

令和元年6月10日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04700

研究課題名(和文)糖鎖の分子機作に基づくがん・COPD・アルツハイマー病の創薬開発

研究課題名(英文)Development of novel glycan-based drug for cancer, COPD and Alzheimer's disease

研究代表者

谷口 直之(Taniguchi, Naoyuki)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・糖鎖オンコロジー部部长

研究者番号：90002188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：がんの病態形成に関わるフコシル化糖鎖の生合成を阻害する新規糖化合物を開発した。この化合物は肝がん細胞の浸潤を抑制することを明らかにした。また、がんの転移に関わる糖鎖合成酵素GnT-Vの立体構造を明らかにし、その酵素機能の特異性を証明した。アルツハイマー病については、病態と関連する糖鎖合成酵素としてGnT-IIIを同定し、その阻害剤候補を探索した。COPDについては、病態緩和効果を示したケラタン硫酸二糖L4の機能増強をめざし、化学合成にてL4多量体を作製した。このL4多量体はC型レクチンにより強く結合し、免疫細胞の炎症反応をより強く抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて開発された新規糖化合物は、肝がん細胞の浸潤能を抑制するため、新規がん治療薬の候補として期待される。また糖鎖合成酵素GnT-Vの酵素機能の特異性を明らかにしたことにより、がんの転移におけるGnT-Vのより詳細な機能の解明が期待される。また糖鎖合成酵素GnT-IIIがアルツハイマー病に関連することを明らかにしたことは、その病態を理解する上で学術的意義が高い。また、ケラタン硫酸二糖L4の抗炎症性作用を明らかにしたことにより、COPDを含め、炎症性疾患の治療薬としての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed the new glyco-compound to inhibit biosynthesis of cancer-related fucosylation. This compound suppressed invasiveness in the liver cancer cell lines. We also revealed molecular structure of GnT-V which is the glycosyltransferase to enhance cancer metastasis. This proved the unique character for GnT-V. For Alzheimer's disease, we have identified GnT-III as the glycosyltransferase related to disease state, and performed screening study to discover compounds to inhibit GnT-III. In COPD study, we have produced more effective keratan sulfate disaccharide L4 polymer by chemosynthesis. This L4 polymer suppressed inflammatory response of immune cells by the stronger binding to C-type lectins.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 糖転移酵素 COPD アルツハイマー病 がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らを含む様々なグループの過去の研究により、タンパク質の糖鎖修飾を担う酵素が同定されてきた。その後、それらの過剰発現細胞や遺伝子欠損マウスの解析から、特定の糖鎖修飾ががんや糖尿病など様々な疾患に関わることが明らかになってきた。さらにそれらの病的変化は、修飾を受ける糖タンパク質の中で鍵となるターゲットタンパク質が主に関わることや、これらの糖鎖や糖タンパク質の発現や機能の追跡が、様々な疾患の診断・治療に応用できる可能性が示唆されてきた。一方で、糖鎖の発現を追跡・改変するツールは限られており、それらの化学・生物ツールの不足は、医学を指向した糖鎖研究において大きな問題点であった。本研究では、申請者らがこれまで特に注力してきたがん、アルツハイマー病、慢性閉塞性肺疾患(COPD)に焦点を絞り、それらの診断や治療に資する基礎的な糖鎖研究の推進とツール開発を行うことを目的とした。

2. 研究の目的

上述のように、本研究は、がん、アルツハイマー病、慢性閉塞性肺疾患(COPD)に焦点を絞った。これらの疾患の病態形成過程における糖鎖の発現変化、機能変化を追跡することで、それらの糖鎖変化が引き起こす病態悪化の詳細を明らかにすることを第一の目的とした。さらに、それらの糖鎖発現の変化を利用した疾患の診断、またそれらの糖鎖変化・糖鎖機能を標的にした新たな創薬研究への展開を目指した。同時に、これまで不足していた糖鎖追跡や改変のツール、糖鎖研究のための分析法の開発といった、技術基盤の向上も目的とした。

3. 研究の方法

(1) 化学・ケミカルバイオロジーによる糖鎖追跡・改変ツールの開発

糖鎖の発現追跡および機能改変を目的として、化学とケミカルバイオロジーのアプローチで新たなツールの開発を目指した。具体的には、フコースの新たなアナログを有機化学のアプローチで合成し、クリックケミストリーと組み合わせて新しい糖鎖検出プローブを開発した。またフコースアナログの糖鎖合成阻害作用の有無をケミカルバイオロジー的手法で検証し、生化学的アプローチからその阻害メカニズムを解明した。さらに、生体内二糖であるL4の有機化学的な改変によって結合タンパク質との親和性および生理作用を向上させたL4オリゴマーを開発した。また、ハイスループットスクリーニングにより糖鎖合成酵素の阻害剤を開発している。

(2) 疾患モデルマウスへの糖鎖投与

糖鎖が関連するがん、COPD、アルツハイマー病の病態メカニズムと糖鎖改変による治療効果を検証するため、疾患モデル動物を用いた解析を行った。特に、抗炎症作用が期待された糖鎖L4を、肺の炎症を起因とするCOPDモデルマウスへ投与し、肺気腫症状の改善効果が得られることを、エラストラーゼ投与マウス、喫煙マウスなどを用いて検証した。アルツハイマーモデルマウスは、理化学研究所の西道博士らが開発したヒト型APPノックインマウスを利用し、アルツハイマー病発症の鍵となるBACE1上のBisecting GlcNAc糖鎖修飾の発現や機能を検証した。

(3) 糖鎖欠損マウスにおける病態解析

がんを含む様々な疾患の要因となりうる肥満と糖鎖との関連を明らかにする目的で、マ

ウスに高脂肪食を投与し、脂肪細胞で発現が変化する糖転移酵素を qPCR ベースの方法(後述)で同定した。発現低下が最も大きかった St6gal1 に注目し、St6gal1 が脂肪細胞の増殖や分化において果たす役割を解析するとともに、St6gal1 欠損マウスに高脂肪食を与えてその効果を検証した。

(4) 新規疾患マーカー分子の探索

疾患のマーカー候補となる糖鎖および糖タンパク質を質量分析や生化学的手法で探索した。COPD に着目し、肺から血中に分泌される糖タンパク質である SP-D および SOD3 の糖鎖解析とマーカーとしての可能性、糖鎖の生物学的意義などを解析した。

(5) LC-MS による糖ヌクレオチドの分析

糖鎖に関連する技術開発を目的として、糖鎖の発現に欠かせない糖ヌクレオチドの一斉定量、高感度分析の開発を目指した。その過程で、動物細胞においてこれまで報告がなかった糖ヌクレオチドである UDP-Man を初めて発見した。

(6) 糖鎖遺伝子の発現解析ツールの開発

糖鎖の発現のベースとなる、糖転移酵素 mRNA の一斉定量法を qPCR ベースで開発した。これを用いて、脳の各細胞における糖転移酵素の発現、エピゲノム改変試薬による発現変動などを解析し、MS によるグライコミクスと関連づけることで、糖鎖発現のベースとなる解析法の確立を目指した。

(7) 糖転移酵素の立体構造解析

糖鎖を生合成する糖転移酵素の触媒メカニズムの解明と阻害剤探索のため、立体構造の解析を行なった。そのうち、がんに関連の深い GnT-V の立体構造の解明に成功した。

4. 研究成果

(1) 化学・ケミカルバイオロジーによる糖鎖追跡・改変ツールの開発

有機化学のアプローチにより、新たに 7-アルキニルフコースを合成し、本フコースアナログが複数のフコース転移酵素の良好な基質となること、クリックケミストリーとの組み合わせで高感度の糖鎖プローブとなることを明らかにした(Kizuka et al., Cell Chem. Biol., 2016)。さらに、7-アルキニルフコースを含むフコースアナログを解析する途中で、6-アルキニルフコースがフコース含有糖鎖の合成阻害作用を有すること、そのメカニズムが GDP-フコース合成酵素 FX の選択的阻害であること、それにより肝がん細胞の浸潤能が抑制されることなどを明らかにした(Kizuka et al., Cell Chem. Biol., 2017)。さらに、抗炎症効果を有することを代表者らが発見した二糖 L4 について、有機化学的アプローチによって三量体化、ポリマー化を行い、結合タンパク質 Langerin との親和性が 1000 倍以上に亢進することを明らかにした(Ota et al., BBA, 2018)。

(2) 疾患モデルマウスへの糖鎖投与

ケラタン硫酸の構成二糖である L4 を、エラスターゼおよび喫煙により誘導した COPD モデルマウスに投与し、その治療効果を検証した。その結果、L4 は肺への炎症細胞の遊走を抑え、肺における炎症と肺気腫化を抑制することを明らかにした (Gao et al., Am. J.

Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol., 2017)。また、アルツハイマー病モデルマウスにおいて、A の脳内蓄積によって引き起こされる酸化ストレスが、糖転移酵素 GnT-III およびその産物である Bisecting GlcNAc の発現を亢進させ、それによって BACE1 タンパク質の機能亢進と病態形成につながることを明らかにした(Kizuka et al., Biochem. J., 2016)。

(3) 糖鎖欠損マウスにおける病態解析

高脂肪食を与えたマウスの脂肪細胞において約 150 の糖転移酵素の発現変化を定量解析したところ、シアル酸転移酵素 St6gal1 の発現が最も低下していることを発見した。さらに、そのターゲットタンパク質として Integrin 1 を同定し、脂肪組織において St6gal1 による Integrin のシアリル化が FAK のリン酸化などの下流シグナルを正に調節していることを明らかにした。これらのことは培養細胞モデルにおいても確認された。また、St6gal1 欠損マウスに高脂肪食を与えたところ、野生型マウスよりも脂肪の増大がみられた。以上より、脂肪細胞において St6gal1 が合成する糖鎖は脂肪の増大や分化を抑制することがわかった (Kaburagi et al., J. Biol. Chem., 2017)。

(4) 新規疾患マーカー糖鎖の探索

COPD のマーカー分子候補として、肺から血中に分泌される SP-D や SOD3 の糖鎖に着目した解析を行なった。健常者の血中の SP-D の糖鎖構造を質量分析により決定し、フコシル化 SP-D の血中レベルと COPD の発症が正に相関することを明らかにした(Ito et al., J. Proteomics, 2015)。また健常者の血中 SOD3 の糖鎖構造も LC-MS により決定した(Ota et al., Glycobiology, 2017)。さらに、糖鎖全体を欠損した SOD3 は正常に分泌されないこと (Ota et al., FEBS Lett., 2016)、シアル酸付加を受けていない SOD3 は Furin による C 末端の切断が正常に起きないことなどを明らかにした。

(5) LC-MS による糖ヌクレオチドの分析

世界で初めて、哺乳細胞に UDP-Man という糖ヌクレオチドが存在することを LC-MS で同定した(Nakajima et al., BBRC, 2018)。UDP-Man は脳に多く、その生合成経路や糖鎖への取り込みなどが不明であることから、今後の発展が期待される。本研究により、UDP-Man を含む様々な糖ヌクレオチドの一斉定量が可能になっている。

(6) 糖鎖遺伝子の発現解析ツールの開発

糖転移酵素の発現量を qPCR で一斉定量するプラットフォームを確立した(Kizuka et al., Proteomics, 2016)。本法を適用して神経系の初代培養細胞における糖転移酵素の発現量を、エピゲノム改変試薬による刺激の有無で解析した。その結果、neuron に比べて astrocyte の糖転移酵素や糖鎖の発現はエピゲノム変化を受けやすいことなどを明らかにした。さらに本法は、上述の脂肪細胞における St6gal1 の同定などにも応用された。

(7) 糖転移酵素の立体構造解析

X 線結晶構造解析により、GnT-V と基質アナログの複合体の立体構造を明らかにした(Nagae et al., Nat. Commun., 2018)。その結果、GnT-V が基質の三糖構造を厳密に認識すること、バイセクト型など他の糖鎖構造は触媒ポケットにフィットしないことを明らかにし、また活性残基を同定した。さらに、これまで無関係と思われていた糖鎖の根元部分やタ

ンパク質部分を認識している可能性が高いこともわかった。現在、その他の糖転移酵素の立体構造の解析も行なっている。

(8) 総説論文

以上の成果は、様々な学術誌に総説の一部として掲載された。がん関連、(Takahashi et al., Mol. Asp. Med., 2016)(Kizuka et al., Biomolecules,2016); アルツハイマー病関連、(Kizuka et al., BBA, 2017)(Kizuka et al., Glycoconj. J.,2018); COPD 関連(Kizuka et al., Cell. Immunol.,2018)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 26 件)

Structure and mechanism of cancer-associated N-acetylglucosaminyltransferase-V.

Nagae M, Kizuka Y, Mihara E, Kitago Y, Hanashima S, Ito Y, Takagi J, Taniguchi N, Yamaguchi Y.

Nat Commun. 査読有 2018 Aug 23;9(1):3380. doi: 10.1038/s41467-018-05931-w.

Implication of C-type lectin receptor langerin and keratan sulfate disaccharide in emphysema.

Kizuka Y, Mishra S, Yamaguchi Y, Taniguchi N.

Cell Immunol. 査読有 2018 Nov;333:80-84.

doi:10.1016/j.cellimm.2018.07.004.

High affinity sugar ligands of C-type lectin receptor langerin.

Ota F, Hirayama T, Kizuka Y, Yamaguchi Y, Fujinawa R, Nagata M, Ismanto HS, Lepenies B, Aretz J, Rademacher C, Seeberger PH, Angata T, Kitazume S, Yoshida K, Betsuyaku T, Kida K, Yamasaki S, Taniguchi N. Biochim Biophys

Acta Gen Subj. 査読有 2018 Jul;1862(7):1592-1601.

doi:10.1016/j.bbagen.2018.04.004.

Identification and characterization of UDP-mannose in human cell lines and mouse organs: Differential distribution across brain regions and organs.

Nakajima K, Kizuka Y, Yamaguchi Y, Hirabayashi Y, Takahashi K, Yuzawa Y, Taniguchi N.

Biochem Biophys Res Commun. 査読有 2018 Jan 1;495(1):401-407.

doi:10.1016/j.bbrc.2017.10.173.

An Alkynyl-Fucose Halts Hepatoma Cell Migration and Invasion by Inhibiting GDP-Fucose-Synthesizing Enzyme FX, TSTA3.

Kizuka Y, Nakano M, Yamaguchi Y, Nakajima K, Oka R, Sato K, Ren CT, Hsu TL, Wong CH, Taniguchi N.

Cell Chem Biol. 査読有 2017 Dec 21;24(12):1467-1478.e5.

doi: 10.1016/j.chembiol.2017.08.023.

〔学会発表〕(計 50 件)

招待講演

【国際学会】(計 13 件)

Taniguchi N., Expression of N-glycan Branching enzymes and their products in Disease implication. (Keynote lecture) 24th International Symposium on Glycoconjugates (Glyco24), Jeju Island, Korea, Aug., 2017

Taniguchi N., Role of N-glycans in disease: implication for pathogenesis of Alzheimer's disease and its possible glycan-based therapeutics, 2016 Glycobiology Meeting of China, Nantong, China, Aug., 2016

Taniguchi N., A keratin sulfate *and* its derivatives attenuate inflammation and the progression of emphysema in the murine lung by targeting to Langerin, C-type lectin, (Keynote lecture), 23rd International Symposium on Glycoconjugates (Glyco23), Split (Croatia), Sep., 2015

【国内学会】(計 6 件)

木塚康彦、北爪しのぶ、谷口直之、「アルツハイマー病を促進させるバイセクト糖鎖」第 89 回日本薬理学会年会(横浜)2016 年 3 月

谷口直之「糖鎖、特に分岐型 N - 型糖鎖の生理的病態的役割」第 38 回日本基礎老化学会大会(横浜)2015 年 6 月

一般口頭発表

【国際学会】(計 18 件)

【国内学会】(計 13 件)

〔図書〕(計 3 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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし