

機関番号：12501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590032

研究課題名 (和文) 免疫賦活作用を示すコンドロイチン硫酸糖鎖活性中心の徹底解明

研究課題名 (英文) A thoroughgoing investigation of structure of chondroitin sulfate stimulating on immunosystem.

研究代表者

戸井田 敏彦 (TOIDA TOSHIHIKO)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：60163945

研究成果の概要 (和文)：市販品のサメ軟骨由来およびクジラ軟骨由来コンドロイチン 6 硫酸 (*N*-アセチルガラクトサミン 6 硫酸残基の含量が 60～70%) を二酸化チタン存在下 370 nm～430 nm の高圧水銀ランプにより光分解し、コンドロイチン硫酸オリゴ糖を調製した。照射時間を 6～12 時間の範囲で反応を行うことにより、2 糖～40 糖 (分子量 450～9000) のオリゴ糖を含む画分を調製した。これらの画分を分取用および分析用 HPLC および核磁気共鳴装置・質量分析装置によりその構造解析を行うとともに、新たに硫酸化糖鎖の質量分析法に挑戦し、これに成功した。単離・精製したコンドロイチン硫酸オリゴ糖を、三酸化イオウ・ピリジン錯体により反応温度 40℃で完全硫酸化体を、さらにシリル化試薬 N,O-ビストリメチルシリルフルオロ酢酸により、*N*-アセチルガラクトサミン 6 位の硫酸基を特異的に脱離、あるいは 10%メタノールを含むジメチルスルホキシド中 80℃24 時間反応し、完全脱硫酸化体を調製し、4 種の異なるコンドロイチン硫酸オリゴ糖ライブラリーを構築した。マウスに調製したコンドロイチン硫酸オリゴ糖を経口投与し、血液中の濃度を私たちが開発したマイクロ除タンパクーポストカラム HPLC 法により追跡し、腸管吸収とコンドロイチン硫酸分子量および硫酸化度の関係を解明した。

研究成果の概要 (英文)：Commercially available chondroitin sulfate was depolymerized by photolytic degradation system using titanium dioxide under 370 ~ 430 nm, and each oligosaccharide has been isolated and characterized by chromatographic and instrumental techniques. Additionally, the purified chondroitin sulfate oligosaccharides were chemically over sulfonated using sulfur trioxide-pyridine complex and supplied for establishment of chondroitin sulfate oligomer library. Furthermore, these oligosaccharides were applied for the investigation of immune stimulating effects of chondroitin sulfate administered orally and found the exact size of oligosaccharide which is able to be absorbed through digestive system of mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
21 年度	800,000	240,000	1,040,000
22 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：糖鎖工学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：コンドロイチン硫酸オリゴ糖ライブラリー，免疫系，経口投与，サイトカイン産生

1. 研究開始当初の背景

コンドロイチン硫酸をはじめとする酸性多糖類が変形性関節炎の治療・疼痛寛解を目的とした医薬品・機能性食品として欧米を中心に市場に流通し、日本国内でも年間約 500 トンのコンドロイチン硫酸、フコイダンなどの酸性多糖類を含んだ機能性食品が流通している。しかしながらその作用機序に関しては不明な点が多く、効果を疑問視する報告もある。しかしながら申請者らは、コンドロイチン硫酸の免疫系賦活作用を介した抗炎症作用に着目し検討を進めた結果、そのメカニズムに関していくつかの確証を得、世界的な脚光を浴びている。しかしながら、高分子酸性多糖であるコンドロイチン硫酸を経口投与した場合、どの程度が血液中に移行し免疫系を賦活化するのか、この作用と酸性多糖類の分子量、硫酸化度などの構造活性相関については、未知の部分が残されている。そこで、構造既知のコンドロイチン硫酸オリゴ糖ライブラリーを構築し、免疫賦活活性を対象に、コンドロイチン硫酸の活性中心を徹底解明することを決意した。

私たちはこれまで天然の多糖類の化学的完全 O-硫酸化反応条件を確立し、これと水酸基のシリル化剤を用いた特異的 6-O-脱硫酸化反応を組み合わせ、抗血液凝固活性、抗ヒアルロニダーゼ活性などとの構造相関を解明するなど、多糖類を中心に化学的なその硫酸化、脱硫酸化の方法を確立し、多くの成果を挙げている。また、抗炎症作用を評価するための細胞培養系を用いた *in vitro*、実験的関節炎惹起マウスを用いた *in vivo* の評価系を確立している。さらにサイトカイン測定を基盤とする、脾臓細胞の分化誘導作用を指標とした抗炎症作用の分子レベルでの評価系と組み合わせることにより、その作用メカニズムを解明することが可能になった。

そこで、今回は天然品酸性多糖類由来オリゴ糖を、新規に開発した光分解分解法（下図 2 参照）を用いて調製・単離し（Break-down 型）、さらにこれらを化学的に硫酸化、脱硫酸化することによって新規のコンドロイチン硫酸オリゴ糖ライブラリーを構築（Build-up 型）するとともに、上記の評価系を用いて個々に調査し、コンドロイチン硫酸の免疫系賦活作

用を介した抗炎症活性について徹底的に調査する。

2. 研究の目的

腸管免疫系を介して抗炎症作用を示す多糖類の効果が注目を集めている。特にコンドロイチン硫酸、フコイダン、ペクチンなどは機能性食品としてその市場を拡大しており、その有効性の科学的根拠の解明が急務である。本課題は、まずはじめに申請者が新規に開発した二酸化チタンを光触媒として用いる非特異的糖鎖分解法を駆使して、各種多糖類由来 4~30 糖のオリゴ糖ライブラリーを構築し、次のこれらオリゴ糖ライブラリーを用いて、腸管免疫系、特にリンパ細胞表面の L-セレクトリン、マクロファージ細胞膜上の Toll like 受容体 (TRL) を標的とした免疫賦活作用の網羅的解析を行い、免疫賦活活性中心の徹底解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

これまで申請者は、市販品のサメ軟骨由来およびクジラ軟骨由来コンドロイチン 6 硫酸 (N-アセチルガラクトサミン 6 硫酸残基の含量が 60~70%)、コンドロイチン 4 硫酸 (N-アセチルガラクトサミン 4 硫酸残基の含量が 50~60%) を二酸化チタン存在下 370 nm~430 nm の高圧水銀ランプにより光分解し（特願 2006-310749 号）多糖由来オリゴ糖を調製することに成功している。照射時間を 6~12 時間の範囲で反応を行うことにより、2 糖~30 糖（分子量 360~8000）のオリゴ糖を含む画分の調製にも成功している。確立した光分解条件を、アルギン酸、フコイダン、ペクチンなどの酸性多糖類にも応用し、オリゴ糖画分を調製する。酸性多糖由来オリゴ糖は、これまで報告されている分解酵素を用いた方法と異なり、非還元末端に不飽和二糖などを含まない、偶数のオリゴ糖糖、すなわち 2, 4, 6, 8, 10... 糖ではなく、光分解であるため多糖を構成する単糖のグリコシド結合を区別することなく切断するため、偶数の構成糖からなるオリゴ糖のみならず、奇数の構成糖からなる、これまで前例のない新規の天然品多糖類由来オリゴ糖である。これらの画分を分取用および分析用 HPLC および核磁気共鳴装置・質量分析装置（核磁気共鳴測定装置（JEOL ECP600, JEOL GSX 500a）、質量

分析測定装置 (MALDI TOFMS, AXIMA および LC-MS AP2000 現有) によりその構造解析を行うとともに、新たに酸性糖鎖の質量分析法に挑戦する。

単離・精製したオリゴ糖を、三酸化イオウ・ピリジン錯体により反応温度 40°C で完全硫酸化体を、さらにシリル化試薬 N,O ビストリメチルシリルフルオロ酢酸により、中性糖、アミノ糖 6 位の硫酸基を特異的に脱離、あるいは 10%メタノールを含むジメチルスルホキシド中 80°C 24 時間反応し、完全脱硫酸化体を調製するなど、合計 8 種の異なる天然酸性多糖由来オリゴ糖ライブラリーを構築する。

これまで申請者らは未分画のサメ軟骨由来コンドロイチン硫酸(平均分子量 21, 000)をマウスに 400 mg/kg 体重経口投与すると、血液中に投与量の 0.05~0.1% のコンドロイチン硫酸が検出されることを突き止めている。また、コンドロイチン硫酸由来 2 糖である N-アセチルコンドロシンを 400 mg/kg 体重の割合でマウスに経口投与すると、投与量の 15~20% が吸収することを確認している。これらの知見を踏まえ、マウスに調製した天然酸性多糖由来オリゴ糖を経口投与し、血液中の濃度を私たちが開発したマイクロ除タンパクーポストカラム HPLC 法により追跡し、腸管吸収とオリゴ糖の分子量および硫酸化度などの酸性度の関係を徹底解明する。

継続して天然酸性多糖の Break-down 型、Build-up 型オリゴ糖ライブラリーの構築を実施する。また、表面プラズモン共鳴測定装置 (BIACORE2000, 現有) を用いて、標的タンパク質 (E-セレクトリン, L-セレクトリン, TLR4 などの受容体など) との相互作用をコンドロイチン硫酸オリゴ糖ライブラリーに対してスクリーニングする。

4. 研究成果

市販品のサメ軟骨由来およびクジラ軟骨由来コンドロイチン 6 硫酸 (N-アセチルガラクトサミン 6 硫酸残基の含量が 60~70%) を二酸化チタン存在下 370 nm~430 nm の高圧水銀ランプにより光分解し、コンドロイチン硫酸オリゴ糖を調製した。照射時間を 6~12 時間の範囲で反応を行うことにより、2 糖~40 糖 (分子量 450~9000) のオリゴ糖を含む画分を調製した。これらの画分を分取用および分析用 HPLC および核磁気共鳴装置・質量分析装置によりその構造解析を行うとともに、新たに硫酸化糖鎖の質量分析法に挑戦し、これに成功した。単離・精製したコンドロイチン硫酸オリゴ糖を、三酸化イオウ・ピリジン錯体により反応温度 40°C で完全硫酸化体を、

さらにシリル化試薬 N,O ビストリメチルシリルフルオロ酢酸により、N-アセチルガラクトサミン 6 位の硫酸基を特異的に脱離、あるいは 10%メタノールを含むジメチルスルホキシド中 80°C 24 時間反応し、完全脱硫酸化体を調製し、4 種の異なるコンドロイチン硫酸オリゴ糖ライブラリーを構築した。マウスに調製したコンドロイチン硫酸オリゴ糖を経口投与し、血液中の濃度を私たちが開発したマイクロ除タンパクーポストカラム HPLC 法により追跡し、腸管吸収とコンドロイチン硫酸分子量および硫酸化度の関係を解明した。

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 13 件)

1. Uchida M., Ishii I., Hosoyama S., Toida T., Ariyoshi N., Kitada M.: "Kefiran Reduces Atherosclerosis in Rabbits Fed a High Cholesterol Diet." *J. Atheroscler Thromb.*, (2011) in press. (査読有)
2. Yoshida M., Toida T., Tomitori H., Kashiwagi K., Igarashi K.: "Identification of acrolein-conjugated protein in plasma of patients with brain infarction." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **391**(2):1234-1239 (2010). (査読有)
3. Higashi K., Toida T., Kashiwagi K., Igarashi K.: "Intense correlation between protein-conjugated acrolein and primary Sjögren's syndrome." *Clin. Chim. Acta*, **411**(5-6):359-363 (2010). (査読有)
4. Burana-Osot J., Soonthornchareonnon N., Hosoyama S., Linhardt R.J., Toida T.: "Partial depolymerization of pectin by a photochemical reaction." *Carbohydr. Res.*, **345**(9):1205-1210. (2010). (査読有)
5. Burana-Osot J., Chaidedgumjorn A., Hosoyama S., Toida T.: "Determination of galacturonic acid from pomelo pectin in term of galactose by HPAEC with fluorescence detection." *Carbohydr. Polym.*, **81**, 461-465 (2010). (査読有)
6. Joo E. J., Hui Y., Park Y., Park N. Y., Toida T., Linhardt R. J., Kim Y. S.: "Induction of Nucleolin Translocation by Acharan Sulfate in A549 Human Lung Adenocarcinoma." *J. Cell. Biochem.*, **110**(5):1272-1278 (2010). (査読有)
7. Yoshida M., Toida T., Igarashi K.: "Correlation between images of silent brain infarction, carotid atherosclerosis and white matter hyperintensity, and plasma levels of acrolein, IL-6 and CRP." *Atherosclerosis*, **211**(2):475-479 (2010). (査読有)

8. Burana-osot, J., Pattanapanyasat, K., Soonthornchareonnon, N., Sukapirom, K and Toida, T.:"Characterization and immuno-stimulating activity of polysaccharides from Thai medicinal plants." *Nat. Prod. Res.*, **24**(15):1403-1412 (2010). (査読有)
9. Zhang F., Zhang Z., Thistle R., McKeen L., Hosoyama S., Toida T., Linhardt R. J., Page-McCaw P.;" Structural characterization of glycosaminoglycans from zebrafish in different ages." *Glycoconj J.*, **26**:211-218 (2009). (査読有)
10. Ogura Y., Kitaguchi T., Suzuki N., Toida T., Suzuki K. T.:"Speciation of selenomethionine metabolites in wheat germ extract." *Metallomics*, **1**, 78-86 (2009). (査読有)
11. Toida T., Hosoyama S., Linhardt R.J.:"Solvolytic depolymerization of chondroitin and dermatan sulfates." *Carbohydr. Res.*, **344**, 888-3 (2009). (査読有)
12. Burana-osot J, Hosoyama S, Nagamoto Y, Suzuki S, Linhardt RJ, Toida T.:"Photolytic depolymerization of alginate." *Carbohydr Res.* (2009) **344**(15):2023-7. (査読有)
13. Masuda Y, Matsumoto A, Toida T., Oikawa T, Ito K, Nanba H."Characterization and antitumor effect of a novel polysaccharide from *Grifola frondosa*." *J. Agric. Food. Chem.*, **57**(21):10143-10149 (2009). (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. 松本 成永・東 恭平・西村 和洋・戸井田 敏彦, 「天然物由来多糖類に含まれるウロン酸類のHPLCによる分離定量」日本分析学会第 59 年会 平成 22 年 9 月 15 日 (仙台).
2. Toida T. "Glycoanalysis." The 3rd Glycomics Symposium, Troy (NY, USA) July, 2010.
3. 戸井田 敏彦, 松本成永, 細山沙織 「簡易メチル化法による部分メチル化アルジトールアセテートの作成」第 71 回分析化学討論会 平成 22 年 5 月 15 日 (松江).

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/bunseki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸井田 敏彦 (TOIDA TOSHIHIKO)
 千葉大学・大学院薬学研究院・教授
 研究者番号：60163945