

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860535

研究課題名(和文) 制御性糖鎖による新しい炎症性腸疾患の病態解明

研究課題名(英文) Pathophysiological role of regulatory oligosaccharides in inflammatory bowel disease

研究代表者

新崎 信一郎 (Shinzaki, Shinichiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60546860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：原因不明の難治性疾患である炎症性腸疾患の免疫担当細胞表面に発現する糖鎖に着目し、炎症を制御する糖鎖の探索およびその機能解析を行った。その結果、N-アセチルグルコサミン転移酵素V(GnT-V)の強制発現マウスにおいてマクロファージの機能不全を介して腸炎の増悪を認めること、また1,6-フコース転移酵素(FUT8)の欠損マウスでは腸炎の改善を認め、T細胞受容体を介したT細胞の活性化抑制を介し腸炎改善に関わることが明らかとなった。これらの成果は糖鎖による腸炎制御の可能性を示す知見と考える。

研究成果の概要(英文)：In the present study we focused on the oligosaccharides on immune cells of patients with inflammatory bowel disease, and investigated the pathophysiological role of immunoregulatory oligosaccharides for colitis. We revealed that overexpression of N-Acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) exacerbated murine experimental colitis by inducing macrophage dysfunction. We also found using 1-6 fucosyltransferase (FUT8) deficient mice that core fucosylation of T-cell receptor is required for T-cell signaling and production of inflammatory cytokines and induction of colitis in mice. These results suggest the possibility of regulating colitis by oligosaccharides.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：制御性糖鎖 炎症性腸疾患 腸管免疫 T細胞 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

原因不明の難治性疾患である炎症性腸疾患の免疫担当細胞表面に発現する**糖鎖に着目し、抗炎症作用を持つ制御性糖鎖の探索**、および糖鎖に結合するタンパク質の炎症抑制への関与について基礎的検討を行うとともに、臨床応用を目指し、糖鎖異常と治療効果、疾患予後との関係を明らかにする。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患は大きくクローン病と潰瘍性大腸炎に大別される、腸管に慢性・再発性の炎症を引き起こす原因不明の難治性疾患である。本邦での患者数は増加の一途をたどり、人口の0.1%強、約14万人が炎症性腸疾患患者として登録されている。若年・青年層に多い社会的損失の大きい疾患であるとともに、長期的には腸管悪性腫瘍の発症リスクが増すと報告され、その病態を解明し効果的な治療法を開発することは急務な課題である。

糖鎖は蛋白質の翻訳後修飾をなす重要な生体分子のひとつであり、核酸、蛋白質に次ぐ第3の鎖であるとされる。炎症性腸疾患の原因の一つとして、免疫学的異常が推察されているが、近年の糖鎖解析技術の進歩により、自己免疫疾患や悪性腫瘍など多くの疾患に糖鎖が関与することが明らかになってきた。

最近、申請者は、炎症性腸疾患患者の免疫グロブリンIgGに結合する糖鎖において、健常者に比してガラクトースが著明に減少することを見いだした(Am J Gastroenterol. 2008; 103(5):1173-81, Inflamm Bowel Dis. 2013; 19 (2), 321-331)。さらに、ガラクトース結合に関わる酵素であるβ-1,4-ガラクトース転移酵素-I (B4galTI)を欠損したマウスでは、炎症性腸疾患患者と類似の糖鎖異常が認められ、野生型マウスに比べて実験腸炎が改善することを明らかにした。ガラクトース欠損IgGそのものに腸炎抑制効果はなく、細胞表面の糖鎖変異に伴うポリラクトサミン鎖を介したB細胞とマクロファージの直接的な相互作用の結果、マクロファージのIL-10産生が増加することが、腸炎の軽減に寄与することを見いだした(Gastroenterology. 2012;142(5):1172-82)。

IgGに結合する糖鎖に関するこれまでの検討によると、シアル酸やフコースなどの糖鎖が結合する方が、炎症に対して保護的に作用することが、動物モデルでの検討で報告されている(Science. 2008;320:373-6, J Biol Chem. 2003;278(5):3466-73)。一方、細胞表面に発現する糖鎖の中で、ポリラクトサミンはガレクチンと呼ばれるレクチンによって架橋され、細胞機能に影響を及ぼすことが報

告されている(Nature. 2001;409(6821):733-9。)が、その詳細な機序は明らかになっていない。また、ガレクチン-1がマウス実験腸炎を抑制するという報告(Gastroenterology. 2003; 124(5):1381-94。)や、潰瘍性大腸炎の術後回腸囊炎においてガレクチン-3の発現が低下するという報告(Pathol Res Pract. 2009; 205(8): 551-8。)など、ガレクチンファミリーの抗炎症作用に関する報告が近年増えてきているが、その機構についてはいまだ不明な点が多い。このため、本研究ではこれまでの研究成果を発展させ、炎症を制御する「**制御性糖鎖**」に着目し、腸管炎症に及ぼす影響を詳細に検討することで、**制御性糖鎖による炎症性腸疾患の新しい病態解明を目指す。**

また、細胞表面のタンパク質に結合する糖鎖の変化が炎症性腸疾患に及ぼす影響については、これまでにほとんど検討されていない。炎症によって変化する糖鎖は多くあり、糖鎖変化により炎症性腸疾患の発症や維持に影響を及ぼしている可能性がある。本研究ではこれらの可能性を検討するべく、**炎症性腸疾患患者の免疫担当細胞の糖鎖構造や、糖鎖変化に影響を及ぼす因子を明らかにすること**で、糖鎖に着目した炎症性腸疾患治療の可能性を追求する。

3. 研究の方法

1) 糖鎖改変モデルにおける免疫担当細胞の機能解析

申請者はこれまでに、β-1,4-ガラクトース転移酵素-I (B4GalTI)欠損マウスにおいて、B細胞やマクロファージにおけるポリラクトサミン鎖の発現が増加し、腸炎の軽減に寄与していると報告した(Gastroenterology. 2012; 142(5):1172-82。)が、ポリラクトサミン以外にも抗炎症にかかわると考えられる糖鎖の存在が示唆されている。また、申請者の予備検討では、別の糖鎖改変マウスであるフコース転移酵素(FUT8)欠損マウスにおいても、ポリラクトサミン鎖の増加が示唆され、実験腸炎モデルが改善傾向を示す。そこで、制御性糖鎖が腸炎に対し抑制的に働く機構を、糖鎖改変モデルや実験腸炎マウスモデルを用いて明らかにした。

2) 炎症性腸疾患患者における制御性糖鎖と臨床経過との関連

炎症性腸疾患患者の末梢血単核球や内視鏡時の生検組織を採取し、患者由来免疫担当細胞における糖鎖発現を、レクチンプロットやフローサイトメトリー、免疫組織染色等で検討するとともに、腸炎制御に関わる蛋白質の細胞内局在を免疫電子顕微鏡法にて解析した。

4 . 研究成果

B1,6-*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を転移する酵素である *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 V(GnT-V)の強制発現マウスにおいて、マクロファージの機能不全を介して、急性腸炎モデルの増悪を認めるとともに、慢性腸炎モデルにおけるおよび腸炎関連腫瘍が増悪することを見出した。この成果につき学会発表を行うとともに、論文発表を行った。(Shinzaki S, et al. J Gastroenterol. 2016)

また、 α 1,6-フコース(コアフコース)は腸炎モデルマウスの腸管炎症部T細胞に強く発現しており、また、炎症性腸疾患患者の腸管炎症部T細胞において、非炎症部に比べてコアフコースの発現が亢進していた。さらに、コアフコースを転移する α 1,6-フコース転移酵素(FUT8)の欠損マウスにおいて実験腸炎の軽減がみられ、T細胞におけるT細胞受容体の脂質ラフトへの移行が低下することで、T細胞の活性化抑制を介し腸炎改善に関わることを見出した。これらの成果についても学会発表をおこなうとともに、論文発表を行った。(Fujii H, et al. Gastroenterology. in press)

以上の結果より、今回の研究により、B1,6-GlcNAc やコアフコースが、腸炎を制御する糖鎖としての役割を持つことが示唆された。

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は下線)

[雑誌論文](計 9 件)

1. Shiraishi E, Iijima H, Shinzaki S (14人中3番目), Takehara T, et al. Vitamin K deficiency leads to exacerbation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis. J gastroenterol. 2016;51(4):346-56. 査読有
2. Miyoshi E, Shinzaki S (6人中2番目), Takehara T, et al. Role of aberrant IgG glycosylation in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Proteomics Clin Appl. 2016;10(4):384-90. 査読有
3. Shinzaki S (17人中1番目), Ishii M, Iijima H, Miyoshi E, et al. N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) exacerbates murine colitis with macrophage dysfunction and

enhances colitic tumorigenesis. J Gastroenterol. 2016;51(4):357-69. 査読有

4. Fujii H, Shinzaki S (16人中2番目), Iijima H, Miyoshi E, et al. Core Fucosylation on T cells, Required for Activation of T-cell Receptor Signaling and Induction of Colitis in Mice, is Increased in Patients with Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology. in press. 査読有
5. Azuma K, Shinzaki S (8人中2番目), Miyoshi E, et al. Twin studies on the effect of genetic factors on serum agalactosyl immunoglobulin G levels. Biomed Rep. 2014; 2(2): 213-216. 査読有
6. Asazawa H, Kamada Y, Shinzaki S (11人中5番目), Miyoshi E, et al. Clin Chem Lab Med. 2015; 53(1): 95-102. 査読有
7. Kamada Y, Shinzaki S (12人中9番目), Miyoshi E, et al. N-Acetylglucosaminyltransferase V exacerbates concanavalin-A induced hepatitis in mice. Mol Med Rep. 2015; 11(5):3573-84. 査読有
8. Hiyama S, Iijima H, Shinzaki S (21人中3番目), Takehara T, et al. Peyer's Patches Play a Protective Role in Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-induced Enteropathy in Mice. Inflamm Bowel Dis. 2014. 20(5): 790-9. 査読有
9. Mukai A, Iijima H, Shinzaki S (17人中5番目), Takehara T, et al. J Gastroenterol. 2014. 49(12):1524-35. 査読有

[学会発表](計 6 件)

1. Fujii H, Shinzaki S (10人中2番目), Iijima H, Miyoshi E, et al. Core fucosylation regulates T-cell activation and ameliorates murine colitis. Digestive Disease Week 2015. 2015年5月16日~19日, アメリカ・ワシントンDC
2. 新崎信一郎(6人中1番目), 飯島英樹, 三善英知, 他. 糖鎖変化が炎症性腸疾患の病態に及ぼす影響とバイオマーカーとしての可能性. 第34回日本糖質学会年会 2015年7月31日~8月1日, 東京大学・安田記念講堂

3. 若松可奈, 藤井宏修, 新崎信一郎 (10人中3番目), 三善英知, 他. マクロファージのTLR4シグナルにおけるコアフコースの関与. 第88回日本生化学会大会 2015年12月1日~4日, 神戸ポートアイランド
4. 藤井宏修, 新崎信一郎 (9人中2番目), 飯島英樹, 三善英知, 他. 腸炎関連発癌におけるコアフコースの関与. 第74回日本癌学会学術集会 2015年10月8日~10日, 名古屋国際会議場
5. Shinzaki S (11人中1番目), Iijima H, Takehara T, et al. N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) exacerbates murine experimental colitis with macrophage dysfunction and enhances colitis-associated tumorigenesis. The 2nd annual meeting of Asian Organization of Crohn's and Colitis, 2014年6月19日~21日, 韓国・ソウル
6. 若松可奈, 新崎信一郎 (9人中3番目), 三善英知, 他. フコシル化の低下は炎症性腸疾患における免疫抑制シグナルを増強する. 第61回日本臨床検査医学会学術集会 2014年11月19日~22日, 福岡国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新崎 信一郎 (SHINZAKI SHINICHIRO)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 60546860

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

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

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/>