

総 説

がんとシアリダーゼ異常

宮城 妙子

Aberrant Expression of Sialidase in Cancer

Taeko MIYAGI

(Received November 20, 2010)

はじめに

細胞ががん化すると、細胞表層糖鎖に異常がみられる。とりわけ、酸性糖であるシアル酸の量や質の変化は、がん細胞の転移や浸潤などの悪性形質と深く関わっているといわれてきた。しかし、その実体についてはいまだ不明の点が多い。シアル酸は、一般に糖タンパクや糖脂質糖鎖の末端に見いだされるが、糖タンパクのコンホメーションに影響を与えたり、分子や細胞の機能部位を認識したり隠蔽することにより、多くの細胞機能に重要な役割を果たしていると考えられている。シアリダーゼ（ノイラミニダーゼとも呼ばれる）はこのシアル酸残基を脱離する糖分解酵素で、糖鎖分解の初期反応を触媒する。しかしながら、従来の解析には外来性の細菌やウイルス由来のシアリダーゼが用いられており、生体内におけるシアル酸変化の機構や意義については長い間不明のままであった。動物起源のシアリダーゼの分子レベルの研究がその極端な不安定性や低発現が災いして遅れていたためである。筆者らは、これまで、この問題を解決し、動物シアリダーゼの単離や性状解析を通じて、細胞内シアリダーゼが単にリソソームでの糖鎖の異化分解に関わるのみではなく、糖タンパクや糖脂質糖鎖からシアル酸を脱離することにより、多くの細胞現象を制御していることを明らかにしてきた。現在、世界で Neu1, Neu2, Neu3, Neu4（ヒト酵素では NEU1-4）と略称される4種のシアリダーゼが同定されているが、筆者らは、この3種を手がけてきた。これらシアリダーゼは主な細胞内局在や基質特異性等の酵素学的性質が異なっており、事実、各々の性質に応じて、独特の役割を果たしていることが次第にわかってきた。しかも、がんでそれぞれ異なった異常を示すことが明らかになった。本稿では、シアリ

ダーゼの異常が重要な糖鎖分子の機能を破綻させ、がんの悪性形質に深く関わっていること、それらを標的とした診断・治療への可能性について、筆者らの成果を中心に紹介したい。

I. シアリダーゼの種類と性状

シアリダーゼは、糖タンパク質や糖脂質糖鎖の非還元末端からシアル酸残基を遊離する Exo-型糖分解酵素で、哺乳動物から微生物まで、自然界に広く分布する。微生物由来のシアリダーゼは宿主への感染などに関わっていることが知られており、例えば、現在、インフルエンザの治療や予防に使用されているタミフルやリレンザはインフルエンザウイルスのシアリダーゼの阻害剤である。しかし、哺乳動物と微生物のシアリダーゼは構造や性質が異なっている。

動物のシアリダーゼ活性は1960年に初めて Warren と Spearing¹⁾ によって報告された。それ以来、種々の哺乳動物組織において見いだされてきたが、それらの活性が同じシアリダーゼに由来するのか、異なったシアリダーゼに由来するのかなどは全く不明であった。他の一般の糖分解酵素と同様に、シアリダーゼが単にリソソームで糖鎖の異化分解に携わっていると考えられていた状況であって、先に、筆者らはラット組織を酵素源として、生化学的な分離・精製や性状解析を行い、細胞内局在や基質特異性等の酵素学的性状を異にする4種のシアリダーゼが存在することを証明し提唱した。主な細胞内局在に応じて、それらをリソソーム内酵素、細胞質酵素、膜結合酵素 I, II と分類した。²⁻⁴⁾ 肝や脳を含む複数のラット組織は実際にこれらの4種を含んでいた。以上のようなシアリダーゼ多様性は、局在や基質特異性の違いに応じて、それぞれのシアリダーゼに特異な役割が

Table 1. Four types of mammalian sialidases

| | Neu1 | Neu2 | Neu3 | Neu4 |
|--------------------------------|-----------------------------------|---|-----------------|---|
| Major subcellular localization | Lysosomes | Cytosol | Plasma membrane | Lysosomes* Mitochondria and ER* |
| Good substrates | Oligosaccharides Glycopeptides | Oligosaccharides Glycoproteins Gangliosides | Gangliosides | Oligosaccharides Glycoproteins Gangliosides |
| Optimal pH | 4.4-4.6 | 6.0-6.5 | 4.6-4.8 | 4.4-4.5 |
| Total amino acids (human) | 415 | 380 | 428 | 496 (484) |
| (mouse) | 409 | 379 | 418 | 497 (413) |
| Chromosome location (human) | 6p 21.3 | 2q 37 | 11q 13.5 | 2q 37.3 |
| (mouse) | 17 | 1 | 7 | 10 |
| Frequent changes in cancer | ↓ | ↓ | ↑ | ↓ |

*For the subcellular localization of human NEU4, two different results have been described.

あることを推察させたが、最近のシアリダーゼ遺伝子クローニングの進歩は、当時の生化学的な解析結果とこの仮説を検証することとなった。リソソーム内酵素、細胞質酵素、膜結合酵素 I、II は、クローニング技術によって同定された現在の Neu1, Neu2, Neu3, および Neu4 に相当する。

Table 1 に現在同定されている 4 種のシアリダーゼの性状をまとめた。これらは染色体部位が異なるだけでなく、主な細胞内局在や基質特異性がそれぞれ異なっており、先の生化学的に解析された結果と性状がほとんど一致していた。⁵⁾ 筆者らは、1993 年、細胞質シアリダーゼの高度精製品の部分ペプチド情報をもとに、世界に先駆けて、シアリダーゼ Neu2 遺伝子の単離に成功し、哺乳動物シアリダーゼ遺伝子の構造が初めて明らかになった。⁶⁾ その一次構造は細菌や原虫のそれと有意の相同性はないが、微生物酵素に見いだされていた Asp box (-Ser-X-Asp-X-Gly-X-Thr-Trp-) と呼ばれる配列や、Arg-Ileu-Pro 等の短いアミノ酸配列が含まれることがわかった。その後、1996-1998 年、マウスの遺伝学的解析によってシアリダーゼ欠損症シアリドシスの原因遺伝子であることが知られていたヒト酵素 NEU1 の遺伝子が米、独、カナダのグループによってそれぞれ独立に、主要組織適合複合体 (MHC) に関連したシアリダーゼとして同定された。⁷⁻⁹⁾ ついで、1999 年には、筆者らが、形質膜にあって、

細胞の増殖や分化で重要な役割を果たしている形質膜局在シアリダーゼ Neu3 遺伝子の単離、同定に成功し、性状解析を行なった。¹⁰⁾ さらに、4 番目の遺伝子として、欧米の 3 グループと筆者らがそれぞれ独立にマウスやヒトゲノムの情報をもとに、Neu4 の同定と性状解析を手がけた。¹¹⁻¹⁴⁾

Neu1 については保護タンパクや β -ガラクトシダーゼと複合体を形成しており、その解離はシアリダーゼの失活をもたらすことがわかっている。¹⁵⁾ Neu1 は糖ペプチドやオリゴ糖のシアル酸をよく分解するが、Neu3 はガングリオシドと呼ばれるシアル酸を含む糖脂質からほとんど特異的にシアル酸を遊離する。微生物シアリダーゼのように、糖鎖の末端のシアル酸であれば脱離するというのではなく、特に、Neu1 と Neu3 は、基質の厳密性という点でユニークなシアリダーゼである (Fig. 1)。一方、Neu2 や Neu4 は糖ペプチド、オリゴ糖、糖タンパクおよびガングリオシドに働く広い基質特異性を有するが、Neu4 は他の 3 種には認められないムチン水解活性を示す。相当するヒト酵素 NEU4 には 2 つのイソフォームが存在し、これらはミトコンドリア移行シグナル配列と考えられる N 末端の 12 アミノ酸残基の有無で区別される。このイソフォームは組織特異的に発現し、脳、筋肉、腎臓では両方、肝臓や大腸粘膜などではもっぱら N 末端 12 アミノ酸残基のない短いフォームが発現

Sialidase

a glycosidase catalyzing the removal of α -glycosidically linked sialic acid residues from carbohydrate groups of glycoproteins and glycolipids

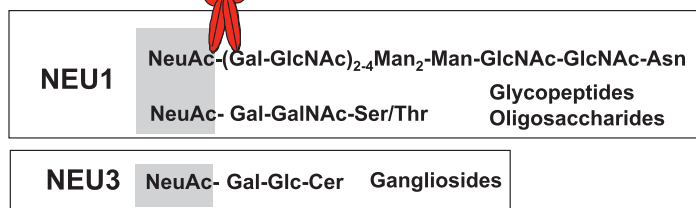
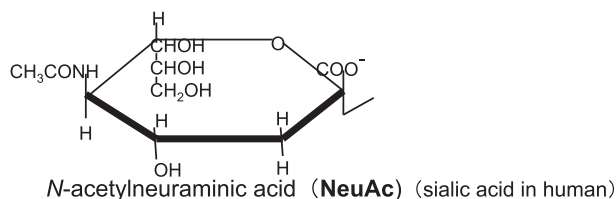


Fig. 1. Sialidase and sialic acid. Sialidase NEU1 preferentially hydrolyzes oligosaccharides and glycopeptides, while sialidase NEU3 acts almost specifically on gangliosides.

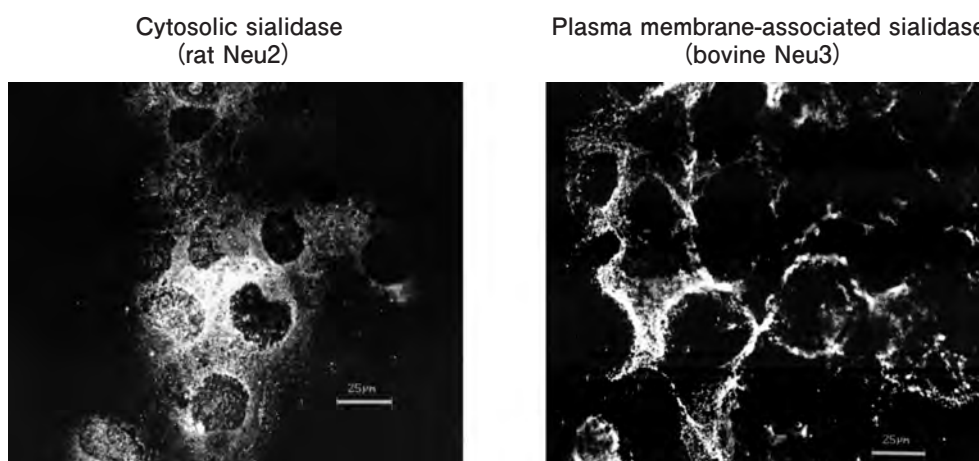


Fig. 2. Immunofluorescent staining of COS-7 cells expressing epitope-tagged Neu2 and Neu3 analyzed by confocal microscopy. Neu2 shows mainly cytosolic expression and Neu3 is detected at cell surface. ¹⁰⁾

している。¹⁴⁾ 4種のうち、Neu2のみがヒト酵素のX線結晶解析によって三次構造が明らかにされている。¹⁶⁾ Neu2とNeu3にHSV-TagをつけてCOS-7細胞に発現させ、Tag抗体で免疫染色したものをFig. 2に示した。それぞれ細胞質、細胞表層が主局在であることが確認された。しかし、最近、これらの細胞内局在は種々の生理的条件で変化することも知られてきた。Neu1はT細胞の活性化によって酵素の細胞内局在がリソソームから細胞表層へと移動することが見いだされ、¹⁷⁾ また、ヒト単球がマクロファージに分化する過程においてもこの発現が著明に上昇し、MHCクラスIIコンパートメントから形質膜に移行するという報告¹⁸⁾ がなされ

た。一方、ヒト酵素NEU3は血清やEGF等の増殖因子の添加によって、Leading edgeに移動し、Rac-1と局在を共にし、細胞の運動能を上昇することがA431細胞で見いだされた。¹⁹⁾ Neu1は核の外膜に、Neu3は核内膜に局在するという証拠も挙げられてきた。²⁰⁾ 中性pH付近で最大活性を示すNeu2以外は他の3種は至適pHが酸性であるが、ヒトNEU3酵素活性は酸性と中性の2相性を示す。ヒト酵素について、一次構造を比較すると、NEU1は他のシアリダーゼに対して、19-24%と相同性が低く、NEU2、NEU3、NEU4間では34-40%と比較的相同性が高い。これらの組織における発現レベルを各々の標準cDNAを用いた定量的RT-

PCR法によって比較すると、NEU1は最も発現が高く、NEU3やNEU4の発現は、その10-20分の1の発現量を示し、NEU2はNEU1の4000-10000分の1と極端に低かった。²¹⁾しかし、この発現プロファイルはヒト、ラット、マウス間で同じではなく、後二者では、Neu2の発現は低くはない。

II. シアリダーゼの機能

細胞内のシアリダーゼレベルが低いため、それらの生理的機能にはまだ不明の点が多い。Neu1は、シアリドーシスの病態研究から、リソソームで糖鎖の異化分解に関わることが分かっていた。この欠損によって、シアル酸を末端に持つオリゴ糖が蓄積している。その他に、免疫反応のシグナリングや細胞表層へのエラスチン繊維の集合等にも関わっていることが知られている。例えば、単球のPMA誘導性分化過程においてはNeu1の発現が著明に上昇する。²²⁾ Neu1ノックアウトマウスを用いた実験では、この酵素が表層レセプターの脱シアル化を介して、マクロファージや樹状細胞の貪食作用を制御していることが示唆された。²³⁾ エラスチン繊維集合がミクロ繊維糖タンパクや他の基質複合糖質の脱シアル化によって促進された。²⁴⁾ さらに、Neu1はインスリンレセプターやインスリン様増殖因子Iレセプターを脱シアル化することによって、筋芽細胞のインスリンへの増殖応答を調節しているという。²⁵⁾ これらはリソソームでの異化分解作用に加えて、Neu1が細胞表層に移動し、そこで、糖鎖分子のシアル酸を脱離することによって、重要な生理機能の制御に関わっていることを示唆している。

Neu2については、筋肉や神経細胞の分化に関わっていると考えられている。ラット細胞質シアリダーゼは骨格筋に多く含まれ、遺伝子の5'上流エンハンサー/プロモーター領域には筋肉特異的転写因子が結合する2つのE-boxペアを含んでいる。²⁶⁾ この領域はラットL6筋芽細胞²⁶⁾やマウスC2C12筋芽細胞²⁷⁾で転写活性を示し、筋管形成に伴って、活性とmRNAレベルが上昇することから、筋分化において重要な役割を担っていることが明らかになった。PC12細胞ではNGF刺激で転写活性化され、神経分化にも関与していることが推察された。²⁸⁾

Neu3については、シグナル分子として、種々の細胞情報伝達に関わっている。²⁹⁾ Neu3が主に局在

する細胞表層の形質膜には、ほとんど他の糖分解酵素が検出できず、良い基質であって細胞情報伝達を制御することが知られているガングリオシドが豊富に存在するので、筆者らは当初からこの可能性を推察してきた。事実、Neu3の性状解析が進むにつれて、ガングリオシドの修飾を介して、あるいは、他のシグナル分子と相互作用することにより、これらの調節に与かっている証拠が蓄積してきた。マウスやヒトの神経芽腫細胞で、^{30,31)} また、ラット視床下部ニューロンで神経突起形成や再生に関わっていることが見いだされた。^{32,33)} さらに、Neu3は、神経芽腫細胞でラフトに、HeLa細胞等では、カベオリン-1と結合する形でカベオラに局在することが明らかになった。^{34,35)} また、興味深いことに、ヒト酵素NEU3のトランスジェニックマウスでは18-22週ごろまでにインスリンシグナリングが障害され、インスリン抵抗性糖尿病フェノタイプがみられることがわかった。³⁶⁾ 高インスリン血症、豚ラ氏島の肥大と β -細胞量の増加がインスリン抵抗性とともに見られた。このマウスにおいては対照群に比べて、インスリンレセプターおよびIRS-1のリン酸化の程度が有意に減少しており、PI3-キナーゼやグリコゲン合成酵素の活性が低下していた。骨格筋組織の粗抽出液で、ガングリオシドGM1およびGM2の蓄積がみられ、チロシンリン酸化を受けたNEU3酵素がシグナル分子Grb-2と会合することが観察された。最近では、上皮成長因子受容体EGFRや細胞運動に関わるRac-1とも相互作用し、増殖や運動のシグナリングを制御していることがわかってきた。

Neu4は細胞のアポトーシスや神経細胞の分化に関与している可能性がある。ミトコンドリア移行シグナル配列を持つアイソフォームはアポトーシス関連のガングリオシドGD3レベルを調節することによって、この現象に関与するという一つの根拠が得られている。³⁷⁾ マウス酵素Neu4については、Neu3と反対に、神経突起形成を負の方向へ調節している結果が得られている。³⁸⁾

III. がんにおけるシアリダーゼ異常

ヒト組織で極端に発現が低いNEU2については、いくつかのがん細胞においてもほとんど検出限界以下であった。そこで、NEU1、NEU3、NEU4について、mRNAレベルをがん細胞やがん患者手術摘出標本で調べてみると、大腸がん等ではNEU1

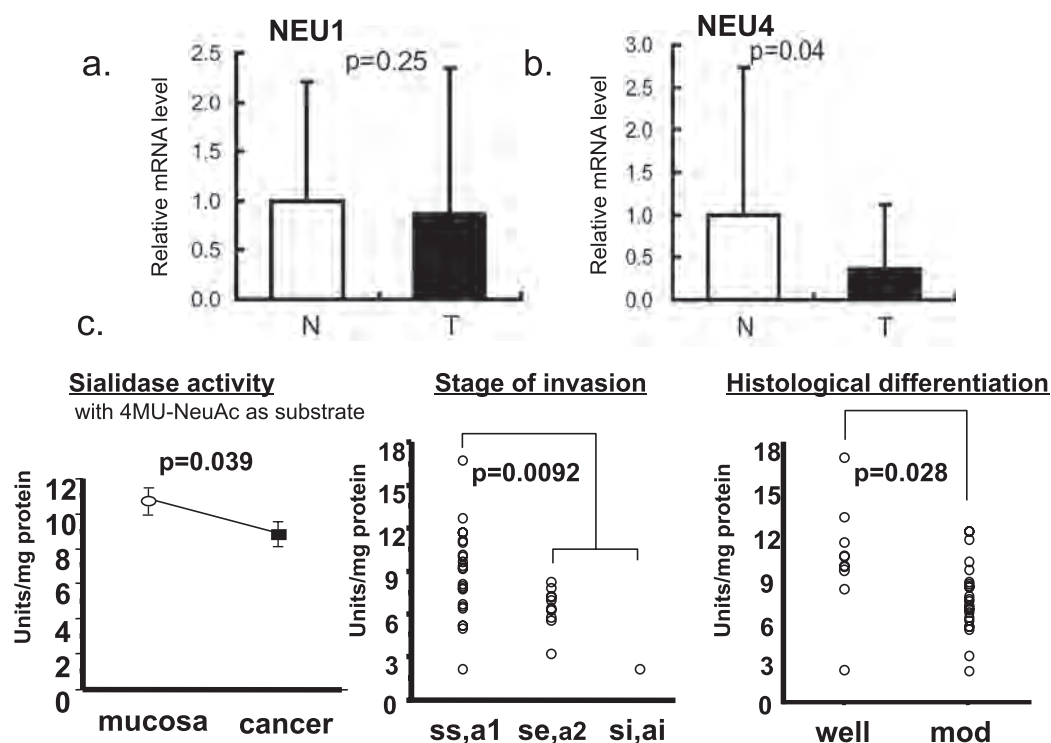


Fig. 3. NEU1 and NEU4 expression in colon cancer. Relative NEU1 (a) and NEU4 (b) mRNA levels in tumor (T) and adjacent non-cancerous (N) tissues evaluated by quantitative real time RT-PCR. The clinico-pathological data (c) related to the sialidase activity levels.

およびNEU4はがんで発現が低下傾向にあった。さらに、両酵素がよく分解する合成基質4-メチルウンベリフェリルシアル酸を用いてシアリダーゼ活性を測定すると、がんの深達度や組織未分化度が増すほど活性低下を示した (Fig. 3)。一方、NEU3は大腸がんを含む多くのがんで亢進していた。NEU1の低下は、がんの転移能を増加させ、足場非依存性増殖を助長するが、NEU3の上昇によって、がん細胞のアポトーシス抑制や運動性や浸潤性亢進など、がんの悪性形質を増強することがわかってきた。以下に、マウスやラット由来のシアリダーゼについての知見についても簡単に触れながら、がんの各種シアリダーゼ異常とその意義について概説したい。

シアリダーゼががんの転移や浸潤とも関わっているらしいことが1960年代から推察されていた。それは細菌由来のシアリダーゼでがん細胞を処理すると、浸潤能等を含む悪性度が変化する現象がみられていたからである。その後、Warrenら³⁹⁾はがん細胞を緩やかなトリプシン処理により遊離した糖ペプチドを調べたところ、対照細胞に比べて分子量のより大きいところに溶出され、これがシ

アリダーゼ処理により消失する現象を見いだした。引き続き、木幡らのグループ⁴⁰⁾やカナダのDennisら⁴¹⁾の精力的な研究の結果、がん細胞の糖タンパクにはN-結合型糖鎖の側鎖分岐が増加すること、これはしばしば、ポリラクタサミン糖鎖の増加によること、そして、その糖鎖非還元末端にはシアル酸が付加していることがこの背景となっていることが明らかとなった。がん細胞のいずれのシアリダーゼがこの現象に関わるかは長い間不明であったが、筆者らは浸潤や転移能がNeu1発現に大きく依存することを見いだした。数種の細胞でNeu1活性が転移能と逆相関することがわかった。例えば、転移能の異なる3種の細胞系、すなわち、悪性転換ラット3Y1繊維芽細胞系、⁴²⁾マウスB16メラノーマ細胞系⁴³⁾およびマウス結腸がんcolon26細胞系⁴⁴⁾を用いて、各種シアリダーゼ活性やmRNAレベルを比較したところ、3者に共通に認められた変化は、高転移性細胞が低転移細胞に比べ、Neu1活性が低いという結果であった。この実験において、シアル酸の付加をつかさどる各種シアリルトランスフェラーゼについても活性レベルを比較したが、細胞株に共通な変化はみられ

ず、シアリダーゼ活性変化が自然転移能や浸潤能に密接に関わっている可能性が推察された。ラット 3Y1 繊維芽細胞にラウス肉腫ウイルスを感染させ、造腫瘍性を獲得させた SR-3Y1 を受容細胞として、v-fos がん遺伝子を導入すると、この fos-SR-3Y1 細胞では肺への自然転移能が上昇し、浸潤能も増強する。総シアル酸量や表層シアル酸量共に、転移能に依存した相違はみられなかったため、この現象は Neu1 活性に主に依存しているものと考えられた。⁴²⁾ 他のリソゾーム酵素活性にはこのよう

な変化は認められず、シアリダーゼにはほぼ特異的であるようであった。そこで、高転移細胞において低発現を示す Neu1 遺伝子を B16 メラノーマ BL6 細胞に導入してその影響を調べたところ、予想通り、肺転移抑制が認められた。⁴³⁾ 細胞の増殖速度や腫瘍の増大速度が低下し、特に、悪性度の指標の一つである足場非依存性増殖 (anchorage independent growth) が低下した。また、マウス colon26 細胞系においては NL17 が最も転移能が高いが、転移能が低い NL4 と比べて、Neu1 の

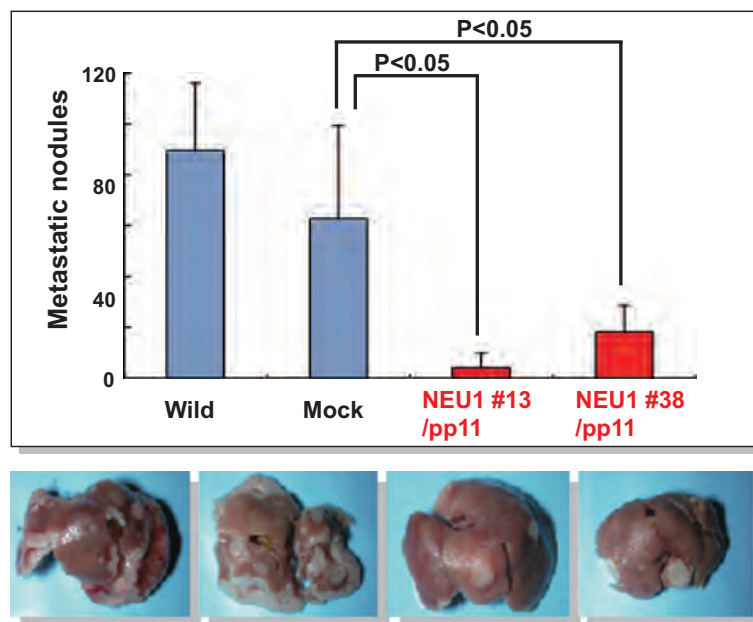


Fig. 4. Suppression of *in vivo* transsplenic liver metastasis of colon cancer by NEU1 overexpression. NEU1 stably transfected HT-29 cells were injected to the spleens of nude mice, and after 7 weeks the nodules in their livers were counted.⁴⁵⁾

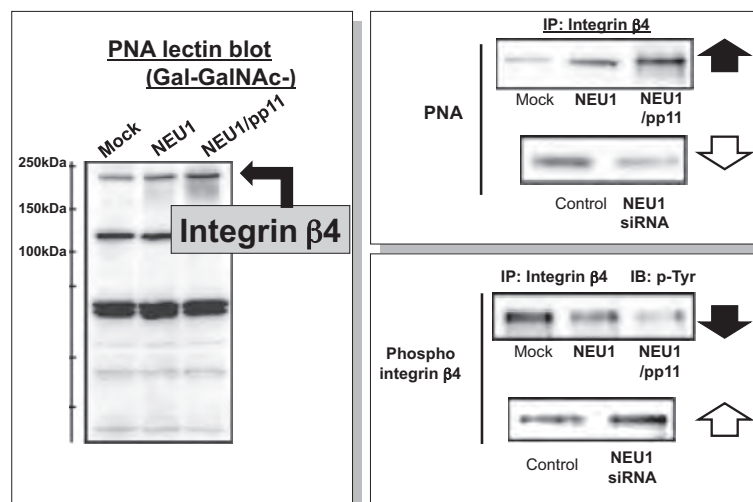


Fig. 5. Elevation of PNA lectin binding and suppression of integrin $\beta 4$ phosphorylation by NEU1 overexpression, and the opposite changes observed by NEU1 silencing. PNA lectin blotting of the cell lysates (the left blot) and immunoprecipitation with anti-integrin $\beta 4$ antibody followed by the lectin blotting and by immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibody (the right blot).⁴⁵⁾

mRNA および活性レベルが著しく低下していた。⁴⁴⁾ また、この現象はヒト酵素 NEU1 においても確認された。NEU1 遺伝子を保護タンパクとともに高転移性大腸がん細胞に導入したところ、NEU1 過剰発現によって運動・浸潤能が低下した。さらに、NEU1 過剰発現 HT29 大腸がん細胞を経脾的に移植すると、肝への転移能が著しく抑制された (Fig. 4)。この現象を導く分子変化の一つとして、接着分子であるインテグリン β 4 の糖鎖シアル酸減少が運動・浸潤能を変化させていることが明らかとなった (Fig. 5)。⁴⁵⁾

Neu2 はがん化で発現低下傾向を示すようである。筆者らはシアリダーゼが転移にいかに関与を与えるかについて調べるため、Neu2 遺伝子のクローン化後、直ちにこの遺伝子を高浸潤・転移能のマウスメラノーマ B16-BL6 細胞に導入した。糖タンパクと糖脂質の両方に働く広い基質特異性を持つ Neu2 によって、悪性形質変化に伴う糖鎖分子の変化を観察するためであった。⁴⁶⁾ この安定発現株を同種マウスの尾静脈から注入すると、著しく肺転移が抑制された。浸潤能や運動能は低下したが、細胞の増殖速度やフィブロネクチンやコラーゲン IV あるいはラミニンへの接着に変化はみられなかった。また、細胞表層や細胞内の糖タンパク糖鎖には影響を与えず、ガングリオシド GM3 の減少やラクトシルセラミドの上昇をもたらしている

という結果が得られた。同じ遺伝子をマウス結腸がん colon26 細胞の高転移細胞 NL17 細胞に導入した場合にも、同様なガングリオシド変化と転移抑制が認められ、その他に、シアリル Le^x レベルが変化していた。⁴⁴⁾ 高転移性の NL17 および NL22 細胞では、低転移性の NL4 および NL44 細胞に比較し、シアリル Le^x および GM3 レベルがはるかに高く、Neu2 導入後の NL17 細胞では、肺転移能、浸潤・細胞運動能の低下とシアリル Le^x および GM3 レベルが低下していた。低転移能を示す細胞の場合と同じ方向へ変化したことを示し、細胞をシアリル Le^x や GM3 に対する抗体で処理することにより、細胞接着や運動性が影響を受けたので、これらの分子の脱シアリル化が転移抑制に関与していることが検証された。

ガングリオシドを優先的に水解する Neu3 はがんの悪性度に深く関わっている。前述のように、細胞のがん化に際して、糖タンパク糖鎖のシアリル化異常が起こるが、糖脂質においてもこの糖鎖異常が Hakomori ら⁴⁷⁾ によって広範に調べられた。より短い糖鎖をもつガングリオシドが増加し、比較的長い糖鎖のガングリオシドが減少するという糖鎖不全現象と、それに伴う前駆体糖脂質の蓄積があり、それに加えて、正常対照細胞にはみられない新しい糖脂質の出現がある。これらの糖脂質はインテグリンや増殖因子レセプター等の機能を

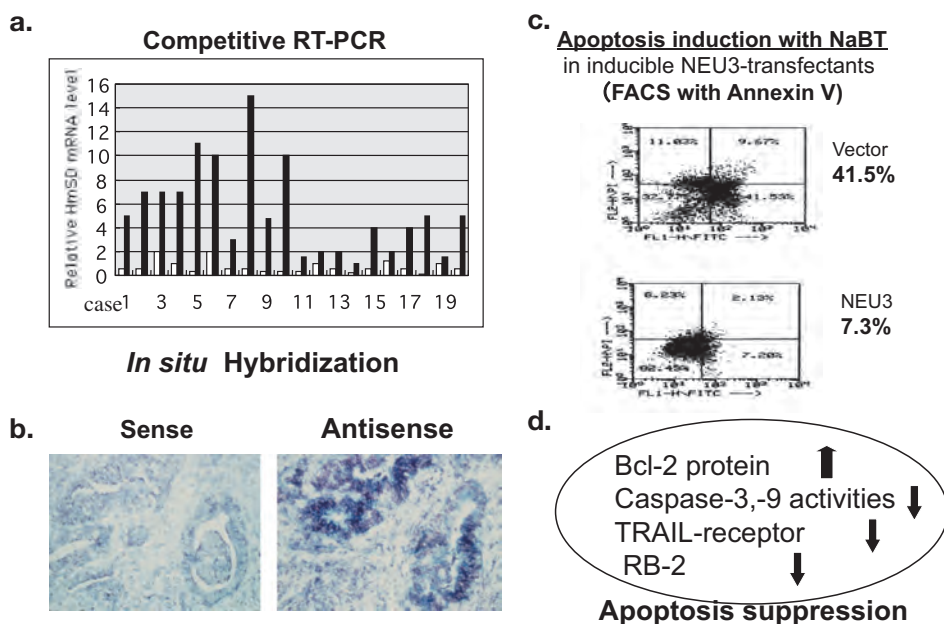


Fig. 6. Increased NEU3 expression and its involvement in apoptosis suppression in colon cancer. NEU3 mRNA level in colon cancers and noncancerous mucosa (closed and open columns, respectively) (a) and in situ hybridization of NEU3 in colon cancer tissues (b). Flowcytometry analysis with annexin V in NEU3-transfected cells after sodium butyrate (NaBT)-induced apoptosis (c). Altered expression of apoptosis-related molecules in NEU3 transfected cells (d).⁵⁰⁾

変化させることによって、がん細胞の増殖、接着、浸潤・転移等に密接に関わるトランスメンブレンシグナリングを修飾している。Neu3 とがん化の関連については、ガングリオシドを水解するシアリダーゼ活性を指標として、この活性がBHK 細胞の悪性転換によって上昇すること、⁴⁸⁾ マウス上皮由来 JB-6 細胞のホルボールエステル TPA による悪性転換時にもこの活性が3-4 倍に上昇すること⁴⁹⁾ 等が観察されていた。遺伝子クローニングの後、筆者らは、ヒト大腸がん組織や複数の大腸がん細胞

胞でヒト酵素 NEU3 発現の異常亢進とその意義を解析した (Fig. 6)。大腸がん患者の手術摘出標本において、がん部と非がん粘膜部の mRNA レベルを RT-PCR で比較すると、がん部においてはほとんど例外なく、3-100 倍に上昇していた⁵⁰⁾。In situ hybridization によってこの発現上昇はがん細胞に起こっていることが確認された。NEU3 異常発現が細胞に与えている影響を解析するため、Ecdyson-誘導系を用いて大腸がん細胞で NEU3 活性を高発現させると、対照細胞に比べて、ブチル

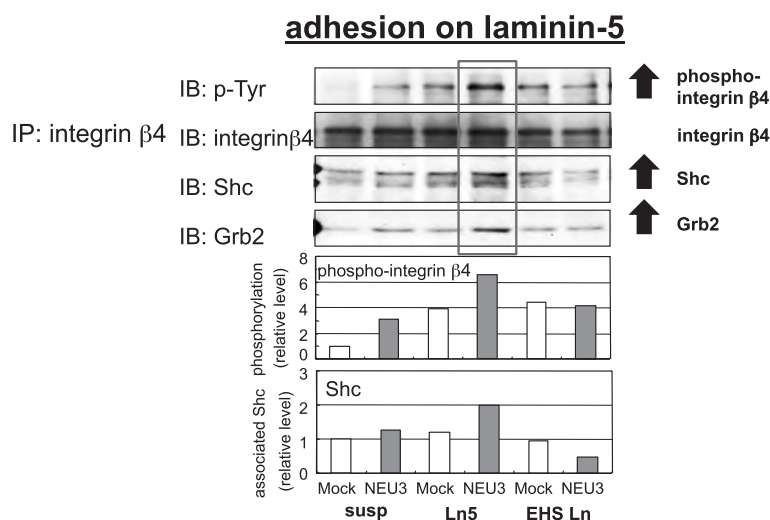


Fig. 7. Increased tyrosine phosphorylation of $\beta 4$ integrin and recruitment of Grb2 and Shc by NEU3 overexpression. Cell lysates were immunoprecipitated with anti- $\beta 4$ integrin antibody and the precipitates were immunoblotted with anti-phosphotyrosine, anti-Shc and anti-Grb2 antibodies.⁵³⁾ Quantitative data for immunoblotting are presented as values relative to those observed in the mock transfectants without adhesion.

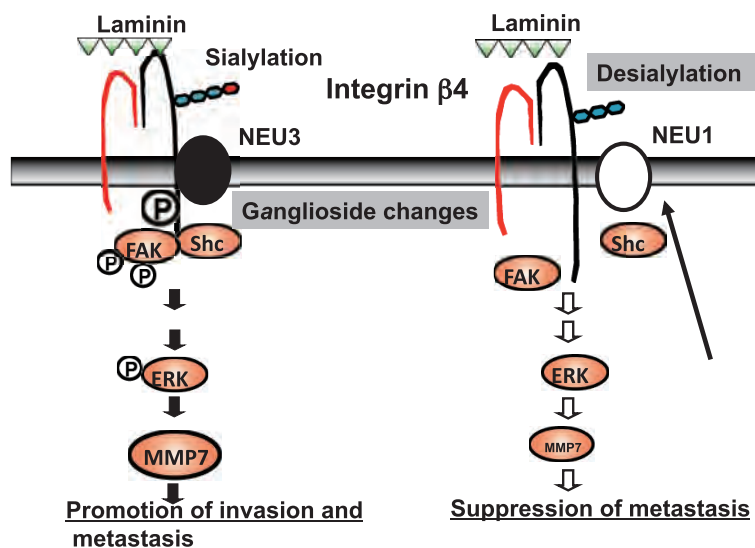


Fig. 8. Opposite roles of two sialidases in integrin $\beta 4$ -mediated signaling on laminin-5. NEU1 inhibits signaling through desialylating the integrin probably at cell surface followed by decreased tyrosine phosphorylation and subsequent attenuation of FAK and ERK1/2 pathway, whereas NEU3 promotes phosphorylation of the integrin with recruitment of Shc and Grb-2 through ganglioside modulation.^{45,53)}

酸で誘導されるアポトーシスが著明に抑制されることがわかった。この細胞では Bcl-2 などのタンパク発現上昇があり、Caspase-3 活性は低下していた。この機構には反応産物ラクトシルセラミド (Lac-cer) の蓄積が関わっているようであった。NEU3 の異常高発現は大腸がんだけでなく、腎細胞がん、⁵¹⁾ 卵巣がん、⁵²⁾ 前立腺がん等にも認められている。この異常亢進ががん細胞の運動性や浸潤性を亢進させていることがわかってきた。大腸がん細胞では、アポトーシスの抑制の他に、細胞外マトリックスとの接着についてもがん細胞に都合の良い環境に導く。すなわち、ラミニン-5 への接着時にはインテグリン $\beta 4$ のリン酸化を亢進させ、FAK や ERK などを活性化し、Grb-2 や Shc がリクルートされるが、ラミニン-1 のみを含む EHS-ラミニンやフィブロネクチンへの接着時には、逆にこのシグナル経路を低下させた (Fig. 7)。この現象には、NEU3 の良い基質である GM3 レベルの低下が関わっているようであった。⁵³⁾ 前述のように、図らずも細胞内でインテグリン $\beta 4$ が NEU1 では脱シアリル化によりリン酸化の抑制を受け、NEU3 ではガングリオシド基質の修飾により、活性化を受けることが明らかとなった (Fig. 8)。また、腎がん細胞 ACHN では、NEU3 が STAT3 の活性化よりは、主に PI3K/Akt 経路を活性化し、転移能などの悪性を促す IL-6 シグナリングを活

性化させていること、PI3K/Rho 活性化を介して運動・浸潤能の亢進をもたらすこともわかった。⁵¹⁾ ここでもラクトシルセラミドの蓄積があり、これが一因となっていることが推察された。高発現した NEU3 がガングリオシドの修飾を介して、アポトーシスシグナリングを攪乱していることを推察させる。一方、NEU3 を siRNA でノックダウンすると、運動・浸潤能の低下が起こるだけでなく、増殖因子レセプター等のチロシンリン酸化を低下させ、がん細胞のアポトーシスが誘導された (Fig. 9)。⁵⁴⁾ 興味深いことに、正常細胞ではノックダウンによってアポトーシスは誘導されなかった。また、これらの現象の標的分子を検索すると、NEU3 ががん細胞の Ras 活性を上昇させ、ERK1/2 等の活性化を介してがん細胞をアポトーシスに導き、逆に siRNA を導入すると、Ras の活性化を阻害し、がん細胞が特別の刺激もなく自ら細胞死に陥ることを見いだした。標的分子の一つとして、EGFR のリン酸化が NEU3 によって制御されていることが検証された (Fig. 10)。これらの結果は NEU3 ががん細胞の生死を制御する重要な分子であることを示している。この現象は *in vivo* でも観察され、NEU3 が大腸がんの発がん過程にも関与している可能性が出てきた。NEU3 トランスジェニックマウスに発がん剤アゾキシメタンを投与し、大腸粘膜に形成される aberrant crypt foci (ACF) 数を対

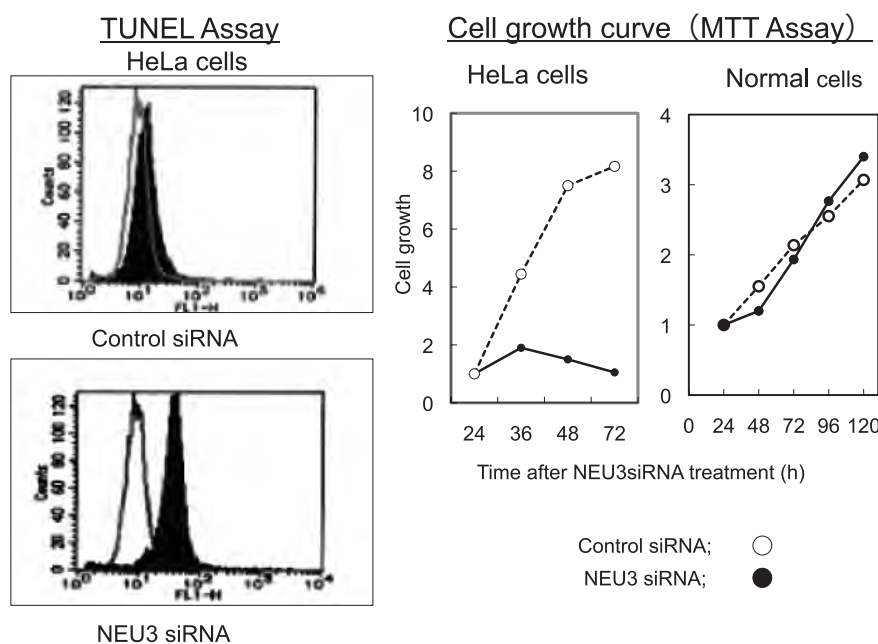


Fig. 9. Induction of apoptosis by siRNA-mediated NEU3 silencing in carcinoma cells but not in normal cells. After transfection of NEU3 siRNA or non-specific control siRNA, TUNEL assay and MTT assay were performed in HeLa cells and noncancerous keratinocytes.⁵⁴⁾

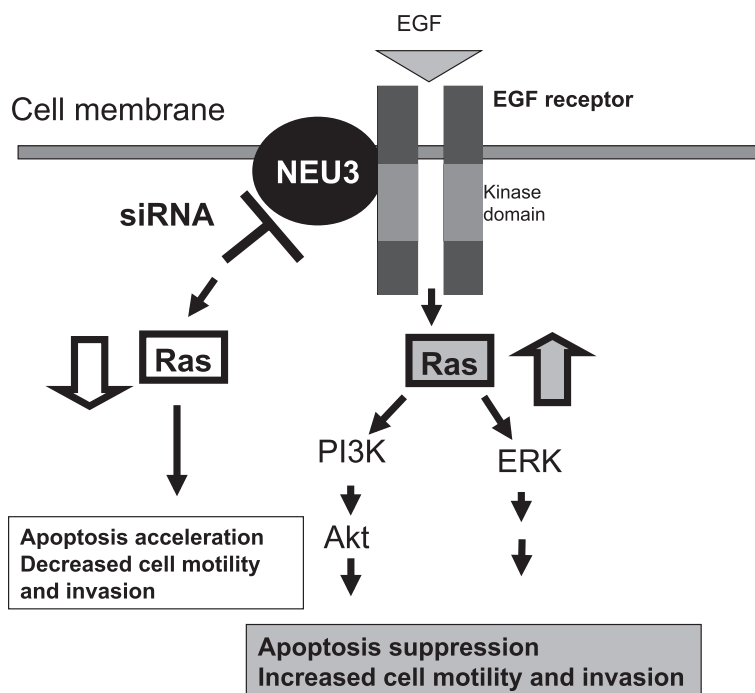


Fig. 10. A possible mechanism of apoptosis regulation by NEU3 in cancer cells. NEU3 overexpression suppresses and its silencing accelerates apoptosis of cancer cells through modulation of EGF receptor phosphorylation and Ras activation.

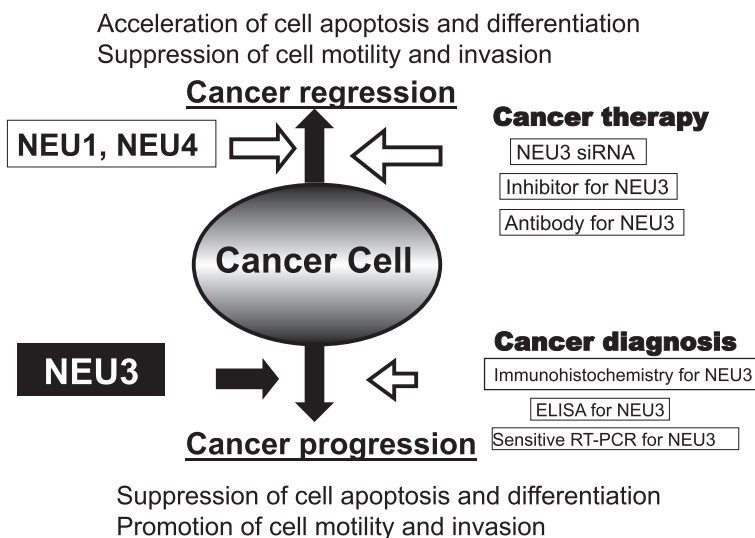


Fig. 11. Functional relationship of three sialidases in human cancer cells and a possible role of NEU3 as a potential target for cancer diagnosis and therapy.

照マウスと比較したところ、その発生率が有意に高いことがわかった。そこではアポトーシス抑制が起こっており、EGFR シグナリングの亢進も認められた。⁵⁵⁾ これらの結果は、siRNA や特異抗体等の採用によって、人工的に NEU3 を発現低下させ、選択的に、しかも副作用が低いがん治療薬として、がん臨床へ応用できる可能性を示している (Fig. 11).

NEU4 は、がんにおいては浸潤・転移性に関与するようである。大腸がん組織で mRNA レベルを調べると、NEU3 の場合とは逆に、非がん粘膜部と比べて有意に低下していた。⁵⁶⁾ 組織の分化の程度や病理のステージとの関連性に有意差はないが、T/NT 比に関しては v0 と v1-3 の間で、p 値が 0.025 であった。大腸がん細胞で NEU4 を高発現すると、浸潤・転移能は抑制され、ノックダウンす

ると逆に促進がみられた。大腸粘膜は、高発現が認められる脳、肝についてNEU4に富んでいる。このシアリダーゼがシアリル-Le^xやシアリル-Le^a等の糖鎖抗原をよく水解することから、ムチン機能を制御し、消化管や肺の粘膜細胞の維持に重要な役割を果たしている可能性がある。これらのシアリルルイス抗原が上昇している大腸がんでは、NEU4低下による粘膜機能の破綻ががん細胞の悪性形質発現に密接に関連しているのかもしれない。

おわりに

動物シアリダーゼの研究の展開によって、シアリダーゼの機能ががんにおける変異の意義の解析が可能となり、生体内における生理的・病理的シアル酸変化の実体が次第に明らかになりつつある。しかしながら、これらのシアリダーゼの活性や発現の制御機構を含む多くの課題が今後さらに解析される必要がある。

筆者らは、特に、がんの形質に深く関わっているシアル酸異常の機構解明を目的に、シアリダーゼの解析を行ってきた。予想を超えて、シアリダーゼは各種がんで異常を示し、その結果、増殖や細胞死、あるいは接着や運動のシグナリングを破綻させ、がんの進展を規定する重要な因子となっていることが分かってきた。特に、多くのがんで異常亢進している形質膜局在型シアリダーゼNEU3は、診断や治療の新規標的分子と期待される。各分野の研究者との共同研究を進めることにより、その特異的阻害剤やsiRNA、特異抗体の利用によって、新規がん治療薬の開発へとつなげることが筆者らの責務であると考えている。

謝辞 本研究は、宮城県立がんセンターの研究所生化学部における共同研究者および病院臨床科医師との共同研究によって進められたものです。ここに心から感謝の意を表したいと思います。

REFERENCES

- 1) Warren L., Spearing C. W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 489–492 (1960).
- 2) Miyagi T., Tsuiki S., *Eur. J. Biochem.*, **141**, 75–81 (1984).
- 3) Miyagi T., Tsuiki S., *J. Biol. Chem.*, **260**, 6710–6716 (1985).
- 4) Miyagi T., Sagawa J., Konno K., Handa S., Tsuiki S., *J. Biochem.*, **107**, 787–793 (1990).
- 5) Miyagi T., *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, **84**, 407–418 (2008).
- 6) Miyagi T., Konno K., Emori Y., Kawasaki H., Suzuki K., Yasui A., Tsuiki S., *J. Biol. Chem.*, **268**, 26435–26440 (1993).
- 7) Bonten E., van der Spoel A., Fornerod M., Grosveld G., D'Azoo A., *Genes Dev.*, **10**, 3156–3169 (1996).
- 8) Milner C. M., Smith S. V., Carrillo M. B., Taylor G. L., Hollinshead M., Campbell R. D., *J. Biol. Chem.*, **272**, 4549–4558 (1997).
- 9) Pshezhetsky A. V., Richard C., Michaud L., Igdoura S., Wang S., Elsliger M.-A., Qu J., Leclerc D., Gravel R., Dallaire L., Potier M., *Nat. Genet.*, **15**, 316–320 (1997).
- 10) Miyagi T., Wada T., Iwamatsu A., Hata K., Yoshikawa Y., Tokuyama S., Sawada M., *J. Biol. Chem.*, **274**, 5004–5011 (1999).
- 11) Comelli E. M., Amado M., Lustig S. R., Paulson J. C., *Gene*, **321**, 155–161 (2003).
- 12) Monti E., Bassi M. T., Bresciani R., Civini S., Croci G. L., Papini N., Riboni M., Zanchetti G., Ballabio A., Preti A., Tettamanti G., Venerando B., and Borsani G., *Genomics*, **83**, 445–453 (2004).
- 13) Seyrantepe V., Landry K., Trudel S., Hassan J. A., Morales C. R., Pshezhetsky A. V., *J. Biol. Chem.*, **279**, 37021–37029 (2004).
- 14) Yamaguchi K., Hata K., Koseki K., Shiozaki K., Akita H., Wada T., Moriya S., Miyagi T., *Biochem. J.*, **390**, 85–93 (2005).
- 15) D'Azzo A., Hoogeveen A., Reuser A. J., Robinson D., and Galjaard H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 4535–4539 (1982).
- 16) Chavas L. M., Tringali C., Fusi P., Venerando B., Tettamanti G., Kato R., Monti E., Wakatsuki S., *J. Biol. Chem.*, **280**, 469–475 (2005).
- 17) Lukong K. E., Seyrantepe V., Landry K., Trudel S., Ahmad A., Gahl W. A., Lefrancois S., Morales C. R., Pshezhetsky A. V., *J. Biol. Chem.*, **276**, 46172–46181 (2001).
- 18) Liang F., Seyrantepe V., Landry K., Ahmad R., Ahmad A., Stamatou N. M., Pshezhetsky A. V., *J. Biol. Chem.*, **281**, 27526–27538 (2006).
- 19) Yamaguchi K., Hata K., Wada T., Moriya S., Miyagi

- T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **346**, 484–490 (2006).
- 20) Wang J., Wu G., Miyagi T., Lu Z. H., and Ledden R. W., *J. Neurochem.*, **111**, 547–554 (2009).
- 21) Hata K., Koseki K., Yamaguchi K., Moriya S., Suzuki Y., Yingsakmongkon S., Hirai G., Sodeoka M., von Itzstein M., Miyagi T., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 3484–3491 (2008).
- 22) Liang F., Seyrantepe V., Landry K., Ahmad R., Ahmad A., Stamatou N. M., Pshezhetsky A. V., *J. Biol. Chem.*, **281**, 27526–27538 (2006).
- 23) Seyrantepe V., Iannello A., Liang F., Kanshin E., Jayanth P., Samarani S., Szewczuk M. R., Ahmad A., Pshezhetsky A. V., *J. Biol. Chem.*, **285**, 206–215 (2010).
- 24) Hinek A., Pshezhetsky A. V., von Itzstein M., Starcher B., *J. Biol. Chem.*, **281**, 3698–3710 (2006).
- 25) Arabkhari M., Bunda S., Wang Y., Wang A., Pshezhetsky A. V., Hinek A., *Glycobiology*, **20**, 603–616 (2010).
- 26) Sato K., Miyagi T., *Glycobiology*, **5**, 511–516 (1995).
- 27) Fanzani A., Giuliani R., Colombo F., Zizioli D., Presta M., Preti A., Marchesini S., *FEBS Lett.*, **547**, 183–188 (2003).
- 28) Fanzani A., Colombo F., Giuliani R., Preti A., Marchesini S., *FEBS Lett.*, **566**, 178–182 (2004).
- 29) Miyagi T., Wada T., Yamaguchi K., Hata K., Shiozaki K., *J. Biochem.*, **144**, 279–285 (2008).
- 30) Hasegawa T., Yamaguchi K., Wada T., Takeda A., Itoyama Y., Miyagi T., *J. Biol. Chem.*, **275**, 8007–8015 (2000).
- 31) Proshin S., Yamaguchi K., Wada T., Miyagi T., *Neurochem. Res.*, **27**, 841–846 (2002).
- 32) Rodriguez J. A., Piddini E., Hasegawa T., Miyagi T., Dotti C. G., *J. Neurosci.*, **21**, 8387–8395 (2001).
- 33) Da Silva J. S., Hasegawa T., Miyagi T., Dotti C. G., Avad-Rodriguez J., *Nat. Neurosci.*, **8**, 606–615 (2005).
- 34) Kalka D., von Reitzenstein C., Kopitz J., Cantz M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 989–993 (2001).
- 35) Wang Y., Yamaguchi K., Wada T., Hata K., Zhao X., Fujimoto T., Miyagi T., *J. Biol. Chem.*, **277**, 26252–26259 (2002).
- 36) Sasaki A., Hata K., Suzuki S., Sawada M., Wada T., Tateno Obinata M., Suzuki Y., Miyagi T., *J. Biol. Chem.*, **278**, 27896–27902 (2003).
- 37) Hasegawa T., Sugeno N., Takeda A., Matsuzaki-Kobayashi M., Kikuchi A., Furukawa K., Miyagi T., Itoyama Y., *FEBS Lett.*, **581**, 406–412 (2007).
- 38) Shiozaki K., Koseki K., Yamaguchi K., Shiozaki M., Narimatsu H., Miyagi T., *J. Biol. Chem.*, **284**, 21157–21164 (2009).
- 39) Warren L., Buck C. A., Tuszynski G. P., *Biochim. Biophys. Acta.*, **516**, 97–127 (1978).
- 40) Kobata A., Amano J., *Immunol. Cell Biol.*, **83**, 429–439 (2005).
- 41) Dennis J. W., Granovsky M., Warren C. E., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1473**, 21–34 (1999).
- 42) Miyagi T., Sato K., Hata K., Taniguchi S., *FEBS Lett.*, **349**, 255–259 (1994).
- 43) Kato T., Wang Y., Yamaguchi K., Milner C. M., Shineha R., Satomi S., Miyagi T., *Int. J. Cancer*, **92**, 797–804 (2001).
- 44) Sawada M., Moriya S., Saito S., Shineha R., Satomi S., Yamori T., Tsuruo T., Kannagi R., Miyagi T., *Int. J. Cancer*, **97**, 180–185 (2002).
- 45) Uemura T., Shiozaki K., Yamaguchi K., Miyazaki S., Satomi S., Kato K., Sakuraba H., Miyagi T., *Oncogene*, **28**, 1218–1229 (2009).
- 46) Tokuyama S., Moriya S., Taniguchi S., Yasui A., Miyazaki J., Orikasa S., Miyagi T., *Int. J. Cancer*, **73**, 410–415 (1997).
- 47) Hakomori S., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1780**, 325–346 (2008).
- 48) Schengrund C. L., Lausch R. N., Rosenberg A., *J. Biol. Chem.*, **248**, 4424–4428 (1973).
- 49) Miyagi T., Sagawa J., Kuroki T., Matsuya Y., Tsuike S., *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 1286–1292 (1990).
- 50) Kakugawa Y., Wada T., Yamaguchi K., Yamanami H., Ouchi K., Sato I., Miyagi T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 10718–10723 (2002).
- 51) Ueno S., Saito S., Wada T., Yamaguchi K., Satoh M., Arai Y., Miyagi T., *J. Biol. Chem.*, **281**, 7756–7764 (2006).
- 52) Nomura H., Tamada Y., Miyagi T., Suzuki A., Taira M., Suzuki N., Susumu N., Irimura T., Aoki D., *Oncol. Res.*, **16**, 289–297 (2006).
- 53) Kato K., Shiga K., Yamaguchi K., Hata K., Kobayashi T., Miyazaki K., Saijo S., Miyagi T., *Biochem. J.*, **394**, 647–656 (2006).

-
- 54) Wada T., Hata K., Yamaguchi K., Shiozaki K., Koseki K., Moriya S., Miyagi T., *Oncogene*, **26**, 2483–2490 (2007).
- 55) Shiozaki K., Yamaguchi K., Sato I., Miyagi T., *Cancer Sci.*, **100**, 588–594 (2009).
- 56) Yamanami H., Shiozaki K., Wada T., Yamaguchi K., Uemura T., Kakugawa Y., Hujiya T., Miyagi T., *Cancer Sci.*, **98**, 299–307 (2007).