

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07951

研究課題名(和文) 癌および炎症疾患における新規ヒアルロニダーゼの機能と発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Function as well as regulation on expression of a novel hyaluronidase in cancer and inflammation

研究代表者

山田 修平 (Yamada, Shuhei)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：70240017

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)：ヒアルロニダーゼ4 (HYAL4) は、コンドロイチン硫酸 (CS) に特異的に作用する酵素であり、癌の転移に関与している可能性がある。癌および炎症におけるHYAL4の役割を解明するため、実験を行った。癌細胞株にHYAL4の遺伝子を安定導入し、高発現細胞株を作成した。また、shRNAを安定導入し、ノックダウン細胞株も得た。それぞれの細胞のCSを定量した。Lewis肺癌細胞株を用い、細胞増殖、細胞移動に対するCSオリゴ糖の添加による影響を評価した。CRISPR/CAS9のシステムを利用してHYAL4欠損マウスの作製を行なった。様々な癌組織におけるHYAL4の発現亢進を、リアルタイムPCRで調べた。

研究成果の概要(英文)：A novel enzyme hyaluronidase-4 (HYAL4) specifically acts on chondroitin sulfate (CS), and may be involved in cancer metastasis. To investigate the role of HYAL4 in metastasis as well as inflammation, several experiments have been performed. HYAL4 gene was stably transfected into a cancer cell line and HYAL4-overexpressing cell lines have been established. HYAL4 shRNA was also stably transfected into a cell line which highly expresses HYAL4, and the knockdown cells have been prepared. The amount of CS in these cell lines has been determined. Influences of the addition of CS oligosaccharides on cell proliferation as well as cell migration of Lewis lung carcinoma cells, have been evaluated. HYAL4-deficient mice have been generated using a CRISPR/CAS9 system. High level expression of HYAL4 in various cancer tissues has been investigated by real-time PCR.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：ヒアルロニダーゼ コンドロイチン硫酸 ヒアルロン酸 癌

## 1. 研究開始当初の背景

○癌、炎症とヒアルロン酸 (HA)、ヒアルロニダーゼ (HYAL): 癌は 30 年以上に渡って日本人の死因の第 1 位を占め、年間 30 万人以上の命を奪っている。癌の原因は様々であり、多様な観点から治療法の開発を目指す必要がある。多くの癌は慢性的な炎症が引き金となることが分かっており、そのような局所性の慢性炎症の抑制が、癌の予防につながると考えられる。

HA は、化粧品などの保湿成分として広く使用されているが、本来は動物の細胞外マトリックスにおいて、組織の構築、細胞間相互作用の調節、受精など様々な機能を発揮している。HA を代謝分解する酵素である HYAL は、正常組織ではリソソームに存在するが、癌化した細胞では細胞外にも大量に分泌され、癌細胞の浸潤能に貢献している。しかし、単に細胞外マトリックスの HA を壊して空間を作り出すだけでなく、分解産物の HA オリゴ糖が、サイトカインの発現、分泌を促し、炎症反応を増悪することが報告されている (Stern, Semin. Cancer Biol., 2008)。実際に、癌化に伴って HA の合成量自体も亢進することが証明されている。また HA オリゴ糖は、癌細胞のアポトーシスを抑制し、移動能やマトリックスメタロプロテアーゼ分泌を促進し、癌の悪性度にも貢献する (Stern *et al.*, Eur. J. Cell Biol., 2006)。

○癌、炎症とコンドロイチン硫酸 (CS): HA と同様の構造をもつ生体内多糖として、CS がある。CS も HA 同様に、動物の細胞外マトリックスに普遍的に存在し、多様な機能を発揮することが知られている。さらに、CS 由来のオリゴ糖も、HA オリゴ糖同様に、ある種のサイトカインの発現、分泌を促し、炎症反応を増悪することが報告されている (Sugahara *et al.*, Cancer Res., 2008)。しかし、HA オリゴ糖に比べ、その研究は遅れており、詳細は明らかでない。

○新規 HYAL、着想に至った経緯: 我々は以前、HYAL ファミリーの一員であるヒアルロニダーゼ 4 (HYAL4) の基質特異性を解明した。この酵素は、遺伝子としては見つけていたが、その活性は報告されていなかった。我々は、この酵素が HYAL という名称とは裏腹に、HA を分解する活性は持たず、CS を特異的に加水分解することを世界に先駆けて明らかにした (Kaneiwa, Yamada *et al.*, Glycobiology, 2010)。この酵素の発現は、正常組織では、胎盤、精巣、骨格筋に限定されており、それらの組織において、何か特定の機能を持つと考えられ、現在解析中である (Kaneiwa, Yamada *et al.*, J. Biol. Chem., 2012)。予備的な実験結果より、HYAL4 が癌細胞において高発現していることを見出した。そこで、我々は、HYAL4 も他の HYAL (具体的には HYAL1 および HYAL2) と同様に、癌組織において高発現し、細胞外マトリックスの CS の分解に関与する可能性を考えた。また、分

解によって生じた CS オリゴ糖は、HA オリゴ糖同様、炎症の増悪に貢献することを予想している。

## 2. 研究の目的

HYAL4 について、これまでの研究を進展させ、本酵素の癌や炎症における役割の解明とその阻害薬の開発を目指す。具体的には以下の目標を掲げた。

(1) HYAL4 が癌の悪性度と相関するのかを解明するため、HYAL4 を高発現させた培養細胞株あるいは HYAL4 をノックダウンした細胞株を調製して、細胞の増殖能、浸潤能などと HYAL4 との相関を調べる。また、HYAL4 遺伝子のプロモーター領域についても解析を行う:【実験項目 1】培養細胞を用いた癌の悪性度に及ぼす HYAL4 の効果

(2) 癌細胞における HYAL4 の機能は、単純に周囲の CS の分解除去に留まらず、消化によって生じたオリゴ糖が影響を与えている可能性がある。これを検証するため、CS オリゴ糖を大量に調製し、培養細胞株に添加して、細胞の増殖能や浸潤能、サイトカインの産生能などへの影響を調べる。:【実験項目 2】培養細胞を用いた癌の悪性度に及ぼす CS オリゴ糖の効果

(3) 上記の *in vitro* のアッセイ系に加え、*in vivo* でも HYAL4 の影響を調べるため HYAL4 ノックアウトマウスを使った解析を行う。ノックアウトマウスの表現型の解析、癌を移植した場合の癌の転移能、人工的に炎症を発生させた場合の症状などを正常マウスと比較し、癌や炎症への耐性能を調べる。また、寿命についても調べる。:【実験項目 3】HYAL4 ノックアウトマウスの解析

(4) 上記の培養細胞やマウスを使った実験に加え、実際の癌患者の組織などにおける HYAL4 の発現を定量的に調べ、癌組織や炎症組織での HYAL4 の高発現を観察する。:【実験項目 4】ヒトの癌組織や炎症組織での HYAL4 の発現

(5) HYAL の異所性の発現は、癌や炎症を増悪させることが予想されるので、HYAL4 に特異的な阻害剤を開発する。その際に、HA を分解する HYAL1 を対照として用い、HYAL1 活性は阻害しないが HYAL4 活性のみを特異的に阻害する化合物のスクリーニングを行う。:【実験項目 5】HYAL4 に特異的な阻害剤の開発

## 3. 研究の方法

【実験項目 1】培養細胞を用いた癌の悪性度に及ぼす HYAL4 の効果

(1) HYAL4 が高発現している細胞株として、卵巣癌細胞 SKOV-3、骨肉腫細胞 Saos2 などを予備的な実験結果より既に見出している。逆に HEK293 細胞は、HYAL4 を発現していないことを見いだしている。HEK293 細胞に、HYAL4 の遺伝子を安定導入し、高発現細胞株を作成する。

(2) HYAL4 の短ヘアピン RNA (shRNA) をデザインし、カスタムオーダーする。HYAL4 を高発現している細胞株に対して、shRNA を安定導入する。mRNA の発現量を定量し、ノックダウン効率を調べる。培地中の CS 量の変化も定量する。予定通りに進まないときは細胞株や shRNA のデザインの変更を検討する。上記以外にも、幾つかの HYAL4 高発現癌細胞株を見つけている。

(3) HYAL4 のゲノム遺伝子上流に存在するプロモーター領域について、転写開始点を決定する。また、ルシフェラーゼアッセイを行い、プロモーター活性をもつ領域を決定する。

(4) (1) で確立した各細胞株について、癌の悪性度の指標となる活性を調べる (Li, Yamada, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2008)。多方面から検討するため、以下に示す複数の実験を遺伝子導入前後の両細胞に対して行ない、比較する。MTT アッセイを利用した細胞増殖能、ボイデンチェーンバーを利用した移動能及び浸潤能、プレートに固相化した細胞外マトリックスタンパク質に対する接着能について調べる。また、各細胞から mRNA を調製し、リアルタイム PCR を行って、主要なサイトカインとマトリックスメタロプロテアーゼの発現量を定量する。サイトカインについては ELISA も行い、分泌量の変化を調べる。また、それぞれの細胞株を市販の C57BL/6 マウスに尾静注し、3 から 4 週間後に、肺にできたコロニーの数をカウントし、転移能の指標とする。

【実験項目 2】培養細胞を用いた癌の悪性度に及ぼす CS オリゴ糖の効果

(1) 精製 HYAL4 を用いて市販の CS-C、CS-D を消化する。消化物をゲルろ過 HPLC で分画し、均一なサイズの CS オリゴ糖を得る (Kinoshita, Yamada *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1997)。特に四糖、六糖、八糖を回収する。予定通りに進まない場合は、市販の精製型 HYAL を用いて CS を加水分解する。同様の構造をもったオリゴ糖が得られると予想される。

(2) HYAL4 を発現していない細胞株に、初年度に大量調製した各 CS オリゴ糖を添加し、

【実験項目 1】(3) と同様の実験を行う。予想通りの結果が得られない場合、オリゴ糖のサイズを変えて実験を行う、またオリゴ糖の元となる CS のアイソフォームを変更して、オリゴ糖を調製し直す。

(3) オリゴ糖の添加によって活性化される細胞内シグナル伝達経路を解明する。特に、CS の関与が報告されている Wnt- $\beta$  カテニンシグナルの活性化を調べる。

【実験項目 3】HYAL4 ノックアウトマウスの解析

(1) HYAL4 ノックアウトマウスを交配によって増やす。同時に、表現型を観察し、同腹子の野生型と体重変化、寿命などを比較する。HYAL4 は精巣に発現しているため、雄のホモ

マウスは生殖能がない可能性がある。その場合は、ヘテロマウスを交配させる。

(2) HYAL4 ノックアウトマウスを用いて、癌や炎症への耐性を、以下のように多方面から調べる。腹腔にチオグリコレート培地あるいはリポ多糖を注射し、腹腔内のマクロファージを定量する (Borsig *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2007)。既に研究室で確立されている鼻炎アレルギーモデルを作成し (Kanaizumi *et al.*, *Scand. J. Immunol.*, 2002)、アレルギーを起こしやすいか検証する。四塩化炭素を吸入暴露、もしくはコーンオイルに溶解したものを経口投与し、1年後、肝臓および副腎腫瘍の発生率を調べる。いずれの実験も同腹子の野生型と比較する。

【実験項目 4】ヒトの癌組織や炎症組織での HYAL4 の発現

(1) 市販の疾病プロファイリングアレイを購入して、様々な癌組織や炎症組織における HYAL4 の発現亢進を、リアルタイム PCR で定量することによって検証する。

(2) 海外研究協力者であるシンガポール国立大学の George Yip 博士らから、胃癌及び乳癌患者の組織由来の cDNA を譲り受け、HYAL4 の発現量を定量リアルタイム PCR によって調べる。差がみられない場合、初年度の様々な癌組織での分析結果に基づき、別の癌を使用する。

【実験項目 5】HYAL4 に特異的な阻害剤の開発

(1) 海外研究協力者であるインドバンガロール大学の Basappa 博士らが化学合成した候補化合物について、HYAL 阻害活性を *in vitro* で調べ、HYAL4 を阻害する化合物をスクリーニングする。現在用いている HYAL4 の活性測定方法よりも、簡便でハイスループットな方法を開発する。

(2) HYAL1 活性は阻害しないが HYAL4 のみを阻害する、特異性の高い阻害剤の開発を目指す。ハイスループットなスクリーニング方法が開発できない場合は、従来用いている方法で HYAL の活性測定を行う (Kaneiwa, Yamada *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2012)。また、提供された化合物の中に効果的なものがなかった場合、他のライブラリーの利用を検討する。

#### 4. 研究成果

本研究では、ヒアルロニダーゼ (HYAL) ファミリーの 1 つである、新規酵素ヒアルロニダーゼ 4 (HYAL4) の、癌および炎症における役割を解明しようとしている。HYAL4 はヒアルロン酸 (HA) によく似たグリコサミノグリカンであるコンドロイチン硫酸 (CS) に特異的に作用する酵素であり、癌の発症に関与する可能性がある。上述したように【実験項目 1】～【実験項目 5】の研究項目を計画しており、それぞれについて、以下に記すような結果が得られた。【実験項目 1】培養細胞を用いた癌の悪性度に及ぼす HYAL4 の効果：

HEK293 細胞に、HYAL4 の遺伝子を安定導入し、高発現細胞株を作成した。逆に、HYAL4 を高発現しているがん細胞株に対して、shRNA を安定導入した。ノックダウンが起きていることを確認した。培地中の CS 量の変化を定量したが、コントロール細胞に比べ、変化は見られなかった。【実験項目 2】培養細胞を用いた癌の悪性度に及ぼす CS オリゴ糖の効果:精製型 HYAL を用いて市販の HA、CS-A、CS-C を消化し、オリゴ糖を大量に得た。ルイス肺ガン細胞株を用い、細胞増殖、細胞移動に対するオリゴ糖の影響を評価した。しかし、いずれの実験でも有意な差は見られなかった。【実験項目 3】HYAL4 ノックアウトマウスの作製:CRISPR/CAS9 を利用したノックアウトマウスの作製を行なった。表現型の解析などは今後行う。【実験項目 4】ヒトの癌組織や炎症組織での HYAL4 の発現:様々な癌組織における HYAL4 の発現亢進を、リアルタイム PCR で調べた。発現亢進している癌組織もあったが、統一した見解が得られていない。【実験項目 5】HYAL4 に特異的な阻害剤の開発:海外研究協力者であるインド、バンガロール大学の Basappa 博士が化学合成した候補化合物について、HYAL4 を特異的に阻害する化合物をスクリーニングしたが、特異性の高い有効な阻害剤は見つかっていない。

#### 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) Satoshi Aoki, Akiko Saito-Hakoda, Takeo Yoshikawa, Kyoko Shimizu, Kiyomi Kisu, Susumu Suzuki, Kiyoshi Takagi, Shuji Mizumoto, Shuheii Yamada, Toin H. van Kuppevelt, Atsushi Yokoyama, Taiji Matsusaka, Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito, Akira Sugawara "The reduction of heparan sulphate in the glomerular basement membrane does not augment urinary albumin excretion" *Nephrol Dial Transplant.*, 2018, in press.
- (2) Takahiro Yoshizawa, Shuji Mizumoto, Yuki Takahashi, Shin Shimada, Kazuyuki Sugahara, Jun Nakayama, Shin'ichi Takeda, Yoshihiro Nomura, Yuko Nitahara-Kasahara, Takashi Okada, Kiyoshi Matsumoto, Shuheii Yamada, Tomoki Kosho "Vascular abnormalities in the placenta of Chst14<sup>-/-</sup> fetuses: implications in the pathophysiology of perinatal lethality of the murine model and vascular lesions in human CHST14/D4ST1 deficiency" *Glycobiology*, 2018, in press.
- (3) Shuji Mizumoto, Tomoki Kosho, Atsushi Hatamochi, Tomoko Honda, Tomomi Yamaguchi, Nobuhiko Okamoto, Noriko Miyake, Shuheii Yamada, Kazuyuki

Sugahara "Defect in dermatan sulfate in urine of patients with Ehlers-Danlos syndrome caused by a CHST14/D4ST1 deficiency" *Clin. Biochem.*, 50(12), 670-677, 2017.

- (4) Long Guo, Nursel H. Elcioglu, Shuji Mizumoto, Zheng Wang, Bige Noyan, Hatice M. Albayrak, Shuheii Yamada, Naomichi Matsumoto, Noriko Miyake, Gen Nishimura, Shiro Ikegawa "Identification of biallelic EXTL3 mutations in a novel type of spondylo-epi-metaphyseal dysplasia" *J. Hum. Genet.*, 62(8), 797-801, 2017.
- (5) Yusuke Mii, Takayoshi Yamamoto, Ritsuko Takada, Shuji Mizumoto, Makoto Matsuyama, Shuheii Yamada, Shinji Takada, Masanori Taira "Roles of two types of heparan sulfate clusters in Wnt distribution and signaling in *Xenopus*" *Nat. Commun.*, 8(1), 1973, 2017.
- (6) Julia Vodopiutz, Shuji Mizumoto, Ekkehard Lausch, Antonio Rossi, Sheila Unger, Nikolaus Janocha, Rainer Seidl, Susanne Greber-Platzer, Shuheii Yamada, Thomas Müller, Bernd Jilma, Rudolf Ganger, Andrea Superti-Furga, Shiro Ikegawa, Kazuyuki Sugahara, Andreas R. Janecke "Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (CSGalNAcT-1) deficiency results in a mild skeletal dysplasia and joint laxity" *Human Mutation*, 38(1), 34-38, 2017.
- (7) \*Florian Job, \*Shuji Mizumoto, Laurie Smith, Natario Couser, Ashley Brazil, Howard Saal, Melanie Patterson, Margaret I. Gibson, Sarah Soden, Neil Miller, Isabelle Thiffault, Carol Saunders, Shuheii Yamada, Katrin Hoffmann, Kazuyuki Sugahara, Emily Farrow. (\*equal contribution) "Functional validation of novel compound heterozygous variants in B3GAT3 resulting in severe osteopenia and fractures: expanding the disease phenotype" *BMC Medical Genetics*, 17(1), 86, 2016.
- (8) Shuji Mizumoto, Shuheii Yamada, and Kazuyuki Sugahara "Molecular interactions between chondroitin-dermatan sulfate and growth factors/receptors/matrix proteins" *Current Opinion in Structural Biology*, 34, 35-42, 2015.
- (9) Shuji Mizumoto, Shuheii Yamada, and Kazuyuki Sugahara "Mutations in biosynthetic enzymes for the protein linker region of chondroitin/dermatan/heparan sulfate cause skeletal and skin dysplasias" *BioMed Res. Int.*, 2015, Article ID 861752, 2015.

〔学会発表〕(計 26 件)

- (1) 山田修平 コンドロイチン硫酸 / デルマタン硫酸生合成酵素の先天的欠損によ

る遺伝性疾患 第 31 回日本軟骨代謝学会  
(名古屋) 平成 30 年 3 月 3  
日  
(2) Brooke L. Farrugia, Shuji Mizumoto, Megan  
S. Lord, Shuhei Yamada, Bruce Caterson, John M.  
Whitlock The mammalian chondroitinase,  
hyaluronidase 4, is produced by human mast cells  
and generates CS cleavage neo-epitopes 7 Lakes  
Proteoglycan Conference (Varese, Italy)  
平成 29 年 9 月 13 日  
(3) 白水仁子、小林智恵里、稲葉史恵、安部  
優貴子、水本秀二、山田修平 ヒアル  
ロニダーゼ 1 および 4 の基質認識に關与する  
アミノ酸残基の解析 第 36 回日本糖質  
学会年会 (旭川) 平成 29 年 7 月 21 日  
(4) 牧野冨紀、水本秀二、山田修平 コンド  
ロイチン硫酸を特異的に加水分解するヒア  
ルロニダーゼ 4 の細胞内局在の解析 第 36  
回日本糖質学会年会 (旭川) 平成 29  
年 7 月 20 日  
(5) 禰津瑠里子、三輪一貴、水本秀二、山田  
修平 発生段階の異なるマウス脳におけ  
るグリコサミノグリカン分解酵素の発現解  
析 第 36 回日本糖質学会年会 (旭  
川) 平成 29 年 7 月 20 日  
(6) 直井友弥、柴本秀太、水本秀二、勝又優  
子、森岡 幸、武内恒成、山田修平 脊髄損  
傷モデルマウスへのヒアルロニダーゼの投  
与 第 63 回日本薬学会東海支部総会・大  
会 (岐阜) 平成 29 年 7 月 8 日  
(7) 小林智恵里、白水仁子、稲葉史恵、安部  
優貴子、水本秀二、山田修平 ヒアル  
ロニダーゼ 1 および 4 の基質認識に關与する  
アミノ酸残基の解析 第 63 回日本薬学  
会東海支部総会・大会 (岐阜) 平成 29  
年 7 月 8 日  
(8) 山田修平、三輪一貴、水本秀二 発達段  
階の脳におけるコンドロイチン硫酸/ヒアル  
ロン酸分解酵素の発現解析 第 49 回日本結合  
組織学会学術大会 (津) 平成 29 年 6 月 17  
日  
(9) 山田修平、三輪一貴、水本秀二 マウス  
脳の各発達過程におけるヒアルロン酸代謝  
関連酵素の発現の定量的解析 平成 28  
年度 新学術領域「神経糖鎖生物学」最終シ  
ンポジウム (名古屋) 平成 29  
年 3 月 3 日  
(10) 永井冨、藤井貴夢、水本秀二、山田修平  
中枢神経系におけるコンドロイチ  
ン硫酸/ヒアルロン酸の分解機構に關する研  
究 平成 28 年度 新学術領域「神経糖  
鎖生物学」最終シンポジウム (名古  
(11) Yukiko Abe, Kentaro Yamagiwa, Shuji  
Mizumoto, Shuhei Yamada Investigation of  
the amino acid residues in hyaluronidases-1 and  
-4 responsible for their substrate recognition  
XXVIII International Carbohydrate  
Symposium (New Orleans, USA)  
平成 28 年 7 月 19 日  
(12) Shuhei Yamada, Sae Nagai, Shuji Mizumoto

Studies on the mechanism of  
degradation of chondroitin sulfate/hyaluronan in  
central nervous system XXVIII  
International Carbohydrate Symposium (New  
Orleans, USA) 平成 28 年 7 月 19 日  
(屋) 平成 29 年 3 月 3 日  
(13) Kazutaka Miwa, Shuji Mizumoto, Shuhei  
Yamada Quantitative analysis of the expression  
of hyaluronan-chondroitin sulfate-degrading  
enzymes in the mouse brain during development  
XXVIII International Carbohydrate  
Symposium (New Orleans, USA)  
平成 28 年 7 月 18 日  
(14) 石川輝、水本秀二、山田修平 マウス  
脳におけるコンドロイチン硫酸とヒアルロ  
ン酸の分解活性の検出 第 62 回日本薬学  
会東海支部総会・大会 (名古屋)  
平成 28 年 7 月 9 日  
(15) 三輪茜音、水本秀二、山田修平 コンド  
ロイチン硫酸を特異的に加水分解するヒア  
ルロニダーゼ 4 の細胞内局在の解析 第 62  
回日本薬学会東海支部総会・大会 (名古  
屋) 平成 28 年 7 月 9 日  
(16) 山田修平、安倍優貴子、山極健太郎、水  
本秀二 ヒアルロニダーゼ 1 および 4 におけ  
るコンドロイチン硫酸およびヒアルロン酸  
の認識に關わるアミノ酸残基の解析 第 48  
回日本結合組織学会学術大会 (長  
崎) 平成 28 年 6 月 25 日  
(17) 山田修平、永井冨、三輪一貴、水本秀二  
脳・神経系におけるコンドロイチン  
硫酸/ヒアルロン酸分解機構に關する研究  
第 48 回日本結合組織学会学術大会  
(長崎) 平成 28 年 6 月 24 日  
(18) 柴本秀太、杉田真千子、水本秀二、菅原  
一幸、山田修平 コンドロイチン硫酸に特  
異的な加水分解酵素である HYAL4 の酵母  
(*Pichia pastoris*) での発現および精製 日本薬  
学会第 136 年会 (横浜) 平成 28 年 3 月 29  
日  
(19) 安倍優貴子、山極健太郎、岩月遥奈、水  
本秀二、山田修平 ヒアルロニダーゼ 1 およ  
び 4 におけるコンドロイチン硫酸およびヒア  
ルロン酸の認識に關わるアミノ酸残基の解  
析 第 38 回日本分子生物学会年会 第  
88 回日本生化学会大会 合同大会 (神  
戸) 平成 27 年 12 月 2 日  
(20) Kentaro Yamagiwa, Haruna Iwatsuki,  
Yukiko Abe, Shuji Mizumoto, Shuhei Yamada  
Investigation of the amino acid residue  
responsible for different substrate specificity of  
hyaluronidases-1 and -4 9th International  
Conference on Proteoglycans and 10th  
Pan-Pacific Connective Tissue Societies  
Symposium (ソウル, 大韓民国)  
平成 27 年 8 月 25 日  
(21) Mayu Mitani, Shuji Mizumoto, Shuhei  
Yamada Quantitative analysis of the expression  
of hyaluronidases in the mouse brain during  
development 9th International Conference

on Proteoglycans and 10th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium (ソウル, 大韓民国) 平成 27 年 8 月 25 日

(22) Yumiko Nomura, Shuji Mizumoto, Shuhei Yamada Cellular localization of chondroitin sulfate hydrolase, hyaluronidase-4 9th International Conference on Proteoglycans and 10th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium (ソウル, 大韓民国) 平成 27 年 8 月 25 日

(23) 三谷真夕、水本秀二、山田修平 発生段階の異なるマウス脳におけるヒアルロニダーゼファミリーメンバーの発現解析 第 34 回日本糖質学会年会 (東京) 平成 27 年 8 月 2 日

(24) 杉田真千子、柴本秀太、水本秀二、菅原一幸、山田修平 酵母 (*Pichia pastoris*) を用いたヒアルロニダーゼ 4 の発現及び精製 第 34 回日本糖質学会年会 (東京) 平成 27 年 8 月 2 日

(25) 山極健太郎、岩月遥奈、安倍優貴子、水本秀二、山田修平 ヒアルロニダーゼ 1 と 4 の基質認識の違いに關与するアミノ酸残基の解析 第 34 回日本糖質学会年会 (東京) 平成 27 年 8 月 2 日

(26) 西島大樹、水本秀二、山田修平 ヒトの癌細胞株や癌組織におけるヒアルロニダーゼ 4 の発現解析 第 61 回日本薬学会東海支部大会 (名古屋) 平成 27 年 7 月 4 日

〔図書〕(計 1 件)

(1) Kazuyuki Sugahara, Shuji Mizumoto, and Shuhei Yamada "Chondroitin sulfate" In Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials (Kobashi, S. and Muellen, K., eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 389-397, 2015.

〔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  
名城大学薬学部病態生化学研究室  
(<http://www-yaku.meijo-u.ac.jp/Research/Laboratory/pathobio/index.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 修平 (YAMADA, Shuhei)  
名城大学・薬学部・教授  
研究者番号：70240017

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

水本 秀二 (MIZUMOTO, Shuji)  
名城大学・薬学部・助教  
研究者番号：40443973

(4) 研究協力者

菅原 一幸 (SUGAHARA, Kazuyuki)  
北海道大学院・生命科学院・名誉教授  
Basappa (BASAPPA)  
インド・バンガロール大学・助教  
George W.C. Yip (YIP, George W.C.)  
シンガポール国立大学・准教授