

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590046

研究課題名(和文)グリコサミノグリカン由来免疫賦活活性糖鎖配列の徹底解明

研究課題名(英文)Detailed study on the immunoactive sequence of glycosaminoglycans.

## 研究代表者

戸井田 敏彦(Toida, Toshihiko)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60163945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：コンドロイチン硫酸の示す様々な生理活性を解明するために、天然物より構造の異なるコンドロイチン硫酸を単離・精製し、その構造を明らかにするとともに、免疫系への影響、神経系への影響などを調査した。その結果、東京湾に生息する9種の深海鮫から、過度に硫酸化されたコンドロイチン硫酸を単離し、その構造を明らかにした。またミッドカイン、プレイオトロフィンに対する相互作用を明らかにし、神経突起伸長作用を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have isolated and characterized new chondroitin sulfate samples from several shark cartilage and examined their binding property to some important biological substances such as midkine and preiotrophin. Furthermore, we have looked at in vivo effects of new chondroitin sulfates on elongation of neurites of mouse embryonic neuroblasts and have found that new chondroitin sulfate samples showed strong effects on neurite elongation compared to usual chondroitin sulfate isolated from whale/bovine cartilage.

研究分野：物理系薬学分析化学

キーワード：グリコサミノグリカン 免疫賦活活性 糖鎖配列

## 1. 研究開始当初の背景

グリコサミノグリカン (GAG)はウロン酸とアミノ糖が交互に結合し、各糖水酸基の一部に硫酸基が付加した二糖の繰り返し構造を有した直鎖の酸性多糖類であり、代表的な GAG として医薬品として用いられているヘパリン (HP)、ヘパラン硫酸 (HS)やコンドロイチン硫酸 (CS)が知られている。GAG はコア蛋白質と共有結合したプロテオグリカンとして、組織の細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在し、成長因子や接着因子と結合することで細胞増殖の他、初期胚の細胞質分裂や形態形成・骨格形成など数多くの生命現象に関与することが広く知られている (Bishop JR. *et al.*, *Nature* 2007, **446**, 1030-1037)。

一方、グリコサミノグリカンの中でもコンドロイチン硫酸は、変形性関節炎の経口寛解食品として広く用いられている。私たちは経口摂取されたコンドロイチン硫酸が、腸管免疫系を介して全身性免疫系に作用し、特にヘルパーT細胞におけるサイトカインの産生を制御することを突き止めた。しかしながらコンドロイチン硫酸の免疫賦活活性はL-セレクチンとの結合が必須であることは明らかになったものの、コンドロイチン硫酸の構造多様性、すなわち分子量、硫酸化度、硫酸エステル結合位置などとの構造活性相関については不明な点が多い。またL-セレクチンのみならず様々なコンドロイチン硫酸結合蛋白との相互作用についても追求することは、新たな医薬品創成の可能性を秘めている。このような背景を基盤として、今回の研究に取り組んだ。

## 2. 研究の目的

本研究では、二酸化チタンを用いた新規光分解反応によりコンドロイチン硫酸由来オリゴ糖ライブラリーを調製し、様々な生体内受容体との相互作用を表面プラズモン共鳴装置によって調査し、マウス脾臓細胞に対する共培養実験により活性の本体であるコン

ドロイチン硫酸糖鎖配列を徹底的に解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

由来の異なる様々なコンドロイチン硫酸を単離精製し、その構造を核磁気共鳴法、ポストカラム HPLC による構成二糖分析により明らかとし、新しいコンドロイチン硫酸を軟骨魚類、硬骨魚類、哺乳動物軟骨より見出した。これらのコンドロイチン硫酸を、二酸化チタン存在下、光照射することにより緩和な条件下で低分子化を試みた。更に表面プラズモン共鳴測定装置により、L-セレクチンとの相互作用を定量的に解析した。また BALBc マウスより脾臓細胞をとり、コンドロイチン硫酸と共培養することによって、培地中に放出されるサイトカイン量を分析した。またマウスに実験的関節炎を発症させ、コンドロイチン硫酸を経口投与することによる関節炎寛解を調査した。

## 4. 研究成果

### (1) 東京湾に生息する深海鮫由来コンドロイチン硫酸の探索

近年、東京湾沖の深海に広がる東京海底谷において、*Mitsukurina owstoni* (ミツクリザメ) をはじめとする希少な深海ザメの捕獲が報告されている。また、駿河湾は日本で最も深い湾として知られており、*Chlamydoselachus anguineus* (ラブカ) の捕獲例もある。これらのサメが目撃されることは稀であり、詳しい生態は不明な部分が多いため更なる研究が期待されている。しかし一方で、漁の対象でないサメの混獲や漁業保護を目的とするサメの駆除などにより、多くのサメが利用されることなく捨てられている。浸透圧調整に尿素を用いているためサメ肉にはアンモニア臭があり、一般的に食利用には適さないことから商業的価値は低く、安価なサメの有効利用が模索されている。このため、未利用のサメ軟骨はコンドロイチン硫酸の有用な資源となる可能性があり、その網

羅的な構造解析は重要な知見となる。

そこでまずはじめに、東京湾に生息するサメやエイなどの9種の軟骨魚類からコンドロイチン硫酸を抽出し、その組成分析を試みた。その結果、多くの深海鮫からデルマタン硫酸-コンドロイチン硫酸ハイブリッド構造が検出され、これら酸性多糖類の新しい生合成系の存在が示唆された。

## (2)多様なコンドロイチン硫酸の生体内受容体に対する結合

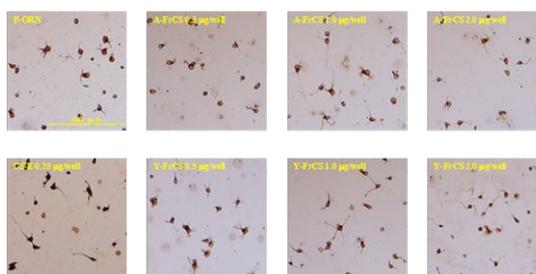
次に二分子間の相互作用を定量的に解析できる表面プラズモン共鳴解析装置 BIACORE を用いて、*Isurus oxyrinchus* 及び *Prionace glauca* から単離された過硫酸化 CS と、神経成長因子であるプレイオトロフィン及びミッドカインとの相互作用解析を行った。更に、胎仔マウスの海馬由来神経細胞を用いて、神経突起伸長促進作用の評価を行った。

二分子間の相互解析用測定には、表面プラズモン共鳴測定装置 BIACORE を用いた。BIACORE センサーチップには、カルボキシメチル基が導入されているものの他、ストレプトアビジンあるいはチオールアルカン基が導入されているものなどがあり、様々な生体物質を固定化できる。中でも、カルボキシメチル基が導入されている CM5 チップは、固定化の簡便さから汎用されており、アミノ基やチオール基、アルデヒド基を介してリガンドを固定化できる。本研究では、アミンカップリング法を用いてプレイオトロフィン及びミッドカインを CM5 チップ表面に固定化した。本法は、デキストランのカルボキシメチル基を EDC と NHS により活性化し、濃

縮したリガンドを、アミノ基を介して固定化する方法である。その結果、左下の表に示す結果が得られた。いずれの過硫酸化コンドロイチン硫酸も高い結合活性を示した。

## (3)コンドロイチン硫酸の神経細胞伸長に対する影響

CS 鎖を含むプロテオグリカンは、脳の発生の調節において重要な役割を担っていると考えられており、*in vitro* で神経突起伸長を促進することを示すいくつかの研究報告がある[42-45]。また、Sugahara らは過硫酸化 CS である CS-E といくつかのヘパリン結合性増殖因子との相互作用を解析したところ、MK とのみ高い親和性を示し、その結合が特異的であり、単に静電的な相互作用によるものではないことを示唆した[46]。現在、過硫酸化 CS は、初代培養系の神経細胞もしくは非神経細胞から産生された神経成長因子を捕獲・濃縮し、神経細胞表面上に存在する各因子の受容体に提示することで、神経突起の伸長を制御する補受容体として機能すると考えられている。そこで今回、マウス海馬由来神経細胞を用いて、単離精製したコンドロイチン硫酸の効果を、神経突起伸長を指標として調査した。その結果、下図に示すように A-FrCS 及び Y-FrCS は 1.0 µg/well でコートした際に最も有意な促進作用を示した。しかし、0.5 µg/well 及び 2.0 µg/well の条件下では有意な神経突起伸長は観察されなかった。一方、CS-E は 0.25 µg/well で有意な促進作用を示したため、CS の示す生理活性は CS 鎖中の構造の違いに大きく依存することが示唆された。



## 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

Ligand	Analyte	Affinity parameter		
		$K_a$ (1/Ms)	$K_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
PTN	A-FrCS	$1.41 \times 10^5$	$8.81 \times 10^{-4}$	$6.25 \times 10^{-9}$
	Y-FrCS	$1.57 \times 10^5$	$2.95 \times 10^{-4}$	$1.88 \times 10^{-9}$
	CS-E	$3.53 \times 10^5$	$2.99 \times 10^{-4}$	$8.47 \times 10^{-10}$
MK	A-FrCS	$2.35 \times 10^5$	$2.51 \times 10^{-4}$	$1.07 \times 10^{-9}$
	Y-FrCS	$2.24 \times 10^5$	$3.80 \times 10^{-5}$	$1.70 \times 10^{-10}$
	CS-E	$3.37 \times 10^5$	$3.97 \times 10^{-5}$	$1.18 \times 10^{-10}$

は下線)

**【雑誌論文】(計 11 件)**

1. Association between components of exudates and periwound moisture-associated dermatitis in breast cancer patients with malignant fungating wounds. Tamai N, Akase T, Minematsu T, Higashi K, Toida T, Igarashi K, Sanada H. *Biol Res Nurs.*, 査読有, *In press*.
2. Polyphenol extract from *Phellinus igniarius* protects against acrolein toxicity in vitro and provides protection in a mouse stroke model. Suabjakyong P, Saiki R, Van Griensven LJ, Higashi K, Nishimura K, Igarashi K, Toida T. *PLoS One*, 査読有, **10**, e0122733 (2015)
3. Composition of glycosaminoglycans in elasmobranchs including several deep-sea sharks: Identification of chondroitin/dermatan sulfate from the dried fins of *Isurus oxyrinchus* and *Prionace glauca*. Higashi K, Takeuchi Y, Mukuno A, Tomitori H, Miya M, Linhardt RJ, Toida T. *PLoS One*. 査読有, **10**, e0120860 (2015)
4. The acute encephalopathy induced by intake of sugihiratake mushroom in the patients with renal damage might be associated with the intoxication of cyanide and thiocyanate. Akiyama H, Matsuoka H, Okuyama T, Higashi K, Toida T, Komatsu H, Sugita-Konishi Y, Kobori S, Kodama Y, Yoshida M, Endou H. *Food Safety*, 査読有, **3**, 16-29 (2015)
5. Distinguishing mild cognitive impairment from Alzheimer's disease with acrolein metabolites and creatinine in urine. Yoshida M, Higashi K, Kuni K, Mizoi M, Saiki R, Nakamura M, Waragai M, Uemura K, Toida T, Kashiwagi K, Igarashi K. *Clin Chim Acta.*, 査読有, **441**, 115-121 (2015).
6. A simple HPLC method for identification of the origin of chondroitin sulfate in health foods. Higashi K, Okamoto Y, Mano T, Wada T, Toida T. *Jpn. J. Food Chem.*, 査読有, **21**, 187-194 (2014).
7. Identification of functional amino acid residues involved in polyamine and agmatine transport by human organic cation transporter 2. Higashi K, Imamura M, Fudo S, Uemura T, Saiki R, Hoshino T, Toida T, Kashiwagi K, and Igarashi K. *PLoS One*, 査読有, **9**, e102234 (2014).
8. Properties of putrescine uptake by PotFGHI and PuuP and their physiological significance in *Escherichia coli*. Terui Y, Saroj SD, Sakamoto A, Yoshida T, Higashi K, Kurihara S, Suzuki H, Toida T, Kashiwagi K, Igarashi K. *Amino Acids*, 査読有, **46**, 661-670 (2014).
9. Acetaldehyde-induced cytotoxicity involves induction of spermine oxidase at the transcriptional level. Uemura T, Tanaka Y, Higashi K, Miyamori D, Takasaka T, Nagano T, Toida T, Yoshimoto K, Igarashi K, Ikegaya H. *Toxicology*, 査読有, **310**, 1-7 (2013)
10. Effect of molecular sizes of chondroitin sulfate on interaction with L-Selectin. Igarashi N, Takeguchi A, Sakai S, Akiyama H, Higashi K, Toida T. *Int. J. Carbohydr. Chem.*, 査読有, **2013**, Article ID 856142 (2013)
11. Sequence analysis and domain motifs in the porcine skin decorin glycosaminoglycan chain. Zhao X, Yang B, Solakylidirim K, Joo EJ, Toida T, Higashi K, Linhardt RJ, Li L. *J. Biol. Chem.*, 査読有, **288**, 9226-9237 (2013)

**【学会発表】(計 16 件)**

1. 東恭平, 武内芳貴, 向野杏, 富取秀行, 宮正樹, 戸井田敏彦. 乾燥フカヒレに含まれるデルマタン硫酸の構造解析. 日本

- 薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 28 日, 神戸.
2. 岡本悠佑, 東恭平, 向野杏, 戸井田敏彦. ミズダコ由来コンドロイチン硫酸における GlcA3S の検出. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 28 日, 神戸.
  3. 吉田円, 東恭平, 國恭司郎, 溝井睦美, 齋木遼太郎, 中村瑞穂, 藁谷正明, 植村研一, 戸井田敏彦, 柏木敬子, 五十嵐一衛. 尿中のアクロレイン代謝物とクレアチニン測定によるアルツハイマー病と軽度認知障害の識別. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 27 日, 神戸.
  4. 伊藤千弘, 西田光貴, 北口公司, 植木章晴, 石田秀治, 木曾真, 東恭平, 戸井田敏彦, 五十嵐一衛, 森雄一郎, 山元宏貴, 伊神孝生, 矢部富雄. 食物繊維摂取による小腸絨毛伸長作用の機構解明. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 27 日, 岡山.
  5. 今村正隆, 東恭平, 不動聡志, 植村武史, 齋木遼太郎, 星野忠次, 戸井田敏彦, 柏木敬子, 五十嵐一衛. Organic cation transporter 2 によるポリアミン及びアグマチン輸送機構の解明. ポリアミン学会第 6 回年会, 2015 年 1 月 20 日, 東京.
  6. 戸井田敏彦, 東恭平, 真野貴, 濱館直史, 松本祥幸, 瀬戸加代子, 和田竜哉. 反転腸管を用いたグルコサミン吸収における黒酢の効果. 第 12 回日本機能性食品医学会, 2014 年 12 月 13 日, 京都.
  7. 今村正隆, 東恭平, 山口勝利, 降幡知巳, 西村和洋, 五十嵐一衛, 戸井田敏彦. ポリアミンによるグリコサミノグリカン合成調節機構の解明. 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 18 日, 京都.
  8. 萩原裕樹, 東恭平, 戸井田敏彦. 小分子蛍光物質を用いた蛍光標識グリコサミノグリカン作製と有効性評価. 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 18 日, 京都.
  9. 山口勝利, 東恭平, 今村正隆, 西村和洋, 柏木敬子, 五十嵐一衛, 戸井田敏彦. ポリアミンによるコンドロイチン硫酸合成調節機構の解明. 第 33 回日本糖質学会, 2014 年 8 月 12 日, 名古屋.
  10. 東恭平, 今村正隆, 山口勝利, 西村和洋, 柏木敬子, 五十嵐一衛, 戸井田敏彦. 動物細胞のグリコサミノグリカンの網羅的解析とポリアミンの役割. 第 33 回日本糖質学会, 2014 年 8 月 10 日, 名古屋.
  11. Higashi K, Imamura T, Yamaguchi K, Furihata T, Nishimura K, Kashiwagi K, Linhardt RJ, Igarashi K, and Toida T. Enhancement of the synthesis of EXT2, EXTL3 and CHSY1 by polyamines at the level of translation in mammalian cells. Gordon research conference on proteoglycans. 2014 年 7 月 7 日, Andover, NH, USA.
  12. Higashi K, Imamura T, Yamaguchi K, Furihata T, Nishimura K, Kashiwagi K, Linhardt RJ, Igarashi K, and Toida T (Invited Lecture). Enhancement of the synthesis of EXT2, EXTL3 and CHSY1 by polyamines at the level of translation in mammalian cells. Glycomics meeting at Rensselaer Polytechnic Institute, 2014 年 7 月 5 日, Troy, NY, USA.
  13. 國恭司郎, 東恭平, 西村和洋, 五十嵐一衛, 戸井田敏彦. 無症候性脳梗塞診断マーカー-3-HPMA の高感度分析法の開発. 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 日, 熊本.
  14. 山口勝利, 東恭平, 今村正隆, 降幡知巳, 西村和洋, 五十嵐一衛, 戸井田敏彦. コンドロイチン硫酸合成酵素における新規ポリアミンモジュロンの同定. 東京慈恵会医学大学 学外共同研究シンポジウ

ム 「ポリアミンと核酸の共進化」第 12  
回合同シンポジウム, 2013 年 11 月 9 日,  
東京.

15. 萩原裕樹, 東恭平, 萩田拓, 花岡宏史,  
上原知也, 荒野泰, 戸井田敏彦. センチ  
ネルリンパ節を標的とした糖鎖リガン  
ドの開発. 第 32 回日本糖質学会年会,  
2013 年 8 月 7 日, 名古屋.
16. Higashi K, Imamura M, Furihata T,  
Nishimura K, Linhardt RJ, Kashiwagi K,  
Igarashi K, Toida T. Comprehensive  
analysis of glycosaminoglycans in  
mammalian cells cultured in the presence or  
absence of polyamines: Identification of  
polyamine modulon in glycosaminoglycan  
synthesis. Gordon research conference on  
polyamines, 2013 年 6 月 17 日, Waterville  
valley, NH, USA.

#### 【その他】

ホームページ等

[http://www.p.chiba-u.jp/lab/bunseki/publication.h  
tml](http://www.p.chiba-u.jp/lab/bunseki/publication.html)

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

戸井田 敏彦 (TOIDA Toshihiko)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：60163945