

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460080

研究課題名(和文) 硫酸化糖鎖による炎症シグナルの調節とその破綻による炎症疾患発症に関する研究

研究課題名(英文) Dysregulation of Sulfated Glycosaminoglycan Biosynthesis is Implicated in Inflammatory Response

研究代表者

灘中 里美 (Nadanaka, Satomi)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60378578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞表面や細胞外マトリクスに存在する硫酸化糖鎖が、受容体を介して細胞内にシグナルを入力し、細胞機能の制御に働く場合がある。この機能は、硫酸化糖鎖の量・糖鎖長・硫酸化構造によって調節されるため、硫酸化糖鎖の合成異常は細胞機能に影響を与え、疾患の原因となり得る。硫酸化糖鎖の合成異常を起こした遺伝子欠損マウスを解析した結果、炎症性疾患の病態が重篤に現れ、この現象がマクロファージの過剰な応答に起因する可能性が示唆された。本研究から、炎症に関連する硫酸化糖鎖が合成される要因とToll-like 受容体の活性化に関わる硫酸化糖鎖の構造的特徴が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：GAGs (glycosaminoglycans) are abundant on the surfaces of most cells and in extracellular matrices as components of PGs (proteoglycans). PGs play important roles in homeostasis at the cellular and tissue level because they function as cofactors in a variety of biological processes, including cell growth, and cell differentiation. These functions of PGs are mediated by interactions between GAG chains and bioactive proteins. In addition, diverse protein ligands recognize the specific saccharide sequences of the GAG side chains. Thus abnormal GAG biosynthesis causes disordered cellular function and various disease conditions. EXTL2 (exostosin-like 2) is one of a regulator to regulate in vivo GAG biosynthesis. Thus, loss of EXTL2 causes a change in amount and structure of GAGs, and the resulting aberrant GAGs are linked to pathological conditions. In this study, we have demonstrated that abnormal GAGs produced in the absence of EXTL2 induce inflammatory response and how they do so.

研究分野：glycobiology

キーワード：proteoglycan glycosaminoglycan

## 1. 研究開始当初の背景

硫酸化糖鎖が FGF2 などの増殖因子の補受容体として機能することは広く認識されているが、最近になり、硫酸化糖鎖が受容体に直接認識され、細胞内にシグナルを入力する例が報告されており、申請者らは、硫酸化糖鎖は実質的な情報をもつシグナル分子として働いているという考えを提案している。これまでに、申請者らは、硫酸化糖鎖の本質的な機能を理解するために、細胞内シグナル経路を調節する硫酸化糖鎖構造を明らかにし (Nadanaka, S. et al., (2008) *J. Biol. Chem.* 283, 27333; Nadanaka, S. et al., (2011) *J. Biol. Chem.* 286, 4199), その生合成機構について調べてきた (Nadanaka, S. and Kitagawa, H. (2008) *J. Biochem.* 144, 7; Okada, M., Nadanaka, S. et al., (2010) *Biochem. J.* 428, 463; Kitagawa, H., Tsutsumi, K., Ikegami-Kuzuhara, A., Nadanaka, S., et al. (2008) *J. Biol. Chem.* 283, 27438). 現在は、硫酸化糖鎖の合成異常が疾患の背景を形成することを明らかにすべく研究を進めている。申請者が所属する研究室では、硫酸化糖鎖の生合成に関与する複数の遺伝子のクローニングに成功しており、そのうちのひとつに *EXTL2* 遺伝子がある。この遺伝子は、がん抑制遺伝子に分類され、硫酸化糖鎖の生合成酵素遺伝子と高い相同性を示すことが明らかになっていたが、生体内での役割が全く解明されていなかった。そこで、この遺伝子の機能を調べるために、*EXTL2* 遺伝子欠損マウス(以下、ノックアウトマウス)を作製し解析した結果、硫酸化糖鎖の合成量が増加しており、*EXTL2* は硫酸化糖鎖の生合成を負に制御する調節因子であることが判明した (Nadanaka, S., et al. (2013) *J. Biol. Chem.* 288, 9321-9333). この制御機構を調べたところ、*EXTL2* は合成中の糖鎖に *N*-アセチルグルコサミン残基を付加し、糖鎖伸長を一時停止させていることがわかった (Nadanaka, S., et al. (2013) *J. Biol. Chem.* 288, 9321-9333). *EXTL2* による硫酸化糖鎖の合成調節機構の生理的重要性を明らかにしようと研究を進めていく過程で、炎症を誘導すると野生型よりノックアウトマウスで重篤な症状が現れることを発見した (Nadanaka, S., et al. (2013) *Biochem. J.* 454, 133-145; Nadanaka, S. and Kitagawa, H. (2014) *Matrix Biol.* 35, 18-24). また、炎症による損傷から治癒に向かう過程で、野生型マウスの硫酸化糖鎖の合成量は増加後、減少し定常レベルに戻るが、ノックアウトマウスでは硫酸化糖鎖量が増加したまま減少しないことがわかった (Nadanaka, S., et al. (2013) *Biochem. J.* 454, 133-145; Nadanaka, S. and Kitagawa, H. (2014) *Matrix Biol.* 35, 18-24). これらの結果から、*EXTL2* による硫酸化糖鎖の合成調節が

炎症状態を決める一因である可能性を考えた。そこで、硫酸化糖鎖と炎症の直接的な関連を示す報告例を調べた。硫酸化糖鎖はコアタンパク質に付加した“プロテオグリカン”として生体内で存在するが、ある種のプロテオグリカンが炎症時に血中に放出され、“Endogenous Danger Signal”として Toll-like 受容体や  $P_2X_7$  受容体に認識されることが報告されていた (Schaefer, L. et al. (2005) *J. Clin. Invest.* 115, 2223; Babelova, A. et al. (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 24035). しかしながら、硫酸化糖鎖の合成異常が炎症受容体の認識を変化させ、炎症シグナルを増強し、炎症の病態に重篤な影響を与える報告はない。本研究では、ノックアウトマウスを用いて、硫酸化糖鎖が炎症に関する情報をもつシグナル分子として働き、その合成異常がマクロファージの炎症シグナルに影響を与え、炎症性疾患の病態に関与することを明らかにする。

## 2. 研究の目的

硫酸化糖鎖の合成異常が、炎症シグナルを直接変化させ、炎症の病態に影響を与えることを示す。ノックアウトマウスにおける硫酸化糖鎖の合成異常が、どのプロテオグリカン上の硫酸化糖鎖に起きているのかについて調べる。さらに、硫酸化糖鎖の合成異常に関して、具体的にどう変化しているのか、硫酸化による微細修飾構造の変化や糖鎖長などについて検討し、疾患に関連した糖鎖の実体を明らかにする。ノックアウトマウスにおける炎症反応の亢進が、マクロファージの炎症シグナル経路の変化に起因することを確認するために、ノックアウトマウスおよび野生型マウスより腹腔マクロファージを単離し、炎症刺激に対する性質が変化していることを示す。硫酸化糖鎖が炎症シグナル受容体に直接認識されることを示すために、硫酸化糖鎖分解酵素や糖鎖付加部位を潰したプロテオグリカン変異体などを用いて調べる。硫酸化糖鎖を用いた創薬開発の可能性を検討するため、*EXTL2* 遺伝子の発現異常により現れたマクロファージの応答異常を、糖鎖が付加していないプロテオグリカンや硫酸化糖鎖の添加によって正常レベルに回復できるかどうか検討する。*EXTL2* 遺伝子の発現を制御する化合物を創薬へ応用する可能性を視野に入れ、*EXTL2* 遺伝子の発現が炎症刺激により変化するかどうか、その発現調節の機構について調べる。

## 3. 研究の方法

炎症に関連して変化する硫酸化糖鎖の実体解明-*EXTL2* 遺伝子の欠損によって影響を受けるプロテオグリカンと硫酸化糖鎖について解析する。

*EXTL2* 遺伝子欠損マクロファージの炎症シグナル経路についての解析-*EXTL2* 遺伝

子の欠損で影響を受ける炎症性シグナル経路を同定し、EXTL2 と炎症シグナルの関係性を明確にする。

硫酸化糖鎖による炎症シグナル経路の調節機構-硫酸化糖鎖が直接炎症シグナル経路を作動させることを、NF- $\kappa$ B レポーターシステムなどを用いて調べる。この系を利用して、糖鎖によるシグナル入力を遮断する阻害剤を探す。

#### 4. 研究成果

細胞表面や細胞外マトリクスに存在する硫酸化糖鎖が、受容体を介して細胞内にシグナルを入力し、細胞機能の制御に働く場合がある。この機能は、硫酸化糖鎖の量・糖鎖長・硫酸化構造によって調節されるため、硫酸化糖鎖の合成異常は細胞機能に影響を与え、疾患の原因となり得る。硫酸化糖鎖の合成異常を起こした遺伝子欠損マウスを解析した結果、炎症性疾患の病態が重篤に現れ、この現象がマクロファージの過剰な応答に起因する可能性が示唆された。本研究では、硫酸化糖鎖の変化が、Toll-like 受容体およびイオンチャネル型プリン(P2X)受容体からインフラマソームの活性化を経てサイトカインの産生を起こすマクロファージの炎症シグナル経路に与える影響を検討し、これに関連する“疾患糖鎖”を糖鎖構造・生合成の面から明らかにすることを目的としている。平成25年度は、四塩化炭素で誘導した急性肝炎における硫酸化糖鎖の変化を解析し、硫酸化糖鎖の合成異常が急性肝炎の病態にどのような影響を与えるかについて調べた。また、マクロファージに入力される炎症シグナルが硫酸化糖鎖の合成異常で影響を受けること、およびToll-like 受容体の活性化に関わる硫酸化糖鎖の構造的特徴を明らかにした。この結果は、自然免疫の恒常性を乱す硫酸化糖鎖の構造上の特徴が明らかになったことを意味し、炎症を基盤とした疾患の発症に関わる「疾患関連糖鎖」の実体を解明することができる可能性を示している。平成26年度は、内因性の Danger Signal として Toll-like 受容体に認識されるプロテオグリカン上の糖鎖に注目し、EXTL2 がプロテオグリカンに結合した Danger Signal として働く硫酸化糖鎖の合成を下方に制御することを示した。平成27年度は、硫酸化糖鎖によって活性化される炎症反応を阻害する低分子化合物のスクリーニングを行ったが、阻害活性をもつ候補化合物を得るには至らなかった。しかし、新たに構築した別のアクセシ系で、硫酸化糖鎖合成酵素遺伝子の発現を阻害する低分子化合物を見出すことができた。本年度の結果を基に、炎症を基盤とした疾患の発症に関わる「疾患関連糖鎖」の生合成制御機構を人為的に操作し、炎症を抑制することができる可能

性がある。

#### 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7件)

1) TFE3 is a bHLH-ZIP-type transcription factor that regulates the mammalian Golgi stress response.

Taniguchi, M., Nadanaka, S., Tanakura, S., Sawaguchi, S., Midori, S., Kawai, Y., Yamaguchi, S., Shimada, Y., Nakamura, Y., Matsumura, Y., Fujita, N., Araki, N., Yamamoto, M., Oku, M., Wakabayashi, S., Kitagawa, H., and Yoshida, H. *Cell Struct. Funct.* 査読有 40, 13-30, 2015

doi: 10.1247/csf.14015

2) Heparan sulfate containing unsubstituted glucosamine residues: biosynthesis and heparanase-inhibitory activity.

Nadanaka, S., Purunomo, E., Takeda, N., Tamura, J., and Kitagawa, H. *J. Biol. Chem.* 査読有 289, 15231-15243, 2014

doi: 10.1074/jbc.M113.545343

This article has been evaluated for 'Faculty of 1000 Medicine'

3) EXTL2 controls liver regeneration and aortic calcification through xylose kinase-dependent regulation of glycosaminoglycan biosynthesis.

Nadanaka, S., and Kitagawa, H. *Matrix Biol.* 査読有 35, 18-24, 2014

doi: 10.1016/j.matbio.2013.10.010

4) Glycosaminoglycan overproduction in the aorta increases aortic calcification in murine chronic kidney disease.

Purnomo, E., Emoto, N., Nugrahaningsih, D.A., Nakayama, K., Yagi, K., Heiden, S., Nadanaka, S., Kitagawa, H., and Hirata, K. *J. Am. Heart Assoc.* 査読有 2, e000405, 2013

doi: 10.1161/JAHA.113.000405

5) The antipsychotic olanzapine induces apoptosis in insulin-secreting pancreatic  $\beta$  cells by blocking PERK-mediated translational attenuation.

Ozasa, R., Okada, T., Nadanaka, S., Nagamine, T., Zyryanova, A., Harding, H., Ron, D., and Mori, K. *Cell Struct. Funct.* 査読有 38, 183-195, 2013 (Open Journal)

doi: 10.1247/csf.13012

6) Roles of EXTL2, a member of the EXT family of tumour suppressors, in liver injury and regeneration processes.

Nadanaka, S., Kagiya, S., and Kitagawa, H. *Biochem. J.* 査読有 454, 133-145, 2013

doi: 10.1042/BJ20130323

7) EXTL2, a member of the EXT family of tumor suppressors, controls glycosaminoglycan biosynthesis in a xylose kinase-dependent manner.

Nadanaka, S., Zhou, S., Kagiya, S., Shoji, N., Sugahara, K., Sugihara, K., Asano, M., and Kitagawa, H. *J. Biol. Chem.* 査読有 288, 9321-9333, 2013  
doi: 10.1074/jbc.M112.416909

〔学会発表〕(計 7 件)

1) 神経細胞の分化過程におけるコンドロイチン硫酸の合成制御機構

灘中里美, 山田英美, 中村侑, 谷口麻衣, 吉田秀郎, 北川裕之, BMB2015, 2015. 12. 1-4 (神戸ポートアイランド)

2) 神経細胞の分化過程におけるコンドロイチン硫酸の合成制御機構

灘中里美, 山田 英美, 中村 侑, 谷口麻衣, 吉田 秀郎, 北川裕之, 文部科学省科研費新学術領域研究「統合的神経機能の制御を標的とした糖鎖の作動原理解明」2015. 6. 25-27 (とりぎん文化会館)

3) ヘパラン硫酸の合成異常が神経発生と行動に与える影響についての解析

池田亜弥, 石野敦重, 尾ノ井孝一, 中村侑, 灘中里美, 北川裕之, 第62回日本生化学会近畿支部例会, 2015. 5. 16 (立命館大学びわこ・くさつキャンパス)

4) Dysregulated GAG Biosynthesis Affects Inhibitory Interneuron Proliferation During Neural Development and Causes Behavioral Disorders

Nadanaka, S. and Kitagawa, H. SFG Meeting Satellite Symposium II (2014) November 16 (Hawaii)

5) Heparan sulfate containing unsubstituted glucosamine residues: biosynthesis and heparanase-inhibitory activity.

Nadanaka, S., Purunomo, E., Takeda, N., Tamura, J., and Kitagawa, H. (2014) Joint Meeting of the Society for Glycobiology (SFG) and the Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR), November 16-19 (Hawaii)

6) 遊離グルコサミン残基を含むヘパラン硫酸—その生合成機構とヘパラーゼ阻害活性—

灘中里美, Eko Purunomo, 武田尚子, 田村純一, 北川裕之, 第33回日本糖質学会年会, 2014. 8. 10-12 (名古屋豊田講堂)

7) EXTL2 によるグリコサミノグリカン合成調節機構とその破綻による急性肝炎の重篤化

灘中里美, Shaobo Zhou, 鍵山正二, 庄司奈緒子, 菅原一幸, 杉浦一司, 浅野雅秀, 北川裕之, 第32回日本糖質学会年会, 2013. 8. 5-7 (大阪国際交流センター)

〔図書〕(計 2 件)

1) Handbook of advanced Glycoscience and Glycoengineering – 糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック～創薬・医療から食品開発まで～監修 秋吉一成 (株)NST, pp. 678, 2015

2) Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes

Taniguchi, N., Honke, K., Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., Angata (Eds) Springer; 2nd ed., pp. 1707, 2014 (2014/3/5)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称:「ヘパラーゼ阻害剤及びヘパラーゼ阻害剤のスクリーニング方法」

発明者: 北川裕之, 灘中里美, 田村純一

権利者: 神戸薬科大学・鳥取大学

種類: 特許

番号:【特願 2013-075157】

出願年月日: 2013-03-29

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

大学ホームページ内研究室サイト

[http://www.kobepharma-u.ac.jp/edrs/faculty\\_member\\_list/biochemistry.html](http://www.kobepharma-u.ac.jp/edrs/faculty_member_list/biochemistry.html)

研究室オリジナルホームページ

<http://www.kobepharma-u.ac.jp/biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

灘中里美 (Nadanaka Satomi)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 60378578

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

北川裕之 (Kitagawa Hiroyuki)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 40221915