

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462470

研究課題名(和文)ウリナスタチンの糖鎖工学に基づく早産治療薬の開発

研究課題名(英文) Glycotechnological development of a drug derived from urinastatin for the inhibition of premature delivery

研究代表者

柿崎 育子 (Kakizaki, Ikuko)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80302024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：早産の治療薬として用いられているウリナスタチンのコンドロイチン硫酸をヒアルロン酸に組み換えたヒアルロン酸ハイブリッドウリナスタチンを作製した。この分子のタンパク質分解酵素トリプシン、プラスミン、エラスターゼ、糖鎖加水分解酵素ヒアルロニダーゼに対する阻害効果は、糖鎖欠損ウリナスタチンよりも大きく、天然のウリナスタチンと同等またはわずかに小さく、糖鎖とその硫酸化度の重要性が示された。子宮由来の培養細胞を用いた炎症のモデルにおける抗炎症作用も天然型と同程度かわずかに低いことが明らかとなった。しかし、生体膜の外側に多く存在するリン脂質との引力相互作用は天然のウリナスタチンより大きいことが示された。

研究成果の概要(英文)：The chondroitin sulfate chain of urinastatin, which is used as an anti-inflammatory medicine to inhibit premature delivery, was remodeled to hyaluronan to create hyaluronan hybrid urinastatin. Hyaluronan hybrid urinastatin inhibited protease (trypsin, plasmin, and elastase) and glycosidase (hyaluronidase) activity. Inhibition of the hyaluronan hybrid urinastatin toward the enzymes was similar though slightly weaker than the native urinastatin but stronger than the urinastatin without chondroitin sulfate chain nor hyaluronan, indicating the importance of the glycosaminoglycan chain and its sulfation. Further, experiments using cultured uterine cells showed that anti-inflammatory effects of the hyaluronan hybrid urinastatin were also similar to the native urinastatin. However, attractive interaction between hyaluronan hybrid urinastatin and phospholipid, abundant in the outer layer of the plasma membrane, was stronger than that of native urinastatin.

研究分野：糖鎖工学

キーワード：ウリナスタチン ヒアルロン酸 プロテオグリカン 糖鎖工学 早産

1. 研究開始当初の背景

新生児の死亡や障害の原因となり得る早産は制御が難しい深刻な問題である。

ウリナスタチン(尿中トリプシンインヒター、UTI、ピクニン)は、1)炎症性サイトカインの誘導抑制、2)炎症時に高値を示すプロテアーゼ等の各種酵素の阻害、3)子宮収縮の抑制等の作用に基づき、早産に対する院内治療薬(膣座剤)として使用されている。サイトカインや酵素が関与する情報伝達の複数の箇所にウリナスタチンが作用し、子宮頸部の熟化を複雑な機序で調節する可能性がある。

ウリナスタチンは、1本のコアとなるタンパク質のセリン残基に、糖鎖成分として1本の低硫酸化コンドロイチン硫酸鎖が結合したシンプルな構造のプロテオグリカンである。分子の30%近くを占めるコンドロイチン硫酸鎖の構造に基づく分子全体の本来の機能は充分には明らかにされていない。

当研究グループは、プロテオグリカンのコアタンパク部分はそのままに、結合するコンドロイチン硫酸鎖部分を酵素的に組み換える技術を開発した(*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 2002)。この方法により、天然のウリナスタチンのコンドロイチン硫酸鎖をヒアルロン酸等の各種グリコサミノグリカン糖鎖に組み換えることに成功している(特許第5152777号)。また、固定化酵素を用いた組み換えシステムの開発により、酵素の混入がない糖鎖組み換えウリナスタチンを高収率で得ることが可能となった(特許第5470612号)。糖鎖を組み換えたウリナスタチンの合成例は国内外で他に無い。

2. 研究の目的

上記背景とプロテオグリカンの糖鎖工学技術に関するこれまでの研究成果をもとに、本研究では、糖鎖組み換えウリナスタチンの新規治療薬への応用を目指し、機能解析実験を行い、天然型と比較した。以下の項目を検討することを目的とした。

1) 熟化抑制作用について

子宮頸部熟化の過程に関わる各種のサイトカインや酵素に及ぼす影響と細胞外マトリックス分子の変化を調べる。

2) 細胞膜への作用について

細胞膜の構成成分との相互作用を調べる。

3) 相互作用するタンパク質分子について

子宮由来の培養細胞や、ウマ羊水やウマ羊膜抽出物を用いて、ウリナスタチン結合タンパク質、レセプターなどとの相互作用に違いが生じるかを調べる。

3. 研究の方法

1) 糖鎖組み換えウリナスタチンの作製

ウリナスタチンの糖鎖(低硫酸化コンドロイチン硫酸)をヒアルロン酸に組み換えたウリナスタチンは、ウシ精巢性ヒアルロ

ニダーゼの加水分解反応と糖転移反応を用いて作製した。加水分解反応によって得られた橋渡し構造を残してコンドロイチン硫酸鎖を分解した糖鎖欠損ウリナスタチンをアクセプターとして、ヒアルロン酸をドナーに用いた糖転移反応により、ヒアルロン酸ハイブリッドウリナスタチンを作製した。糖鎖組み換えウリナスタチンの糖鎖構造は、糖鎖構造に特異的な酵素、高速液体クロマトグラフィー等を用いて分析した。

2) 糖鎖組み換えウリナスタチンとヒアルロン酸結合タンパク質との結合性の解析

ヒアルロン酸結合タンパク質(HABP)との結合性は、western blotting 様の方法で、抗体の代わりにビオチン化 HABP を用いることにより検出した。

3) 子宮頸部熟化や炎症に関わる酵素に及ぼす糖鎖組み換えウリナスタチンの影響

子宮頸部の熟化は細胞外マトリックスの変化である。この現象に関与する可能性があるタンパク質分解酵素(トリプシン、プラスミン、エラスターゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ MMPs)、糖鎖加水分解酵素(ヒアルロニダーゼ)、および熟化の刺激となるプロスタグランジンの産生に関わる脂質分解酵素(ホスホリパーゼ A2)等に及ぼす各種ウリナスタチンの阻害効果を調べた。酵素活性は、各々の酵素に特異的な基質(標識または非標識)を用い、分解産物の蛍光や吸光度の測定、あるいは高速液体クロマトグラフィーでの分析により評価した。

4) 子宮頸部熟化に関わるサイトカインに及ぼす糖鎖組み換えウリナスタチンの影響

擬似的な熟化を誘導するような刺激としてリポ多糖を添加して培養した子宮組織由来の細胞において、炎症の指標となるサイトカイン(IL-8, IL-1 β 他)や細胞外マトリックス関連分子の代謝酵素(ヒアルロン酸合成酵素 HASs, ヒアルロン酸分解酵素 HYALs, MMPs)、細胞外マトリックス分子(ヒアルロン酸他)の変動をリアルタイム PCR や ELISA 法による定量によって調べた。

5) 細胞外マトリックス分子に及ぼす糖鎖組み換えウリナスタチンの影響

子宮組織由来の細胞をリポ多糖と糖鎖組み換えウリナスタチン存在下で培養し、子宮頸部の熟化の際に劇的に増加する細胞外マトリックス分子のヒアルロン酸の量およびサイズの変化を調べた。ヒアルロン酸は、ヒアルロン酸に特異的に結合するタンパク質(HABP)を用いた ELISA 様の方法と高速液体クロマトグラフィーとを組み合わせて分析した。

6) 細胞膜を構成するリン脂質と糖鎖組み換えウリナスタチンとの相互作用の評価

細胞膜を構成する特定のリン脂質から成る単分子膜のミセルを構築し、これと糖

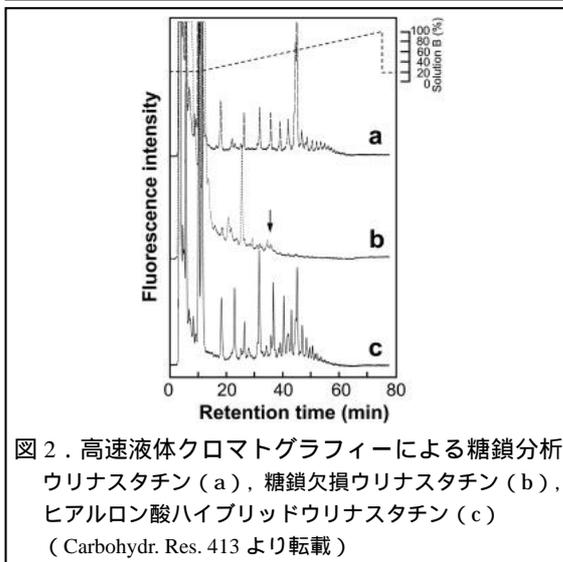
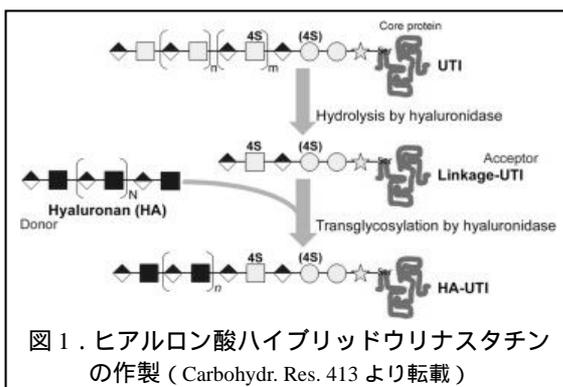
鎖組み換えウリナスタチンとの相互作用を生物物理学的に解析した (Yanagisawa, et al., *Soft Matter*, 9, 2013に報告された方法)。

7) 糖鎖組み換えウリナスタチンと相互作用するタンパク質の探索

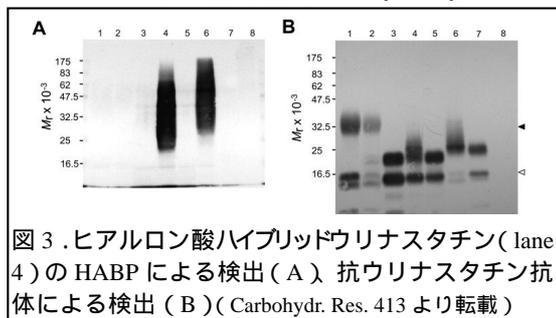
子宮組織由来の培養細胞抽出物や膜画分、あるいはウマ羊膜、ウマ羊水中に含まれるウリナスタチン結合分子の探索を行った。天然のウリナスタチン、糖鎖欠損ウリナスタチン、あるいはヒアルロン酸ハイブリッドウリナスタチンをそれぞれ固定した樹脂を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行い、その吸着画分、非吸着画分に含まれるタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動で比較した。また、上記サンプルと各種ウリナスタチンを混合してインキュベートしたのち、会合条件下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、そのパターンを比較した。

4. 研究成果

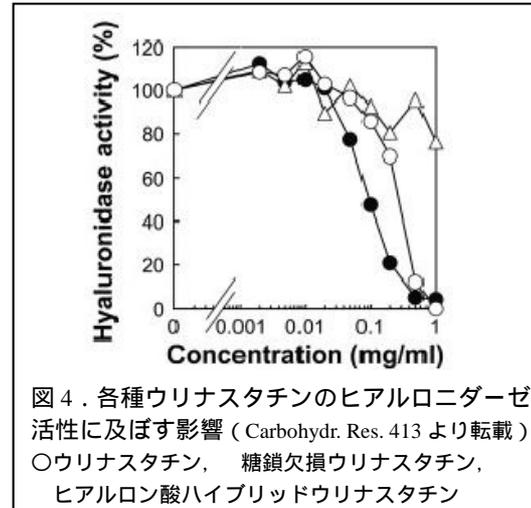
本研究を遂行するために、期間全体を通し、必要な糖鎖欠損ウリナスタチン、糖鎖組み換えウリナスタチン(主としてヒアルロン酸ハイブリッドウリナスタチン、実験によっては硫酸基の位置の異なるコンドロイチン硫酸鎖に組み換えたウリナスタチン)を天然のウリナスタチンから酵素的に作製した(図1)、ミリグラム単位で調製することができた。



作製したヒアルロン酸ハイブリッドウリナスタチンがもつヒアルロン酸は、天然のウリナスタチンがもつコンドロイチン硫酸鎖と同程度の糖鎖長であった(図2)。また、この分子は、天然のウリナスタチンにはなかったHABPとの結合能を獲得した(図3)。



平成26年度は、天然のウリナスタチンおよび糖鎖組み換えウリナスタチンの各種酵素活性に及ぼす影響を調べた。その結果、ヒアルロン酸ハイブリッドウリナスタチンは天然のウリナスタチンと同等の高いトリプシン阻害活性を有していたが、ヒアルロン酸分解酵素(ヒアルロニダーゼ)に対する阻害活性は低下した(図4)。糖鎖の硫酸化のパターンが異なる糖鎖組み換えウリナスタチンを試験物質としてヒアルロニダーゼ活性に及ぼす影響を評価することにより、ウリナスタチンのヒアルロニダーゼ阻害活性の強さは、糖鎖成分(コンドロイチン硫酸鎖)の硫酸化度に依存することが知られた。



さらに、生体膜を構成する代表的なリン脂質から成る単分子膜のミセルをそれぞれ構築し、ウリナスタチンの局在を観察するとともに、単分子膜間の接着性に及ぼすウリナスタチンの影響を生物物理学的に解析した。その結果、ヒアルロン酸ハイブリッドウリナスタチンは、天然型ウリナスタチンと比べて生体膜の外側に多く存在するリン脂質(ホスファチジルコリン)に強い引力相互作用を示した。いずれのウリナスタチンについても単分子膜近傍に局在する様子が観察された。一方、生体膜の内側に多く含まれるリン脂質(ホスファチジルエタノールアミン)の単分子膜とはいずれのウリナスタチンも引力相互作用

が観察されなかった。この作用は、糖鎖欠損ウリナスタチンよりも天然のウリナスタチンで大きく、さらに、ヒアルロン酸ハイブリッドウリナスタチンで大きかった(表1)。これらのことから、ウリナスタチンの糖鎖は、細胞間への浸透性に寄与していることが示唆され、ヒアルロン酸ハイブリッドウリナスタチンは、天然型のウリナスタチンよりも細胞間に浸透しやすいことが期待される。この成果は、国際会議で発表され、国際学術雑誌 *Carbohydrate Research* に掲載された。

表 1. ホスファチジルコリン単分子膜の引力相互作用に及ぼす糖鎖組み換えウリナスタチンの影響 θ , 単分子膜の接触角; F , 引力相互作用.

| | θ [degree] | F [mN/m] |
|------------------|-------------------|------------|
| UTI | 44±7 | 0.29±0.1 |
| Linkage-UTI | 52±7 | 0.39±0.1 |
| HA-UTI | 62±7 | 0.52±0.1 |
| Without UTIs | 45±6 | 0.29±0.1 |
| H ₂ O | 45±6 | 0.29±0.2 |

(*Carbohydr. Res.* 413 より転載)

また、糖鎖の組み換えによって、ウリナスタチンと相互作用する新たな分子を見出せる可能性を検討するために、子宮組織由来の培養細胞の抽出物や膜画分、ウマ羊膜抽出物、ウマ羊水について、天然のウリナスタチン、糖鎖欠損ウリナスタチン、ヒアルロン酸ハイブリッドウリナスタチンと結合する分子の探索を行った。しかし、両者の間に差を見出せなかった。

平成 27 年度は、ウリナスタチンのヒアルロニダーゼ阻害効果に重要な糖鎖構造について、前年度の検討に引き続き、糖鎖工学的に作製した構造の知られた各種コンドロイチン硫酸オリゴ糖を用いてさらに詳細に調べた。その結果、コンドロイチン硫酸鎖の硫酸化度と阻害活性の相関が結論づけられた。この成果は、国際学術雑誌 *Carbohydrate Polymers* に掲載された。また、子宮組織由来の培養細胞を用いた疑似的な熟化のモデルにおいて、細胞外マトリックスを構成する分子の代謝やその調節に関わる各種遺伝子の発現変動に及ぼすウリナスタチンの影響を調べた。同時に、子宮頸部の熟化で急激に増加することが知られているヒアルロン酸の量やサイズも測定した。その結果、ヒアルロン酸ハイブリッドウリナスタチンも天然のウリナスタチンもそれらの変化に対して同様の方向性で作用することが示された。しかし、ヒアルロン酸ハイブリッドウリナスタチンの作用は天然型のものと同程度かわずかに弱いものであった。

平成 28 年度は、炎症時に高値を示す各種酵素に対するウリナスタチンの効果を調べ

た。ウリナスタチンは、シクロオキシゲナーゼ-2 や MMPs の活性には影響を与えないか、高濃度でわずかな阻害を示した。エラスターゼ、プラスミンに対しては、阻害効果を示し、その効果の程度はウリナスタチンがもつ糖鎖の構造に依存すること明らかとなった。タンパク質と糖鎖の複合体(プロテオグリカン)であるウリナスタチンのこれら酵素に対する阻害効果は、天然のウリナスタチン、ヒアルロン酸ハイブリッドウリナスタチン、糖鎖欠損ウリナスタチンの順で大きく、酵素の阻害にはコアタンパクの構造に加えてウリナスタチンがもつコンドロイチン硫酸の構造が重要であることが示唆された。コンドロイチン硫酸構造の重要性は、糖鎖のみを用いた実験によっても裏付けられた。平成 27 年度の細胞モデルを用いた実験結果と合わせると、炎症に対するヒアルロン酸ハイブリッドウリナスタチンの抑制効果は、天然のウリナスタチンのものと同程度かわずかに弱い可能性が示された。

研究期間全体を通して、ヒアルロン酸ハイブリッドウリナスタチンが天然のものより強い作用は、細胞膜との相互作用の他は見いだせなかったが、本研究で作製した糖鎖組み換え体を用いることにより、これまで情報が少なかった天然のウリナスタチンの糖鎖構造の重要性が示された。

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 3 件)

1. Kakizaki, I., Koizumi, H., Chen, F., and Endo, M.: Inhibitory effect of chondroitin sulfate oligosaccharides on bovine testicular hyaluronidase. *Carbohydr Polym.* **121**, 362–371 (2015). (査読有)
DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.11.071
2. Kakizaki, I., Takahashi, R., Yanagisawa, M., Yoshida, F, and Takagaki, K.: Enzymatic synthesis of hyaluronan hybrid urinary trypsin inhibitor. *Carbohydr Res.* 413, 129–134 (2015). (査読有)
DOI:10.1016/j.carres.2015.05.009
3. Kakizaki I., Miura, A., Ito, S., Mineta, T., Hong, J.S., and Kato, Y.: Characterization of proteoglycan and hyaluronan in water-based delipidated powder of salmon cartilage. *J. Appl. Glycosci.*, 62 (3), 115–120 (2015). (査読有)
DOI:10.5458/jag.jag.JAG-2015_011

[学会発表] (計 2 件)

1. Kakizaki, I., Takahashi, R., Yanagisawa, M., Yoshida, T., and Takagaki, K. Enzymatic synthesis of hyaluronan hybrid urinary trypsin inhibitor. Hirosaki International Symposium on Transplant 2014 (2014.10.31, Hirosaki, Japan)

2. Kakizaki, I., Chanmee, T., Ontong, P., and Itano, N. Measurement of intracellular nucleotide sugar levels in hyaluronan-overproducing breast cancer cells. 10th International Conference on Hyaluronan (Hyaluronan 2015) (2015.6.7-10, Florence, Italy)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~bioche1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿崎 育子 (KAKIZAKI Ikuko)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80302024

(2) 研究分担者

田中 幹二 (TANAKA Kanji)

弘前大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20311540

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし