'-RACE により得られた 5'-UTR に GFP 遺伝子をつなぎ、HepG2 細胞及び 293 細胞にトランスフェクトした後にフローサイトメトリーにより GFP の蛍光強度を測定して mRNA あたりのタンパク質発現量を算出した。すなわち、リアルタイム RT-PCR により測定した GFP mRNA 量で蛍光強度を補正し、各 5'-UTR の翻訳効率とした。その結果、GnT-III mRNA の 5'-UTR は短く (平均 109 塩基)、翻訳効率は高い傾向が、GnT-V mRNA の 5'-UTR は長く (平均 277 塩基)、翻訳効率は低い傾向が見られた。しかし、特に翻訳効率の低かった 1 個の 5'-UTR (GnT-V の H10 由来) を除くと、各々の遺伝子の 5'-UTR の間では翻訳効率の違いは最大 3 倍程度であった。また、各 5'-UTR の翻訳効率は細胞によらず同様の傾向を示した。このことから、GnT-V の H10 転写産物のプロモーターを除いて、転写レベルの増減がタンパク質発現に及ぼす影響の程度は大きく異なることはないと考えられた。

以上の知見をもとに、遺伝子発現調節物質のスクリーニング系には GnT-III の F2-1 プロモーターを使用することとした。(F2-1)-5 断片 (282 bp) を有するレポータープラスミドを Huh7 細胞にトランスフェクトし、約 800 株の微生物培養上清を添加して 2 日間培養した後にルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、1 株の培養液が F2-1 プロモーター活性を 2 倍程度増強したものの、十分な再現性を得るには至らなかった。

次いで、各種植物の水、含水エタノール又はエタノールによる抽出物 (約 150 サンプル) 及び植

物由来化合物(約 60 サンプル)について、同様のスクリーニングを行った。この結果、植物抽出物のうち 2 サンプルが F2-1 プロモーターを活性化した。うち、1 サンプルについて良好な再現性が得られた。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

アルツハイマー病患者のマクロファージにおいて GnT-III 遺伝子の発現レベルが低く、アミロイド  $\beta$  を貪食しないこと、及びアルツハイマー病患者のマクロファージにクルクミノイドを添加すると GnT-III 遺伝子の発現及びアミロイド  $\beta$  貪食能が回復することが報告されている (*Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 12849-12854, 2007)。本研究により得られた植物抽出物中の有効成分の分離には至っていないが、食品として摂取することにより GnT-III 遺伝子の発現を向上させることができれば、がんの転移だけではなく、アルツハイマー病の発症や悪化を防げるかもしれない。

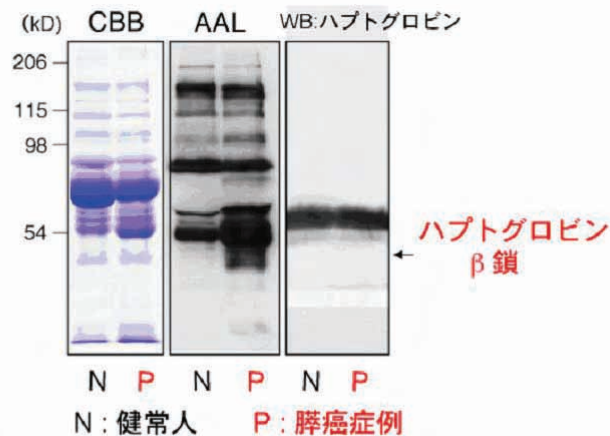
## 3.3 新しい膵がんの腫瘍マーカー、フコシル化ハプトグロビンの開発

(大阪大学大学院 糖鎖シグナルグループ)

### (1) 研究実施内容及び成果

膵がんは症状をもつ患者が病院に来たときにはすでに転移を伴っているケースが多く、5 年生存率が 10% 以下の予後不良のがんである。その最大の理由は早期診断が困難なことであり、今日腫瘍マーカーとして臨床の場で頻用される CA19-9 が陽性になるのは、ある程度病気が進行してからである。また肝がんのように疾患発症のハイリスク群が同定されてはならず、胃がんや大腸がんのように検診システムも確立されていない。これまでの preliminary な実験データより、膵がん細胞が多くのフコシル化タンパクを分泌していることがわかった。そこで、本研究ではフコシル化を標的とした膵がんの新しい腫瘍マーカーの開発を試みた。

膵がん患者の血清中に、フコシル化ハプトグロビンが増加することを見だし、新しい膵がんの腫瘍マーカーになる可能性を示した (*Int. J. Cancer* **118(11)**, 2803-2808, 2006)。すなわち、フコシル化を認識するレクチン AAL (*Aleuria aurantia* lectin) を用いてウェスタンブロットを行うと、分子量 40 Kd のタンパクが膵がん患者血清中で増加し (図 11)、N 末端シーケンスによってハプトグロビンの  $\beta$  鎖と同定した。



膵癌症例の血清で顕著にフコシル化されている  
約 40 kD のタンパク質はハプトグロビン  $\beta$  鎖であった。

図 11 膵がん患者血清におけるフコシル化ハプトグロビンの増加

免疫沈降した(もしくは抗体カラムを用いて精製した)ハプトグロビンを同様の AAL レクチンによるウェスタンブロットを行い、フコシル化糖鎖の増加を確認した。さらに質量分析法を用いて、その詳細な糖鎖構造を解析した。その結果、健常人のハプトグロビン糖鎖にはフコースが検出されなかったが、膵がん患者のハプトグロビン糖鎖にはコアフコース及び末端フコースが検出された(図 12)。

Mass spectrometryで解析した結果、膵癌例には2本鎖、3本鎖N型糖鎖にフコースがついていた

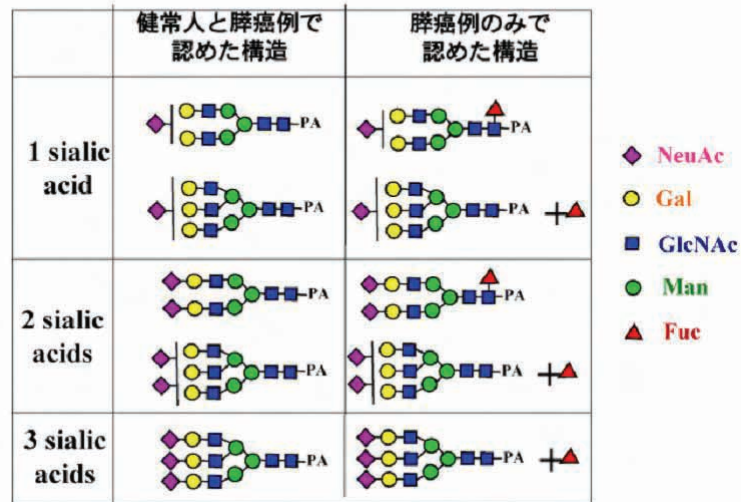
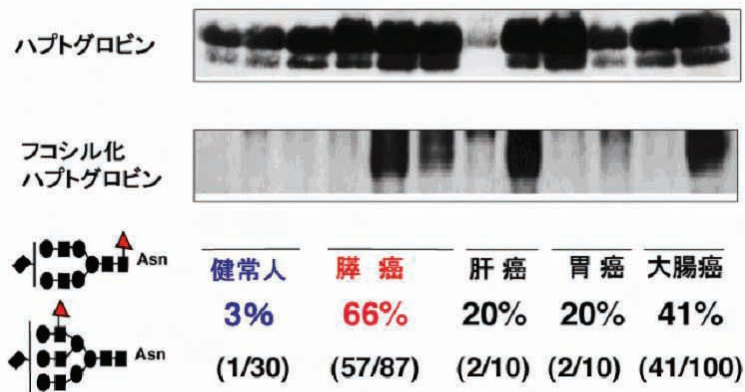


図 12 フコシル化ハプトグロビンの糖鎖構造分析結果

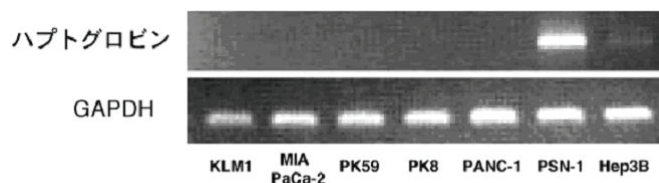
数種類のがんの患者でフコシル化ハプトグロビンの陽性率を検討すると、大腸がんで40%、肝がんと肝硬変で25%、健常人で3%であったのに対して、膵がんでは60%以上の陽性率を示した(図13)。従来から用いられているCA19-9の測定を組み合わせると、85%の症例において少なくともいずれかが陽性であった。また、临床上、膵がんとの鑑別を要する慢性膵炎での陽性率は約20%であった。



種々の疾患におけるフコシル化ハプトグロビンの陽性率:フコシル化ハプトグロビンはハプトグロビン全体量とは相関が認められず、膵癌患者において最も陽性率が高かった。

図13 種々の疾患におけるフコシル化ハプトグロビンの陽性率

ここで、フコシル化ハプトグロビンの産生臓器が問題になる。6種類の膵がん培養細胞におけるハプトグロビン遺伝子の発現をRT-PCR法により検討した結果、大量に発現している細胞はPSN-1細胞のみであった(図14)。



膵癌細胞のなかには培養液中にフコシル化ハプトグロビンを分泌しているものもある。

図 14 各種がん細胞におけるハプトグロビン遺伝子の発現

また膵がんの手術症例 5 例でハプトグロビンの発現を RT-PCR で検討したところ、すべてのがん組織で発現が見られた。ところが、血清中のフコシル化ハプトグロビンの陽性率は、組織でのハプトグロビンの発現量とは必ずしも一致しなかった。従って、膵がん組織だけではなく肝臓を含む他の組織でフコシル化ハプトグロビンが産生されると考えられる。ハプトグロビンは本来肝臓で産生されるので、肝臓が産生臓器の最も有力な候補と考えられる。肝臓以外の候補としては、がん細胞及びがん組織に浸潤した白血球があげられる。

胆汁の糖タンパク質の糖鎖構造と血清のそれを比較すると、前者ではフコシル化の量が圧倒的に多く、これはハプトグロビンにも当てはまる。野生型マウスでは肝細胞において産生され、胆汁中に分泌される数種類のタンパク質が、Fut8 ノックアウトマウスの胆汁中には殆ど検出されなかった。このことから、フコシル化は肝細胞が産生する糖タンパクの胆汁中への分泌のシグナルになっている可能性がある (*J. Biol. Chem.* **281**, 29797-29806, 2006)。

フコシル化ハプトグロビンは AAL を用いたウェスタンブロット法により検出しており、この方法は手間がかかるので臨床応用、特にスクリーニング検査には不向きである。そこで、ハイスループット化を目指して ELISA 類似の測定系を開発することにした。すなわち、抗ハプトグロビン抗体の F(ab')<sub>2</sub> フラグメントを固相化し、サンプルを反応させた後、ビオチン化 AAL と酵素標識ストレプトアビジンにより検出する系を考案した。プロトタイプキットを作製し、モデルサンプル(フコシル化ハプトグロビン産生細胞株の培養上清)の測定を行ったところ、Fuc-Hpt を特異的に検出できた。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

現在のフコシル化ハプトグロビンの検出系(レクチンブロット法や免疫沈降法を用いた方法)に関しては、定量が困難なことや操作が煩雑であることが問題となり、臨床検査法としてすぐには使えない。このため現在検討中の ELISA 類似の測定系をより完成度の高いものにする必要がある。この方法では、抗体のみを用いる通常のサンドイッチ ELISA に比べて特異性、再現性などが問題となる可能性がある。これらの問題点が解決できれば、実際の臨床検査として使える可能性がある。ただし CA19-9 などと同様に、どこまで膵がんの特異性があるかは今後の検討課題である。これまでの私達の検討では、大腸がんでも 40%強の陽性率を示し、最近の他施設からの報告では進行肝がん、前立腺がん、肺がんなどでもフコシル化ハプトグロビンが高率に検出されるため、フコシル化ハプトグロビンの産生機構を詳細に解析する必要がある。そのためには培養細胞レベルでの検討が必要で、本 ELISA 類似キットの有用度が増すことになる。またフコシル化タンパク質は急性の炎症で増加することが古くから知られている。実際の臨床の場では、急性炎症は鑑別の対象にならないが、こうした症例におけるフコシル化ハプトグロビンの陽性率、定量性も検討すべきである。本キットが完成して、様々な疾患のフコシル化ハプトグロビンを測定すると、膵がんのマーカーだけでなく、他疾患の病態評価や診断にもつながるかもしれない。



### 3.4 FUT8 の発現が細胞増殖・分化に及ぼす影響の解明

(大阪大学大学院 糖鎖治療学グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

**$\alpha$ 1,6 コアフコースは EGFR-トリプシン-PAR2 シグナル経路に重要であり、細胞増殖能を制御することができる**

$\alpha$ 1,6 フコース転移酵素 (Fut8) は、糖タンパク質の *N*-結合複合型糖鎖の Asn に結合した GlcNAc の 6 位に  $\alpha$  配位でフコース残基を導入する酵素である。

Fut8 のノックアウトマウスは、そのほとんどが生後数日以内に致死性を示し、少数の生存マウスも野生型に比べて非常に小さく(図 15)、数週間で死に到るものも多いという重篤な表現形を示す。つまり、 $\alpha$ 1,6 コアフコースがマウスの正常な発育に必須であることが示されたのである。これまでに我々は、Fut8 のノックアウトマウスの肺組織において TGF- $\beta$  受容体を介したマトリックスメタロプロテアーゼの発現抑制ができなくなることを見出した (*Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 15791-15796, 2005)。それによって、肺組織の細胞外マトリクス生合成と分解の均衡が破れ、肺気腫様の疾患になることが確認された。またこの欠損マウスは TGF- $\beta$  を大量に投与することによりその症状が改善することも確かめられた。ちなみに、他のフコース転移酵素 (Fut1、Fut2、Fut7、Fut9、Fut4 及び Fut7) ノックアウトマウスの作成も報告されているが、いずれも Fut8 ノックアウトマウスほど重篤な表現形を示してはいない。

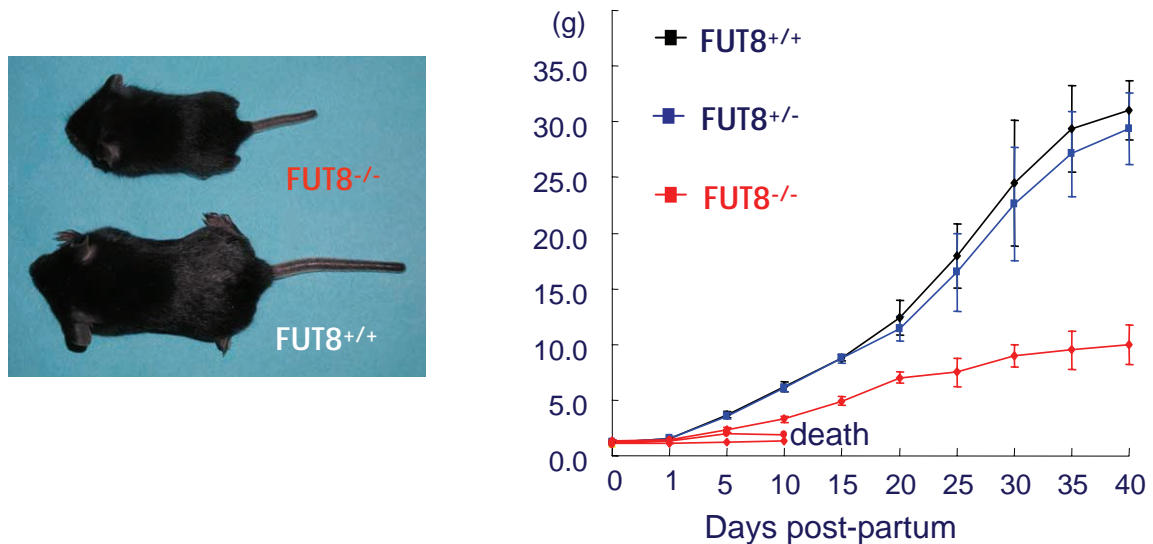


図 15 Fut8 ノックアウトマウスの発育異常

Fut8 ノックアウトマウスの EGF 受容体は、 $\alpha$ 1,6 コアフコースが欠損しているため、シグナルをうまく伝達できず、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ことを以下のようにして見出した。

先に述べたように、Fut8 ノックアウトマウスは生後直ぐに重篤な表現形を示すことが分かっていたため、その遺伝子の発現異常は出生前に起こっていることが容易に推察された。そこで、妊娠後 18.5 日目の Fut8 のノックアウトマウスの胎児における mRNA の発現をマイクロアレイ(表 1) 及びリアルタイム RT-PCR により調べたところ、数種類のトリプシン遺伝子(トリプシノーゲン 4、7、8、11、16、20) の発現が野生型と比較し 10 分の 1 から 20 分の 1 程度に低下していることを見出した。

表 1 Fut8 ノックアウトマウスにおけるトリプシノーゲン遺伝子発現の抑制

Gene name	GenBank	Fold changes (FUT8 <sup>-/-</sup> /FUT8 <sup>+/+</sup> )
Trypsin 3 (Trypsinogen 11)	NM_011645	0.17
Trypsin 4 (Trypsinogen 8)	NM_011646	0.33
RIKEN cDNA 1810009J06 gene (Trypsinogen 4)	NM_023707	0.2
RIKEN cDNA 2210010C04 gene (Trypsinogen 7)	NM_023333	0.08
Trypsinogen 16	NM_053243	0.13

また、トリプシンのタンパク質そのものの発現量の低下及びそれに伴う総トリプシン活性の低下も確認された。これらは、Fut8 ノックアウトマウスの膵臓組織の染色によって明確に示すことができている(図 16)。

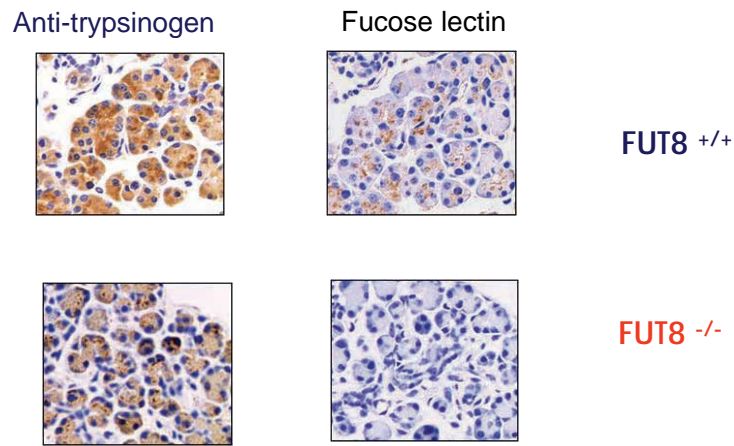


図 16 Fut8 ノックアウトマウスの膵臓におけるトリプシンの発現低下

トリプシンは、食物の消化酵素としてのみならず、種々の生体反応にとって非常に重要な役割を担っていることが明らかにされている。例えば、受精の初発段階としての精子が卵子にもぐりこむ際の先端反応や、ほ乳類の手の指の間の水かき様の組織の退縮はトリプシンによることが分かっている。また、がん細胞の転移において原発巣からのがん細胞の離脱や転移巣への浸潤には多くのプロテアーゼが関与するが、トリプシンも重要な関与酵素の一つであることが知られている。またその際のがん細胞の増殖にプロテアーゼレセプターが関与していることが最近の研究で明らかにされてきた。プロテアーゼレセプター (PAR) には、4 種類のファミリーが知られている。PAR1、PAR3 及び PAR4 はトロンビンによって活性化され、PAR2 はトリプシンによって活性化される。ここに、トリプシンと細胞増殖の関わりの可能性が存在する。

糖転移酵素の発現が抑制され、その糖転移産物(糖タンパク質の糖鎖)に構造変化が起こり、糖タンパク質の機能が変化し、その結果 PAR2 を介したシグナルに影響が出るかどうかを確かめるためには、このプロセスに相当の時間を要すると考えられるので、細胞内シグナルの遮断のような一時的な抑制ではなく、定常的に遺伝子の発現を抑制する系によって検討する必要がある。そこで、我々はレトロウイルスベクターを用いて、定常的に Fut8 の発現を抑制(ノックダウン)したマウス膵臓がん由来細胞(TGP49-Fut8-KD 細胞)を作成した。TGP49-Fut8-KD 細胞において、Fut8 の mRNA、酵素活性及びピコアフコース構造は顕著に減少しており、トリプシノーゲン遺伝子の発現も抑制されていた(図 17)。

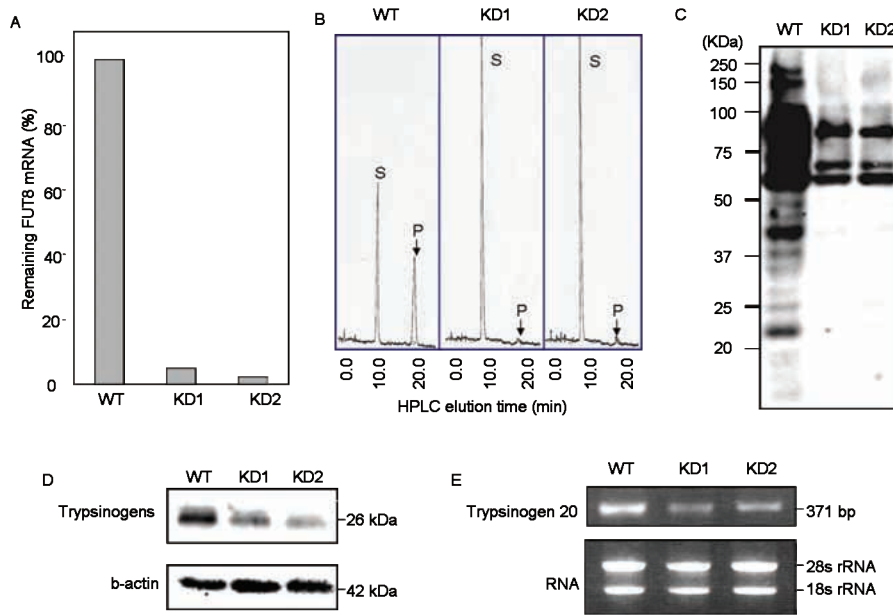


図 17 TGP49-Fut8-KD 細胞における FUT8 及びトリプシノーゲンの発現抑制  
 A:Fut8 mRNA 量(リアルタイム RT-PCR)、B:FUT8 活性、C:コアフコース構造(AAL レク  
 チンブロットイング)、D:トリプシノーゲンタンパク質の発現(ウェスタンブロットイング)、E:  
 トリプシノーゲン 20 遺伝子の転写(RT-PCR)

この TGP49-Fut8-KD 細胞を用いて、次の項目について検討した。

- (1) トリプシンの産生に影響があるか？
- (2) 細胞の挙動(特に増殖活性)に影響があるか？
- (3) PAR2 のシグナルには影響があるか？

まずは(1)トリプシンの産生であるが、予想通りトリプシンの mRNA もタンパク質も産生が低下して  
 いた(図 17)。また、(2)細胞増殖も抑制されていた(図 18)。これは、Fut8 ノックアウトマウスが野生  
 型に比べて小さいことと関係があるかも知れない。(3)PAR2 特異的なシグナル経路は知られてお  
 らず、これ自体を特定することは困難であったが、特異的なペプチド(SLIGRL)リガンド及びこの反  
 応の中和抗体を用いて、リガンドの添加により細胞増殖が回復することを証明できた(図19)。

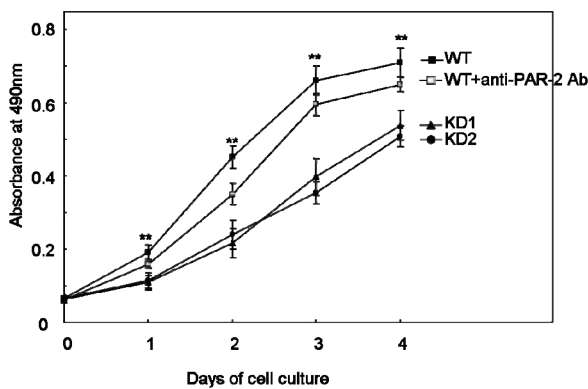


図18 TGP49-Fut8-KD 細胞の増殖抑制

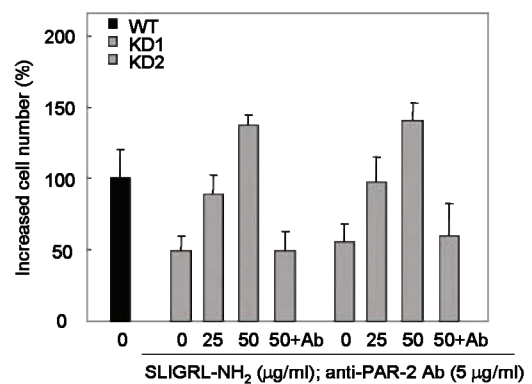


図 19 PAR-2 リガンドによる増殖の回復

トリプシンは糖タンパク質ではないので、 $\alpha$ 1,6 コアフコースがなくなることの影響を受けるターゲット分子がほかに存在すると予想した。細胞増殖と最も関係しそうな AP-1 複合体の Fut8 ノックアウトマウスにおけるを調べた(図 20)。その結果、野生型に比べて Fut8 ノックアウトマウスの c-fos 及び c-jun の遺伝子発現がそれぞれ 35.4%、57.4%と明らかに低下していた。次に、 $\alpha$ 1,6 コアフコースを数多く(N-結合糖鎖は 12 本)持っており、Fut8 のターゲット分子の可能性が大きい EGFR について調べた。TGP49-Fut8-KD 細胞で確かめてみると、予想通り EGFR の  $\alpha$ 1,6 コアフコース含量は低下しており、自己リン酸化の量も低下していることが分かった(図 21)。EGFR のリガンドである EGF 又は TPA を添加することによりトリプシンの発現量が増加することから、EGFR の  $\alpha$ 1,6 コアフコース結合量が低下するとリガンドとの親和力が低下することが確かめられた。

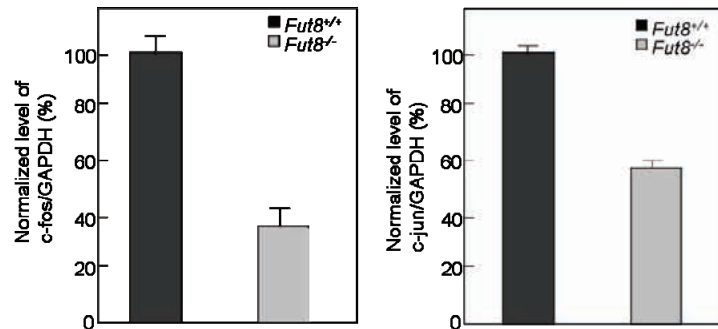


図 20 Fut8 ノックアウトマウスにおける AP-1 の発現抑制

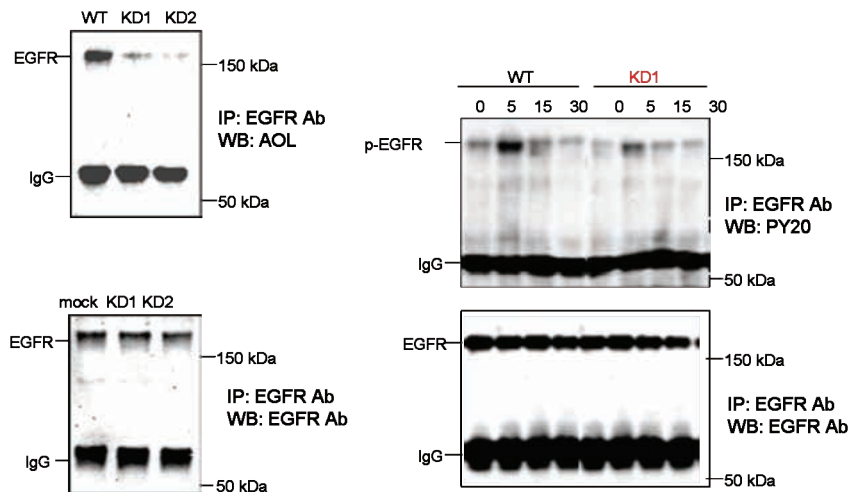


図 21 TGP49-Fut8-KD 細胞における EGFR のコアフコースの減少とリン酸化の抑制

つまり、以上の Fut8 ノックアウトマウス及び Fut8 ノックダウン細胞の解析実験により、EGFR-トリプシン-PAR2 シグナル経路が存在し、この経路は細胞増殖に深く関与していることが解明できた。しかもこの経路は、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明示しており、Fut8 遺伝子によるがんの遺伝子治療の可能性を示している。

### $\alpha$ 1,6 コアフコースはB細胞の初期分化段階に重要な $\alpha$ 4 $\beta$ 1 インテグリン/VCAM-1 の親和性に影響を及ぼしている

最近我々は Fut8 ノックアウトマウスのリンパ球の FACS 解析を行い、B 細胞の初期分化過程に異常のあることを発見した。この分化異常がターゲット分子の  $\alpha$ 1,6 コアフコースが欠損しているためであることを想定し、そのターゲット分子の解明とその分化異常との関係を研究した。

B 細胞は骨髄内において造血幹細胞から分化し、抗原を認識して抗体を産生する形質細胞へと分化することが知られている。このたび我々が注目したのは、B 細胞の初期分化過程であるプロ B

細胞からプレ B 細胞へと分化するステップである(図)。

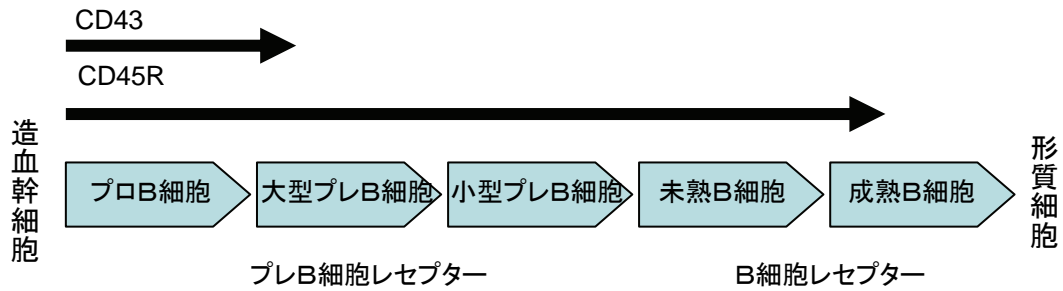


図 22 B 細胞の分化ステップ

Fut8 ノックアウトマウスの骨髄 (CD45R、CD43、IgM、CD11b、Gr-1、TER119)、脾臓 (DX5、CD3、CD4、CD5、CD8、CD45R、CD43、IgM、CD19、IgD、CD11b、Gr-1、TER119)、胸腺 (CD3、CD4、CD8) のリンパ球を FACS により測定した。

その結果、Fut8 ノックアウトマウスの骨髄のリンパ球中のプレ B 細胞 (CD45R<sup>+</sup>、CD43<sup>-</sup>) の割合が野生型に比して半分以下になっていることが分かった(図 23)。つまり、Fut8 ノックアウトマウスは  $\alpha$  4  $\beta$  1 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と考えられた。

B 細胞の初期分化過程に重要な役割を担う主な分子として、SCF (stem cell factor)、c-kit、IL-7 及び  $\alpha$  4  $\beta$  1 インテグリン/VCAM-1 が知られている。我々は、IL-7 と  $\alpha$  4  $\beta$  1 インテグリン/VCAM-1 に注目し、ストローマ細胞 (ST2 又は PA6) の共存下、マウス由来の骨髄細胞とプレ B 細胞株 70Z/3 の分化を検討した。まず、ST2 あるいは PA6 及び IL-7 の存在下、野生型マウス又は Fut8 ノックアウトマウス骨髄中の B 前駆細胞頻度をコロニーアッセイにより測定した(表 2)。いずれのストローマ細胞存在下においても、野生型マウスに比べて Fut8 ノックアウトマウス骨髄中の B 前駆細胞頻度は 4 割から 6 割と低かった。

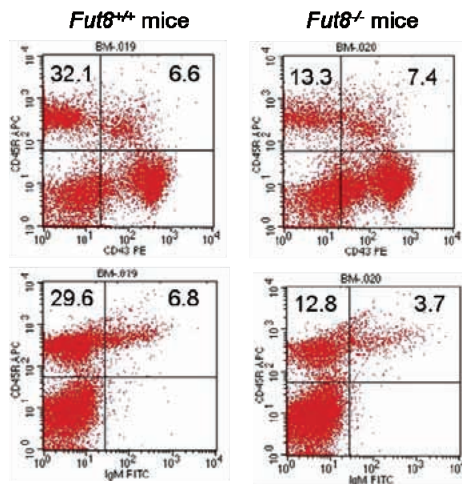


図 23 Fut8 ノックアウトマウス骨髄におけるプレ B 細胞の減少

表 2 野生型及び Fut8 ノックアウトマウス骨髄中の B 前駆細胞頻度

	No. of colonies per plate (frequency)	
	<i>Fut8</i> <sup>+/+</sup> mice	<i>Fut8</i> <sup>-/-</sup> mice
ST2 + IL-7-dependent precursors	45.4 ± 6.2 (1/78)	29.4 ± 2.4 (1/138)
PA6 + IL-7-dependent precursors	26.6 ± 5.0 (1/154)	11.4 ± 3.0 (1/398)

Mean ± SD of triplicate cultures.

一方、ストローマ細胞側の N-結合型糖鎖のコアフコース欠損がプレ B 細胞のコロニー形成に及ぼす影響を調べるために、ST2 細胞の Fut8 をノックダウンして ST2-KD 細胞を作製した。なお、PA6 よりも ST2 の方が Fut8 を多く発現していたため、ST2 を用いた。野生型マウス骨髄細胞を ST2-KD 細胞の上で培養した場合には、ST2 細胞を用いた場合に比べて B 細胞の前駆細胞コロニー数が半分以下であった。また、抗  $\alpha$  4  $\beta$  1 インテグリン抗体又は抗 VCAM-1 抗体を添加するとコロニー数は顕著に減少した。この結果は、ストローマ細胞におけるコアフコース並びに  $\alpha$  4  $\beta$  1 イ

ンテグリン及び VCAM-1 がプレ B 細胞の支持活性に深く関与していることを示している。

そこで、 $\alpha 4 \beta 1$  インテグリンのコアフコース化された *N*-結合糖鎖の重要性を調べるために、定常的に Fut8 の発現をノックダウンしたプレ B 細胞 (70Z/3-KD 細胞) を作製した。70Z/3-KD 細胞の VCAM-1 に対する結合は、mock 細胞に比べて弱く、70Z/3 細胞と抗  $\alpha 4 \beta 1$  インテグリン抗体を予め混合した場合、VCAM-1 に対する結合は殆どブロックされた (図 24)。

以上から、プレ B 細胞 (70Z/3) 上の  $\alpha 4 \beta 1$  インテグリン及びストローマ細胞 (ST2) 上の VCAM-1 は、 $\alpha 1,6$  コアフコースが欠損すること (70Z/3-KD 及び ST2-KD) によって細胞接着活性が低下することが観察され、 $\alpha 4 \beta 1$  インテグリン及び VCAM-1 のいずれもが Fut8 のターゲット分子であることが判明した。このことから、プレ B 細胞の分化増殖には B 前駆細胞の  $\alpha 4 \beta 1$  インテグリンとストローマ細胞の VCAM-1 双方における *N*-結合糖鎖のコアフコース化がきわめて重要であると予想できる (図)。

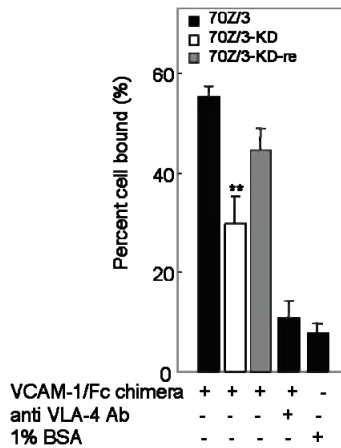


図24 プレ B 細胞株の VCAM-1 への結合能

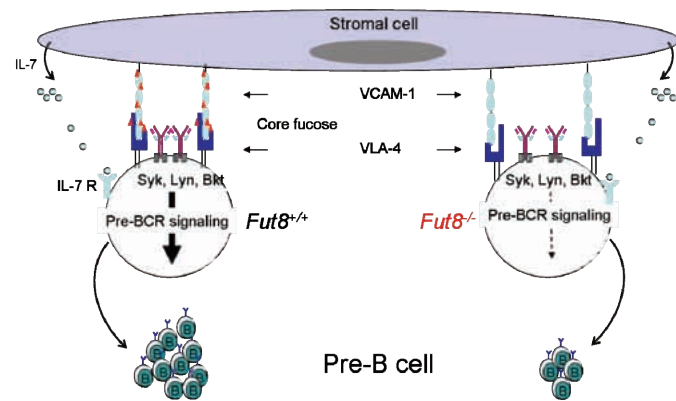


図 25 B 細胞の分化と Fut8

## (2) 研究成果の今後期待される効果

コアフコース残基が生体にとって重要な機能に深くかかわっていることが判明したことは、学術的にも非常に興味深いところである。しかもこの研究の過程において、培養細胞を用いた RNAi でコアフコースの量を調節することによって細胞接着や細胞増殖、さらには細胞分化への影響をコントロールできることがわかった。つまり、本来生体は糖タンパク質の関与する反応の制御を糖鎖の修飾によって行っている可能性を示せた。また、我々の研究によって明らかにされた  $\alpha 1,6$  フコース転移酵素 (Fut8) は、他のフコース転移酵素とは異なり、その関与する多様な反応についても再認識されるであろう。

応用例として最も重要なことは、特許も出願した24が、例えば Fut8 の発現を抑制することによりがん細胞の増殖を抑制することができるという発見である。一方、リンパ性白血病の 3 割近くは、プレ B 細胞の表面抗原を有していることが知られており、プレ B 細胞性急性リンパ性白血病 (pre-B ALL) は小児のがんの中で発症率が最も高い病気である。現在では化学療法など治療法の進歩により寛解率は向上しているが、未だ完全治癒は容易ではない。また、pre-B ALL には E2A-PBX、TEL/AML1 あるいは BCR-ABL といった染色体転座が見出されることがあるが、多くはまだ原因が不明である。いわゆる、遺伝子治療のターゲット遺伝子となり得る可能性を持っている Fut8 の研究がこの白血病発症の原因を明らかにする可能性もあり、今後その標的治療の開発にとって大変有力なツールとなると考える。

### 3.5 複合糖質の糖鎖構造解析法の開発 (大阪大学大学院 糖鎖治療学グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

糖タンパク質のアスパラギン型糖鎖を解析するために、キャピラリー電気泳動 (CE)-ESI-MS を用いる分析方法を検討した。

CE 分離を質量分析の前に行えると多大な利点がある。第一に CE 分離では、電荷や分子の大きさを分離できるわけであり、その後の分析を大変有利に進めることができる。また、溶離液に工夫は必要だが HPLC カラムとは桁違いの理論段数も魅力である。さらに、HPLC 分離に比べて分離に要する時間が短い。

本研究に用いた誘導体化法は、糖タンパク質から *N*-グリコナーゼで切り離された糖鎖がグリコシルアミン型で遊離されることを利用する方法である (*J Proteome Res* 4, 146-152, 2005、図 26)。

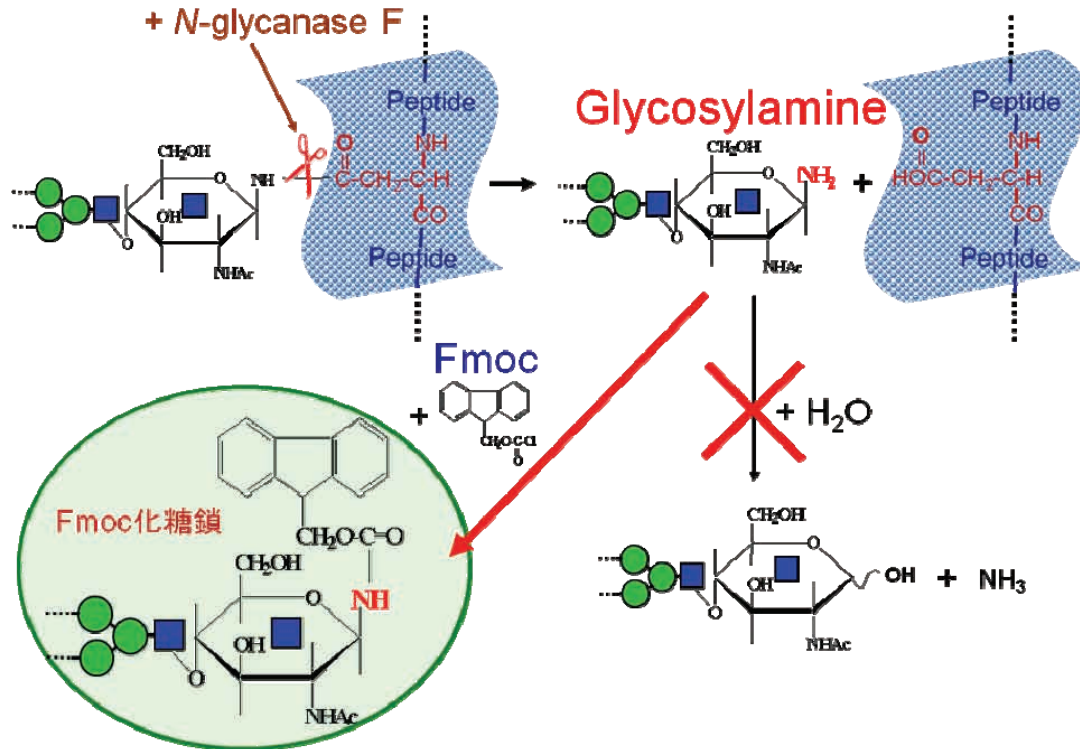


図 26 Fmoc による糖鎖の誘導体化

遊離されたグリコシルアミン型のオリゴ糖を Fmoc 誘導体化し、直ちに CE-ESI-MS で分析を行うことにより分析は糖鎖の切断からの全工程を 4 時間程度で完了することができる。本法は、MS/MS 解析を行うことにより、糖鎖の構造情報も得ることができる優れた方法と考えられる。

Human AGP ( $\alpha$  1-acid glycoprotein)、Bovine Fetuin 及び RNase B (Bovine pancreas) を対象として分析した。糖鎖の遊離方法、その後の誘導体化及び分析条件は、糖タンパク質をリン酸緩衝液 (pH 8.5) に溶解後、*N*-グリコナーゼを加え 2 時間 37°C でインキュベートし、グリコシルアミン型で遊離された糖鎖を含む酵素反応液に Fmoc-Cl のアセトン溶液を添加し 37°C で 1 時間加温した。反応終了後、過剰試薬をクロロホルムによる抽出で除去し水層の一部を CE-ESI-MS で分析した。

糖タンパク質から、グリコシルアミン型で遊離された糖鎖は Fmoc-Cl により容易に短時間で標識され、クロロホルムを用いる抽出操作により容易に余剰の Fmoc-Cl を除去して精製することができた。さらに、Fmoc 標識された糖鎖を含む反応溶液は直ちに CE により分析することができ、CE-MS 又は CE-MS/MS により構造情報を容易に取得することができた。

中性もしくは (シアル酸結合の場合) 酸性の糖鎖が、なぜ CE-ESI-MS で正電荷を帯びるのかということに興味を持たれる。複合型 2 本鎖糖鎖は 2 価イオン、3 本鎖糖鎖は 3 価、オリゴマンノース型の糖鎖は 1 価で検出されることが分かった。このことから、これらの電荷は GlcNAc の窒素原子上にプラスチャージが生じるためと考えるのが妥当なようである。このような電荷の例は、過去に報告が

なく CE-ESI-MS 分析に特有の現象と思われた。

最近その開発競争が注目されている抗体医薬品であるハーセプチン、リツキサン及びシナジスの糖鎖分析に本法を応用した。これら抗体医薬品の多くは、CHO 細胞で製造されるヒト型もしくはキメラタンパク質であるためその糖鎖構造は類似している。図 27 にハーセプチンの分析チャート及び解析した糖鎖構造を示す。

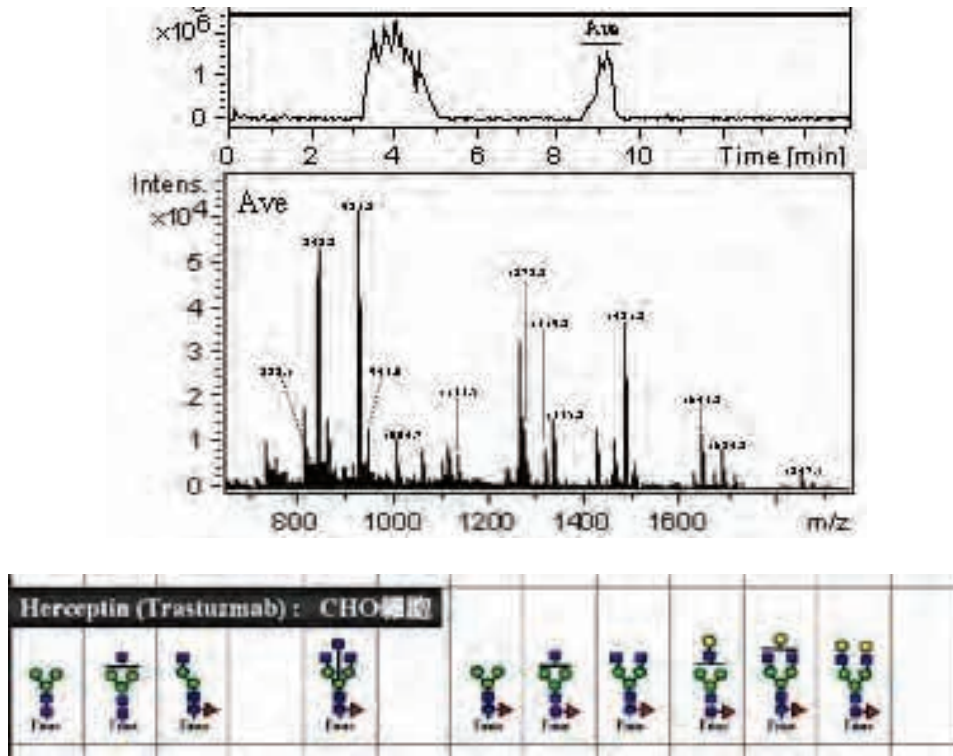


図 27 ハーセプチンの糖鎖構造解析結果

本研究で確立した CE-ESI-MS で分析法は糖鎖の切断からの全工程を 4 時間程度で完了することができるため、糖タンパク質医薬品の糖鎖構造の品質管理や製造工程管理に使うことができると思われる。今後、MS/MS 測定を利用して糖鎖配列とフラグメンテーションの関係を検証すべく、データを収集していく予定である。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

糖タンパク質のアスパラギン型糖鎖を解析するために、現在最も広く使われている方法は、糖鎖を糖タンパク質からヒドラジンもしくは酵素で切断し、その後蛍光標識(例えば 2-アミノピリジンを使った PA 化)を行い、HPLC にて解析するという方法である。この方法の欠点は、HPLC の溶出位置がその糖鎖の構造決定の根拠となるため、非常にコントロールされた分析系を必要とすることと、構造が完全に決められた高純度のスタンダードが必須であるということである。

このたび我々が確立した方法の特長は、分析の最終手段に MS を使っているためほぼ確実に糖鎖構造の推定ができ、必ずしもスタンダードを必要としないことである。また、CE では泳動中に各分子が分離できるが、これは必須ではなく本実験系の CE は微量サンプルを効率よく導入するインジェクターとしての役目が大きい。

このように高速で高感度な分析法が確立できたので、品質試験や製造工程管理などに応用することの可能性については現在検討中である。さらに、基礎の分野の機能的糖鎖分析及び糖タンパク質医薬品の開発において、部位特異的糖鎖分析(どの位置にどういった構造の糖鎖が付加しているか)が重要になってくる。最終的には、糖鎖のみならず糖ペプチドの CE-ESI-MS 法の確立を目指す。



#### 4 研究参加者

①タカラバイオグループ(遺伝子発現解析、GnT-IIIプロモーター解析、フコシル化ハプトグロビンのELISA系構築)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
小山 信人	タカラバイオ(株)	部長	総括	平成14年11月～ 平成19年10月
峰野 純一	タカラバイオ(株)	センター長	遺伝子発現解析総括	平成14年11月～ 平成19年10月
佐川 裕章	タカラバイオ(株)	主幹研究員	プロモーター解析、遺伝子 発現調節物質探索総括	平成14年11月～ 平成17年9月
向井 博之	タカラバイオ(株)	センター長	遺伝子発現解析	平成14年11月～ 平成19年10月
高山 正範	タカラバイオ(株)	副センター長	遺伝子発現解析	平成15年4月～ 平成19年10月
巽 容子	タカラバイオ(株)	主任研究員	遺伝子発現解析	平成14年11月～ 平成17年3月
北川 正成	タカラバイオ(株)	副センター長	遺伝子構造解析	平成14年11月～ 平成19年10月
于 福功	タカラバイオ(株)	次席研究員	肝幹細胞への遺伝子導入	平成14年11月～ 平成15年10月
糠谷 育衛	タカラバイオ(株)	次席研究員	肝幹細胞への遺伝子導入	平成14年11月～ 平成15年10月
小林 英二	タカラバイオ(株)	主任研究員	プロモーター解析、遺伝子 発現調節物質探索	平成14年11月～ 平成19年4月
佐々木 美紀子	タカラバイオ(株)	研究員	プロモーター解析、遺伝子 発現調節物質探索	平成14年11月～ 平成19年8月
田辺 雅茂	タカラバイオ(株)	研究員	プロモーター解析、遺伝子 発現調節物質探索	平成14年11月～ 平成19年10月
九町 木綿	タカラバイオ(株)	研究員	プロモーター解析、遺伝子 発現調節物質探索	平成14年11月～ 平成16年3月
高橋 秀一	タカラバイオ(株)	次席研究員	遺伝子発現解析	平成14年11月～ 平成17年3月
中筋 愛	タカラバイオ(株)	研究員	プロモーター解析、遺伝子 発現調節物質探索	平成14年11月～ 平成17年9月
外園 成和	タカラバイオ(株)	研究員	遺伝子発現解析	平成14年11月～ 平成16年3月
佐野 睦	タカラバイオ(株)	主幹研究員	総括サポート	平成14年11月～ 平成19年10月
江頭 知恵	タカラバイオ(株)	課長補佐	プロモーター解析、遺伝子 発現調節物質探索	平成16年4月～ 平成19年10月
松村 肇	タカラバイオ(株)	研究員	肝細胞への遺伝子導入	平成16年4月～ 平成18年6月
上萩 京子	タカラバイオ(株)	主幹研究員	フコシル化ハプトグロビン ELISA系の開発	平成18年4月～ 平成19年10月

注:参加時期最後の所属・役職を示す。

②糖鎖治療学グループ(FUT8 ノックダウン細胞の解析、プロテオミクス解析、糖鎖構造解析)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
近藤 昭宏	大阪大学大学院 医学系研究科	寄附講座教授	糖鎖遺伝子による 肝炎／肝癌の新しい治療薬開発のための基礎的検討	平成14年11月～ 平成19年8月
中川 孝俊	大阪大学大学院 医学系研究科	寄附講座助手		平成14年11月～ 平成19年8月
李 文哲	大阪大学大学院 医学系研究科	21世紀COE 博士研究員		平成17年4月～ 平成19年8月
中の 三弥子	大阪大学大学院 医学系研究科	21世紀COE 博士研究員		平成17年4月～ 平成19年8月
篠部 衣利子	大阪大学大学院 医学系研究科	研究補助員		平成15年4月～ 平成17年10月
西川 真美	大阪大学大学院 医学系研究科	研究補助員		平成15年4月～ 平成17年8月
三神 恵	大阪大学大学院 医学系研究科	研究補助員		平成15年4月～ 平成18年4月

③糖鎖シグナルグループ(レクチンによる糖鎖シグナルの解析、肝幹細胞分離法の開発と応用の検討、新規腫瘍マーカーの開発)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
三善 英知	大阪大学大学院 医学系研究科	教授	CREST 研究の全般	平成14年11月～ 平成19年10月
魚住 尚史	大阪大学大学院 医学系研究科	CREST 研究員	新規レクチンの探索	平成15年6月～ 平成18年5月
吉岡 智子	大阪大学大学院 医学系研究科	研究補助員	実験の補助 (ハプトグロビン)	平成18年11月～ 平成19年10月
野田 勝久	大阪大学大学院 医学系研究科	21世紀COE博士研究員	糖鎖遺伝子によるウイルス性肝障害の修復	平成16年4月～ 平成16年9月
井出 義人	大阪大学大学院 医学系研究科	大学院生	レクチン／糖鎖を用いた診断の臨床的アプローチ	平成16年4月～ 平成18年3月
奥山 紀子	大阪大学大学院 医学系研究科	大学院生	糖鎖遺伝子によるウイルス性肝障害の修復	平成16年4月～ 平成17年3月
秋長 歩	大阪大学大学院 医学系研究科	大学院生	肝細胞の分化と糖鎖／レクチンの研究	平成16年4月～ 平成18年3月
佐々木 望	大阪大学大学院 医学系研究科	大学院生	肝細胞の分化と糖鎖／レクチンの研究	平成16年4月～ 平成18年3月
森脇 健太	大阪大学大学院 医学系研究科	大学院生	フコシル化の制御	平成16年4月～ 平成19年10月
近藤 菜美	大阪大学大学院 医学系研究科	大学院生	細胞内シグナルの解析	平成16年4月～ 平成18年3月
山中 香奈子	大阪大学大学院 医学系研究科	大学院生	糖鎖を用いた腫瘍マーカーの開発	平成16年4月～ 平成18年3月

顧 建国	大阪大学大学院 医学系研究科	助教授	神経の分化と糖鎖の研究	平成 16 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
茂田 昌樹	大阪大学大学院 医学系研究科	研究員	神経の分化と糖鎖の研究	平成 16 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
金澤 禎之	大阪大学大学院 医学系研究科	研究補助員	肝臓の分化と糖鎖	平成 16 年 11 月～ 平成 17 年 12 月
三神 恵	大阪大学大学院 医学系研究科	研究補助員	論文作成の補助	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 8 月
水野 洋子	大阪大学大学院 医学系研究科	21 世紀 COE 博士 研究員	肝臓の再生医療、動物 実験	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 10 月
中川 勉	大阪大学大学院 医学系研究科	NEDO ポス ドク研究員	腫瘍マーカーの開発	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 10 月
桑本 佳奈	大阪大学大学院 医学系研究科	大学院生	腫瘍マーカーの開発	平成 19 年 4 月～ 平成 19 年 10 月
近藤 昭宏	大阪大学大学院 医学系研究科	招へい教 授	糖鎖遺伝子による肝炎/ 肝臓の新しい治療薬開 発のための基礎的検討	平成 19 年 9 月～ 平成 19 年 10 月
中の 三弥子	大阪大学大学院 医学系研究科	21 世紀 COE 博士 研究員	糖鎖遺伝子による肝炎/ 肝臓の新しい治療薬開 発のための基礎的検討	平成 19 年 9 月～ 平成 19 年 10 月

## 5 招聘した研究者等

なし

## 6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 44 件)

1. Capurro M, Wanless I R, Sherman M, Deboer G, Shi W, **Miyoshi E**, Filmus J. Glypican-3: A novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **125**(1), 89-97, 2003.
2. Noda K, **Miyoshi E**, Gao C-X, Nakahara S, Kitada T, Honke K, Suzuki K, Yoshihara H, Yoshikawa K, Kawano K, Tonetti M, Kasahara A, Hori M, Hayashi N, Taniguchi N. Relationship between elevated FX expression and increased production of GDP-L-fucose, a common donor substrate for fucosylation in human hepatocellular carcinoma and hepatoma cell lines. *Cancer Res* **63**, 6282-6289, 2003.
3. Ito Y, Miyauchi A, Yoshida H, Nakano K, Takamura Y, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka T, Taniguchi N, Matsuura N, Kuma K and **Miyoshi E**. Expression of  $\alpha$ 1,6fucosyltransferase is bimodal in papillary carcinoma progression. *Cancer Letter* **200**, 167-172, 2003.
4. Nakahara S, **Miyoshi E**, Noda K, Ihara S, Gu J, Honke K, and Taniguchi N. Involvement of oligosaccharide changes in  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Integrin in a cisplatin-resistant human squamous cell carcinoma cell line. *Molecular Cancer Therapeutics* **2**, 1207-1214, 2003.

5. Akita H D, **Miyoshi E**, Suzuki O, Itoh T, Kinoshita I, Yamazaki K, Nishimura M, Katoh H, and Taniguchi N. Expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in non-small cell lung cancers: its association with prognosis and histology. *Clinical Cancer Res.* **10**, 1773–1779, 2004.
6. Ihara S, **Miyoshi E**, Nakahara S, Sakiyama H, Ihara H Honke K Dickson R B Lin C Y, and Taniguchi N. Addition of  $\beta$ 1–6 GlcNAc branching on matriptase increases the stability to degradation, especially via the Asn 772 site. *Glycobiology* **14**, 139–146, 2004.
7. Gu J, Zhao Y, Isaji T, Shibukawa Y, Ihara H, Takahashi M, Ikeda Y, **Miyoshi E**, Honke K, and Taniguchi N.  $\beta$ 1,4-*N*-acetylglucosaminyltransferase III down-regulates neutrite outgrowth induced by co-stimulation of epidermal growth factor and integrins through the Ras/ERK signaling pathway in PC12 cells. *Glycobiology* **14**, 177–186, 2004.
8. Isaji T, Gu J, Nishiuchi R, Zhao Y, Takahashi M, **Miyoshi E**, Honke K, Sekiguchi K, and Taniguchi N. Introduction of bisecting GlcNAc into integrin alpha 5beta 1 reduces ligand binding and down-regulates cell adhesion and cell migration. *J Biol Chem.* **279**, 19747–19754, 2004.
9. Murata K, **Miyoshi E**, Ihara S, Noura S, Kameyama M, Ishikawa O, Doki Y, Yamada T, Ohigashi H, Sasaki Y, Higashiyama M, Tarui T, Takada Y, Kannagi R, Taniguchi N, and Imaoka S. Attachment of human colon cancer cells to vascular endothelium is enhanced by *N*-acetylglucosaminyltransferase V. *Oncology* **66**, 492–501, 2004.
10. Kim YS, Hwang SY, Oh S, Sohn H, Kang HY, Lee JH, Cho EW, Kim JY, Yoo JS, Kim NS, Kim CH, **Miyoshi E**, Taniguchi N, and Ko JH. Identification of target proteins of *N*-acetylglucosaminyl-transferase V and fucosyltransferase 8 in human gastric tissues by glycomic approach. *Proteomics* **4**, 3353–3358, 2004.
11. Tomiie M, Isaka S, **Miyoshi E**, Taniguchi N, Kimura T, Ogita K, Tsutsui T, Shimoya K, Nakagawa T, **Kondo A**, Koyama M, Murata Y. Elevated expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in first trimester human placenta. *Biochem Biophys Res Commun* **330** (3), 999–1004, 2005.
12. Miyagawa S, Nakatsu S, Nakagawa T, **Kondo A**, Matsunami K, Hazama K, Yamada J, Tomonaga K, Miyazawa T, and Shirakura R. Prevention of PERV infection in pig to human xenotransplantation by the RNA interference silences gene. *J. Biochem.* **137**, 503–508, 2005.
13. Sturla L, Fruscione F, Noda K, **Miyoshi E**, Taniguchi N, Contini P, Tonetti M. Core fucosylation of *N*-linked glycans in Leukocyte Adhesion Deficiency/Congenital Disorder of Glycosylation IIc (LAD II/CDG IIc) fibroblasts. *Glycobiology* **15** (10), 924–934, 2005.
14. Gao CX, **Miyoshi E**, Uozumi N, Takamiya R, Wang X, Noda K, Gu J, Honke K, Wada Y, Taniguchi N. Bisecting GlcNAc Mediates the Binding of Annexin V to Hsp47. *Glycobiology* **15** (11), 1067–1075, 2005.
15. Ishibashi Y, Dosaka-Akita H, **Miyoshi E**, Shindoh M, Miyamoto M, Kinoshita I, Miyazaki H, Itoh T, Kondo S, Nishimura M and Taniguchi N. Expression of

*N*-Acetylglucosaminyltransferase V in the development of human esophageal cancers: immunohistochemical data from carcinomas and nearby non-cancerous lesions. *Oncology* **69** (4), 301–310, 2005.

16. Wang X, Inoue S, Gu J, **Miyoshi E**, Noda K, Li W, Mizuno–Horikawa Y, Nalano M, Asahi M, Takahashi M, Uozumi N, Lee S H, Ikeda Y, Yamaguchi Y, Aze Y, Tomiyama Y, Fujii J, Suzuki K, **Kondo A**, Shapiro S D, Lopez–Otin C, Kuwaki T, Okabe M, Honke K, and Taniguchi N. Dysregulation of TGF- $\beta$ 1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (44), 15791–15796, 2005.
17. Kim YS, Kang HY, Kim JY, Oh S, Kim CH, Ryu CJ, **Miyoshi E**, Taniguchi N, Ko JH. Identification of target proteins of *N*-acetylglucosaminyl-transferase V in human colon cancer and implication of protein tyrosine phosphatase kappa in enhanced cancer cell migration. *Proteomics* **6** (4), 1187–1191, 2005.
18. Okuyama N, Ide Y, Nakano M, Nakagawa T, Yamanaka K, Moriwaki K, Murata K, Ohigashi H, Yokoyama S, Eguchi H, Ishikawa O, Ito T, Kato M, Kasahara A, Kawano S, Gu J, Taniguchi N, and **Miyoshi E**. (2005) Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation. *Int J Cancer* **118** (11), 2803–2808.
19. Wang X, Gu J, Ihara H, **Miyoshi E**, Honke K, Taniguchi N. Core fucosylation regulates EGF receptor-mediated intracellular signaling. *J Biol Chem* **281** (5), 2572–2577, 2006.
20. Lee SH., Takahashi M, Honke, K, **Miyoshi E**, Osumi D, Sakiyama H, Ekuni A, Wang X, Inoue S, Gu J, Kadomatsu K, and Taniguchi N. Loss of core fucosylation of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 impairs its function, leading to the upregulation of serum levels of insulin-like growth factor-binding protein 3 in Fut8<sup>-/-</sup> mice. *J Biochem* **139**, 391–398, 2006.
21. Ide Y, **Miyoshi E**, Nakagawa T, Gu J, Tanemura M, Nishida T, Ito T, Yamamoto H, Kozutsumi Y and Taniguchi N. Aberrant expression of *N*-Acetylglucosaminyltransferase-IVa and IVb (GnT-IVa and b) in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **341** (2), 478–482, 2006.
22. Miyagawa S, Nakatsu S, Nakagawa T, **Kondo A**, Matsunami K, Hazama K, Yamada J, Tomonaga K, Miyazawa T, Shirakura R. Prevention of PERV infections in pig to human xenotransplantation by the RNA interference silences gene. *J Biochem (Tokyo)* **137**(4), 503–508, 2005.
23. Ishimura H, Takahashi T, Nakagawa H, Nishimura S, Arai Y, Horikawa Y, Habuchi T, **Miyoshi E**, Kyan A, Hagiwara S, Ohyama C. *N*-acetylglucosaminyltransferase V and beta1-6 branching *N*-linked oligosaccharides are associated with good prognosis of patients with bladder cancer. *Clin Cancer Res* **12**(8), 2506–2511, 2006.
24. Iijima J, Zhao Y, Isaji T, Kameyama A, Nakaya S, Wang X, Ihara H, Cheng X, Nakagawa T, **Miyoshi E**, **Kondo A**, Narimatsu H, Taniguchi N, Gu J. Cell-cell interaction-dependent regulation of *N*-acetylglucosaminyltransferase III and the bisected *N*-glycans in GE11

- epithelial cells: Involvement of E-cadherin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem* **281(19)**, 13038–13046, 2006.
25. Ito Y, Akinaga A, Yamanaka K, Nakagawa T, **Kondo A**, Dickson RB, Lin CY, Miyauchi A, Taniguchi N, **Miyoshi E**. Co-expression of matrilysin and *N*-acetylglucosaminyltransferase V in thyroid cancer tissues—its possible role in prolonged stability in vivo by aberrant glycosylation. *Glycobiology* **16**, 368–374, 2006.
  26. Miyagawa S, Nakatsu S, Hazama K, Nakagawa T, **Kondo A**, Matsunami K, Yamamoto A, Yamada J, Miyazawa T, Shirakura R. A novel strategy for preventing PERV transmission to human cells by remodeling the viral envelope glycoprotein. *Xenotransplantation* **13**, 258–63, 2006.
  27. Shigeta M, Shibukawa Y, Ihara H, **Miyoshi E**, Taniguchi N, Gu J.  $\beta$ 1,4-*N*-Acetylglucosaminyltransferase III potentiates  $\beta$ 1 integrin-mediated neuriteogenesis induced by serum deprivation in Neuro2a cells. *Glycobiology* **16(6)**, 564–571, 2006.
  28. Nakagawa T, Uozumi N, Nakano M, Mizuno-Horikawa Y, Okuyama N, Taguchi T, Gu J, **Kondo A**, Taniguchi N, **Miyoshi E**. Fucosylation of *N*-glycans regulates secretion of hepatic glycoproteins into bile ducts. *J Biol Chem* **281(40)**, 29797–29806, 2006.
  29. Li W, Nakagawa T, **Koyama N**, Wang XC, Jin J, Mizuno-Horikawa Y, Gu J, **Miyoshi E**, Kato I, Honke K, Taniguchi N, **Kondo A**. Down regulation of trypsinogen expression is associated with growth retardation in  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase-deficient mice: attenuation of proteinase-activated receptor 2 activity. *Glycobiology* **16(10)**, 1007–1019, 2006.
  30. Zhao Y, Nakagawa T, Ito S, Inamori K, Isaji T, Kariya Y, **Kondo A**, **Miyoshi E**, Miyazaki K, Kawasaki N, Taniguchi N, Gu J. *N*-Acetylglucosaminyl transferase III antagonizes the effect of *N*-acetylglucosaminyltransferase V on  $\alpha$ 3(1) integrin-mediated cell migration. *J Biol Chem* **281(43)**, 32122–32130, 2006.
  31. Isaji T, Sato Y, Zhao Y, **Miyoshi E**, Wada Y, Taniguchi N, Gu J. *N*-Glycosylation of the (–)propeller domain of the integrin  $\alpha$ 5 subunit is essential for  $\alpha$ 5(1) heterodimerization, expression on the cell surface and its biological function. *J Biol Chem* **281(44)**, 33258–67, 2006.
  32. Suzuki T, Hara I, Nakano M, Shigeta M, Nakagawa T, **Kondo A**, Funakoshi Y, Taniguchi N. Man2C1, an alpha-mannosidase is involved in the trimming of free oligosaccharides in the cytosol. *Biochem J* **400(1)**, 33–41, 2006.
  33. Nakahara S, Saito T, Kondo N, Moriwaki K, Noda K, Ihara S, Takahashi M, Ide Y, Gu J, Inohara H, Katayama T, Tohyama M, Kubo T, Taniguchi N, **Miyoshi E**. A novel angiogenesis inducer,  $\beta$ 1, 6-*N*-Acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V), is processed as a secreted enzyme by  $\gamma$ -secretase. *FASEB J* **20(14)**, 2451–2459, 2006.
  34. Zhao Y, Ito S, Wang XC, Isaji T, **Miyoshi E**, Kariya Y, Miyazaki K, Kawasaki N, Taniguchi N, Gu J. Deletion of core fucosylation on  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin down-regulates its functions. *J Biol Chem* **281(50)**, 38343–38350, 2006.

35. Ihara H, Ikeda Y, Toma S, Wang X, Suzuki T, Gu J, **Miyoshi E**, Tsukihara T, Honke K, Matsumoto A, Nakagawa A, and Taniguchi N. Crystal Structure of Mammalian  $\alpha$ 1,6-Fucosyltransferase, FUT8. *Glycobiology* **17(5)**, 455–466, 2006.
36. Wada Y, Azadi P, Costello C, Dell A, Dwek RA, Geyer H, Geyer R, Kakehi K, Karlsson N, Kato K, Kawasaki N, Khoo KH, Kim S, **Kondo A**, Lattova E, Mechref Y, **Miyoshi E**, Nakamura K, Narimatsu H, Novotny M, Packer N, Perreault H, Peter-Katalini J, Pohlentz G, Reinhold V, Rudd M, Suzuki A, Taniguchi N. Comparison of the Methods for Profiling Glycoprotein Glycans: HUPO HGPI (Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/Proteome Initiative) Multi-institutional Study. *Glycobiology* **17(4)**, 411–422, 2007.
37. Sasamura T, Ishikawa HO, Sasaki N, Higashi S, Kanai M, Nakao S, Ayukawa T, Aigaki T, Noda K, **Miyoshi E**, Taniguchi N, Matsuno K. The O-fucosyltransferase O-fut1 is an extracellular component that is essential for the constitutive endocytic trafficking of Notch in Drosophila. *Development* **134(7)** 1347–1356, 2007.
38. Li W, Takahashi M, Shibukawa Y, Yokoe S, Gu J, **Miyoshi E**, Honke K, Ikeda Y, Taniguchi N. Introduction of bisecting GlcNAc in *N*-glycans of adenylyl cyclase III enhances its activity. *Glycobiology* **17(6)**, 655–662, 2007.
39. Matsumura K, Higashida K, Ishida H, Hata Y, Yamamoto K, Shigeta M, Mizuno-Horikawa Y, Wang X, **Miyoshi E**, Gu J, and Taniguchi N. Carbohydrate-binding specificity of a fucose-specific lectin from aspergillus oryzae: A novel probe for core fucose. *J Biol Chem* **282(21)**, 15700–15708, 2007.
40. Handerson T, Berger A, Harigopol M, Rimm D, Nishigori C, Ueda M, **Miyoshi E**, Taniguchi N, Pawelek J. Melanophages reside in hypermelanotic, aberrantly glycosylated tumor areas and predict improved outcome in primary cutaneous malignant melanoma. *J Cutaneous Pathology* **34(9)**, 679–686, 2007.
41. Moriwaki K, Noda K, Nakagawa T, Asahi M, Yoshihara H, Taniguchi N, Hayashi N, **Miyoshi E**. A high expression of GDP-fucose transporter in hepatocellular carcinoma is a key factor for increases in fucosylation. *Glycobiology* **17(12)**, 1311–1320, 2007.
42. Li W, Ishihara K, Yokota T, Nakagawa T, **Koyama N**, Mizuno-Horikawa Y, Wang X, **Miyoshi E**, Taniguchi N, **Kondo A**. Reduced  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrin/VCAM-1 interactions lead to impaired pre-B cell repopulation in alpha 1,6-fucosyltransferase deficient mice. *Glycobiology* **18(1)**, 114–124, 2008.
43. Yamamoto E, Ino K, **Miyoshi E**, Shibata K, Takahashi N, Kajiyama H, Nawa A, Nomura S, Nagasaka T, Kikkawa F. Expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in endometrial cancer correlates with poor prognosis. *British Journal of Cancer* **97(11)**, 1538–1544, 2007.
44. Kim YS, Hwang SY, Kang HY, Sohn H, Oh S, Kim JY, Yoo JS, Kim YH, Kim CH, Jeon JH, Lee JM, Kang HA, **Miyoshi E**, Taniguchi N, Yoo HS, Ko JH. Functional proteomic study reveals that *N*-acetylglucosaminyltransferase V reinforces the invasive/metastatic potential of colon cancer through aberrant glycosylation on TIMP-1. *Mol Cell Proteomics* **7(1)**, 1–14, 2008.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 三善英知, 谷口直之. 糖鎖による増殖・分化の制御. 蛋白質・核酸・酵素 **48**, 929-933, 2003.
2. 三善英知. 可溶性糖転移酵素がもつ生物機能 ～GnT-Vを中心に～. グライコワード, CS-A01, 2003
3. 伊原伸治, 三善英知, 谷口直之. 糖鎖によるプロテアーゼの修飾:  $\beta$ 1-6 鎖とマトリプターゼ. 蛋白質・核酸・酵素 **48**, 980-983, 2003.
4. 中原 晋, 三善英知, 谷口直之. 可溶性 GnT-V の生物学的機能. 医学のあゆみ **207**, 13-17, 2003.
5. 三善英知, 谷口直之. 糖鎖とがんの浸潤、転移 ～GnT-V とマトリプターゼを中心に～. 医学のあゆみ **207**, 343-347, 2003.
6. 三善英知, 伊原伸治, 野田勝久, 坂江優佳, 渡邊良子, 谷口直之, 村田幸平, 佐々木裕, 笠原彰紀, 林 紀夫. 糖鎖による新しい消化器癌の転移機構. 第13回肝サイトスケルトン研究会誌 **13**, 27-32, 2003.
7. 三善英知. ことばのカルテ「糖鎖」. メディカルレビュー, 2004
8. 野田勝久, 三善英知. 北田学利, 谷口直之, 笠原彰紀, 林 紀夫. 新規癌 GDP-L-fucose 測定法の開発と肝癌診断への応用ー特に肝癌での細胞内 GDP-L-fucose 量と GDP-L-fucose 合成酵素 FX の発現レベルから. 肝サイトスケルトン研究会雑誌 **14**, 41-47, 2004.
9. 三善英知, 谷口直之. 分泌型糖転移酵素 GnT-V がもつ血管新生作用とその生合成機構. 実験医学 **22(7)**, 940-945, 2004.
10. 三善英知. ことばのカルテ「カドヘリン」. メディカルレビュー, 2004.
11. 三善英知, 谷口直之. プロテオミクスから機能グライコミクスへ:糖鎖の機能解明の重要性. 生化学 **76**, 1137-1143, 2004.
12. 野田勝久, 三善英知, 谷口直之. 肝癌におけるフコシル化糖鎖の調節機構について. Medical Science Digest **30**, 499-504, 2004.
13. 近藤昭宏, 藤井 茂, 三善英知, 谷口直之. 糖蛋白質糖鎖の抽出・精製と糖鎖構造解析法. 分子細胞生物学基礎実験法(改訂第2版)堀尾武一監修, 新垣尚捷, 角野富三郎, 西川克三, 樋口富彦, 細井和雄, 堀内義史, 松尾雄志, 宮崎 香編集, 南江堂, pp. 316-338, 2004.
14. 近藤昭宏. グライコミクス. 医学を学ぶための生物学(改訂第2版)谷口直之, 米田悦啓編集, 南江堂, pp. 437-443, 2004.
15. 中川孝俊, 近藤昭宏, 谷口直之. グライコムとの融合、疾患プロテオミクスの最前線. 戸田年総, 荒木令江編集, メディカルドゥ, pp. 361-365, 2005.



16. 三善英知, 谷口直之. 糖鎖と癌の浸潤・転移. 遺伝子医学 MOOK 3 号, 糖鎖と病気, p. 85-90, 2005.
17. 魚住尚史, 三善英知, 谷口直之. 分子生物学 basic technique 糖鎖の分離と標識化. THE LUNG perspectives, p.104-108, 2005.
18. 三善英知. 癌とフコシル化. 未来を拓く糖鎖科学, 金芳堂, p. 283-287, 2005.
19. 三善英知. 肝臓と糖鎖. 糖鎖フラッシュ 7 号, p.20-25, 2006.
20. 三善英知, 谷口直之. AFP の糖鎖異常から疾患プロテオームへ. 臨床化学, **35**, p.30-36, 2006.
21. Miyako Nakano, Akihiro Kondo, Kazuaki Kakehi and Naoyuki Taniguchi. Glycomics – a new target for pharmaceuticals. *Drug Discovery Today: Technologies* **3(1)**, 39-47, 2006.
22. Wang XC, Gu J, Miyoshi E, Honke K, Taniguchi N. Phenotype changes of Fut8 knockout mouse: core fucosylation is crucial for the function of growth factor receptor(s). *Methods in Enzymology* **417**, 11-22, 2006.
23. A. Kondo, W. Li, T. Nakagawa, M. Nakano, N. Koyama, X. Wang, J. Gu, E. Miyoshi, N. Taniguchi. From glycomics to functional glycomics of sugar chains: identification of target proteins with functional changes using gene targeting mice and knock down cells of FUT8 as examples. *Biochim Biophys Acta* **1764**, 1881-1889, 2006.
24. 三善英知. 膵癌の新しい腫瘍マーカーの開発. 医学のあゆみ別冊・消化器疾患 II. 肝・胆・膵, p. 278-281, 2006.
25. 石田大輔, 三善英知. 分子生物学 basic technique autoMACS について. The LUNG perspective **14**, 453-456, 2006.
26. 三善英知. 癌マーカーとしての糖鎖. 実験医学増刊号 **25(7)** 「波及・深化する糖鎖研究 糖鎖のもつ多彩な機能の解析と疾患研究に与えるインパクト」, 1036-1041, 羊土社 古川鋼一, 遠藤玉夫, 川寄敏祐 監修, 2007.
27. 三善英知. 癌の転移を制御する糖鎖の働き. Medical Science Digest **33(8)**, 962-963, ニューサイエンス社, 安藤太三, 2007.
28. 三善英知. コアフコース糖鎖と腫瘍マーカー. 生化学 **79(8)**, 790-794, 日本生化学会, 2007.
29. 三善英知. フコースを標的とした糖鎖腫瘍マーカー. 実験医学増刊号 **25(17)**, 「癌診断研究の最前線」, p. 172-177, 羊土社, 中村祐輔 監修, 2007.

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 14 件、国際会議 14 件)  
(国際会議)

1. Miyoshi E.

Molecular mechanisms for GnT-V-mediated tumor metastasis.  
3<sup>rd</sup> Korea-Japan Glycobiology Program、2003 年 3 月

2. Miyoshi E.

Glycobiology and Cancer Metastasis.  
Seminar in Liver Research Center in Rhode Island Hospital、2004 年 7 月 14 日

3. Miyoshi E and Taniguchi N.

A novel function of GnT-V as an angiogenesis co-factor and its processing mechanism.  
The first meeting of HGPI、2004 年 8 月 23 日、大阪

4. Miyoshi E

Identification of a target molecule for GnT-V: A novel pathway of oligosaccharide-related tumor metastasis.  
2005 Pachifichem "Glycobiology"、2005 年 12 月 15~20 日、米国・ホノルル

5. Eiji Miyoshi

Molecular mechanisms of fucosylated alpha-fetoprotein (AFP-L3) in hepatocellular carcinoma: A possible implication for secretion system of fucosylated glycoproteins in the liver.  
第 56 回日本電気泳動学会 (JES) 国際シンポジウム "Genomics, Proteomics, and Clinical Applications"、2006 年 6 月 15 日、東京

6. Eiji Miyoshi

Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation.  
GlycoT 2006、2006 年 6 月 25~28 日、つくば

7. Eiji Miyoshi

Oligosaccharides regulate tumor metastasis.  
Tumor Biology Seminar in Georgetown University、2006 年 9 月 8 日、米国・ワシントン DC

8. Akihiro Kondo (Osaka University)

Core fucose regulates protease activated receptor 2 signal.  
Frontiers in Glycomics: Bioinformatics and Biomarkers in Disease、2006 年 9 月 10~13 日、米国・ベセスダ

9. Eiji Miyoshi

Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation.  
Frontiers in Glycomics; Bioinformatics and Biomarkers in Disease、2006 年 9 月 11~13 日、米国・ベセスダ

10. Eiji Miyoshi

Molecular mechanisms for production of fucosylated AFP in HCC.

HBE Princeton Workshop: “Readiness of New HCC Biomarkers”、2006年10月25～26日、  
米国・プリンストン

11. Eiji Miyoshi

A lesson from fucose and fucosyltransferases.

Tumor Biology Seminar in Drexel University、2006年10月27日、米国・フィラデルフィア

12. Eiji Miyoshi

Fucosylated haptoglobin could be a novel marker for pancreatic cancer: Detail mechanisms underlying its production.

Gordon Conference (ERDN)、2007年1月21～26日、米国・ベンチューラ

13. Naoyuki Taniguchi, Akihiro Kondo, Eiji Miyoshi

Functional Glycomics using Glycosyltransferase genes - Identification of target proteins explores the Mechanism and Biomarkers of disease.

University of Dortmund、2007年5月14～16日、ドイツ・ドルトムント

14. Eiji Miyoshi

Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation.

The 27<sup>th</sup> Sapporo Cancer Seminar International Symposium, Glycomics、2007年7月11～13日、札幌

(国内会議)

1. 三善英知

新規診断マーカーの開発と糖鎖研究の新展開

大日本製薬研究所セミナー、平成15年2月、大阪

2. 三善英知、野田勝久、谷口直之、林 紀夫

糖鎖による肝臓の再生医療の基礎的検討

第39回日本肝臓学会総会シンポジウム、平成15年5月、福岡

3. 近藤昭宏

糖転移酵素によるB型肝炎治療研究

日本学術会議・生物系薬学研究連絡委員会シンポジウム、平成15年5月、静岡

4. 谷口直之、三善英知、本家孝一

GnT-Vと腫瘍血管新生

第62回日本癌学会総会シンポジウム、平成15年9月、名古屋

5. 三善英知、伊原伸治、谷口直之

マトリプターゼの糖鎖と癌の転移

第9回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会シンポジウム、平成16年7月、名古屋

6. 三善英知

糖鎖による新規腫瘍マーカーの開発と難治性がん克服への戦略

産学連携を指向した疾患グライコプロテオミクスセミナー、平成17年5月、大阪

7. 三善英知  
糖鎖と癌の転移  
第 543 回 大阪大学生理化学談話会、平成 17 年 5 月、大阪
  8. 三善英知、佐々木 望、野田勝久、谷口直之、林 紀夫  
糖鎖を用いた肝再生医療への基礎的検討  
第 41 回 日本肝臓学会総会ワークショップ、平成 17 年 6 月、大阪
  9. 三善英知  
糖鎖の機能解明から糖鎖創薬へ  
日本化学会主催：次世代バイオテクノロジーとしての糖鎖工学、平成 17 年 7 月、東京
  10. 三善英知、谷口直之  
*N*-グリカンの癌転移における役割と糖鎖治療  
第 64 回 日本癌学会総会シンポジウム、平成 17 年 9 月、札幌
  11. Eiji Miyoshi, Naoyuki Taniguchi  
Lessons from the studies on core fucose as a target for glycomarkers and glycotherapy  
第 78 回日本生化学会シンポジウム、平成 17 年 10 月、神戸
  12. 三善英知  
糖鎖機能の解明から糖鎖診療へ  
第 65 回日本癌学会総会ランチョンセミナー、平成 18 年 9 月 28 日、横浜
  13. 三善英知  
グライコミクスの手法を用いた膵癌の新しい腫瘍マーカーの開発  
日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会、平成 19 年 7 月 30～31 日、東京
  14. 三善英知  
コアフコースと腫瘍マーカー  
第 27 回日本分子腫瘍マーカー研究会、平成 19 年 10 月 2 日、東京
- ② 口頭発表 (国内会議 48 件、国際会議 3 件)  
(国際会議)
1. Miyoshi E, Unozumi N, Nakagawa T, Kondo A, Gu J, Taniguchi N.  
A lectin blotting, as a useful and simple tool for functional glycomics.  
Interlec 21、2004 年 6 月 23～28 日、湘南
  2. Kondo A.  
Roundtable meeting.  
Consortium for Functional Glycomics、2005 年 5 月、米国・ベセスダ
  3. Taguchi T, Watanabe T, Ihara H, Miyoshi E, Honke K, Taniguchi N.  
A specific detection of GlcNAc  $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1 branches in *N*-linked glycoproteins from cancer cells based on the specificity of *N*-acetylglucosaminyltransferase VI.  
HUPO 5<sup>th</sup> Annual World Congress、10 月 28 日～11 月 1 日、米国・ロングビーチ

(国内会議)

1. 坂江優佳、高 叢笑、奥山紀子、渡邊良子、野田勝久、三善英知  
Bisected GlcNAc を認識するレクチンであるアネキシン V の生物学的機能の解析  
第 49 回 日本臨床検査医学会総会、平成 14 年 11 月、大阪
2. 野田勝久、三善英知、奥山紀子、宮本泰豪、本家孝一、谷口直之  
 $\alpha$  1-6 フコシル化糖蛋白合成における GDP-L-fucose 合成酵素 FX の検討  
第 14 回 LEC ラット研究会、平成 15 年 5 月、埼玉
3. 北爪(川口)しのぶ、岡 律子、立田由里子、三善英知、橋本康弘  
LEC ラットにおける可溶型シアル酸転移酵素の解析  
第 14 回 LEC ラット研究会、平成 15 年 5 月、埼玉
4. 三善英知、渡邊良子、伊原伸治、宇多絵里香、奥山紀子、坂江優佳、野田勝久、谷口直之  
糖鎖修飾によるマトリプターゼの機能変化とがんの転移  
第 12 回日本がん転移学会学術集会 ワークショップ、平成 15 年 6 月、金沢
5. 中原 晋、三善英知、野田勝久、本家孝一、猪原秀典、久保 武、谷口直之  
シスプラチン耐性扁平上皮癌細胞における  $\alpha$  5  $\beta$  1 インテグリンの糖鎖改変とその役割  
第 12 回日本がん転移学会学術集会 ワークショップ、平成 15 年 6 月、金沢
6. 野田勝久、三善英知、北田学利、谷口直之、笠原彰紀、林 紀夫  
新規 GDP-fucose 測定法の開発と肝癌診断への応用  
第 14 回肝サイトスケレトン研究会、平成 15 年 8 月、京都
7. 野田勝久、三善英知、顧 建国、本家孝一、林 紀夫、谷口直之  
肝癌における  $\alpha$  1-6 フコシル化糖蛋白合成における GDP-L-fucose 合成酵素 FX の検討  
第 23 回分子腫瘍マーカー研究会、平成 15 年 9 月、名古屋
8. 野田勝久、三善英知、中原 晋、本家孝一、林 紀夫、谷口直之  
ヒト肝癌、肝癌細胞株における GDP-L-fucose 濃度と GDP-L-fucose 合成酵素 FX との関係  
について  
第 62 回日本癌学会総会、平成 15 年 9 月、名古屋
9. 伊藤康弘、宮内 昭、秋長 歩、谷口直之、三善英知  
N-acetylglucosaminyltransferase V は matriptaase を通じて、甲状腺乳頭癌の早期における  
発育に関係する  
第 62 回日本癌学会総会、平成 15 年 9 月、名古屋
10. 三善英知、伊原伸治、渡邊良子、秋長 歩、奥山紀子、宇多絵里香、野田勝久、谷口直之  
マトリプターゼの糖鎖修飾とがんの転移  
第 62 回日本癌学会総会、平成 15 年 9 月、名古屋
11. 中原 晋、三善英知、斉藤貴志、高橋素子、野田勝久、伊原伸治、本家孝一、猪原秀典、久  
保 武、谷口直之  
可溶型 GnT-V の役割とその分泌機構  
第 62 回日本癌学会総会、平成 15 年 9 月、名古屋
12. Nakagawa T, Koyama N, Miyoshi E, Taniguchi N, and Kondo A.

Strategy to Address Mechanisms for Suppression of HBV replication with GnT-III gene transfection.

日本生化学会、平成 15 年 10 月、横浜

13. Kanako Ymanaka, Yasuhiro Ito, Noriko Okuyama, Naoyuki Taniguchi, Jorge Filmus, Eiji Miyoshi.  
Expression of glypican 3 in thyroid cancer: a possible implication for a novel tumor marker.  
第 76 回日本生化学会、平成 15 年 10 月、横浜
14. Susumu Nakahara, Eiji Miyoshi, Takashi Saito, Motoko Takahashi, Katsuhisa Noda, Shinji Ihara, Koichi Honke, Hidenori Inohara, Takeshi Kubo, Naoyuki Taniguchi.  
A Biological Function of Soluble GnT-V and its Mechanism of Secretion.  
第 76 回日本生化学会、平成 15 年 10 月、横浜
15. 小山信人  
糖転移酵素によるウイルス遺伝子の発現抑制  
第 1 回糖質科学コンソーシアムシンポジウム、平成 15 年 11 月、東京
16. 小山信人  
肝炎の糖鎖治療戦略  
千里ライフサイエンスセミナー「糖鎖の機能解析から糖鎖創薬への架け橋」、平成 16 年 2 月、大阪
17. 三善英知、山中香奈子、伊藤康弘、野田勝久、Jorge Filmus、谷口直之  
甲状腺がんにおけるグリピカン 3 の発現に関する検討  
第 24 回分子腫瘍マーカー研究会、平成 16 年 9 月、博多
18. 井出義人、三善英知、奥山紀子、野田勝久、顧 建国、谷口直之  
膵癌における糖鎖構造の変化とその意義  
第 62 回日本癌学会総会、平成 16 年 9 月、福岡
19. 三善英知、稲葉二郎、木下憲明、顧 建国、谷口直之、伊藤 哲  
LEC ラットを用いた DNA アレイによる肝疾患診断のための基礎的検討  
第 62 回日本癌学会総会、平成 16 年 9 月、福岡
20. Takatoshi Nakagawa, Eiji Miyoshi, Naoyuki Taniguchi, Akihiro Kondo.  
Development of an efficient method for glycopeptides and non-glycopeptides separation using cellulose column chromatography.  
第 77 回日本生化学会、平成 16 年 10 月、横浜
21. 近藤昭宏  
糖転移酵素から見た糖鎖の機能解析  
近畿大学大学院薬学研究科特別講義、平成 16 年 11 月
22. 中の三弥子、近藤昭宏、掛樋一晃、谷口直之  
Fmoc 誘導体化法を利用する糖タンパク質糖鎖の CE-ESI MS 分析  
日本薬学会年会、平成 17 年 3 月、東京
23. 近藤昭宏、三善英知、谷口直之

糖転移酵素の発現抑制による肝がん細胞増殖抑制における基礎的検討  
第 41 回日本肝臓学会総会、平成 17 年 6 月、大阪

24. 金澤禎行、竹原徹郎、三善英知、谷口直之、林 紀夫  
膵臓細胞の肝細胞への分化と Bcl-2 の影響に関する検討  
第 41 回日本肝臓学会総会、平成 17 年 6 月、大阪
25. 野田勝久、三善英知、森脇健太、吉原治正、山田幸則、谷口直之、林 紀夫  
肝臓におけるフコシル化糖鎖調節機構について  
第 41 回日本肝臓学会総会、平成 17 年 6 月、大阪
26. 三善英知、中原 晋、猪原秀典、谷口直之  
腫瘍血管新生作用を持つ分泌型糖転移酵素 GnT-V は、どのようにして作られるか？  
第 14 回 日本癌転移学会、平成 17 年 6 月
27. 三善英知、佐々木望、秋長 歩、野田勝久、魚住尚史、谷口直之、林 紀夫  
糖鎖を用いた肝再生医療への基礎的検討  
第 1 回 肝セルバイオロジー研究会、平成 17 年 7 月、京都
28. 高 叢笑、三善英知、魚住尚史、谷口直之  
アネキシン V の特殊な糖鎖構造が分子シャペロン Hsp47 の結合に重要である  
第 1 回 肝セルバイオロジー研究会、平成 17 年 7 月、京都
29. 井出義人、三善英知、魚住尚史、顧 建国、小堤保則、山本晴美、谷口直之  
膵臓における糖転移酵素 GnT-IV の発現変化とその意義  
第 64 回 日本癌学会総会、平成 17 年 9 月、札幌
30. 金澤禎行、竹原徹郎、三善英知、鈴木貴弘、法水 淳、大川和良、阪森亮太郎、山口真二  
膵細胞から肝細胞への分化転換におけるアポトーシス関連遺伝子の検討  
第 9 回 日本肝臓学会大会、平成 17 年 10 月、神戸
31. 小山信人  
「糖鎖を標的にした新しいがん及びウイルス疾患の治療法／診断法の開発」  
第 3 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、平成 17 年 12 月 6 日、東京
32. 三善英知、野田勝久、笠原彰紀、谷口直之、林 紀夫  
肝臓における AFP-L3 分画(フコシル化 AFP)産生の分子機構  
第 43 回日本肝臓学会総会、平成 18 年 5 月 25～26 日、京都
33. 北田学利、村上卓道、松田高明、中城和也、南谷かおり、桜井康介、大須賀慶吾、三善英知、田村信司、中村仁信、林 紀夫、岸野文一郎  
肝臓治療における Real-time Virtual Sonography (RVS)の有用性  
第 43 回日本肝臓学会総会、平成 18 年 5 月 25～26 日、京都
34. 伊藤敏文、小森真人、伊藤善基、三善英知  
慢性膵炎におけるフコシル化ハプトグロビン発現とその意義の検討  
第 37 回日本膵臓学会、平成 18 年 6 月 30 日～7 月 1 日、横浜

35. 三善英知、奥山紀子、井出義人、森脇健太、村田幸平、北田学利、伊藤敏文、笠原彰紀、林 紀夫、谷口直之  
新しい膵癌の腫瘍マーカーとしてのフコシル化ハプトグロビン  
第2回京都肝セルバイオロジー研究会、平成18年7月15日、京都
36. 伊左治知弥、佐藤裕也、趙 艶陽、三善英知、谷口直之、顧 建国  
インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  の機能糖鎖モジュールに関する研究  
第26回日本糖質学会、平成18年8月23~25日、仙台
37. 森脇健太、野田勝久、谷口直之、三善英知  
大腸癌細胞のフコシル化と遺伝子異常  
第65回日本癌学会総会、平成18年9月28~30日、横浜
38. 魚住尚史、中川 勉、佐々木望、谷口直之、三善英知  
CA19-9 抗原が提示している分子群の同定及び生物機能の解析  
第65回日本癌学会総会、平成18年9月28~30日、横浜
39. 中川 勉、魚住尚史、中の三弥子、水野洋子、谷口直之、三善英知  
AFP-L3 分画の産生機序としてのフコシル化選別輸送の可能性  
第65回日本癌学会総会、平成18年9月28~30日、横浜
40. 三善英知、佐々木望、森脇健太、魚住尚史、中川 勉、林 紀夫、谷口直之  
糖鎖を用いた肝幹細胞の分離と応用  
第65回日本癌学会総会、平成18年9月28~30日、横浜
41. 野田勝久、三善英知、森脇健太、村田真衣子、森川公美子、名和誉敏、佐藤雅子、明田寛史、後藤靖和、山田幸則、吉原治正、鎌田武信、林 紀夫  
cDNA microarray を用いた肝細胞癌の網羅的フコシル化糖蛋白関連遺伝子の解析  
第43回 日本肝臓学会総会、平成19年5月31日~6月1日、東京
42. 三善英知、佐々木 望、野田勝久、谷口直之、林 紀夫  
糖鎖を用いた肝幹細胞の分離と応用  
第43回 日本肝臓学会総会、平成19年5月31日~6月1日、東京
43. 三善英知、伊藤敏文  
グライコミクス的手法を用いた膵癌の新しい腫瘍マーカーの開発  
第38回 日本膵臓学会大会、平成19年6月28~29日、福岡
44. 伊藤敏文、中田悠紀、戸田万生良、日山智史、山本政司、小森真人、村田浩昭、伊藤善基、三善英知  
Functional Dyspepsia(FD)と慢性膵炎の鑑別診断  
第38回 日本膵臓学会大会、平成19年6月28~29日、福岡
45. 中川勉、魚住尚史、中の三弥子、田口友彦、桑本佳奈、津田沙織、谷口直之、三善英知  
肝臓において合成された糖蛋白質のフコシル化は胆汁中への分泌を制御する  
第3回 京都肝セルバイオロジー研究会、平成19年7月14日
46. 三善英知、新崎信一郎、飯島英樹、林 紀夫、中川孝俊、近藤昭宏  
IgG の糖鎖解析による炎症性腸疾患の新しい病態解析についての検討



第 27 回日本糖質学会年会、平成 19 年 8 月 1~3 日、福岡

47. 李 文哲、石原克彦、横田貴史、中川孝俊、小山信人、金 錦花、水野洋子、王 向春、三善英知、谷口直之、近藤昭宏

$\alpha$  1,6 コアフコースは B 細胞の初期分化過程に重要である

第 27 回日本糖質学会年会、平成 19 年 8 月 1 日-8 月 3 日、福岡

48. Miyoshi E, Nakano M, Moriwaki K, Nakagawa T, Hayashi N, Taniguchi N.

Molecular basis for production of fucosylated haptoglobin in cancer

第 66 回日本癌学会総会、平成 19 年 10 月 3~5 日、横浜

③ ポスター発表 (国内会議 35 件、国際会議 54 件)

(国際会議)

1. Miyoshi E, Saito T, Uda E, Nakagawa T, Kondo A and Taniguchi N.  
Involvement of GnT-V in cancer progression in terms of its target proteins and tumor angiogenesis.  
Gordon Conference (Glycobiology)、2003 年 3 月、米国・ベンチューラ
2. Miyamura T, Towatari T, Sano M, Kato I, and Kondo A.  
Structure Analysis of Cathepsins' Asparagine-linked Oligosaccharides.  
Gordon Research Conference、2003 年 3 月、米国・ベンチューラ
3. Miyoshi E, Uda E, Noda K, Watanabe Y, Saito T, and Taniguchi N.  
A novel function of a secreted type of *N*-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) as an angiogenesis inducer; A possible implication for a strategy for inhibiting tumor angiogenesis.  
94th American Association Cancer Research Annual Meeting、2003 年 7 月、米国・ワシントン DC
4. Akihiro Kondo, Takatoshi Nakagawa, Eiji Miyoshi, and Naoyuki Taniguchi.  
Recent Advances for the Analysis of Glycopeptides by Mass Spectrometry. (論文作成中)  
Glycobiology meeting、2003 年 12 月、米国・サンディエゴ
5. Miyoshi E, Nakahara S, Noda K, Gu J, Inihara H, Kubo T, and Taniguchi N.  
Involvement of oligosaccharide changes alpha5beta1 integrin in a cisplatin-resistant human squamous carcinoma cell line.  
95<sup>th</sup> Annual meeting of AACR、2004 年 3 月 27~31 日、米国・オーランド
6. Noda K, Miyoshi E, Nakahara S, Hori M, Hayashi N, Taniguchi N.  
A high expression of FX followed by increases in GDP-L-fucose levels contribute to the elevated core fucosylation in HCC.  
95<sup>th</sup> Annual meeting of AACR、2004 年 3 月 27~31 日、米国・オーランド
7. Ishibashi Y, Akita D H, Miyoshi E, Shindoh M, Itoh T, Miyamoto M, Katoh H, Miyazaki H, Nishimura M, Taniguchi N.  
Role of GnT-V in the development of human esophageal cancers: Results from immunohistochemical analysis of carcinomas and nearby non-cancerous lesions.  
95<sup>th</sup> Annual meeting of AACR、2004 年 3 月 27~31 日、米国・オーランド
8. Gu J, Miyoshi E, Taniguchi N.

Beta 1,4 *N*-acetylglucosaminyltransferase III downregulates neutrite outgrowth induced by co-stimulation of epidermal growth factor and integrins through the Ras/ERK signaling pathway in PC12 cells.

IUBMB/ASBMB 2004、2004 年 7 月、米国・ボストン

9. **Miyoshi E**, Ihara S, Gu J, Dickson R, Lin C-Y, Taniguchi N.  
The addition of beta a-6 GlcNAc branching in *N*-glycans on matriptase prolongs its degradation, resulting in an enhancement in tumor metastasis.  
IUBMB/ASBMB 2004、2004 年 7 月、米国・ボストン
10. **Akihiro Kondo**, Takatoshi Nakagawa, Miyako Nakano, **Nobuto Koyama**, **Eiji Miyoshi**, and Naoyuki Taniguchi.  
Development of Analysis Method for Glycopeptides Using Cellulose Column Chromatography.  
HUPO、2004 年 10 月、中国・北京
11. Wenzhe Li, Takatoshi Nakagawa, **Nobuto Koyama**, Jianguo Gu, **Eiji Miyoshi**, Naoyuki Taniguchi and **Akihiro Kondo**.  
Study of •1,6-fucosyltransferase-deficient mice.  
US/JAPAN Glyco 2004、2004 年 11 月、米国・ホノルル
12. **Miyoshi E**, Sasaki N, Akinaga A, Noda K, Nakagawa T, **Kondo A**, Kameyama A, Nakaya S, Narimatsu H, and Taniguchi N.  
Oligosaccharide is one of markers for hepatic stem cells.  
Gordon Conference Glycobiology、2005 年 3 月 6~12 日、米国・ベンチューラ
13. Miyako Nakano, Takatoshi Nakagawa, Naoyuki Taniguchi, Kazuaki Kakehi, and **Akihiro Kondo**.  
Capillary electrophoresis-mass spectrometry for a rapid and sensitive analysis of *N*-glycans.  
Gordon Research Conference、2005 年 3 月、米国・ベンチューラ
14. Wenzhe Li, Takatoshi Nakagawa, **Nobuto Koyama**, Jianguo Gu, **Eiji Miyoshi**, Naoyuki Taniguchi and **Akihiro Kondo**.  
Study of •1,6-fucosyltransferase-deficient mice.  
Gordon Research Conference、2005 年 3 月、米国・ベンチューラ
15. Ide Y, **Miyoshi E**, Okuyama N, Nakano M, Nakagawa T, Uozumi N, Taniguchi N.  
Increases of fucosylated haptoglobin in the sera of patients with pancreatic cancer.  
96<sup>th</sup> Annual meeting of AACR、2005 年 4 月 16~20 日、米国・アナハイム
16. **Miyoshi E**, Nakahara S, Saito T, Kondo N, Noda K, Inohara H, Taniguchi N.  
A novel angiogenesis inducer, GnT-V is processed as a secreted type by  $\gamma$ -secretase.  
96<sup>th</sup> Annual meeting of AACR、2005 年 4 月 16~20 日、米国・アナハイム
17. Handerson T, Berger A, Nishigori C, Ueda M, Harigopol M, Camp R, **Miyoshi E**, Taniguchi N, Rimm D, Pawelek J.  
Macrophages target beta 1,6-branched oligosaccharide-, and matriptase- expression areas of tumors, and predict a survival benefit in malignant melanoma.  
96<sup>th</sup> Annual meeting of AACR、2005 年 4 月 16~20 日、米国・アナハイム

18. **Kondo A**, Nakagawa T, Nakano M, **Miyoshi E**, Taniguchi N.  
Glycoproteomic analyses of hepatitis B virus-infected hepatoma cells.  
HUPO 4<sup>th</sup> Annual World Congress、2005年8月29日～9月1日、ドイツ・ミュンヘン
19. **Miyoshi E**, Nakano M, Ide Y, Moriwaki K, Nakagawa T, Okuyama N, Taniguchi N.  
Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer; a detailed analysis on the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation.  
HUPO 4<sup>th</sup> Annual World Congress、2005年8月29日～9月1日、ドイツ・ミュンヘン
20. Nakano M, Kakehi K, Taniguchi N, **Kondo A**.  
Capillary Electrophoresis–Electrospray Mass Spectrometry for Rapid and Sensitive Analysis of *N*-glycans as 9–Fluorenylmethyl Derivatives.  
HUPO 4<sup>th</sup> Annual World Congress、2005年8月29日～9月1日、ドイツ・ミュンヘン
21. Gu J, Wang X, **Miyoshi E**, Taniguchi N.  
Core fucosylation regulates TGF- $\beta$ 1 receptor-mediated signaling.  
GLYCO 18、2005年9月5～9日、イタリア・フィレンツェ
22. Isaji T, Gu J, Shigeta M, Zhao Y, **Miyoshi E**, Taniguchi N.  
*N*-glycans of beta-propeller domain of alpha5 integrin are essential for alpha5beta1 heterodimer formation and its biological functions.  
GLYCO 18、2005年9月5～9日、イタリア・フィレンツェ
23. Shigeta M, Gu J, Ihara H, Korekane H, Shibukawa Y, **Miyoshi E**, Taniguchi N.  
GnT-III is involved in dendritic neuritogenesis by introducing the bisecting-GlcNAc into *N*-glycan on  $\alpha$ 1 integrin.  
The 2005 Meeting of the Society for Glycobiology、2005年11月9～12日、米国・ボストン
24. Mita S, Inamori K, Gu J, Mizuno-Horikawa Y, **Miyoshi E**, Dennis JW, Taniguchi N.  
GnT-IX and GnT-V are Expressed in a Different Manner in Mouse Tissues.  
The 2005 Meeting of the Society for Glycobiology、2005年11月9～12日、米国・ボストン
25. Lee SH, Takahashi M, **Miyoshi E**, Ekuni A, Taguchi T, Inoue, Gu J, Honke K, Taniguchi N.  
Core Fucosylation of Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein is Required for the Function as a Internalization for IGFBP3.  
The 2005 Meeting of the Society for Glycobiology、2005年11月9～12日、米国・ボストン
26. Wang X, Gu J, **Miyoshi E**, **Kondo A**, Honke K, and Taniguchi N.  
Dysregulation of TGF- $\beta$ 1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice.  
The 2005 Meeting of the Society for Glycobiology、2005年11月9～12日、米国・ボストン
27. Li W, Takahashi M, Gu J, **Miyoshi E**, Shibukawa Y, Taniguchi N.  
Overexpression of *N*-Acetylglucosaminyltransferase III Results in an Increasing Activity of Adenylyl Cyclase III.  
The 2005 Meeting of the Society for Glycobiology、2005年11月9～12日、米国・ボストン
28. Ide Y, **Miyoshi E**, Nakagawa T, **Kondo A**, Tanemura M, Yamamoto H, Kozutsumi Y and Taniguchi N.

Aberrant expression of *N*-Acetylglucosaminyltransferase-IVa and IVb (GnT-IVa and b) in pancreatic cancer.

97<sup>th</sup> Annual meeting of AACR、2006年4月16~20日、米国・ワシントン DC

29. **Miyoshi E**, Wang XC, Gu J, Inoue S, Uozumi N, Taniguchi N.  
Modification of TGF beta-receptor oligosaccharides down regulates the signaling, leading to emphysema-like changes in core fucose deficient mice.  
97<sup>th</sup> Annual meeting of AACR、2006年4月16~20日、米国・ワシントン DC
30. **Akihiro Kondo**, Miyako Nakano, Takatoshi Nakagawa, Naoyuki Taniguchi (Osaka University)  
Femto-mole Level Glycan Analyses by Micro-flow LC/ESI-MS.  
20<sup>th</sup> IUBMB Congress in Kyoto、2006年6月18~23日、京都
31. Isaji T, Gu J, **Miyoshi E**, Taniguchi N.  
*N*-Glycans on  $\beta$ -propeller domain of integrin  $\alpha 5$  subunit are essential for •• heterodimerization, expression on cell surface and its biological functions.  
20<sup>th</sup> IUBMB Congress in Kyoto、2006年6月18~23日、京都
32. Zhao Y, Gu J, Wang X, Isaji T, **Miyoshi E**, Kariya Y, Miyazalo K, Kawasaki N, Itoh S, Taniguchi N.  
Deletion of core fucosylation on •3•1 integrin down-regulates its functions.  
20<sup>th</sup> IUBMB Congress in Kyoto、2006年6月18~23日、京都
33. Wang X, Gu J, **Miyoshi E**, Honke K, Taniguchi N.  
Core fucosylation regulates EGF receptor-mediated intracellular signaling.  
20<sup>th</sup> IUBMB Congress in Kyoto、2006年6月18~23日、京都
34. Yokoe S, Takahashi M, Asahi M, Osumi D, Gu J, **Miyoshi E**, Taniguchi N.  
The Asn418-linked *N*-glycan of ErbB3 inhibits spontaneous heterodimerization with ErbB2, and suppresses anchorage dependent and independent cell growth through MAPK and PI3K/Akt pathways.  
20<sup>th</sup> IUBMB Congress in Kyoto、2006年6月18~23日、京都
35. **Miyoshi E**, Akinaga A, Ito Y, Yamanaka K, Nakagawa T, **Kondo A**, Dickson RB, Lin C-Y, Miyauchi A, Taniguchi N.  
Co-expression of matriptase and *N*-acetylglucosaminyltransferase V in thyroid cancer tissues: its possible role in prolonged stability in vivo by aberrant glycosylation.  
20<sup>th</sup> IUBMB Congress in Kyoto、2006年6月18~23日、京都
36. Watanabe T, Ihara H, **Miyoshi E**, Honke K, Taniguchi N, Taguchi T.  
A specific detection of GlcNAc•1-6Man; •1 branches in *N*-linked glycoproteins based on the specificity of *N*-acetylglucosaminyltransferase IV.  
20<sup>th</sup> IUBMB Congress in Kyoto、2006年6月18~23日、京都
37. Nakagawa T, Uozumi N, Nakano M, Mizuno Y, Okuyama N, Taguchi T, Gu J, **Kondo A**, Taniguchi N, **Miyoshi E**.  
Comparison of oligosaccharide structures between biliary and serum glycoproteins.  
20<sup>th</sup> IUBMB Congress in Kyoto、2006年6月18~23日、京都

38. Matsumura K, Higashida K, Ishida H, Hata Y, Abe Y, Kato M, Ueda M, Sawabu N, Murakami D, Yamamoto K, Shigeta M, Mizuno Y, **Miyoshi E**, Gu J, Taniguchi N.  
AOL, a novel probe for core fucose (1); Carbohydrate-binding specificity of a fucose-specific lectin from *Aspergillus oryzae*.  
20<sup>th</sup> IUBMB Congress in Kyoto, 2006年6月18~23日、京都
39. Ihara H, Ikeda Y, Toma S, Gu J, **Miyoshi E**, Nakagawa A, and Taniguchi N.  
The structural and enzymatic properties of human  $\alpha$ -1,6-fucosyltransferase, FUT8.  
20<sup>th</sup> IUBMB Congress in Kyoto, 2006年6月18~23日、京都
40. Li W, Nakagawa T, **Koyama N**, Gu J, **Miyoshi E**, Taniguchi N, **Kondo A**.  
Down regulation of trypsinogen expression is associated with growth retardation in  $\alpha$ -1,6-fucosyltransferase deficient mice: attenuation of proteinase-activated receptor 2 activity.  
20<sup>th</sup> IUBMB Congress in Kyoto, 2006年6月18~23日、京都
41. Mita S, Inamori K, Gu J, Mizuno Y, **Miyoshi E**, Taniguchi N.  
Different distributions of GnT-IX and GnT-V in mouse brain.  
20<sup>th</sup> IUBMB Congress in Kyoto, 2006年6月18~23日、京都
42. Wenzhe Li, Takatoshi Nakagawa, **Nobuto Koyama**, Jianguo Gu, **Eiji Miyoshi**, Naoyuki Taniguchi, and **Akihiro Kondo** (大阪大学、タカラバイオ)  
Down Regulation of Trypsinogen Expression Is Associated with Growth Retardation in  $\alpha$ -1,6-Fucosyltransferase-Deficient Mice: Attenuation of Proteinase-Activated Receptor 2 Activity.  
GlycoT 2006, 2006年6月25~28日、つくば
43. Sakaguchi M, Omaozumi Y, Shingo T, Ishibashi S, Hayama k, **Miyoshi E**, Hirabayashi J, Kuroiwa T, Mizusawa H, Nishi N, Poirier F, Narimatsu H, Taniguchi N, Sawamoto K, Okano H.  
The mechanisms of galectin-1 in promoting proliferation of adult neural stem cells.  
GlycoT 2006, 2006年6月25~28日、つくば
44. Iijima J, Zhao Y, Isaji T, Kameyama A, Nakaya S, Wang X, Ihara H, Cheng X, Nakagawa T, **Miyoshi E**, **Kondo A**, Narimatsu H, Taniguchi N, Gu J.  
Cell-cell interaction-dependent regulation of *N*-acetylglucosaminyltransferase III and the bisected *N*-glycans in GE11 epithelial cells: Involvement of E-cadherin-mediated cell adhesion.  
GlycoT 2006, 2006年6月25~28日、つくば
45. **Akihiro Kondo**, Miyako Nakano, Takatoshi Nakagawa, Naoyuki Taniguchi (Osaka University)  
Femto-mole Level Glycan Analyses by Micro-flow LC/ESI-MS.  
XXIIIrd International Carbohydrate Symposium, 2006年7月23~28日、カナダ・ウィスラー
46. Miyako Nakano, **Eiji Miyoshi**, Naoyuki Taniguchi and **Akihiro Kondo** (Osaka University)  
Normal phase LC-ESI MS Analyses for Femto-mole Level *N*-Glycans.  
HUPO 5th Annual World Congress, 2006年10月28日~11月1日、米国・ロングビーチ
47. Takatoshi Nakagawa, **Nobuto Koyama**, **Eiji Miyoshi**, Naoyuki Taniguchi and **Akihiro Kondo**

(Osaka University, Takara Bio Inc.)

Identification of secretion regulatory molecules in HBV by glycoproteomic techniques.

HUPO 5th Annual World Congress、2006年10月28日～11月1日、米国・ロングビーチ

48. Miyoshi E, Nakano M, Okuyama N, Taniguchi N.  
Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation.  
HUPO 5<sup>th</sup> Annual World Congress、2006年10月28日～11月1日、米国・ロングビーチ
49. Wenzhe Li, Takatoshi Nakagawa, Nobuto Koyama, Jianguo Gu, Eiji Miyoshi, Naoyuki Taniguchi, Akihiro Kondo (Osaka University, Takara Bio Inc.)  
Down regulation of EGFR–trypsin–PAR2 pathway in FUT8 deficient mice.  
Glycobiology 2006、2006年11月15～19日、米国・ハリウッド
50. Wenzhe Li, Katsuhiko Ishihara, Takafumi Yokota, Takatoshi Nakagawa, Eiji Miyoshi, Nobuto Koyama, Naoyuki Taniguchi and Akihiro Kondo (Osaka University, Takara Bio Inc.)  
Impaired pre-B cell development in the  $\alpha$ -1,6-fucosyltransferase deficient mice.  
10th Annual San Diego Glycobiology Symposium、2007年1月19～20日、米国・サンディエゴ
51. Wenzhe Li, Katsuhiko Ishihara, Takafumi Yokota, Takatoshi Nakagawa, Eiji Miyoshi, Nobuto Koyama, Naoyuki Taniguchi and Akihiro Kondo.  
Impaired pre-B cell development in the alpha 1,6-fucosyltransferase deficient mice  
Glycobiology and Sphingobiology 2007、2007年2月27日-3月1日、徳島
52. Miyoshi E, Sasaki N, Uozumi N, Moriwaki K, Noda K, Hayashi N, Taniguchi N.  
Oligosaccharides are a novel marker for the isolation of hepatic stem cells.  
98<sup>th</sup> AACR Annual Meeting 2007、2007年4月14～18日、米国・ロサンゼルス
53. Akihiro Kondo, Wenzhe Li, Katsuhiko Ishihara, Takafumi Yokota, Takatoshi Nakagawa, Eiji Miyoshi, Nobuto Koyama, and Naoyuki Taniguchi.  
Impaired pre-B cell development in the alpha 1,6-fucosyltransferase deficient mice.  
Immunology 2007 by AAI、2007年5月18～22日、米国・マイアミ
54. Wenzhe Li, Katsuhiko Ishihara, Takafumi Yokota, Takatoshi Nakagawa, Eiji Miyoshi, Nobuto Koyama, Naoyuki Taniguchi and Akihiro Kondo.  
Impaired pre-B cell development in the alpha 1,6-fucosyltransferase deficient mice.  
GLYCO-19: XIXth International Symposium on Glycoconjugates、2007年7月15～20日、オーストラリア・ケアンズ

(国内会議)

1. 佐々木 望、三善英知、秋長 歩、近藤菜美、井出義人、魚住尚史、谷口直之  
糖鎖をマーカーにした肝幹細胞分離のための基礎的検討  
第51回日本臨床検査医学会総会、平成16年9月、東京
2. 近藤菜美、谷一靖江、三善英知、谷口直之、小杉 厚  
ヒトT細胞活性化に伴うラフト発現上昇機構の解析  
第51回日本臨床検査医学会総会、平成16年9月、東京

3. 奥山紀子、三善英知、井出義人、魚住尚史、野田勝久、山中香奈子、秋長 歩、川野 淳、谷口直之  
膵／胆管癌細胞が分泌するフコシル化蛋白質の検索  
第 62 回日本癌学会総会、平成 16 年 9 月、福岡
4. 山中香奈子、三善英知、伊藤康弘、秋長 歩、奥山紀子、井出義人、魚住尚史、川野 淳、谷口直之  
甲状腺がんにおける Glypican3 の発現の解析  
第 62 回日本癌学会総会、平成 16 年 9 月、福岡
5. 秋長 歩、三善英知、伊原伸治、奥山紀子、山中香奈子、野田勝久、松浦成昭、谷口直之  
がんにおけるマトリプターゼの分解抑制機構  
第 62 回日本癌学会総会、平成 16 年 9 月、福岡
6. 喜屋武麻紀子、飯塚 正、山崎 裕、野谷健一、向後隆男、三善英知、谷口直之、石橋陽子、秋田弘俊、進藤正信  
舌扁平上皮がんにおける GnT-V の発現と悪性形質との関連  
第 62 回日本癌学会総会、平成 16 年 9 月、福岡
7. Hideyuki Ihara, Yoshitaka Ikeda, Motoko Takahashi, Eiji Miyoshi, Jianguo Gu, Naoyuki Taniguchi.  
Kinetic analysis of human  $\alpha$ -1,6-fucosyltransferase.  
第 77 回日本生化学会、平成 16 年 10 月、横浜
8. Keiichiro Inamori, Takeshi Endo, Jianguo Gu, Ichiro Matsuo, Yoshishige Ito, Shigeru Fujii, Hiroko Iwasaki, Hisashi Narimatsu, Eiji Miyoshi, Koichi Honke, Naoyuki Taniguchi.  
*N*-Acetylglucosaminyltransferase IX acts on the GlcNAc $\cdot$ 1-2Man $\cdot$  moiety in both the core structure on *N*-glycan and O-mannosyl glycan.  
第 77 回日本生化学会、平成 16 年 10 月、横浜
9. Daisuke Ohsumi, Hidetoshi Ichikawa, Motoko Takahashi, Katsuhisa Noda, Syunichi Yokoe, Eiji Miyoshi, Mutsuo Ishikawa, Naoyuki Taniguchi.  
Overexpression of fucosyltransferase 8 decreases the EGF-induced ERK phosphorylation in WiDr cells.  
第 77 回日本生化学会、平成 16 年 10 月、横浜
10. Congxiao Gao, Eiji Miyoshi, Naofumi Uozumi, Jianguo Gu, Koichi Honke, Naoyuki Taniguchi.  
Identification of intracellular target molecules for annexin V.  
第 77 回日本生化学会、平成 16 年 10 月、横浜
11. Xiangchun Wang, Jianguo Gu, Hideyuki Ihara, Shinya Inoue, Motoko Takahashi, Eiji Miyoshi, Koichi Honke, Naoyuki Taniguchi.  
Core fucosylation regulates EGF receptor-mediated signaling.  
第 77 回日本生化学会、平成 16 年 10 月、横浜
12. Yanyang Zhao, Jianguo Gu, Xiangchun Wang, Tomoya Isaji, Masaki Shigeta, Yoshinobu Kariya, Kaoru Miyazaki, Eiji Miyoshi, Naoyuki Taniguchi.  
Core fucosylation modulates integrin-mediated cell spreading and migration on laminin-5.  
第 77 回日本生化学会、平成 16 年 10 月、横浜

13. 中川孝俊、三善英知、谷口直之、近藤昭宏  
HBV 感染肝癌細胞の網羅的解析  
日本ヒトプロテオーム機構(JHUPO)第3回大会、平成17年8月、横浜
14. 中の三弥子、中川孝俊、掛樋一晃、谷口直之、近藤昭宏  
CE-ESI-MSを用いた Fmoc-N 結合糖鎖の迅速かつ高感度分析  
日本ヒトプロテオーム機構(JHUPO)第3回大会、平成17年8月、横浜
15. 奥山紀子、中の三弥子、中川勉、村田幸平、近藤昭宏、谷口直之、三善英知、  
フコシル化ハプトグロビンは新規膵臓がんマーカーである  
日本ヒトプロテオーム機構(JHUPO)第3回大会、平成17年8月、横浜
16. 森脇健太、奥山紀子、井出義人、中の三弥子、中川 勉、山中香奈子、魚住尚史、顧 建国、  
村田幸平、中川孝俊、近藤昭宏、谷口直之、三善英知  
膵癌患者におけるフコシル化ハプトグロビンの増加とそのメカニズム  
第25回分子腫瘍マーカー研究会、平成17年9月、札幌
17. 石橋陽子、秋田弘俊、三善英知、進藤正信、宮本正樹、木下一郎、近藤 哲、谷口直之  
食道癌における *N*-Acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) 発現の意義  
第64回 日本癌学会総会、平成17年9月、札幌
18. 森脇健太、野田勝久、三善英知、魚住尚史、川野 淳、谷口直之  
肝癌における GDP-fucose transporter によるフコシル化制御について  
第64回 日本癌学会総会、平成17年9月、札幌
19. 中川 勉、三善英知、魚住尚史、中の三弥子、顧 建国、谷口直之  
肝細胞の選別輸送における  $\alpha$ 1,6 フコースの役割に関する検討  
第64回 日本癌学会総会、平成17年9月、札幌
20. Mita S, Inamori K, Gu J, Miyoshi E, Taniguchi N.  
Immunohistochemical analysis of brain and testis specific *N*-  
-acetylglucosaminyltransferase-IX (GnT-IX).  
第78回日本生化学会、平成17年10月、神戸
21. Oka R, Kitazume S, Tachida Y, Ogawa K, Sugimoto I, Takashima S, Higuchi M, Aria H,  
Saidou T, Miyoshi E, Taniguchi N, Hashimoto Y.  
Quantitative analysis of plasma  $\cdot$ 2,6-sialyl epitopes (ST6Gal I products) on upregulation of  
BACE1.  
第78回日本生化学会、平成17年10月、神戸
22. Sakiyama H, Takahashi M, Miyamoto Y, Yamamoto T, Teshima T, Gu J, Miyoshi E, Taniguchi  
N.  
The internalization and metabolism of 3-deoxyglucosone in human umbilical vein endothelial  
cells.  
第78回日本生化学会、平成17年10月、神戸
23. Yokoe S, Takahashi M, Asahi M, Gu J, Miyoshi E, Taniguchi N.  
Assigned role of *N*-glycan of ErbB3.



第 78 回日本生化学会、平成 17 年 10 月、神戸

24. Nakagawa T, Uozumi N, Nakano M, Taguchi T, Kondo A, Gu J, Taniguchi N, Miyoshi E.  
•1-6 fucosylation regulates secretion of glycoproteins to bile.  
第 78 回日本生化学会、平成 17 年 10 月、神戸
25. Nakagawa T, Miyoshi E, Taniguchi N, Kondo A.  
Analysis of Hepatitis B virus (HBV) infected Hepatoma cells using proteomic approach.  
第 78 回日本生化学会、平成 17 年 10 月、神戸
26. Shigeta M, Ihara H, Korekane H, Shibukawa Y, Miyoshi E, Taniguchi N, Gu J.  
GnT-III is involved in dendritic neuritogenesis by introducing the bisecting-GlcNAc into  
N-glycan on •1 integrin.  
第 78 回日本生化学会、平成 17 年 10 月、神戸
27. 中の三弥子、奥山紀子、井出義人、中川 勉、森脇健太、村田幸平、谷口直之、三善英知  
新しい膵癌の腫瘍マーカー: 質量分析によるハプトグロビンの糖鎖構造の解析  
第 4 回 JHUPO & 第 2 回 JSCP 合同学会、平成 18 年 7 月 18~19 日、東京
28. 中川孝俊、三善英知、谷口直之、近藤昭宏  
血清グライコプロテオーム 糖転移酵素の影響  
第 4 回 JHUPO & 第 2 回 JSCP 合同学会、平成 18 年 7 月 18~19 日、東京
29. Miyako Nakano, Kazunori Iwata, Naoyuki Taniguchi, Akihiro Kondo (大阪大学、昭和電工)  
Analysis of Femto-mole Level N-Glycans by Hyphenated Technique of Normal Phase Liquid  
Chromatography and ESI MS.  
第 26 回日本糖質学会年会、平成 18 年 8 月 23~25 日、仙台
30. 森脇健太、野田勝久、魚住尚史、中川孝俊、近藤昭宏、谷口直之、三善英知  
肝臓における GDP-fucose transporter によるフコシル化制御について  
第 26 回日本糖質学会年会、平成 18 年 8 月 23~25 日、仙台
31. 王 向春、顧 建国、三善英知、谷口直之  
コアーフコシレーションは増殖因子レセプターの機能に重要である  
第 26 回日本糖質学会年会、平成 18 年 8 月 23~25 日、仙台
32. Wenzhe Li, Katsuhiko Ishihara, Takafumi Yokota, Takatoshi Nakagawa, Eiji Miyoshi, Nobuto  
Koyama, Naoyuki Taniguchi and Akihiro Kondo (大阪大学、タカラバイオ)  
Impaired pre-B cell development in the •1,6-fucosyltransferase deficient mice.  
第 36 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 18 年 12 月 11~13 日、大阪
33. 中の三弥子、中川 勉、田尻道子、和田芳直、谷口直之、三善英知  
膵癌患者血清由来ハプトグロビンの N 型糖鎖の部位特異的解析による新規腫瘍マーカーの  
発見  
日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会、平成 19 年 7 月 30~31 日、東京
34. Nakagawa T, Uozumi N, Nakano M, Taniguchi N, Miyoshi E.  
Fucosylation levels in serum and bile during hepatocarcinogenesis.  
第 66 回日本癌学会総会、平成 19 年 10 月 3~5 日、横浜

35. Moriwaki K, Noda K, Taniguchi N, Hayashi N, Miyoshi E.

A high expression of GDP-fucose transporter in hepatocellular carcinoma is a key factor for increases in fucosylation.

第 66 回日本癌学会総会、平成 19 年 10 月 3~5 日、横浜

(4)特許出願

① 国内出願 (5 件)

1. 発明の名称:肝幹細胞の分離方法

発明者:三善英知、野田勝久、谷口直之、林 紀夫

出願人:タカラバイオ(株)

出願日:平成 15 年 5 月 21 日

出願番号:特願 2003-142807

2. 発明の名称:遺伝子発現抑制のための方法及び組成物

発明者:佐々木美紀子、江頭知恵、小山信人、峰野純一、加藤郁之進

出願人:タカラバイオ株式会社

出願日:平成 17 年 8 月 12 日

出願番号:特願 2005-235044

3. 発明の名称:プロモーターおよび該プロモーターを用いた遺伝子発現方法

発明者:佐々木美紀子、小山信人、田辺雅茂、小林英二、佐川裕章、峰野純一、加藤郁之進

出願人:タカラバイオ株式会社

出願日:平成 17 年 11 月 21 日

出願番号:特願 2005-335138

4. 発明の名称:FUT8の機能を抑制するための組成物

発明者:近藤昭宏、李文哲、中川孝俊、小山信人、谷口直之、加藤郁之進

出願人:国立大学法人大阪大学、タカラバイオ株式会社

出願日:平成 18 年 3 月 3 日

出願番号:特願 2006-057036

5. 発明の名称: $\beta$  カゼインによって認識される複合体とその癌診断への応用

発明者:三善英知、魚住尚史、近藤昭宏

出願人:国立大学法人 大阪大学

出願日:平成 18 年 9 月 27 日

出願番号:特願 2006-262363

② 海外出願 (2 件)

6. 発明の名称:Method for separating hepatic progenitor cell

発明者:三善英知、野田勝久、谷口直之、林 紀夫

出願人:タカラバイオ(株)

出願日:2004 年 4 月 13 日

出願番号:Appl. Serial No. 822760(米国)

7. 発明の名称:フコシルトランスフェラーゼの発現を抑制するための組成物

発明者:近藤昭宏、李 文哲、中川孝俊、小山信人、谷口直之、加藤郁之進

出願人:国立大学法人 大阪大学、タカラバイオ株式会社  
出願日:平成 19 年 3 月 2 日  
出願番号:PCT/JP2007/054035

(5)受賞等

① 受賞

1. 第 43 回 日本肝臓学会総会 優秀演題賞  
糖鎖を用いた肝幹細胞の分離と応用  
三善英知、佐々木 望、野田勝久、谷口直之、林 紀夫  
2007 年 5 月 31 日
2. 第 38 回 日本膵臓学会大会 優秀演題賞  
グライコミクスの手法を用いた膵癌の新しい腫瘍マーカーの開発  
三善英知、伊藤敏文  
2007 年 6 月 29 日

② 新聞報道

なし

③ その他

なし

(6)その他特記事項

- 7 研究期間中の主な活動  
ワークショップ・シンポジウム等

なし

## 8 結び

当チームは本研究を機に結成されたので、テーマに直接関係する研究の蓄積が豊富とは言えず、研究期間の前半は期待していた実績を挙げられなかった。しかし、研究テーマについては B 型肝炎からがん、また、研究対象とする糖転移酵素については GnT-III 及び GnT-V から FUT8 に重心を移動させることにより、FUT8 遺伝子の発現抑制による細胞増殖抑制メカニズムの解明や腫瘍マーカーとしてのフコシル化ハプトグロビンの発見をはじめとした成果を挙げる事ができた。

FUT8 遺伝子の発現を抑制するだけでがんを治療できるわけではないが、化学療法や放射線療法との組合せにより従来よりも高い治療効果を得られるようになるかもしれない。この場合、遺伝子発現を抑制するよりも、FUT8 の活性や GDP-フコスの合成酵素又はトランスポーターを阻害することによりコアフコース構造を抑制する方が現実的ではないかと思われる。一方、フコシル化ハプトグロビンはより実用化に近い位置にあると考えている。今後、検出キットの感度や特異性を向上させる必要があるが、抗体に比べて結合性の弱いレクチンを用いて検出する点がネックになる可能性がある。コアフコース構造を認識する新規のレクチンや抗体の開発がブレークスルーとなるかもしれない。

CREST の研究費はある程度自由に費目間の流用ができる点において好都合であった。その一方、平成 18 年度までは研究費の大部分が JST の直接執行であり、共同研究者の分まで合わせると毎月処理する書類や伝票はかなりの量になった。例えば、オンライン処理システムが導入されていれば研究者、研究事務所双方の労力がかなり軽減されていたのではなかろうか。

当チームは、研究代表者が企業の所属という、CREST においてはやや特殊な形であった。そのため、タカラバイオグループにおいては本研究専属の研究員を置かず、実験ごとに最も適した部署が担当することにした。このやり方が研究成果にプラスに働いたかマイナスに働いたかはともかく措くとして、各研究員が日々の業務を抱えている現状にあっては一つの選択肢であったと考えている。

われわれが 5 年間の研究を遂行するにあたり、研究総括の谷口先生を初め、領域アドバイザーの先生方、JST 本部及び糖鎖研究事務所の皆さんなど、関係各位には多大なご助力をいただきました。深く感謝します。



タカラバイオグループ



糖鎖治療学グループ



糖鎖シグナルグループ