

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08257

研究課題名(和文)単糖代謝阻害剤を標的とした嚢胞性腎疾患群の病態機序解明と薬効の検証

研究課題名(英文)Examination of inhibition effect by monosaccharide analog for renal cyst progression in polycystic kidney disease

研究代表者

中嶋 和紀(Nakajima, Kazuki)

藤田医科大学・共同利用研究設備サポートセンター・講師

研究者番号：10442998

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):嚢胞性腎疾患群は腎臓や肝臓に嚢胞が形成される遺伝的腎疾患であり、糖代謝や糖鎖の異常により細胞増殖が亢進し、病態が悪性化していく。本研究では糖代謝阻害剤が糖鎖合成を阻害して、嚢胞拡大を抑えるかどうかを解析した。6-アルキニルフコースは肝嚢胞を抑える可能性が示唆された一方、7-アジドキシロースは嚢胞腎細胞株の増殖を抑えた。また近年着目を浴びている2-デオキシグルコースは、糖脂質合成酵素阻害剤と併用することで効果が高まることもわかった。さらに、そのメカニズムの鍵となる分子としてGDP-2-デオキシマンノースやUDP-マンノースの存在を同定し、単糖代謝阻害剤による治療戦略に新たな視点をもたらした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嚢胞性腎疾患群に対する薬物治療法は、唯一トルバプタンのみであり新たな治療方法の確立が望まれている。今回の研究で検討した単糖代謝阻害剤は、その阻害剤の効果を高めることで新たなシード化合物になりえる。また、その阻害剤と別経路の糖脂質代謝阻害剤さらにトルバプタンの併用は、実臨床に近い薬剤を組み合わせた新たな併用療法につながると考えている。さらに今回の研究で検出された希少糖ヌクレオチドは、糖鎖修飾の新たな制御因子になりうることから、嚢胞腎研究や生化学研究において新たな発展が期待される。

研究成果の概要(英文):Polycystic kidney disease is characterized by the progressive development of kidney and liver cysts. In this study, I elucidated how treatment with a modified sugar analog disrupts a biological pathway, which in turn block cyst progression. 6-alkynyl fucose was thought to block liver cyst progression via glycan changes, in contrast, 6-azido xylose blocked cell progression in renal cyst-derived cell lines. As other targets, 2-deoxyglucose and Venglustat, inhibitors of glucose metabolism and glycosphingolipid synthesis, cooperatively blocked the cell progression in the cyst-derived cells. Moreover, I identified novel monosaccharide-activated nucleotide sugars (GDP-2-deoxy-mannose and UDP-mannose) as key regulators in glycosylation. Therefore, our hypothesis will provide novel therapeutic targets and valuable insights regarding the molecular mechanisms in polycystic kidney diseases.

研究分野：生化学

キーワード：嚢胞性腎疾患群 糖脂質 グルコース代謝 糖ヌクレオチド グライコミクス メタボロミクス 細胞増殖

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

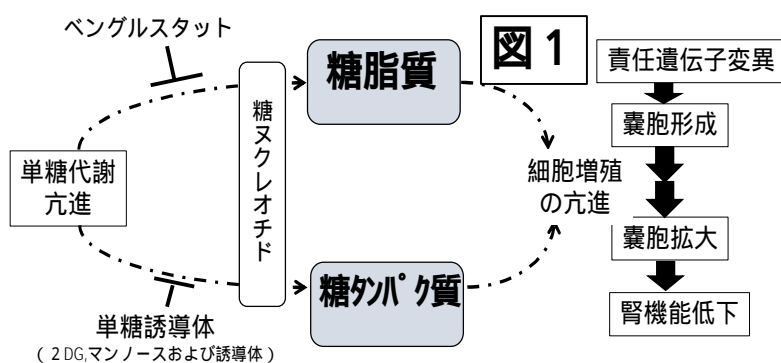
嚢胞性腎疾患群(ADPKD)は腎全体に無数の嚢胞が生じる遺伝性の腎疾患である。その病因はポリシスチン *PKD1* という糖タンパク質の遺伝的変異により、ポリシスチンが機能不全になり、細胞増殖が亢進、嚢胞が拡大、腎機能が低下してゆく。パソプレシン受容体阻害剤であるトルバプタンは唯一の治療薬としてその病態進行を遅らせる目的で用いられる。しかしトルバプタンには多尿など日常生活に支障をきたす副作用があることや、薬価が高いことが問題になっている。

単糖代謝阻害剤は ADPKD の新たな治療標的として着目されている。例えば、グルコース代謝阻害剤の一つとして、2-デオキシグルコース (2-DG) は嚢胞拡大を抑える(Rowe et al. *Nat.Med.*, 2013, Takiare et al, *PNAS*, 2011)。2DG はグルコース代謝を阻害して、ATP の産生を抑えてサイクリック AMP などを通して細胞増殖を抑えられている。

糖代謝という観点からは、マンノースも候補物質である。マンノースは毒性が少ないだけでなく、腫瘍の増殖を抑制する(Gonzalez et al. *Nature*, 2018)。我々は、さらにこのような単糖の異性化や修飾基を導入することで作用を強化できると考えている。共同研究者の木塚らは、糖を誘導体化することで、糖鎖の機能を阻害して癌の悪性を抑えることを明らかにした (Kizuka et al. *Cell Chem. Biol.*, 2017)。

また 2DG は、糖脂質や糖タンパク質糖鎖の発現にも影響を与える。ADPKD 患者でも、糖鎖合成酵素の遺伝子変異が見出されたことで(Fedele et al. *Nat.Genetics*, 2011)、糖鎖が病態形成に関わることが指摘されている。その一つとして、糖脂質合成酵素阻害剤のベングルスタットは、ADPKD の治療薬として治験や臨床研究が進んでいる。

以上のように、単糖代謝阻害剤による糖鎖変化、それに伴う細胞増殖抑制効果を検証することは新たな治療戦略を検討するうえで重要であると考えられる。



2. 研究の目的

本研究は「糖鎖修飾」に着目し、嚢胞性腎疾患群の病態機序を明らかにすることが目的である。特に本研究は申請者らの経験に基づいた概念—すなわち単糖の回路により生み出される様々な糖鎖分子の連動、それによって細胞増殖が調節されるという仮説—に着目し、グルコース代謝—糖脂質代謝の代謝連関、グルコース代謝と糖タンパク質糖鎖の連関を介する病態悪性機構を検討する。具体的には、これらの阻害剤である 2-DG、マンノースおよびその誘導体、ベングルスタットに着目して阻害剤の治療効果を検証する。これによってトルバプタンとの薬剤併用法や、阻害効果を高めた新たなシード化合物を見出すことが目的である。

3. 研究の方法

本研究ではマンノースなどのほかに、化学合成した糖アジド体、代謝連関を阻害する化合物などを、尿細管細胞株に添加して糖鎖への影響と細胞増殖への影響、さらにそのメカニズムを解析した。

(1) 阻害剤添加時における糖鎖変化の解析

健常人由来遠位尿細管細胞株(RETEC)、嚢胞腎患者由来遠位尿細管細胞株(W9-12)にマンノース関連素材や各種阻害剤を加えて 48 時間後、細胞を回収した。レクチンプロットやグライコミクス、グライコリピドミクスを行った。

(2) 細胞増殖抑制効果の検証

同様に、マンノース関連素材や各種阻害剤を加えて、細胞数を計測もしくは MTT アッセイを行った。また抗ホスホマンノイソメラーゼ抗体によるウエスタンプロットを行い、阻害剤に対する感受性を検証した。

(3) 代謝変容に着目した病態メカニズムの解析

同様に、得られた細胞から親水性代謝産物を抽出し、高速液体クロマトグラフィー質量分析計を用いてメタボロミクスを行った。また単糖の活性型フォームである糖ヌクレオチドのターゲットメタボロミクスも行った。

4. 研究成果

(1) 単糖代謝阻害剤と糖脂質代謝阻害剤の併用効果の検証

共同研究者の石橋らは、2DG が糖脂質合成を阻害することを見出し、グルコース代謝と糖脂質代謝のクロスリンク機構を提唱した(石橋ら, *J. Biol. Chem.*, 2015)。本研究では、糖脂質合成酵素阻害剤(ベングルスタット)が、逆にグルコース代謝を抑制しているかどうかを検証した。この仮説が存在すれば代謝クロスリンクによる病態悪性化スパイラルの存在を提唱できる。

ベングルスタットを嚢胞腎細胞株に加えた結果、グルコース代謝全般は著しく抑制され、AMP 活性化プロテインキナーゼ(AMPK)のリン酸化を亢進した。また糖脂質合成酵素 *UGCG* をノックアウトした細胞を樹立し、糖脂質が直接的に関与するかどうかを検証した。予想に反して、そのノックアウトした細胞でも、Genz123346 による AMPK のリン酸化が観察された。このことから、グルコース代謝を阻害していることが明らかになった。

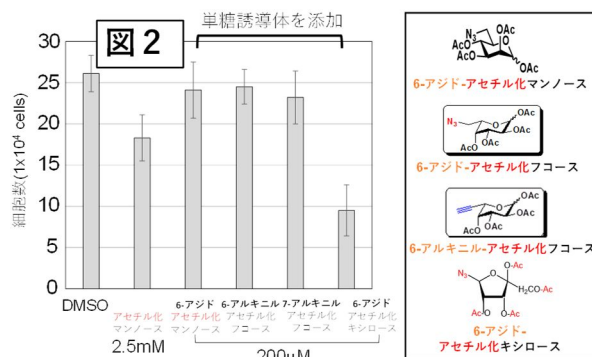
ベングルスタット(ジェンザイム社)は ADPKD に対して国内外で治験や臨床研究が進行している。今回の発見によって新たな治療戦略や副作用メカニズムの検討に活かされるであろう。

(2) 化学修飾した単糖代謝阻害剤による糖鎖変化と細胞増殖抑制効果の解析

単糖代謝阻害剤は既報の 6-アルキニルフコースと、6-アジドフコース、7-アルキニルフコースに加え、さらに有機合成した 6-アジドキシロースを嚢胞腎細胞株に添加した。

6-アルキニルフコースは、肝細胞株や健康人由来尿細管細胞において糖鎖合成を阻害したが、嚢胞腎細胞に対しては影響がみられなかった。この結果は、6-アルキニルフコースが腎嚢胞の病態よりむしろ、肝嚢胞の病態抑制に効果があることを示している。

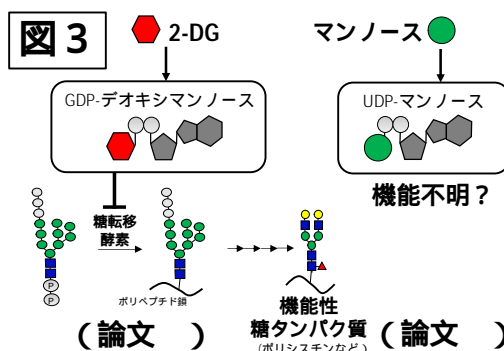
キシロース誘導体は嚢胞腎に対して強い増殖抑制効果を示したが、健康人細胞株に対しては効果が弱かった。キシロース誘導体は、嚢胞腎を効果的に抑える阻害剤であった。



(3) 単糖代謝阻害剤が糖鎖変化をもたらすメカニズムの解析

メカニズム解析は、単糖の活性型フォームである糖ヌクレオチドに着目した。2DG の主要なメカニズムは解糖系を阻害することであるが(Chiaravalli et al. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2016)、我々は 2DG から代謝された希少糖ヌクレオチド(GDP-2DG-マンノース)の存在を証明した。GDP-2DG-マンノースは、アスパラギン結合型糖鎖の分解を誘導し、細胞外小胞の分泌を抑制する機能性分子であった(図3, 論文)。

一方、マンノースは抗腫瘍効果があり、抗がん剤の化学療法の効果を高める。昨年度の研究では、マンノースの細胞膜透過性を高めたペンタアセチルマンノースが嚢胞腎細胞の増殖を抑えることを明らかにした。教科書的にマンノースはGDP-マンノースに代謝されることが知られているが、我々はUDP-マンノースという希少糖ヌクレオチドの存在を証明した(論文)。UDP-マンノースの機能は今もなお不明なままである。今後、嚢胞性腎疾患における希少糖ヌクレオチドの役割を明らかにしていく予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Harada Y, Nakajima K, Li S, Suzuki T, Taniguchi N.	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for analyzing the biosynthesis and degradation of N-glycan precursors in mammalian cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protoc	6. 最初と最後の頁 100316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100316	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Harada Y, Nakajima K, Suzuki T, Fukushige T, Kondo K, Seino J, Ohkawa Y, Suzuki T, Inoue H, Kanekura T, Dohmae N, Taniguchi N, Maruyama I.	4. 巻 33
2. 論文標題 Glycometabolic Regulation of the Biogenesis of Small Extracellular Vesicles.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 108261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108261.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitano M, Kizuka Y, Sobajima T, Nakano M, Nakajima K, Misaki R, Itoyama S, Harada Y, Harada A, Miyoshi E, Taniguchi N.	4. 巻 296
2. 論文標題 Rab11-mediated post-Golgi transport of the sialyltransferase ST3GAL4 suggests a new mechanism for regulating glycosylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 100354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda Y, Nakajima K, Mutoh T.	4. 巻 21
2. 論文標題 Neuroprotection by Neurotrophin through Crosstalk of Neurotrophic and Innate Immune Receptors in PC12 Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 6456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21186456.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ma C, Takeuchi H, Hao H, Yonekawa C, Nakajima K, Nagae M, Okajima T, Haltiwanger RS, Kizuka Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 Differential Labeling of Glycoproteins with Alkynyl Fucose Analogs,	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci	6. 最初と最後の頁 E6007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirayama H, Matsuda T, Tsuchiya Y, Oka R, Seino J, Huang C, Nakajima K, Noda Y, Shichino Y, Iwasaki S, Suzuki T	4. 巻 294(44)
2. 論文標題 Free Glycans Derived From O-mannosylated Glycoproteins Suggest the Presence of an O-glycoprotein Degradation Pathway in Yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 15900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.009491	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohyama.Y, Nakajima.K, Reinfow MB, Novak J. Takahashi K	4. 巻 5
2. 論文標題 Mass spectrometry for the identification and analysis of highly complex glycosylation of therapeutic or pathogenic proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Expert Review of Proteomics	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14789450.2020.1769479	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ohyama Y, Yamaguchi H, Nakajima K, Mizuno T, Fukamachi Y, Yokoi Y, Tsuboi N, Inaguma D, Hasegawa M, Renfrow MB, Novak J, Yuzawa Y, Takahashi K.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Analysis of O-glycoforms of the IgA1 hinge region by sequential deglycosylation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 671
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57510-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakano M, Mishra SK, Tokoro Y, Sato K, Nakajima K, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Kizuka Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 1 Bisecting GlcNAc Is a General Suppressor of Terminal Modification of N-glycan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Cell Proteomics.	6. 最初と最後の頁 2044-2057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/mcp.RA119.001534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中嶋和紀	4. 巻 4
2. 論文標題 UDP-グルコースを介するSNA11 mRNAの分解調節はがん転移を抑制する	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.56.4_350	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondo A, Takahashi K, Yamaguchi H, Yoshida Y, Mizuno T, Nakajima K, Hayashi H, Koide S, Inaguma D, Hasegawa M, Hiki Y, Yuzawa Y	4. 巻 4
2. 論文標題 Mass spectrometry-based approach for development of biomarkers in IgA nephropathy: a pilot trial	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fujita Medical Journal	6. 最初と最後の頁 36-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima K, Kizuka Y, Yamaguchi Y, Hirabayashi Y, Takahashi K, Yuzawa Y, Taniguchi N. I	4. 巻 495
2. 論文標題 dentification and characterization of UDP-mannose in human cell lines and mouse organs: Differential distribution across brain regions and organs.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun,	6. 最初と最後の頁 401-407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.10.173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kazuki Nakajima
2. 発表標題 Identification and characterization of UDP-mannose in human cell lines and mouse organs: Differential distribution across brain regions and organs
3. 学会等名 Glyco XXV, Milan, Italy, (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中嶋和紀, 村手健一郎, 島さゆり, 水谷泰彰, 新美芳樹, 植田晃広, 渡邊宏久, 武藤多津郎
2. 発表標題 健常人脳脊髄液に含まれるスフィンゴ糖脂質プロファイル
3. 学会等名 第40回 日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋和紀, 島さゆり, 新美芳樹, 植田晃広, 武藤多津郎
2. 発表標題 健常人脳脊髄液に含まれるスフィンゴ糖脂質プロファイル
3. 学会等名 スフィンゴテラピー研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中嶋和紀, 木塚康彦, 山口芳樹, 平林義雄, 高橋和男, 湯澤由紀, 谷口直之
2. 発表標題 UDP-マンノースの検出と解析, 組織分布について
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中嶋和紀
2. 発表標題 糖ヌクレオチド代謝に着目したメタボローム解析技術の構築 腎疾患の代謝メカニズム解析への応用
3. 学会等名 第91回日本生化学大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中嶋和紀
2. 発表標題 DKDの新規バイオマーカー開発
3. 学会等名 第48回日本腎臓学会西部学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuki Nakajima, Kazuo Takahashi, Masanori Kugita, Shizuko Nagao, and Yukio Yuzawa.
2. 発表標題 Lipidomics and metabolomics reveal metabolic crosstalk between elevated glycosphingolipids and glucose metabolisms in polycystic kidney progression
3. 学会等名 International Society of Nephrology（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 中嶋和紀	4. 発行年 2020年
2. 出版社 名古屋出版	5. 総ページ数 3
3. 書名 糖鎖生物学 コラム4	

1. 著者名 中嶋和紀	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本薬学会	5. 総ページ数 350
3. 書名 ファルマシア	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	湯澤 由紀夫 (Yuzawa Yukio) (00191479)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
連携研究者	高橋 和男 (Takahashi Kazuo) (90631391)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
連携研究者	長尾 静子 (Nagao Shizuko) (20183527)	藤田医科大学・研究支援推進本部・教授 (33916)	
連携研究者	木塚 康彦 (Kizuka yasuhiko) (20564743)	岐阜大学・糖鎖生命コア研究所・准教授 (13701)	
連携研究者	石橋 洋平 (Ishibashi Yohei) (90572868)	九州大学・農学研究院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------