

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14399

研究課題名(和文)糖加水分解酵素阻害剤による免疫回復療法開発に関する研究

研究課題名(英文) Research directed toward developing immune-recovery treatment based on inhibiting a glycosidase

研究代表者

蟹江 治 (Kanie, Osamu)

東海大学・先進生命科学研究所・教授

研究者番号：90291062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：O-結合型糖鎖の切断状況により一過性に機能するGcMAFの血中安定性向上により、がんに対する免疫応答の維持を期待できるため、GalNase阻害による新しい免疫調節がん治療研究を行った。阻害剤を用いて、ヒト肝がん由来株化細胞の粗酵素に対する阻害研究を行った結果、本酵素活性を認め、これに対して良好な阻害能を確認した。ヒトGalNaseに対して阻害効果が認められたため、GcMAFの効果持続性改善に期待できる結果であると考えられる。また、GcMAFの糖鎖構造を質量分析装置を用いて解析した結果、微量ではあるもののGalNAcが結合したGcMAFの存在を確認した。

研究成果の概要(英文)：A partially truncated O-glycan-carrying Gc protein is known to activate immunity as GcMAF. It is expected that controlling the blood stability of GcMAF might affect the immune response against tumor. For this reason, a research directed toward finding a new therapeutic method based on inhibition of a key enzyme, GalNase, was carried out. Investigation of human GalNase activity and the inhibitory activity of a synthetic inhibitor revealed that the particular enzyme was stored in lysosome and was inhibited by the inhibitor. It is expected that the inhibitor molecule might be potent to maintain blood-GcMAF level. The presence of GalNAc structure in the GcMAF was also confirmed based on mass spectrometric analysis.

研究分野：生物有機化学

キーワード：高齢化 がん 敗血症 免疫療法 酵素阻害 マクロファージ

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会が進む中、最近の統計調査からは死因におけるがん、並びに、感染症の死亡率が上昇している。これは人口を形成する年齢による影響が大きく、年齢調整死亡率においてはさほどの変化がないことが示されているが、実際には高齢者の絶対数が増加し、それら疾病の治療に対する要望と必要性が高まっていることに変わりがない。さらに、救急医療の現場においも高齢による影響が高まっている。例えば、感染症により引き起こされる敗血症においては65歳以上の高齢者において他に比して約7倍の高い死亡率となっており救急医療の場においても問題となっている。高齢者では軽度の侵襲が致死的な病態に移行することが多く、軽度な外傷や熱傷、脳梗塞、市中肺炎、悪性腫瘍等の侵襲から免疫抑制状態に陥り全身状態が悪化する。特に高齢者や基礎疾患のある患者では局所の感染が全身性に波及する敗血症に陥りやすい。

マクロファージ活性化因子(MAF)による免疫療法への期待：がん治療は、薬物療法、放射線療法、免疫療法、造血幹細胞移植療法などに大別される。先に述べたMAFによる療法は、がん、AIDSや高齢化などの要因により免疫不全症を呈する場合に、マクロファージを活性化、続き細胞性免疫、液性免疫などの活性化が誘導されることを基礎としており、根本的な治療法とすることができる。さらに、MAFは元々ヒトが体内で合成する糖タンパク質であり副作用については極めて軽微であるとの報告がある。この他にもMAFは、マクロファージの活性化とは別にcAMPの形成を促し、血管新生を阻害するとの報告もある。がんに対するMAF療法について高齢化社会との関連において注目すべき点は、90歳までの幅広い年齢層において有効性が示されていることである。

医学的見地における基礎研究の必要性：例えば東海大学病院高度救命センターにおける65歳以上の高齢者敗血症の死亡率は35%であり、65歳未満の成人敗血症死亡率5%と比べて有意に高値であったが、高齢者の敗血症研究は少なく特に免疫機能との関係について十分に解析されておらず早急な研究対象となることが望まれる。

### 2. 研究の目的

背景に述べたような免疫不全に関する問題に対し、MAF療法を発展させ新たな治療

法を提案することが可能と考えられる。すなわち、免疫不全を呈する患者において内在性のMAFがこれを破壊する酵素である-N-アセチルガラクトサミニダーゼ(GalNase)により不活性化されてしまう。

この内在性のMAFの分解を抑制できれば外部からのMAF投与は必要なく、極めて高価な糖タンパク質製剤への依存から解放される。また、投与したMAFが破壊されるのを防ぐことにより投与量の軽減も期待できる。合成した低分子化合物群について

GalNaseおよびMAFを用いて検討し、免疫回復の基盤とする。将来的には、がん移植マウスを用い<sup>18</sup>Fグルコースの細胞への取り込みをPETにより追跡するとともに病巣の評価をおこない、また、敗血症モデルマウスを用い検討できれば、免疫不全が関連する疾病に対する新しい治療法の基礎となると期待できる。

### 3. 研究の方法

阻害剤の合成：合成は、ガラクト配置を有するアザ糖を合成するため、D-リキソース誘導体を原料とし13工程で公知論文情報にしたがった。すなわち、Wittig反応、還元反応、2回の求核置換反応を経て得られるアリルアルコールをシャープレスの不斉エポキシ化反応によりエポキシ化し、さらにクロロメシル基のアジド基による置換反応によりアザ糖骨格とした。その後、炭素間結合の酸化的開裂により得られるアルデヒドを還元アルキル化、その後塩酸酸性条件下で接触水素添加して、阻害剤としてフェネチル体を得た。

HepG2細胞の酵素活性試験・阻害剤効果検証：ディッシュ(直径10cm、4枚、90%コンフル)で培養したHepG2細胞を0.02%EDTA/PBS(1mL)を加え37℃で5分インキュベートした。それをスクレーパーでかきとり15mLファルコンチューブに集めた。ここに15mM Tris-HCl(3mL)、ガラスビーズ(直径106μm以下、50mg)を加えて超音波破砕(和研薬株式会社製sonicatorULTRASONICPROCESSORXL)した。振動(3分)と休止(15秒)のサイクルを3回繰り返した。この細胞破砕液を4℃で11000gで15分遠心した。上澄を回収し、70%硫酸沈殿をオーバーナイトで行った。これを、4℃で15000rpmで20分遠心し、上澄を除去、沈殿物をクエン酸バッフ

アー (pH 5、2 mL) に溶かした。これをクエン酸バッファー (pH 5) で6時間透析した。透析液を2 mLに希釈し、粗酵素溶液とした。

最終濃度1 mMのPNP-GalNAcと粗酵素液をクエン酸緩衝液 (pH 5) 中で反応した (37 °Cで19時間)。これらに0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>炭酸ナトリウムを加え、プレートリーダー (吸光度415 nm) にて酵素活性測定を行った。

上記の粗酵素液を用いて阻害剤の効果の検証を行った。粗酵素液、1 mM PNP-GalNAcと阻害剤を用いクエン酸緩衝液中で反応を行った。この時、阻害剤の濃度は30 nM ~ 10 μMで行った。

マウス血中のGalNase活性試験: C3H/HeJ、C3H/HeN (11週齢以上)のマウスから約300 μLずつの血清を回収し、得られた血清を50 mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) で希釈し、一晚70%硫酸沈殿を行った後に50 mMリン酸緩衝液で5時間透析を行った。このように抽出したサンプルに1 mM PNP-GalNAcを加え、50 mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) 中37 °Cで1時間インキュベートした。その後0.5 MのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を加え反応を止めた。これを分光光度計UV415 nmで測定した。

Gcプロテインの糖鎖修飾解析: Gcグロブリン (0.2 mg) をNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>に溶解し、RapiGest (10 mM) を加えて40 °Cで10分放置した。その後、DTT存在下80 °Cにて15分放置した。これを氷冷し、ヨードアセトアミド (20 mM) を加え、暗所で30分放置した。その後トリプシンを加え、37 °Cで一晩放置した。TFAとCH<sub>3</sub>CNを加え、固相抽出カーボンカラムで精製した。この時、20%、40%、80%アセトニトリル濃度で、2 mL × 2回ずつ回収した。なお、80%アセトニトリルは4本回収した。得られた粗精製物についてLC-MS、HPLCを用いて分析を行った。分析条件: カラムはchromolith performance RP-18eを用い、送液量は1 mL/min、移動相、A. 0.1%ギ酸-水、B. 0.1%ギ酸含有アセトニトリルグラジエントモード; 0-5分: 2%B、5-20分: 2%-25%B、37 °C、1.0 mL/min、吸光度214 nmで検出した。

#### 4. 研究成果

GalNaseに対する阻害剤を化学合成、この分子を用いGalNaseに対する阻害能を評価した。

単糖 (GalNAc) が結合したGcMAFの血中での安定化により、がんに対する免疫応答の維持を期待できるため、GalNAc分解酵素 (GalNase) 阻害による新しい免疫調節抗がん治療を期待し研究を行った。

合成したGalNase阻害剤を用いて、ヒト肝がん由来株化細胞HepG2から抽出した粗酵素に対する阻害研究を行った結果、HepG2細胞において本酵素の活性 (43 nmol/mg/h) が認められ、これに対してIC<sub>50</sub>=230 nMの阻害を確認した。この結果は、鶏由来のGalNase阻害結果によく一致し、本阻害剤が種を超えて広くGalNaseに対して阻害効果を有することを示している。また、ヒトのGalNaseに対して良好な阻害効果が認められたことから、GcMAFの効果持続性改善に期待できる。

一方、GalNaseの細胞外液への放出は認められず、文献情報と異なる結果も得られた。がん組織においては、細胞が限定された空間で増殖し、細胞膜などに物理的に大きなストレスがかかると考えられ、一般的には放出されないGalNaseがリークし、これによってGcMAFの破壊が起こる可能性が示唆された。マウスを用いた研究においては、系統によってGalNaseの血中活性が異なる結果を得た。がんを引き起こしやすい系統において高いGalNaseの活性が観察されたことは、非常に興味深い。

最後に、入手可能なGcMAFの糖鎖構造について、質量分析装置を用いて解析した。この結果、微量ではあるもののGalNAcが結合したGcMAFが確かに存在することを確認した。

#### 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 1件)

1. Yoshimi Kanie and Osamu Kanie, Addressing the glycan complexity by using mass spectrometry: In the pursuit of decoding glycologics, *Biochemical Compounds*, 5:3(2

017)  
<http://dx.doi.org/10.7243/2052-9341-5-3>

〔学会発表〕(計 3件)

1. Osamu Kanie, Space, Time and glycan processing: Synthetic and analytical approach, XXIIIth International Carbohydrate Symposium, 2016年7月18 - 22日.
2. 浅見悠里、河口優香、蟹江善美、蟹江治、立体特異的 TMS グリコシドの合成研究、第35回日本糖質学会年会、2016年9月1日 - 3日
3. 浅見悠里、蟹江治、ガラクトース誘導体の立体特異的な TMS 化反応、2016年度糖質科学合同セミナー、2016年10月16 - 17日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

蟹江 治 (KANIE, Osamu)  
東海大学・先進生命科学研究所・教授  
研究者番号：90291062

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

井上 茂亮 (INOUE, Shigeaki)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：30582209

田中 克典 (TANAKA, Katsunori)

独立行政法人理化学研究所・田中生体機能合成化学研究室・準主任研究員  
研究者番号：00403098

##### (4) 研究協力者

( )