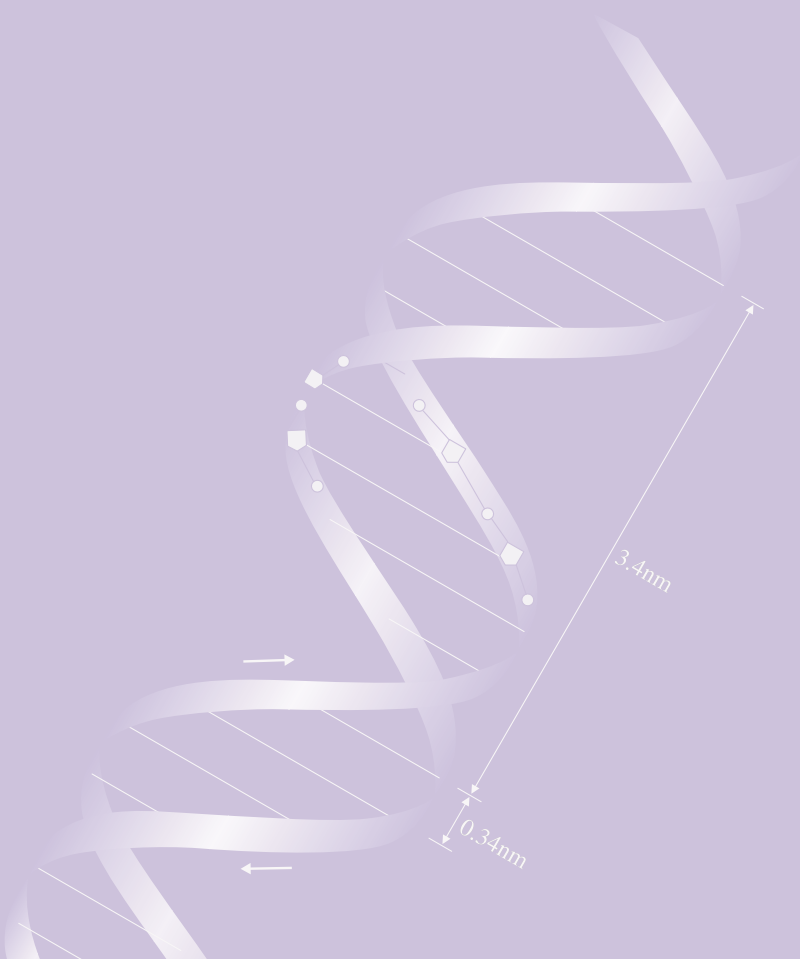


プロジェクト 1

平成12年～平成16年 文部科学省私立大学学術研究高度化推進事業
バイオベンチャー研究開発拠点整備事業研究成果報告書

糖鎖シグナルと生体防御

平成17年4月 京都産業大学



バイオ・ベンチャー プロジェクト1
「糖鎖シグナルと生体防御」

平成12年度～平成16年度私立大学学術研究高度化推進事業
「バイオ・ベンチャー研究開発拠点整備事業」研究成果報告書

平成17年4月

学校法人 京都産業大学

京都産業大学

工学研究科（生物系）

中田 博（京都産業大学工学部教授）

【 目 次 】

◇ 研究成果報告書の発刊にあたって	1
◇ 研究組織	2
◇ 研究成果概要	
研究成果要約	3
研究活動状況	35
◇ 学術論文・著書・総説など	47
◇ 外部評価	297

研究成果報告書の発刊にあたって

京都産業大学工学部生物工学科教授
バイオベンチャープロジェクト代表 中田 博

文部科学省私立大学学術研究高度化推進事業のバイオ・ベンチャー開発拠点整備事業「バイオ・ベンチャープロジェクト」に採択され、「糖鎖シグナルと生体防御」及び「高等植物のオルガネラゲノム工学」の2つのテーマで研究を進めてきました。最終年度にあたり、それぞれのテーマで報告書を提出する運びとなりました。21世紀はライフサイエンスの時代と言われています。本分野においては、ヒトゲノムの解析が終了し、予防医学やテーラーメイド医療に大きな進展を見ました。その反面、新たな課題がクローズアップされ、ポストゲノム研究という形で糖鎖の研究は最重要課題の1つとなってきました。本学の「糖鎖シグナルと生体防御」の研究は、時代に先駆けてその問題に着手したことになり、時機を得たものでありました。

我々は、遺伝子レベルで得られた知見を背景として、あるいはその技術を利用し、あくまで生物学的現象を分子レベルでとらえるという試みを繰り返してきました。その結果、担癌状態における免疫抑制機構、癌転移における原因分子の同定と分子メカニズムの解析、及び肺癌や喫煙時のマクロファージを中心とした解析において、極めてオリジナリティーの高い特筆すべき結果を得ることが出来ました。さらに、このような分子メカニズムの解析の延長線上に、応用として免疫抑制剤や抗腫瘍剤の開発などで2件の特許申請がなされたことも大きな成果としてあげられます。糖鎖生物学は今後ともポストゲノムの中心課題として発展していくことが期待されています。この5年間で得られた成果を基礎として、糖鎖研究の拠点を形成し、さらなる発展を期す所存であります。

研究組織

京都産業大学工学部生物工学科・教授
(プロジェクト1 代表) 中田 博

京都産業大学工学部生物工学科・教授 岡山 實

京都産業大学工学部生物工学科・教授 竹内 実

共同研究者

愛知医科大学分子医科学研究所・所長 木全弘治

水谷糖質科学振興財団・事務局長 吉田圭一

愛知がんセンター研究所
第一病理学教室・室長 中西速夫

京都府立医科大学血管系老化センター
病態病理学部門・教授 伏木信次

関西医科大学第一生理学教室・講師 山本章嗣

京都府立医科大学微生物学教室・助教授 松田 修

鹿児島大学医学部公衆衛生学教室・教授 竹内 亨

(株)協和エンジニアリング・主任研究員 清水要志夫

1) 研究成果要旨

〈岡山〉

「糖鎖シグナルと生体防御」の研究プロジェクト実施期間中に、岡山らは、マウス・ルイス肺癌由来の転移能の異なるいくつかのクローン性株細胞を樹立し、それを用いて、シンデカン-2（以下SN2と省略）の発現量と転移能との間に逆相関の存在することを明らかにし、その背後に、（1）SN2が、血管新生制御能を持つこと、（2）SN2がインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ との協調下でアクチン細胞骨格形成制御に関与していること、及び（3）SN2とマトリックス・メタロプロテアーゼ（MMP）-2活性化受容体（MT1-MMP/TIMP複合体分子）との間でproMMP-2の競合的奪い合いを介したMMP-2（癌転移への直接的関与が示されている）活性化制御能を持つことを明らかにした。更には、新規物質硫酸化ジェランが強い転移抑制活性を示すことを発見し（特許申請中：出願番号：特がん2004-244405）、抗転移剤としての臨床的応用の可能性を示した。

〈中田〉

1) 上皮性癌細胞の産生するムチンの生物学的意義について；上皮性癌細胞の産生するムチンと免疫系細胞との相互作用を解析し、癌組織におけるムチンの生物学的意義について明らかにしてきた。ムチンに結合しうる免疫系細胞上の受容体を検索した結果、単球/マクロファージ上のスカベンジャーリセプター（SCR）や種々の免疫系細胞上のシグレックファミリー（シグレック 2, 3, 7）についてムチンと結合しうることがわかった。SCRを介した系では、ムチンの結合によりシクロオキシゲナーゼ2が誘導され、PGE2の産生が亢進した。PGE2により免疫系のバランスがTh2に偏ること、血管新生因子の産生亢進などを通して、癌細胞の増殖・進展に有利な環境を整えていることがわかった。シグレックについても、B細胞のシグナル伝達の抑制やNK細胞の細胞障害活性のムチンによる抑制などが明らかになった。

2) マウス脳に存在するシンデカン-3の生物学的意義について；マウス胎児における癌胎児性糖鎖抗原の発現を検討する過程で、脳特異的にTn抗原が発現することを見いだした。コアタンパク質はシンデカン-3であることを示すとともに、ニューロカンと結合することを見いだした。また、この相互作用は小脳顆粒細胞の神経突起の形成に関与することを見いだした。

〈竹内〉

喫煙による肺泡マクロファージの免疫機能、遺伝子損傷、ガン細胞の肺転移への影響とその機構についてマウスに一定量、一定期間シガレットタバコ主流煙を曝露し検討した。喫煙により、肺泡マクロファージの抗原提示機能の低下、LPSによるB細胞増殖反応の低下が認められ、その低下機構には喫煙により産生増強された活性酸素により抗原提示に関与した肺泡マクロファージのクラスII、B7-1とLPSに対するCD14などの細胞表面抗原発現、またIL-1 β 、TNA- α のmRNA発現が抑制されたことが示された。さらに、これらの発現低下は、肺泡マクロファージのDNA損傷による可能性が示唆された。また、肺転移に関しては、喫煙マウスで肺転移が促進され、肺毛細血管にICAM-1の発現が認められた結果より、ガン細胞が毛細血管壁に接着し易くなり肺転移が促進された可能性が示唆された。これらの成績より、喫煙により肺の免疫機能は低下し、特に肺泡マクロファージを介したB細胞反応系が強く抑制されていたことから、喫煙により肺感染が起り易い状況が引き起こされていると考えられる。

2) 評価

本プロジェクトは糖鎖生物学と癌免疫学の第一線の研究者をそろえ、多角的視野からプロジェクトを推進できる優れた組織体制が組まれている。研究内容は癌の進展における糖鎖の役割の研究に焦点が良く絞られている。研究成果のうち、岡山らによるヘパラン硫酸シンデカン-2の癌転移抑制作用は画期的な発見である。岡山らはさらに微生物や海藻由来の多糖であるジェランを化学的に硫酸化したものに転移抑制作用があることを見いだしており、臨床応用が十分に期待できる。中田らは癌細胞の産生するムチンが単球・マクロファージのスカベンジャーリセプターに結合し、COX2およびPGE2の産生を誘導することにより癌細胞の増殖・進展を促進することを見いだした。癌細胞の産生するムチンはシグレックとも結合し免疫抑制を惹起することを見いだした。これらの研究は今後がんの診断・治療への応用が期待できる。竹内らは喫煙が発癌のみならず癌の肺転移にも密接に関与することを解明しており、転移防止に役立つ発見と考えられる。総じて、研究期間内に臨床応用可能な有意義なシーズが多数得られており、これらの成果はバイオベンチャー開発拠点の整備事業として高く評価できる。

【プロジェクト1】「糖鎖シグナルと生体防御」 外部評価（2）

1) 研究成果要旨

〈岡山〉

「糖鎖シグナルと生体防御」の研究プロジェクト実施期間中に、岡山らは、マウス・ルイス肺癌由来の転移能の異なるいくつかのクローン性株細胞を樹立し、それを用いて、シンデカン-2（ヘパラン硫酸糖鎖を持つプロテオグリカン）の発現量と転移能との間に逆相関の存在することを明らかにし、その背後に、(1) シンデカン-2が、血管新生制御能を持つこと、(2) シンデカン-2がインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ との協調下でアクチン細胞骨格形成制御に関与していること、及び(3) シンデカン-2とマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)-2活性化受容体(MT1-MMP/TIMP 複合体分子)との間で proMMP-2 の競合的奪い合いを介した MMP-2 (癌転移への直接的関与が示されている) 活性化制御能を持つことを示し、これらの実験系における糖鎖シグナルの役割を明らかにした。更には、新規物質のヘパラン硫酸糖鎖ミメティクスである硫酸化ジェランが強い癌転移抑制活性を示すことを発見し(特許申請中: 出願番号: 特がん 2004-244405)、抗癌転移剤としての臨床的応用の可能性を示した。

〈中田〉

1) 上皮性癌細胞の産生するムチン(糖タンパク質)の生物学的意義について; 上皮性癌細胞の産生するムチンと免疫系細胞との相互作用を解析し、癌組織におけるムチンを介した糖鎖シグナルの生物学的意義について明らかにした。ムチンに結合しうる免疫系細胞上の受容体を検索した結果、単球/マクロファージ上のスカベンジャーリセプター(SCR)や種々の免疫系細胞上の糖鎖結合タンパクであるシグレックファミリー(シグレック 2, 3, 7)についてムチンと結合しうる事がわかった。SCRを介した系では、ムチンの結合によりシクロオキシゲナーゼ2が誘導され、プロスタグランジン E_2 の産生が亢進した。プロスタグランジン E_2 により免疫系のバランスが Th2 に偏ること、血管新生因子の産生亢進などを通して、癌細胞の増殖・進展に有利な環境を整えていることがわかった。シグレックについても、B細胞のシグナル伝達の抑制やNK細胞の細胞障害活性のムチンを介した糖鎖シグナルによる抑制などが明らかになった。

2) マウス脳に存在するシンデカン-3の生物学的意義について; マウス胎児における癌胎児性糖鎖抗原の発現を検討する過程で、脳特異的に Tn 抗原が発現することを見いだした。コアタンパク質はシンデカン-3であることを示すとともに、ニューロカンと結合することも見いだした。また、この糖鎖シグナルを介した分子間相互作用は小脳顆粒細胞の神経突起の形成に関与することを見いだした。

〈竹内〉

喫煙による肺マクロファージの免疫機能低下、遺伝子損傷、癌細胞の肺転移への影響とその機構についてマウスに一定量、一定期間シガレットタバコ主流煙を曝露し検討した。喫煙により、肺マクロファージの抗原提示機能の低下、LPSによるB細胞増殖反応の低下が認められ、その低下機構には喫煙により産生増強された活性酸素により抗原提示に関与した肺マクロファージのクラスII、B7-1とLPSに対するCD14などの細胞表面抗原発現低下、またIL-1 β 、TNA- α のmRNA発現が抑制されたことが示された。さらに、これらの発現低下は、肺マクロファージのDNA損傷による可能性が示唆された。また、肺への癌転移に関しては、喫煙マウスで肺への癌転移が促進され、肺毛細血管にICAM-1の発現が認められた結果より、癌細胞が毛細血管壁に接着し易くなり肺への転移が促進された可能性が示唆された。これらの成績から、喫煙により肺の免疫機能は低下し、特に肺マクロファージを介したB細胞反応系が強く抑制され、肺感染が起こり易い状況が引き起こされていると考えられる。

2) 評価

本プログラム、「糖鎖シグナルと生体防御」、はタンパク質、核酸とともに第三の生命の鎖とされている糖鎖の生命現象における意義を解明し、「生体防御」という基礎医学的観点からその具体的医学応用の方向を探索することを目指したものである。本プログラムは、ヒトゲノムが事実上完全に解明された現在、タンパク質、遺伝子、糖鎖の生物学的機能の詳細を基盤に生命現象を研究する21世紀初頭の「ポストゲノム」研究の最先端に位置づけることができる生命科学分野であると言えよう。また糖鎖の持つ分子シグナルを臨床医学で重要な課題である発癌メカニズム、免疫機構といった生体防御機構の解析に結びつける研究方向性も意義が大きい。本研究プログラムを中心に遂行した、岡山、中田、竹内らはそれぞれプロテオグリカン、ムチン型糖鎖、肺癌発生過程におけるマクロファージの役割に関する研究分野で多くの業績を持ち世界的に認められた研究者であったが、プログラム期間中にはさらに学外の共同研究者とも活発な研究情報交換や共同研究がなされ、プログラムの遂行にとまらず、将来に継続できる共同研究の基盤が形成されたと考えられ

る。期間中に各研究者はそれぞれ計画された研究課題にそった着実な研究業績をあげ、その要旨は上記項目(1)に示した。この間(平成15年5月現在の中間報告までにおいて)国際誌に発表した英文原著論文数14報をはじめとして、著書7編、学会発表54報等があり、平成14年度には同表題の公開セミナーも開催するなど活発な研究活動を展開した。特に意義の大きい発見として評価できるのは、(岡山ら)(1)シンデカン-2の発現と癌転移能との間には逆相関があることを示し、その背後にシンデカン-2が、(a)血管新生制御能、及び、(b)癌転移への直接的関与が示されているMMP-2の活性化制御能を有することが深く関連していることを示した点。更には、MMP-2活性化制御へのシンデカン-2へパラン硫酸糖鎖の関与の機構として、MMP-2の活性化受容体(細胞膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-1:MT1-MMPとTIMPとの複合体分子)とシンデカン-2のへパラン硫酸糖鎖との間におけるproMMP-2の奪い合いの機構を新しい機構として提唱した点。(2)新規物質硫酸化ジェランによる癌転移抑制にも成功した点であろう。本物質は微生物や海藻由来の多糖、ジェラン、を化学合成反応で硫酸化したもので、生体に対して毒性を持たず、動物臓器由来でないためウイルスやプリオン等の混入の危険性が無く、又、安価で大量製造が可能である等、臨床医学応用に適した物質であることが提唱された。(中田ら)(1)単球/マクロファージ上のスカベンジャーリセプターにムチンが結合することを示し、この糖鎖シグナルを介して(2)同細胞でシクロオキシゲナーゼ2の誘導、プロスタグランジンE₂の産生が亢進することを示した。さらに糖鎖シグナルは(3)プロスタグランジンE₂の血管新生の誘導やTh2バランスへの偏りなどを通して、癌細胞の増殖・進展に有利な環境をつくることを示した。また、(4)実際の担癌患者の血清中のムチンでも、末梢血単球を活性化することを示した。(5)シグレック2,3,7などがムチンに結合し、その糖鎖シグナルが免疫抑制にかかわることを見いだした。(6)マウス胎児期脳に発現しているシンデカン-3にTn抗原が発現していることを見いだした。(7)シンデカン-3はへパラン硫酸糖鎖を介してニューロカンに結合することを見だし、ニューロカンではC末側のEGF様ドメインが結合に必須であることがわかった。(8)シンデカン-3を介した糖鎖シグナルはニューロカンとの分子間相互作用を通じて小脳顆粒細胞の神経突起形成に関与していることがわかった。(竹内ら)肺泡マクロファージの免疫機能は、喫煙により生じた活性酸素により肺組織、肺泡マクロファージのDNA損傷が引き起こされた結果、機能低下となり、さらに染色体、遺伝子の異常が引き起こされ、肺癌の発生、癌細胞の肺転移にこれら要因が密接に関係していることが見出された。喫煙による免疫機能の低下、活性酸素の増加、DNA損傷、染色体異常と肺癌の発生、癌細胞の肺転移に関しての系統だった研究はこれまでほとんど行われておらず、その意味でも意義ある発見であった。また竹内の確立した喫煙を介した肺泡マクロファージの免疫機能の低下と肺癌発生を関連付ける実験系は、岡山、中田らの解析したプロテオグリカン、ムチン型糖鎖による糖鎖シグナルと癌発生機構の関連性の解析に使用できる可能性をもち、将来にわたってプログラム内での新しい共同研究課題として発展することも期待される。

以上。



KYOTO SANGYO UNIVERSITY