

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460165

研究課題名(和文) 感染・化学物質に対する過剰な炎症応答の収束を目指した硫酸化糖鎖切断現象の機能解析

研究課題名(英文) Cleavage of sulfated glycan as a regulatory event for inflammatory responses to infection and chemical compounds

研究代表者

東 伸昭 (Higashi, Nobuaki)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40302616

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)：感染に伴う急性炎症はまれに全身に拡がり、最悪の場合は致命的な敗血症を引き起こす。多種類の炎症性メディエータ分子群が出揃った現在、これらメディエータの作用を増強する環境と、炎症の下流にあたる細胞外マトリックス構造の傷害機構の解明が急務である。ヘパラーゼはヘパラン硫酸の切断を介して基底膜構造の分解に関与するとともに、遊離型ヘパラン硫酸の産生を介して炎症性メディエータの産生と放出を促進する。本研究ではヘパラーゼを介した炎症調節機構に着眼し、硫酸化糖鎖の切断を介する炎症促進機構、ヘパラーゼ阻害物質による炎症疾患モデルの抑制効果、ヘパラーゼ自身の炎症性サイトカイン様作用、の3点を検討した。

研究成果の概要(英文)：Acute inflammation as a cause of infection occasionally expands to whole body, which gives rise to fatal systemic infection. Apart from previous approaches focusing on identification of critical mediators, our focus is on microenvironments that help a variety of mediators' action, also degrading process of extracellular matrices. Heparanase is an enzyme involved in basement membrane degradation as well as enhanced release of inflammatory mediators resulting from cleavage of heparan sulfate. Our goal is to elucidate how inflammatory reaction is regulated by cleavage of sulfated carbohydrates, also to suppress inflammation through inhibition of heparanase activity. We examined a novel regulatory mechanism of inflammation of via cleavage of heparin sulfate/heparin, therapeutic effect of a heparanase inhibitor on inflammatory diseases, and a novel proinflammatory cytokine-like action of heparanase.

研究分野：医歯薬学

キーワード：環境系薬学 感染 炎症 好中球 マスト細胞 細胞外マトリックス ヘパラーゼ ケモカイン

## 1. 研究開始当初の背景

感染や化学物質曝露を受けた宿主個体に生じる炎症は、病原体や化学物質の速やかな排除と適応免疫の成立のために必須の生体防御反応である。一方、感染や外傷に伴う敗血症、病原体の持続的な感染・化学物質の繰り返し曝露に伴う慢性炎症は、異所性・持続性を特徴としており、生体の制御可能な範囲を超えた過剰応答である。生体の破壊に繋がるこれら炎症の理解とその収束を目的に、炎症性サイトカイン・ケモカイン等発症に関わる生理活性物質群、さらに抑制性サイトカイン等緩解に関わる分子群について膨大な検討が進められ、炎症の成立と緩解における重要性が示されてきた。しかし、単独の生理活性物質の産生や機能の阻害によるこれらの炎症性疾患の制御は依然困難である。

硫酸化糖鎖（ヘパラン硫酸、ヘパリン）はグルコサミンとグルクロン酸の2糖繰り返し構造が部分的に硫酸修飾された、生体内で最も強い陰電荷を有する多糖高分子である。細胞外マトリックス、細胞表面に分布し、正電荷をもつ物質、例えばサイトカイン・ケモカイン類、Danger Associated Molecular Pattern (DAMP)タンパク質・細胞外マトリックス分子等と会合する。また一部のウイルス、病原体の細胞への感染の受容体となる場合も報告されている。この硫酸化糖鎖を切断するエンド型酵素がヘパラーゼであり、ほ乳類では唯一この酵素が同定されている。ヘパラーゼは基底膜など細胞外マトリックス中のヘパラン硫酸、顆粒内のヘパリン等の硫酸化糖鎖を基質として切断し、その結果、複数の生理活性物質の動態を変えると予想される。敗血症において硫酸化糖鎖は、発症（TLR4を介する炎症惹起、血管内皮細胞表面の糖鎖切断による浸潤促進）収束（ケモカイン排除による炎症抑制）の両面の作用が報告されており、局所性・全身性の炎症における硫酸化糖鎖の切断の有無とその役割を時間軸・空間軸に沿って整理・理解する必要がある。

## 2. 研究の目的

急性・慢性炎症や敗血症などの炎症疾患において、ヘパラーゼを介する硫酸化糖鎖の切断・放出が生じるか、酵素分子の機能阻害が炎症を抑制

するか検討する。特に、切断の結果生じると予想される基底膜の分解、サイトカイン・ケモカイン等の産生と放出に着目し、以下3点の解明を目的とする。

- (1) マスト細胞の硫酸化糖鎖の切断を介した炎症調節機構
- (2) 炎症部位への白血球細胞の浸潤におけるヘパラーゼの役割
- (3) ヘパラーゼの炎症性サイトカイン様活性

## 3. 研究の方法

### (1) マスト細胞の硫酸化糖鎖の切断を介した炎症調節機構

ヘパラーゼの発現によりマスト細胞からの起炎症性メディエータ放出が転写非依存的に増強される機構を、生体由来のマスト細胞を用いて検討した。腹腔から取得した細胞をサイトカイン SCF 存在下で長期培養することによって結合組織型マスト細胞と考えられる腹腔由来マスト細胞を調製した。この細胞に組換え体ヘパラーゼを導入し、硫酸化糖鎖の変化を検討した。また細胞をコラーゲンゲル内に包埋し、生理活性物質の放出を検討した。

### (2) 炎症部位への白血球細胞の浸潤におけるヘパラーゼの役割

感染に伴って生じる炎症として、背部空気嚢内に微生物由来成分（ホルミル化ペプチド fMLP）、もしくはカラギーナン投与による局所炎症モデル、腹腔内ゼイモザン投与による腹膜炎モデル、リポ多糖の静脈内投与による敗血症モデルを用いた。ヘパラーゼ阻害物質投与と群と対照群において、炎症局所や各臓器における単球・顆粒球の浸潤と炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を定量した。角膜由来内皮細胞が産生する細胞外マトリックスから<sup>35</sup>S標識基底膜を調製し、炎症性細胞によって生じる基底膜分解機構を検討した。

本実験で用いたヘパラーゼ活性阻害物質 heparastatin(SF4)は微生物科学研究所 安達勇光博士より恵与された。

### (3) ヘパラーゼの炎症性サイトカイン様活性の発見

ヘパラーゼの生理作用、特に炎症誘導作用の検討を行うにあたり、濃度・夾雑物のないことが明確である、組換え体ヘパラーゼを昆虫細胞が

ら調製した。活性を有しない前駆体相当組換え体 (form A)、活性を有する成熟体相当組換え体 (form B) を作製した。上皮細胞のモデルとして結腸癌細胞株 colon 26、colon 38 とヒト結腸癌細胞株を用いた。一部の実験では、stealth siRNA によるヘパラン硫酸生成に関わる遺伝子の発現抑制を介して細胞表面ヘパラン硫酸の発現を低下させ、ヘパラーゼのシグナル伝達におけるヘパラン硫酸の機能を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) マスト細胞の硫酸化糖鎖の切断を介した炎症調節機構

我々はマスト細胞の顆粒内で生じる硫酸化糖鎖ヘパリンの切断が炎症応答の調節に関与する可能性を以前に示したが、この検討には MST というマストサイトーマ培養細胞を用いていた。生体由来のマスト細胞を用いて、ヘパリンの切断がもたらす炎症応答の調節機構をさらに検討した。

腹腔細胞由来マスト細胞は顆粒内にヘパリンを含むが、未刺激状態では糖鎖切断酵素ヘパラーゼの発現が検出されなかった。この細胞にヘパラーゼタンパク質を導入したところ、顆粒内ヘパリンの切断に伴う顆粒内物質の細胞外マトリックスからの放出量増加を認めた。ヘパリン切断に依存する炎症応答の調節機構が生体由来のマスト細胞においても確認された。

マスト細胞から産生されヘパリンに親和性を有する他の分子としてサイトカイン MCP-1、IL-13 の細胞外マトリックスからの放出を検討したが、放出量には有意差が認められなかった。分泌顆粒内で事前に複合体を形成していることが放出量の調節に重要であると考えられるので、引き続きヘパリンの分子サイズが顆粒内物質の放出を調節するのか検討したい。成果をあげるには至らなかったが、腹腔由来マスト細胞、マストサイトーマ MST をマウス皮膚内に移植し、真皮の細胞外マトリックスにおける顆粒内物質の放出量を検討する実験系の構築を始めており、継続したい。

本成果は論文 (Biochem J 458(2): 291-299, 2014) で報告するとともに、多数の学会発表を行った。

##### (2) 炎症部位への白血球細胞の浸潤におけるヘパラーゼの役割

ヘパラーゼは基底膜ヘパラン硫酸プロテオグリカンの糖鎖部分を基質としてこれを切断することから、炎症性細胞が基底膜を越えて炎症部位に浸潤する際の鍵酵素であると予想される。この点を検証するため、マウス炎症モデルの炎症局所に直接ヘパラーゼ阻害物質を投与する薬理学アプローチによって、炎症の発症におけるヘパラーゼの関与を検討した。

heparastatin(SF4)投与群においては、単球浸潤した単球・顆粒球の細胞数がともに有意に低下したが、この低下は腹膜炎モデルでは認められなかった。空気嚢炎症モデルにおいて嚢内局所に産生されたケモカイン量を検討したところ、好中球を標的とするケモカイン KC、MIP-2 については阻害剤投与群による抑制は観察されなかった。一方、炎症性サイトカイン TNF、単球を標的とするケモカイン MCP-1 の産生量は有意に低かった。少なくとも好中球については、heparastatin(SF4) がケモカイン産生を介するのではなく、浸潤過程を直接抑制している可能性が高いと考えた。

in vivo 浸潤の定量化は困難であるので、heparastatin(SF4)による細胞浸潤の抑制、基底膜ヘパラン硫酸の分解抑制を in vitro 試験で検討したところ、阻害物質が細胞の動きに影響を与えずに細胞浸潤を抑制すること、炎症性細胞の可溶化物による基底膜ヘパラン硫酸の分解をほぼ完全に抑制することが示された。heparastatin(SF4)による in vivo 浸潤の阻害効果の作用点は基底膜分解にあることが強く示唆された。

本成果は論文 (Int Immunopharmacol, 35: 15-21, 2016) で報告するとともに、多数の学会発表を行った。

感染に伴う敗血症モデルを題材に、ヘパラーゼが局所における炎症性サイトカイン産生、白血球細胞の浸潤に関与するか検討した。マウス全身のヘパラーゼを2時間程度持続して抑制する条件を設定し、リポ多糖投与時におけるヘパラーゼの発現上昇と臓器への白血球の浸潤を検討したが、阻害物質の投与による差は認められなかった。期間中に別研究グループからの成果として、リポ多糖投与後に臓器におけるヘパラーゼの活性上昇、血中ヘパラン硫酸量の増加が報告され、ヘパラン硫酸自体が敗血症ショックのマーカーとなり得る可能性が指摘された。我々の検討でヘパラーゼの関与が認められなかった理由は明らかでは

ない。リポ多糖投与によりヘパラーゼの発現上昇が認められる局所を同定し、この局所をねらった阻害物質の投与により、敗血症におけるヘパラン硫酸とヘパラーゼの関与を再検討したい。

### (3) ヘパラーゼの炎症性サイトカイン様活性の発見

ヘパラーゼが基底膜や細胞表面のヘパラン硫酸を分解するのみならず、それ自身が炎症性シグナルの伝達に関与する可能性を検討した。主に結腸上皮細胞に由来する癌細胞株を用い、ヘパラーゼのサイトカイン様作用を検討した。

マウス結腸癌細胞株である colon 26、colon 38 を組換え体ヘパラーゼで直接刺激し、細胞の培養上清中に放出されるサイトカイン量、酵素 (MMP2、MMP9) の産生を検討した。調べたサイトカインのうち、特に炎症性ケモカイン MCP-1、KC と MMP9 の放出が有意に上昇することを見出した。前駆体タンパク質 form A は成熟型タンパク質 form B よりも強くケモカイン産生を誘導したことから、heparastatin(SF4)を添加してもケモカイン産生抑制が認められなかったことから、ケモカイン産生はヘパラーゼの酵素活性に依存しないことが示された。ヘパラン硫酸生合成酵素遺伝子である Ext1 の発現抑制に伴いケモカイン産生が低下したことから、ヘパラーゼと細胞表面のヘパラン硫酸への結合がケモカイン産生に関与することが示された。

本成果は論文(Biochem Biophys Res Commun, 469(4):878-883, 2016)で報告するとともに、多数の学会発表を行った。

本研究を通じ、ヘパラーゼは、顆粒内硫酸化糖鎖の切断と低分子化、基底膜ヘパラン硫酸の切断、さらに炎症性サイトカイン様の作用、という少なくとも3通りの現象を介して、炎症の開始と増幅に関与することを示した。heparastatin(SF4)もしくは同機能をもつヘパラーゼ阻害物質を投与することにより、少なくとも一部の炎症疾患の症状が抑制されることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

1. Sue M, Higashi N\*(corresponding author), Shida H, Kogane Y, Nishimura Y, Adachi H,

Kolaczowska E, Kepka M, Nakajima M, Irimura T.

An iminosugar-based heparanase inhibitor heparastatin (SF4) suppresses infiltration of neutrophils and monocytes into inflamed dorsal air pouches.

Int. Immunopharmacol., 35: 15-21, 2016

2. Tsunekawa N, Higashi N\*(corresponding author), Kogane Y, Waki M, Shida H, Nishimura Y, Adachi H, Nakajima M, Irimura T.

Heparanase augments inflammatory chemokine production from colorectal carcinoma cell lines.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 469(4):878-883, 2016

3. Xin X, Akasaka-Manyu K, Manyu H, Furukawa J, Kuwahara N, Okada K, Tsumoto H, Higashi N, Kato R, Shinohara Y, Irimura T, Endo T.

POMGNT1 Is Glycosylated by Mucin-Type O-Glycans.

Biol. Pharm. Bull., 38(9):1389-1394, 2015

4. Higashi N, Waki M, Sue M, Kogane Y, Shida H, Tsunekawa N, Hasan A, Sato T, Kitahara A, Kasaoka K, Hayakawa Y, Nakajima M, Irimura T.

Heparanase-mediated cleavage of macromolecular heparin accelerates release of granular components of mast cells from extracellular matrices.

Biochem. J., 458(2): 291-299, 2014

5. Kogane Y, Higashi N\*(corresponding author), Nishimura Y, Nakajima M, Irimura T.

Heparanase Downmodulation in the Process of Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Mouse Mammary Epithelial Cells.

J. Glycomics Lipidomics, 3: 107, 2013

[学会発表] (計18件)

1. 東 伸昭、中島元夫、入村達郎

顆粒内糖鎖ヘパリンの切断酵素ヘパラーゼはマスト細胞に取り込まれて機能する

日本薬学会第137年会(2017年3月24~27日: 仙台国際センター、仙台) 3/26 ポスター発表

2. 東 伸昭 ( 招待講演 )

マスト細胞が分泌顆粒内に保持する硫酸化糖鎖とヘパラーゼ

Glycoimmunology 2017( 2017 年 1 月 25~26 日 : 国立大学法人東京医科歯科大学、東京 ) 1/26 口頭発表

3. 東 伸昭 ( 招待講演 )

ヘパラーゼによる硫酸化糖鎖の切断と免疫細胞の機能調節

GlycoTokyo2016 ( 2016 年 11 月 19 日 : 国立大学法人東京工業大学大岡山キャンパス、東京 ) 11/19 口頭発表

4. 東 伸昭、須江真由美、志田拓顕、小金裕介、西村吉雄、安達勇光、Elzbieta Kolaczowska、Magdalena Kepka、中島元夫、入村達郎

ヘパラーゼ阻害物質 heparastatin(SF4) は炎症細胞の浸潤と基底膜ヘパラン硫酸分解を抑制する

第 35 回日本糖質学会年会 ( 2016 年 9 月 1~3 日 : 高知市文化プラザかるぼーと、高知 ) 9/3 ポスター発表

5. 東 伸昭、中島元夫、入村達郎

ヘパラーゼは大腸癌細胞のケモカイン産生を増強する

第 25 回日本がん転移学会学術集会 ( 2016 年 7 月 21~22 日 : 米子コンベンションセンター、米子 ) 7/21 ポスター発表

6. Nobuaki Higashi, Mayumi Sue, Hiroaki Shida, Yusuke Kogane, Yoshio Nishimura, Hayamitsu Adachi, Elzbieta Kolaczowska, Magdalena Kepka, Motowo Nakajima, Tatsuro Irimura.

"An Iminosugar-based heparanase inhibitor heparastatin (SF4) suppresses infiltration of neutrophils and monocytes into inflamed dorsal air pouches."

The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages ( 2016 年 6 月 4~5 日 : ソラシティ・カンファレンスセンター、東京 ) 6/4 ポスター発表

7. 東 伸昭、須江真由美、志田拓顕、西村吉雄、安達勇光、中島元夫、入村達郎

「ヘパラーゼ阻害物質は好中球の浸潤と基底膜ヘパラン硫酸分解を抑制する」

日本薬学会第 136 年会 ( 2016 年 3 月 26~29 日 :

パシフィコ横浜、横浜 ) 3/29 ポスター発表

8. 東 伸昭 ( 招待講演 )

「細胞外マトリックスの場で免疫細胞の機能を調節するヘパラーゼ」

Glyco-immunology 2015( 2015 年 8 月 19~20 日 : 国立大学法人東京医科歯科大学、東京 ) 8/20 口頭発表

9. 東 伸昭、恒川直輝、中島元夫、入村達郎

「ヘパラーゼはヘパラン硫酸を介して大腸癌細胞株のケモカイン産生を亢進する」

第 34 回日本糖質学会年会 ( 2015 年 7 月 31 日~8 月 2 日 : 国立大学法人東京大学、東京 ) 8/2 ポスター発表

10. Nobuaki Higashi, Naoki Tsunekawa, Yusuke Kogane, Yoshio Nishimura, Hayamitsu Adachi, Motowo Nakajima, Tatsuro Irimura.

"Heparanase augments inflammatory chemokine production in colorectal carcinoma cell lines."

International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015 ( 2015 年 7 月 9~10 日 : 国立大学法人東京大学、東京 ) 7/9 ポスター発表

11. Nobuaki Higashi, Tatsuro Irimura.

"Heparanase-mediated cleavage of macromolecular heparin accelerates release of granular components of mouse peritoneal cell-derived mast cells."

第 43 回日本免疫学会学術集会 ( 2014 年 12 月 11 日 : 国立京都国際会館、京都 ) 12/11 ポスター発表

12. 東 伸昭、中島元夫、入村達郎

「マスト細胞分泌顆粒内ヘパリンの切断は細胞外マトリックスからの生理活性物質の放出を促進する」

第 33 回日本糖質学会年会 ( 2014 年 8 月 10~12 日 : 国立大学法人名古屋大学、名古屋 ) 8/11 ポスター発表

13. 東 伸昭、恒川直輝、中島元夫、入村達郎

「結腸がんの転移微小環境におけるヘパラーゼ : ヘパラーゼによる転移関連分子の発現誘導とその抑制の試み」

第 23 回日本がん転移学会学術集会 ( 2014 年 7 月 10~11 日 : 金沢市文化ホール・金沢ニューグランドホテル、金沢 ) 7/10 ポスター発表

14. Naoki Tsunekawa, Nobuaki Higashi,  
Tatsuro Irimura.  
"Heparanase in metastatic microenvironment  
of colon cancer: a potential inducer of  
chemokine production."  
第 42 回日本免疫学会学術集会 (2013 年 12 月  
11~13 日: 幕張メッセ、千葉) 12/11 口頭/ポスタ  
ー発表
15. 恒川直輝、東 伸昭、中島元夫、入村達郎  
「結腸がんの転移微小環境におけるヘパラーゼ  
の関与」  
第 18 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会  
(2013 年 8 月 16~17 日: 千里ライフサイエンス  
センター、大阪) 8/16 ポスター発表
16. 東 伸昭、恒川直輝、中島元夫、入村達郎  
「ヘパラーゼは結腸がん細胞株に作用し転移関  
連分子の発現を誘導する」  
第 32 回日本糖質学会年会 (2013 年 8 月 5~7 日:  
大阪国際交流センター、大阪) 8/5 口頭発表
17. 恒川直輝、東 伸昭、中島元夫、入村達郎  
「結腸がんの転移微小環境におけるヘパラー  
ゼ: ケモカイン産生誘導における役割」  
第 22 回日本がん転移学会学術集会 (2013 年 7 月  
11~12 日: ホテルブエナビスタ、松本) 7/11 口頭  
発表
18. 恒川直輝 ( 「学生優秀発表者賞」を受賞 )  
東 伸昭、中島元夫、入村達郎  
「結腸がんの転移微小環境におけるヘパラー  
ゼ: ケモカインの発現誘導における役割」  
第 14 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム  
(2013 年 6 月 1 日: 長井記念ホール、東京) 6/1  
口頭発表

[図書・総説] (計 4 件)

1. 東 伸昭  
上皮細胞層の恒常性維持におけるヘパラーゼと  
ヘパラーゼの役割  
アレルギーの臨床 37:300-302, 2017
2. 東 伸昭  
糖鎖切断酵素ヘパラーゼは免疫細胞の移動ツ  
ールである  
アレルギーの臨床 35:1368-1371, 2015
3. 東 伸昭  
硫酸化糖鎖ヘパリンと糖鎖切断酵素ヘパラーゼ  
はマスト細胞の機能を変える

アレルギーの臨床 35:1169-1173, 2015

4. 東 伸昭  
免疫応答・炎症を調節するヘパラーゼ・ヘパ  
リンとヘパラーゼ  
「糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック」  
p.113-116  
(監修 秋吉一成、エヌティーエス、2015 年)

[産業財産権] (計 0 件)

[その他] 特になし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

東 伸昭  
(東京大学・大学院薬学系研究科・准教授(2013.4  
から 2016.9 まで)、星薬科大学・薬学部・教授  
(2016.10 から 2017.3 まで))  
研究者番号 40302616

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし