

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01313

研究課題名(和文)慢性炎症性疾患へのN-アセチルグルコサミン糖鎖高分子を用いた分子標的化技術の創製

研究課題名(英文)Development of molecular targeting system for various chronic diseases by GlcNAc-bearing polymer

研究代表者

伊勢 裕彦 (ISE, Hirohiko)

九州大学・先導物質化学研究所・准教授

研究者番号：10324253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、慢性炎症性疾患の疾患部位を標的とした分子標的化技術の開発を行った。これらの疾患部位では、筋線維芽細胞や星細胞が活性化し、そして、これらの活性化した細胞はType3中間径フィラメント(ビメンチン及びデスミン、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)、ペリフェリン)を高発現している。本研究では、これらの分子が細胞表面上に出現してN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)糖鎖に対して高い相互作用を示すことを発見した。さらにこれらの分子に対して高い結合力を有するGlcNAc糖鎖高分子AC-GlcNAcの開発を行い、慢性炎症性疾患に対する分子標的化技術の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed molecular targeting system for various chronic diseases. At these lesion sites, many activated myofibroblasts and stellate cells are proliferated. These cells highly express type 3 intermediate filaments (vimentin, desmin, glial fibrillary acidic protein(GFAP), and peripherin). We found that these proteins are expressed on cell surface and have N-acetylglucosamine (GlcNAc)-binding activities. Moreover, new GlcNAc-bearing polymer, AC-GlcNAc, that can rigidly bind to these proteins was developed. These findings are very useful for developing molecular targeting system for various chronic diseases.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ビメンチン デスミン GFAP ペリフェリン 慢性炎症性疾患 GlcNAc 糖鎖高分子

## 1. 研究開始当初の背景

慢性炎症性疾患は、線維症や動脈硬化症、自己免疫性疾患、癌などの総称であり、これらの疾患は慢性炎症が原因となって発症することが知られている。そして、これらの疾患は重篤な病態をもたらすものの効果的な治療手段がなく、本質的な治療戦略の構築が急務であった。現在では、これらの疾患に対する治療は疾患部位において特徴的に発現する分子を標的とした分子標的薬の開発が期待されている。しかしながら、最適な標的分子の探索とそれに対する薬剤設計（抗体医薬など）は非常に難しく膨大なコストが必要である。このようなことから、国内外において慢性炎症性疾患に対する分子標的薬の設計は困難を極めており、また医療経済を逼迫させる可能性があることから、より安価な分子標的薬の開発が求められている状況である。

申請者は、糖鎖構造を単純化した合成糖鎖高分子を用いて新たな細胞機能制御を目指す糖鎖工学による細胞生物学という学際的研究に取り組んできた。近年、申請者はGlcNAc糖鎖高分子が間葉系細胞や癌細胞に対して高い相互作用を持つことを見出し、その相互作用は細胞骨格分子として知られるビメンチンが細胞表面に出現してGlcNAc糖鎖高分子と結合し起こることを初めて発見した(Glycobiology, 20, 843-864, 2010; Glycobiology, 22, 1741-1759, 2012)。今までにビメンチンは、慢性炎症性疾患と呼ばれる線維症や動脈硬化症、発ガン等の多くの病変部位において高発現する細胞骨格分子として知られていたが、細胞内に局在する分子として考えられていたために標的分子としては注目されていなかった。申請者によるGlcNAc糖鎖高分子を用いたビメンチンの細胞表面への出現とGlcNAc結合活性の発見により、GlcNAc糖鎖高分子を用いたビメンチンを標的とする治療戦略の構築の可能性が初めて見出された。例えば、GlcNAc糖鎖高分子を結合させた薬物を開発することで慢性炎症性疾患の病変部位への分子標的薬の設計やイメージングの実現が期待できる。また抗体医薬などと比較して、合成高分子であるので非常に安価に作製することができる。このような経緯から、本研究では、ビメンチンを効果的に標的化できる新たなGlcNAc糖鎖高分子の設計から、いままでよりも安価で多くの種類の慢性炎症性疾患について包括的な早期診断や分子標的薬の構築を実現できるという着想に至った

## 2. 研究の目的

本研究では上記の研究背景をもとに、ビメンチンに対して高い結合力を有するGlcNAc糖鎖高分子の開発とビメンチンとGlcNAc糖鎖高分子の詳細な結合機構の解明から、ビメ

ンチンを標的とした慢性炎症性疾患の治療戦略の構築を目指している。研究期間内には以下のことに取り組む。

1) ビメンチンに対して高い相互作用を有する新たなGlcNAc糖鎖高分子の作製

均一な低分子量の制御されたGlcNAc糖鎖高分子をリビングラジカル重合によって作製し、ビメンチンに対して高い相互作用を持つために必要最低限の分子量(糖の数)を明らかにする。また糖を結合する主鎖をアクリル酸などで行い、出来るだけ低分子であり、プローブとして様々な薬剤や生体イメージングプローブに結合できるGlcNAc糖鎖高分子を設計する。

2) 新たに作製されたGlcNAc糖鎖高分子の慢性炎症性疾患に対する標的化の検討

新たに作製されたGlcNAc糖鎖高分子の線維芽細胞や癌細胞における細胞表面上のビメンチンとの結合を詳細に観察することで、ビメンチンとGlcNAcの結合様式を詳細に検討する。特に慢性炎症性疾患の病変部位に出現する活性化した線維芽細胞(筋線維芽細胞)や癌細胞とのGlcNAc糖鎖高分子との相互作用を検討することで、これらの疾患部位への標的化が可能かについて検討する。さらに疾患モデルマウス(担ガンマウスなど)を用いて疾患部位への標的化が可能かを検討する。

## 3. 研究の方法

本研究では、ビメンチンを認識する新しいGlcNAc糖鎖高分子の設計とその糖鎖高分子を用いた慢性炎症性疾患の病変部位(線維症や癌組織)の標的化を実現する。この目的の達成のため、以下の項目を中心に研究を実施する。

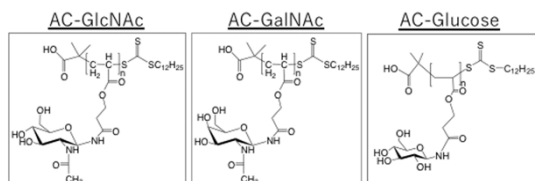
1) アクリル酸にGlcNAcが結合したモノマーを作製し、RAFT(Reversible Addition/Fragmentation Chain Transfer)を用いたリビングラジカル重合によって分子量の制御されたGlcNAc糖鎖高分子を作製する。

2) 新しく作製されたGlcNAc糖鎖高分子のビメンチンとの相互作用を表面プラズモン共鳴解析等で解析し、蛍光ラベルしたGlcNAc糖鎖高分子と様々な細胞(ガン細胞や筋線維芽細胞等)との相互作用をフローサイトメトリーなどで検討する。そして、ビメンチンと高い結合力を有するGlcNAc糖鎖高分子の分子量を明らかにする。さらに細胞表面上のビメンチンとGlcNAc糖鎖高分子の結合様式も共焦点顕微鏡などで詳細に解析する。

## 4. 研究成果

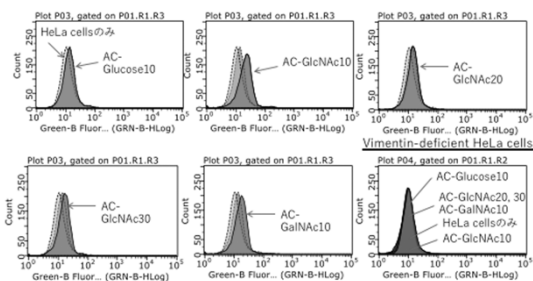
本研究は、主鎖をアクリル酸2-カルボキシエチルとして、このカルボキシル基にアミノ化したGlcNAcをアミド結合で結合した。GlcNAcのアミノ化は、炭酸水素アンモニウムにGlcNAcを反応させることでGlcNAcの1位の還元末端をアミノ基に変換した。アミノ化GlcNAcとアクリル酸2-カルボキシエチルのアルボキシル基に脱水縮合剤DMT-MM

を用いて結合した。その後、HPLCにて精製し、モノマーを得た。またN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)及びグルコースを有するモノマーも作製した。作製されたモノマーについてRAFT剤によるリビングラジカル重合によって分子量の制御されたGlcNAc糖鎖高分子AC-GlcNAcを数種類作製した。作製されたAC-GlcNAcと他のポリマーについてGPC測定を行い、分子量の解析を行った。



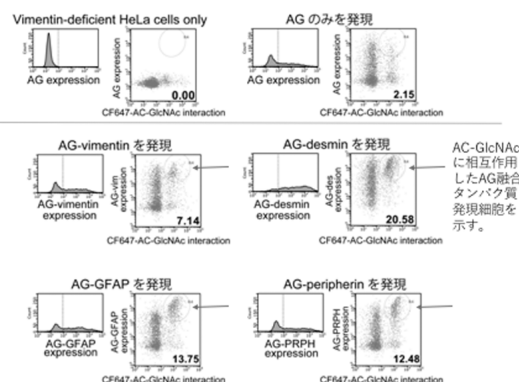
| Monomer/RAFT (mol ratio) | Mn   | Mw    | Mw/Mn | Number of glycosides (Mw-RAFT/Monomer) |
|--------------------------|------|-------|-------|----------------------------------------|
| AC-GlcNAc 10             | 3500 | 4700  | 1.34  | 13                                     |
| AC-GlcNAc 20             | 5700 | 9300  | 1.63  | 26                                     |
| AC-GlcNAc 30             | 6900 | 12000 | 1.74  | 34                                     |
| Monomer/RAFT (mol ratio) | Mn   | Mw    | Mw/Mn | Number of glycosides (Mw-RAFT/Monomer) |
| AC-GalNAc 10             | 3800 | 5200  | 1.36  | 14                                     |
| Monomer/RAFT (mol ratio) | Mn   | Mw    | Mw/Mn | Number of glycosides (Mw-RAFT/Monomer) |
| AC-Glucose 10            | 3900 | 4600  | 1.18  | 14                                     |

その結果、RAFT剤とモノマーのモル比に準じたポリマーの作製に成功した。これらのAC-GlcNAcの末端に蛍光基を導入し、ビメンチンを高発現するHeLa細胞との相互作用を検討した。



その結果、重量平均分子量が4700のものが最もHeLa細胞に強く相互作用することが明らかになった。GlcNAcの数が、10個程度でもHeLa細胞に相互作用できることが示された。またCRISPER/CAS9でビメンチンを欠損させたHeLa細胞を作製し、これらの細胞とポリマーの相互作用を検討した。その結果、ビメンチン欠損HeLa細胞では、AC-GlcNAcの相互作用が欠損していた。さらにAC-GalNAcやAC-Glucoseの相互作用も消失したことから、これらのポリマーもビメンチンと相互作用している可能性が高いことが示された。以上のことから分子量が制御され、且つ低分子量のGlcNAc糖鎖高分子AC-GlcNAcの作製に成功した。次にビメンチンとAC-GlcNAcの相互作用においてビメンチンのGlcNAc結合部位は、rod IIドメインであり、このドメインはビメンチン以外のType3中間径フィラメントであるデスミンやグリア線維性酸性タンパク質(GFAP)、ペリフェリンにも存在している。従って、これらの分子も細胞表面に出現して

GlcNAc結合活性を有している可能性が高い。そこで、これらに分子の末端に蛍光タンパク質であるアザミグリーン(AG)を融合し、ビメンチン欠損HeLa細胞に発現させた。そして、これらの細胞とCF647(蛍光基)-AC-GlcNAcとの相互作用を検討した。



その結果、ビメンチンやデスミン、GFAP、ペリフェリンを発現させた細胞において、AC-GlcNAcと相互作用している細胞集団が観察された。このことから、これらの分子は細胞表面に出現してGlcNAc結合活性を有していることが示された。そこで、これらType3中間径フィラメントのGlcNAc結合活性について表面プラズモン共鳴解析によって検討を行った。

| A. Immobilized AC-GlcNAc (1) |                    |                       |                       |
|------------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
|                              | $k_a$ (1/Ms)       | $k_d$ (1/s)           | $K_D$ (M)             |
| Vimentin                     | $1.42 \times 10^4$ | $4.07 \times 10^{-4}$ | $2.87 \times 10^{-8}$ |
| Desmin                       | $1.72 \times 10^4$ | $1.01 \times 10^{-3}$ | $5.83 \times 10^{-8}$ |
| GFAP                         | $5.22 \times 10^4$ | $2.97 \times 10^{-3}$ | $5.69 \times 10^{-8}$ |
| Peripherin                   | $1.34 \times 10^4$ | $8.07 \times 10^{-4}$ | $6.18 \times 10^{-8}$ |
| B. Immobilized AC-GlcNAc (2) |                    |                       |                       |
|                              | $k_a$ (1/Ms)       | $k_d$ (1/s)           | $K_D$ (M)             |
| Vimentin                     | $1.02 \times 10^4$ | $9.24 \times 10^{-4}$ | $9.10 \times 10^{-8}$ |
| Desmin                       | $1.45 \times 10^4$ | $7.97 \times 10^{-4}$ | $5.48 \times 10^{-8}$ |
| GFAP                         | $1.14 \times 10^4$ | $1.17 \times 10^{-3}$ | $1.03 \times 10^{-7}$ |
| Peripherin                   | $8.51 \times 10^4$ | $9.85 \times 10^{-4}$ | $1.16 \times 10^{-7}$ |
| C. Immobilized AC-GlcNAc (3) |                    |                       |                       |
|                              | $k_a$ (1/Ms)       | $k_d$ (1/s)           | $K_D$ (M)             |
| Vimentin                     | $7.69 \times 10^3$ | $6.34 \times 10^{-4}$ | $2.96 \times 10^{-8}$ |
| Desmin                       | $1.98 \times 10^4$ | $3.51 \times 10^{-4}$ | $1.17 \times 10^{-7}$ |
| GFAP                         | $1.41 \times 10^4$ | $9.21 \times 10^{-4}$ | $2.37 \times 10^{-7}$ |
| Peripherin                   | $8.55 \times 10^3$ | $9.19 \times 10^{-4}$ | $2.97 \times 10^{-7}$ |

表面プラズモン共鳴によって、様々な分子量のAC-GlcNAcとの相互作用を検討したところ、分子量が4700程度のAC-GlcNAcに対してビメンチンやデスミン、GFAP、ペリフェリンは、その解離定数が、およそ $10^{-8}$ M程度であった。このことから、Type3中間径フィラメントの新しい機能として細胞表面出現とGlcNAc結合活性を見出した。今後は、これらの分子の細胞表面への出現機構解明とこれらの分子の生体に対する役割の解明、疾患への関与を検討していく予定である。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Ise H (Corresponding author), Yamasaki S, Sueyoshi K, Miura Y. Elucidation of GlcNAc-

binding properties of type III intermediate filament proteins, using GlcNAc-bearing polymers. *Genes Cells* 22, 900-917 (2017)

DOI: <https://doi.org/10.1111/gtc.12535>

② Ise H (Corresponding author), Vimentin's N-acetylglucosamine-binding activity: its physiological function. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 29(169), E71-E79 (2017)

DOI: <https://doi.org/10.4052/tigg.1611.1E>

[学会発表] (計 26 件)

- ① 伊勢裕彦、三浦佳子、ガン細胞や間葉系細胞に対して高い相互作用を有する GlcNAc 糖鎖高分子の設計、第 34 回日本糖質学会大会、2015. 08. 01.
- ② 伊勢裕彦、山崎貞徳、三浦佳子、N-アセチルグルコサミン糖鎖高分子の細胞認識に基づく細胞機能解明と医療材料設計、第 64 回高分子討論会、2015. 09. 16.
- ③ 山崎貞徳、伊勢裕彦、中村直志、三浦佳子、木戸秋悟、GlcNAc 含有高分子を用いたビメンチンの新たな機能の解明、日本生物物理学会大会、2015. 09. 14.
- ④ 伊勢裕彦、N-アセチルグルコサミン糖鎖高分子の細胞認識に基づく細胞機能解明と医療材料設計、平成 27 年度九州地区高分子若手研究会・夏の講演会、2015. 06. 26.
- ⑤ 伊勢裕彦、培養皿固定型心筋分化誘導因子 IGFBP4-GVGP によるマウス ES 細胞の効率的な心筋分化誘導、第 80 回インターフェロン・サイトカイン学会、2015. 07. 18.
- ⑥ 伊勢裕彦、細胞認識性バイオマテリアルを用いた新規細胞機能の解明とその応用研究、第 5 回日本バイオマテリアル学会九州ブロック講演会、2015. 09. 18.
- ⑦ 伊勢裕彦、山崎貞徳、三浦佳子、N-アセチルグルコサミンを有する糖鎖高分子は、細胞表面上に出現した細胞骨格分子ビメンチンと相互作用する、第 18 回生命化学研究会、2016. 01. 08.
- ⑧ 伊勢裕彦、細胞認識性バイオマテリアルを用いた新しい細胞機能発見とその応用研究、先導物質科学研究所講演会、2016. 01. 18.
- ⑨ 伊勢裕彦、細胞骨格分子ビメンチンが関与する新しいネクロシス細胞処理機構の解明、第一回デザイン生命工学研究会、2016. 03. 08.
- ⑩ 後藤洋子、山崎俊正、石塚保行、新見伸吾、伊勢裕彦、絹フィブロインにおける糖鎖修飾導入と血管内皮細胞の接着性評価、平成 28 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(日本蚕糸学会第 86 回大会)、2016. 03. 18
- ⑪ 後藤洋子・山崎俊正・石塚保行・新見伸吾・伊勢裕彦、血管再生足場材料としての N-アセチルグルコサミン糖鎖修飾絹フィブロインの創出、第 65 回高分子学会年次大会、2016. 05. 25
- ⑫ 伊勢裕彦、細胞骨格分子ビメンチンが関与する新しいネクロシス細胞処理機構の解

明、第 81 回インターフェロンサイトカイン学会、2016. 05. 13.

- ⑬ 伊勢裕彦、三浦佳子、山崎貞徳、N-アセチルグルコサミン糖鎖高分子によって見出された Type3 型中間径フィラメントのレクチン活性、第 35 回日本糖質学会、2016. 09. 01.
- ⑭ 山崎貞徳、伊勢裕彦、三浦佳子、細胞骨格タンパク質ビメンチンを認識する新規 N-アセチルグルコサミン糖鎖高分子の開発、第 35 回日本糖質学会、2016. 09. 03.
- ⑮ 伊勢裕彦、山崎貞徳、三浦佳子、Type3 型中間径フィラメントの細胞表面上の出現と N-アセチルグルコサミンに対するレクチン活性、第 89 回日本生化学会大会、2016. 09. 25.
- ⑯ 山崎貞徳、伊勢裕彦、三浦佳子、細胞骨格タンパク質ビメンチンを認識する新規 N-アセチルグルコサミン糖鎖高分子の開発、第 89 回日本生化学会大会、2016. 09. 27.
- ⑰ 伊勢裕彦、山崎貞徳、三浦佳子、Type3 型中間径フィラメントを認識する N-アセチルグルコサミン糖鎖高分子の開発、2016. 09. 23.
- ⑱ 伊勢裕彦、山崎貞徳、三浦佳子、Type3 型中間径フィラメントを認識する新規 GlcNAc 糖鎖高分子の開発、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2017、2016. 11. 22.
- ⑲ 山崎貞徳、伊勢裕彦、三浦佳子、細胞骨格タンパク質ビメンチンを認識する新規 N-アセチルグルコサミン糖鎖高分子の開発、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2017、2016. 11. 22.
- ⑳ 伊勢裕彦、N-アセチルグルコサミン糖鎖高分子により見出された Type3 型中間径フィラメントの細胞表面出現と N-アセチルグルコサミン結合活性、ダイナミックアライアンス G3 分科会、2016. 12. 03.
- ㉑ 伊勢裕彦、Type3 型中間径フィラメントの細胞外出現と N-アセチルグルコサミンに対するレクチン活性、第 2 回デザイン生命工学研究会、2017. 03. 21.
- ㉒ 後藤洋子、山崎俊正、石塚保行、新見伸吾、伊勢裕彦、N-アセチルグルコサミン糖鎖修飾絹フィブロインの血管再生用基材としての特性評価、第 39 回日本バイオマテリアル学会、2017. 11. 21.
- ㉓ 伊勢裕彦、三浦佳子、新規 GlcNAc 糖鎖高分子を用いた Type3 型中間径フィラメントの新機能の発見、第 39 回日本バイオマテリアル学会、2017. 11. 20.
- ㉔ 伊勢裕彦、N-アセチルグルコサミン糖鎖高分子により見出された Type3 型中間径フィラメントの細胞表面出現と N-アセチルグルコサミン結合活性、ダイナミックアライアンス G3 分科会、2017. 11. 28.
- ㉕ 伊勢裕彦、山崎貞徳、三浦佳子、糖鎖高分子によって解明された Type3 型中間径フィラメントの細胞表面出現と N-アセチルグルコサミン結合活性、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017, 12, 6
- ㉖ 伊勢裕彦、新規 GlcNAc 糖鎖高分子を用いた Type3 型中間径フィラメントの新機能の発見、第

3回デザイン生命工学研究会、沖縄、2018年  
3月9日

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：N-アセチルグルコサミン糖鎖基含有化合物、薬剤輸送用キャリアー化合物、製剤、及び、薬剤輸送システム  
発明者：伊勢裕彦  
権利者：ソマール株式会社  
種類：特許  
番号：特開 2015-218314 (P2015-218314A)  
出願年月日：2015/12/07  
国内外の別：国内

名称：糖鎖含有ポリマー、および、糖鎖含有ポリマー複合体  
発明者：チョンボンヒョン, 伊勢裕彦, 赤池敏宏, キムソンジョン  
権利者：ソマール株式会社  
種類：特許  
番号：特開 2015-105230 (P2015-105230A)  
出願年月日：2015/06/08  
国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

名称：細胞培養基材、およびそれを用いた細胞培養方法並びに多能性幹細胞の分化誘導方法  
発明者：湊彩や香, 伊勢裕彦, 赤池敏宏  
権利者：ソマール株式会社  
種類：  
番号：特許第 6105854 号 (P6105854)  
取得年月日：2017/03/10  
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊勢 裕彦 (ISE, Hirohiko)  
九州大学・先導物質化学研究所・准教授  
研究者番号：10324253