

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750364

研究課題名(和文) 癌組織中レクチンの糖鎖特異性を直接同定する手法の開発

研究課題名(英文) Development of a method to identify the specific affinity of carbohydrates for the cancer tissue

研究代表者

下山 敦史(Shimoyama, Atsushi)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90625055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖質分子と認識受容体との相互作用を利用することで、特定の臓器やがん組織へのターゲティングが可能となると考え、糖質分子を用いた細胞の特異的認識システムの構築を目指した。近年、細菌由来の免疫活性化糖質分子であるリポ多糖の受容体、TLR4のがん組織における強発現が報告されている。よってリポ多糖誘導体を用いることで、免疫制御機能を有したがんターゲティング分子を見つけ出すと考えた。しかしながら、一般にリポ多糖は毒性が強い。そこで、宿主細胞内共生菌ならば致死毒性を有するリポ多糖は持ち得ず、無毒のリポ多糖を有するのではないかと考え、共生菌由来リポ多糖の単離構造決定および機能解析研究を展開した。

研究成果の概要(英文)：To accomplish the specific cell recognition system by using the interaction between carbohydrate molecules and their receptor, carbohydrate molecules having specific interaction with cancer tissue but having no toxicity were investigated. Lipopolysaccharide (LPS) is a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, and is recognized by TLR4-MD2 complex to induce potent immunostimulating activities. Recent findings show that TLR4 are expressed not only on immune cells but also on cancer cells. Therefore, LPS has great potential as an immunomodulating molecule including the capability of cancer clustering. However, LPS generally shows cytotoxicity because of its potent inflammatory activities. To reveal the non-toxic TLR4 ligands, we focused on intracellular symbiotic bacterial LPS. The isolation method of the intracellular symbiotic bacterial LPS from freeze-dried cell was confirmed and the chemical structure of intracellular symbiotic bacterial LPS was determined.

研究分野：天然物化学、糖化学、有機合成化学

キーワード：細胞内共生菌 リポ多糖 TLR4-MD2 腫瘍ターゲティング 免疫制御 リポドA

1. 研究開始当初の背景

糖質分子は、細胞表面受容体を介し、細胞間の情報伝達や免疫、感染症など生体内における様々な認識に関わり、がんや炎症など様々な疾患に関連する。細胞表面受容体の局在は、その細胞の種類や環境により大きく異なり、認識される糖質分子もその構造多様性ゆえに多彩なパターン構造を形成可能なため、これらの組み合わせにより特異的な認識が可能となっている。そのため、この特異的認識を利用した糖関連分子による細胞認識プローブの開発が試みられてきた¹⁾。また、近年、糖質分子が糖タンパク質²⁾や糖鎖デンドリマー³⁾の体内動態を制御することも明らかになりつつある。

前述のように、糖鎖はその構造多様性ゆえに複雑な分子認識を可能にしているが、同時に、その多様で複雑な構造が、化学合成を容易でないものとしている。また、その構造の多様性と不均一さから天然からの単離精製も困難である。そのため、このような糖質リガンドの機能解析研究は、未だ発展途上にあると言える。

2. 研究の目的

本研究では、糖質分子とそれらの認識受容体との相互作用を利用することで、特定の臓器や腫瘍組織、炎症部位へのターゲティングが可能となると考え、糖質分子プローブを用いた細胞の特異的認識システムの構築を目指した。糖質分子によるターゲティングは抗体等に比べると、相互作用は弱いものの、集積が早いことを示唆するデータが得られており、創薬や医療診断分野への展開が期待できる。

細菌細胞表面由来の自然免疫活性化因子としてリポ多糖が知られているが、近年、その受容体である TLR4 が、大腸がん、乳がん、胃がんなどへ強発現していることが報告されている⁴⁾。よってリガンドであるリポ多糖もしくはその活性中心であるリポ A を用いることで、腫瘍組織集積能を有した自然免疫制御分子を見出せると考えている。しかしながら、これまでにリポ多糖を用いたターゲティング分子の報告はほとんどない。また、ターゲティング分子に限定せずとも生体内利用を指向したリポ多糖関連分子で、実用化されている例はサルモネラ菌由来のリポ多糖を単離・誘導化し、弱毒化した 3D-MPL(グラクソ・スミスクライン)が免疫アジュバントとして使用されている⁵⁾のみである。これは、大腸菌型に代表される多くのリポ多糖、リポ A の毒性が強いことに起因している。

一方で、我々は、近年、リポ A の活性が菌体の特性と深く関連することを見いだしている。例えば、寄生性細菌であるヘリコバクター・ピロリは、免疫阻害活性を示すリポ A を主成分とすることを明らかにしており⁶⁾、この免疫阻害作用により、ピロリ菌は

宿主の免疫系から逃れ、寄生関係が維持できていると考えられる。このような背景から、宿主の細胞内に共生しているような細菌ならば、致死毒性を有するリポ多糖は持ち得ず、人体に無毒なりポ多糖、リポ A を有する可能性が示唆された。

本研究では、無毒の TLR4 リガンドを見だし、腫瘍組織集積能を有した自然免疫制御分子の開発へと応用するため、腸内パイエル板に共生し腸管内における炎症作用を抑制していることが示唆されている宿主細胞内共生菌、*Alcaligenes* 属細菌のリポ多糖に着目した。*Alcaligenes* 属細菌由来のリポ多糖は、単離された例がなく、構造や機能が未知であったため、以下に示すように、共生菌に由来するリポ多糖の単離構造決定および機能解析研究を展開した。

3. 研究の方法

共同研究者である東大の清野教授、医薬基盤研の國澤教授より供与を受けた細胞内共生菌の乾燥菌体から、リポ多糖の抽出を試みた。具体的にはリポ多糖抽出キット (iNtRON Biotechnology, Inc.) を用い、リポ多糖を含む白色固体を得た。また、操作の確からしさを評価するため、本法によりリポ多糖を抽出できることが既に確認できている大腸菌株、*E. coli* O111 と *E. coli* S17 についても同様の操作を行った。

得られた抽出物にリポ多糖が含まれているのかをリムルス試験により評価した。リムルス試験とは、カプトガニの血液がリポ多糖と反応し、凝固することを応用したリポ多糖の検出法である。その結果、大腸菌と同様に共生菌からもリポ多糖を含む抽出物が得られていることが明らかとなった(図1)。現在、共同研究者によりこれらのキット抽出物を用いた生物活性試験が行われている。TLR4 ノックアウト細胞を用いた実験により共生菌抽出物も TLR4/MD2 により認識されることが確認され、毒性も大腸菌由来リポ多糖に比べ数百倍低いことが示されている他、

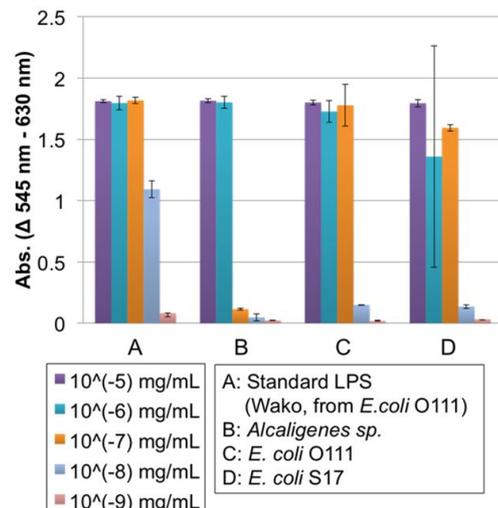


図1. キット抽出リポ多糖画分を用いたリムルス試験

免疫機能についても有用な情報が得られつつある。

続いてリポド A を得るために加水分解反応を検討した。多くの場合リポ多糖は酸性糖 Kdo を介してリポド A と多糖部分が結合した構造を有する。この Kdo-リポド A 間の結合は弱酸により加水分解されることが知られている。酢酸を用いてリポド A の切り出しを行い、質量分析による解析を行った結果、リポド A 由来と思われるピークが観測された。さらに、得られた画分に対してリムルス試験を行った結果、それぞれの画分においてリムルス活性が観測され、これらの画分が、リポド A を含んでいることが示唆された(図 2)。

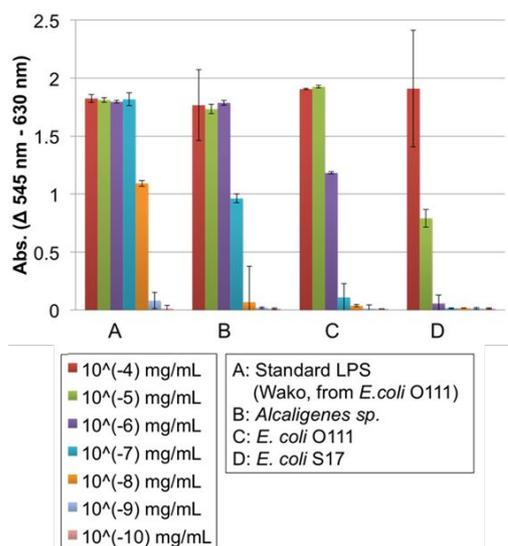


図 2. キット抽出リポド A 画分を用いたリムルス試験

このように共生菌よりリポ多糖を含む画分を得る手法を確立した。しかしながら、SDS-PAGE や NMR 等の手法により得られたキット抽出 LPS 画分、リポド A 画分の純度を調べると、ペプチドや核酸に由来する夾雑物の残存が示唆された。そこで、より高純度のリポ多糖を得るため、抽出精製法を再検討した。

具体的には、PCP (フェノール・クロロホルム・石油エーテル) 法⁷⁾ (図 3) による抽出を試みた。共生菌の乾燥菌体をエタノール、アセトン、石油エーテルで洗浄した後、石油エーテル/クロロホルム/フェノール抽出法により粗精製リポ多糖 1 を白色固体として得た。

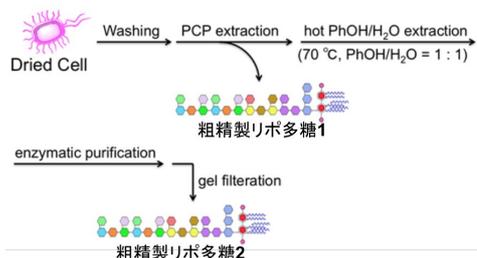


図 3. PCP 法及び熱フェノール/水を用いた LPS の抽出

また、PCP 抽出法の他の層に関しては熱フェノール/水抽出法により抽出を行い、DNase、

RNase および Proteinase による酵素処理を行った後体積排除カラムクロマトグラフィによって精製を行い、粗精製リポ多糖 2 得ている。PCP 法により抽出したリポ多糖の純度を SDS-PAGE により解析したところ、粗精製リポ多糖 1, 2 とともにキット抽出物よりもさらに高純度でリポ多糖が含まれていた。本法により、*Alcaligenes* 属細菌から、高純度のリポ多糖を単離することに成功しており、このように共生菌由来リポ多糖の単離精製法を確立できた。続いて、高純度で得たリポ多糖の化学構造を質量分析や NMR を用いて決定した。

4. 研究成果

本研究では、腫瘍組織集積能を有した自然免疫制御分子の開発へと応用するため、無毒の TLR4 リガンドを有する可能性が示唆された、腸内パイエル板共生菌のリポ多糖に着目し、その単離精製法の確立および構造決定を行った。

単離精製については前述のように、PCP 抽出法と熱フェノール/水抽出法による抽出、酵素処理の後、サイズ排除クロマトグラフィー等を用いることで、共生菌由来リポ多糖を高純度で得る手法を確立した。

得られたリポ多糖の化学構造決定については、ナポリフェデリコ 2 世大学のモリナロ教授のグループと共同研究を展開し、質量分析や NMR 等の手法を用いることで、*Alcaligenes* 属細菌由来のリポ多糖の化学構造を完全に決定した。現在、高純度のリポ多糖を用いた生物機能解明を共同研究により進めつつ、決定した共生菌由来リポ多糖の全合成研究を進めている。

< 引用文献 >

- 1) R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 2013-25.
- 2) K. Tanaka, T. Masuyama, K. Hasegawa, T. Tahara, H. Mizuma, Y. Wada, Y. Watanabe and K. Fukase, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 102-5.
- 3) K. Tanaka, E. R. O. Siwu, K. Minami, K. Hasegawa, S. Nozaki, Y. Kanayama, K. Koyama, W. C. Chen, J. C. Paulson, Y. Watanabe, K. Fukase, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 8195-8200.
- 4) Y. Sato, Y. Goto, N. Narita, D. S. B. Hoon, *Cancer Microenviron.* **2009**, *2*, 205-214.
- 5) C. W. Cluff, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2009**, *667*, 111-23.
- 6) A. Shimoyama, A. Saeki, N. Tanimura, H. Tsutsui, K. Miyake, Y. Suda, Y. Fujimoto, K. Fukase, *Chem. -Eur. J.* **2011**, *17*, 14464-14474.
- 7) C. Galanos, O. Liideritz, O. Westphal, *European J. Biochem.* **1969**, *9*, 245-249.

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4件)

K. Fukase, A. Shimoyama, Y. Manabe, Effective Synthesis of Oligosaccharide under Microfluidic Conditions, *J. Syn. Org. Chem. JPN.* **2015**, 73 (5), 452-459. 査読有り

A. Shimoyama, K. Mizote, Y. Fujimoto, K. Fukase, Synthesis and Biofunctional Study of Immunomodulative Lipopolysaccharide Partial Structures, *Glycoconjugate J.* **2015**, 32, 310. 査読有り

深瀬浩一、田中克典、下山敦史, 分子イメージングによる糖鎖複合体の動態解析, 日本分子イメージング学会機関誌 *JSMI report* **2015**, 8(2), 18-25. 査読有り

A. Shimoyama, Bioorthogonal Reactions for Biomolecular Functionalization and Imaging, *J. Syn. Org. Chem. JPN.* **2014**, 72 (3), 303-304. 査読有り

[学会発表](計20件)

A. Shimoyama, K. Mizote, Y. Fujimoto, K. Fukase, Synthesis and Bio-functional Studies of Immunomodulating LPS Partial Structures, the 13th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-13), Rihga Royal Hotel (Kyoto), 2015年11月11日

A. Shimoyama, Y. Fujimoto, K. Fukase, Synthesis and Bio-functional Studies of Immunomodulating Lipopolysaccharide Partial Structures, The 8th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, TAKEDA Center for Learning and Innovation (Osaka) 2016年1月21日~22日

S. Nakagawa, A. Shimoyama, T. Aiba, Y. Fujimoto, K. Fukase, Synthesis and biological activity of phosphatidylinositol for the elucidation of NKT cell pre-activation mechanism, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), Honolulu (USA), 2015年12月15日~20日

S. Masui, Y. Manabe, A. Shimoyama, T. Fukuyama, I. Ryu, K. Fukase, Kinetic control Fischer glycosylation using acidic silica gel under fluidic conditions, The 2015

International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), Honolulu (USA), 2015年12月15日~20日

K. Mizote, A. Shimoyama, N. Shibata, F. D. Lorenzo, Y. Fujimoto, A. Molinaro, J. Kunisawa, H. Kiyono, K. Fukase, Characterization of LPS/lipid A from *Alcaligenes* sp., 7th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology (ACGG), Matsushima, Hotel Kaikanso (Miyagi), 2015年11月12日~15日

A. Shimoyama, K. Mizote, Y. Fujimoto, K. Fukase, Synthesis and Biofunctional Study of Immunomodulative Lipopolysaccharide Partial Structures, 23rd International Symposium on Glycoconjugates (Glyco23), Hotel Le Meridien (Split, Croatia) 2015年9月15日~20日

下山敦史、藤本ゆかり、深瀬浩一、免疫調節作用を有するリポ多糖部分構造の化学合成とその機能解析、ERATO 村田脂質活性構造プロジェクト夏のセミナー、エクシブ琵琶湖(滋賀)、2015年8月25日~26日

富澤一美、下山敦史、王倩倩、藤本ゆかり、深瀬浩一、光親和性標識化ペプチドグリカンフラグメントの合成と機能、日本化学会第96春季年会、同志社大学(京都)、2016年3月24日~27日

土田紘也、下山敦史、田中克典、深瀬浩一、共役イミンの二量化反応を用いた不飽和アルデヒド検出法の開発、日本化学会第96春季年会、同志社大学(京都)、2016年3月24日~27日

中川翔、下山敦史、相羽俊彦、藤本ゆかり、深瀬浩一、内因性CD1dリガンドとしてのホスファチジルイノシトールの合成とその生理活性、日本化学会第96春季年会、同志社大学(京都)、2016年3月24日~27日

増井誠二、真鍋良幸、下山敦史、福山高英、柳日馨、深瀬浩一、酸性シリカゲルを用いたフロー系でのフィッシャーグリコシル化、日本化学会第95春季年会、日本大学(千葉)、2015年3月26日~29日
下山敦史、中川翔、藤本ゆかり、深瀬

浩一、内因性 CD1d リガンドとしてのホスファチジルイノシトールの合成とその生物活性、第 19 回生理活性をあまり意図しない自由な天然物合成勉強会、アワーズイン阪急(東京)、2016 年 2 月 29 日~3 月 1 日

下山敦史、藤本ゆかり、深瀬浩一、Synthesis of Porphyromonas gingivalis Lipid A、第 18 回生理活性をあまり意図しない自由な天然物合成勉強会、ホテル新大阪(大阪)、2015 年 10 月 3 日~4 日

下山敦史、糖質を用いたがん組織のイメージング手法の開発、第 17 回生理活性をあまり意図しない自由な天然物合成勉強会、アワーズイン阪急(東京)、2015 年 2 月 28 日~3 月 1 日

中川翔、下山敦史、相羽俊彦、藤本ゆかり、深瀬浩一、内因性 CD1d リガンドの探索を目指したホスファチジルイノシトールの合成とその生理活性、第 5 回 CSJ 化学フェスタ、タワーホール船堀(東京)、2015 年 10 月 13 日~15 日

中川翔、下山敦史、相羽俊彦、藤本ゆかり、深瀬浩一、NKT 細胞の前活性化機構解明を目指したホスファチジルイノシトールの合成とその生理活性、第 34 回日本糖質学会年会、東京大学(東京)、2015 年 7 月 31 日~8 月 2 日

下山敦史、藤本ゆかり、深瀬浩一、免疫調節作用を有するリポ多糖部分構造の化学合成とその機能解析、JST-ERATO 村田脂質活性構造プロジェクト最終成果報告会、大阪大学会館(大阪)、2016 年 3 月 17 日

中川翔、下山敦史、相羽俊彦、藤本ゆかり、深瀬浩一、内因性 CD1d リガンドとしてのホスファチジルイノシトールの化学合成とその生物活性、JST-ERATO 村田脂質活性構造プロジェクト最終成果報告会、大阪大学会館(大阪)、2016 年 3 月 17 日

中川翔、下山敦史、相羽俊彦、藤本ゆかり、深瀬浩一、ホスファチジルイノシトールの合成とその生理活性、FCCA グライコサイエンス若手フォーラム 2015、東京、2015 年 7 月 30 日

中川翔、下山敦史、相羽俊彦、藤本ゆかり、深瀬浩一、NKT 細胞の活性化機構解明を目指したホスファチジルイノシトールの合成とその生理活性、第 50 回天然物化学談話会、グリーンピア岩沼(宮城)、2015 年 7 月 1 日~3 日

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学 深瀬研究室：

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/fukase/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下山 敦史 (SHIMOYAMA, Atsushi)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：90625055