

令和元年6月10日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K04910

研究課題名(和文) ガレクチンネットワークを基盤とする運動機能障害の解明と生活習慣リスク診断

研究課題名(英文) Elucidation of motor dysfunction based on galectin network and lifestyle risk diagnosis

研究代表者

宮西 伸光 (Miyanishi, Nobumitsu)

東洋大学・食環境科学部・教授

研究者番号：80372720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生活習慣病による運動機能障害の克服をめざした、ガレクチンネットワークを基盤とする運動機能障害の解明と生活習慣のリスク診断が可能なバイオチップの開発とその応用を行い、以下の研究成果を得た。

本研究で構築したバイオセンサチップを用いて様々なガレクチンとAGE群との親和性解析を試みた結果、同一のAGEに対し、ガレクチンの種類によってその親和性が大きく異なっている事が明らかとなった。また、ガレクチン群の相互作用パターンの違いにより、生活習慣病予備群、初期・中期の生活習慣病、中度・高度の生活習慣病あるいは高い合併症併発の高リスク患者の3系統の症状の進行について診断できる事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガレクチンファミリーは細胞の恒常性維持や免疫系疾患と深く関与している事が知られているが、本研究では各種AGEに対するガレクチンファミリーの全体の挙動をモニタリングし、生体内のAGE発生機序と生活習慣病とを関連付けることで生活習慣病の発症リスクやその種類、合併症併発のリスク診断に適応できることを初めて示す事ができ、生活習慣病予備群、初期・中期の生活習慣病、中度・高度の生活習慣病あるいは高い合併症併発の高リスク患者の3系統の症状の進行について診断できる事が明らかとなった。合併症として誘発される神経障害や運動機能障害などの発症リスクモニタリング、生活習慣モニタリングが可能となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, with the aim of overcoming motor dysfunction caused by lifestyle-related diseases, we have elucidated motor dysfunction based on galectin network and developed a biochip that can be used to diagnose lifestyle risk and its applications. As a result of analyzing the affinity between various galectins and AGE groups using the biosensor chip constructed in this research, it could be confirmed that the affinity for the same AGE differs depending on the type of galectin. In addition, from the interaction pattern of the galectin group, it was possible to diagnose the progression or complication of three types of symptoms of the pre-lifestyle lifestyle disease group, the early middle stage lifestyle-related disease, and the high risk patient group of severe lifestyle-related disease.

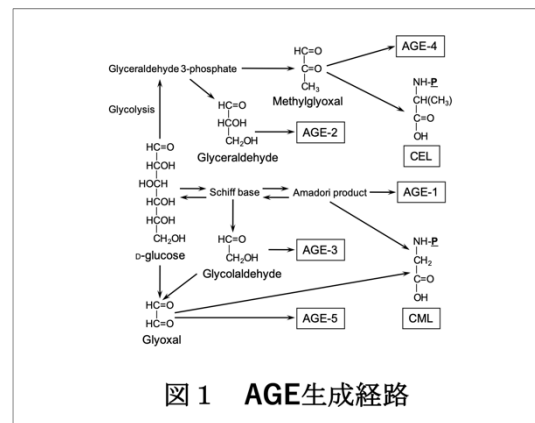
研究分野：糖進化、糖化学、糖鎖生物学、バイオセンサ

キーワード：相互作用 ガレクチン バイオセンサ

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

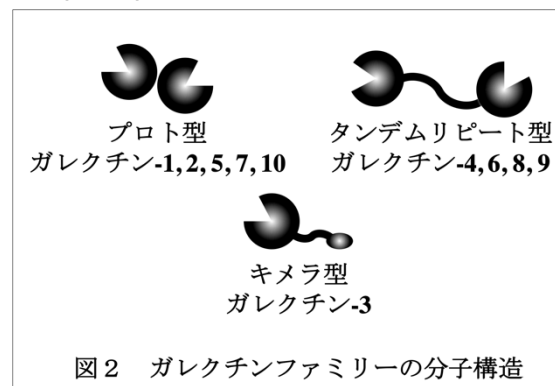
1. 研究開始当初の背景

近年の食生活の多様化とともに、現代病と呼ばれる様々な生活習慣病が蔓延してきており、現代社会の大きな問題となっている。特に長期にわたる食習慣の乱れは、様々な生活習慣病を引き起こす事では知られている。特に糖尿病患者や慢性的な過食による長期高血糖状態は神経障害・網膜症・腎症の三大合併症を引き起こし、その後、生命活動を著しく低下させる重篤な疾患へと移行する。また、神経障害を起因とする運動機能低下は、長期高血糖状態から派生する生活習慣病患者において Quality of Life (QOL) を著しく低下させる大きな要因となっている。このような神経障害や運動障害が起こる原因については、糖質過多により発生する AGE 群の血管内腔や組織への沈着を原因とする代謝異常や、細胞内部における糖鎖関連分子の形態的異常が引き起こす自然免疫系障害が指摘されているが、その具体的なメカニズムや疾患との関連性については明らかにされていない。この原因の一つとしてこれまでに、様々な食生活習慣について規定づけられた複数のパラメータで客観的に評価する測定系が確立されていなかったことが挙げられる。一方、AGE はアミノ化合物 (アミノ酸、ペプチドおよびタンパク質) と還元糖を加熱した時に生じる褐色物質 (メラノイジン) の糖化反応 (glycation) の最終生成物の事であり、生体内において糖尿病患者の血管壁や骨格筋、神経組織の病変部などに、その存在や蓄積が確認されていることから、様々な病体のマーカー候補とされている (図 1)。AGE は糖尿病患者や長期にわたる食生活の乱れによる糖質過多などから生じる生活習慣病と非常に密接に関係している事が指摘されているものの、AGE はその生成反応が一樣ではなく複雑であり、また微量であることから、その発生や一連の代謝に関わる詳細については殆ど明らかにされていない。



2. 研究の目的

本研究では、生活習慣病による運動機能障害の克服をめざした、ガレクチンネットワークを基盤とする運動機能障害の解明と生活習慣のリスク診断が可能なバイオチップの開発とその応用を行う。様々な分子形態を有するガレクチン群 (図 2) と各種疾患関連糖鎖群を配置したマイクロチップを構築し、長期にわたる食生活の乱れによる Advanced Glycation End Product (AGE) 群の推移およびそれらのネットワーク制御分子の挙動を指標とした、生活習慣リスクモニタリング用バイオセンサチップの開発を行う。AGE は過去 1 ~ 2 か月の食生活や生活習慣を反映することから“過去の生活習慣を見る”ことができ、さらに“長期高血糖状態が誘発する運動機能障害や神経障害のリスクをモニタリング”できる事から、これらの関連因子の解析を行う。



3. 研究の方法

本研究では、大きく 2 つの点に焦点を置いた研究を展開する。1 つ目として、研究の前半では様々な構造を有する AGE 群とガレクチンネットワークを介した親和特異性の網羅的解析および、ガレクチンネットワークの形成と AGE 代謝制御機構と疾患との関連性について明らかにする。ガレクチン-9 とガレクチン-1、-3、-8、-9 との相互作用については、申請者はその現象を報告していることから、本研究計画ではさらに“ガレクチンネットワーク”を形成させた状態における AGE 群および OST-48 や 80K-H などの受容体複合体形成因子との関連性を明らかにする。また、受容体複合体形成と病態との関連性、結合や解離に関与している複合糖鎖群の構造について解析する。2 つ目として研究の後半において、得られた情報をもとに様々なネットワークを形成させた状態のガレクチン群ならびに関連性が見いだされた構造の複合糖鎖群をそれぞれアレイ状に配置したマイクロチップを構築し、各種 AGE 関連疾患モデルを用いた AGE 関連疾患に関わる因子の挙動解析を行い、さらに、合併症として誘発される神経障害や運動機能障害モデルを用いた発症リスクモニタリングを行い、生活習慣モニタリングが可能なマイクロチップの開発を行う。

4. 研究成果

様々な構造を有する AGE 群とガレクチンネットワークを介した親和性特性の網羅的解析およびガレクチンネットワークの形成と AGE 代謝制御機構と疾患との関連性について解析を行い、以下の成果を得た。様々な AGE を各種構造別に分類し、ガレクチンファミリーが AGE の

どの段階の反応産物から認識を始めるのかを網羅的に解析した結果、ガレクチンファミリーはいずれもグリオキサールに対して親和性を示さなかった。ガレクチン3がグリオキサールに対して相互作用を示さない事を既に報告しているが、他のガレクチンファミリーにおいてもその傾向は同じであった。また、ガレクチン3は炭素数3のメチルグリオキサールやメチルグリオキサール-AGE に対して親和性を示さず、また同じ炭素数3のグリセロアルデヒドに対しても全く相互作用を示さないが、グリセロアルデヒド-AGE に対しては親和性を示すという特徴的な相互作用を示す事を既に報告しているが、他のガレクチンファミリーも類似した傾向を示す事が初めて示された。この結果、ガレクチンファミリーはターゲットとなる分子の相互作用には炭素数よりも水酸基の数が重要であり、かつ AGE 化の状態が極めて重要である事が初めて明らかとなった。さらに、この一連の分子間相互作用には OST-48 や 80K-H などの受容体複合体形成因子との複合体形成に依存しない相互作用である事も示された。AGE 化により起こるガレクチンファミリーとの相互作用は、AGE のタンパク質領域の構成アミノ酸よりも高次構造に強く依存していることが考えられたが、本研究ではその高次構造の詳細を明らかにする事はできなかった。しかしながら、本研究においてガレクチンファミリーは AGE の糖領域の構造を厳密に認識し、同時にタンパク質領域の高次構造の両方の分子領域の認識が極めて重要である事を明らかにする事ができた。この事は生体内での糖化と細胞内外の維持管理にガレクチン群が組織的に機能している事を示す結果であり糖化に起因する関連疾患解明への一助となると考えられた。本研究で構築したバイオセンサチップを用いて、様々なガレクチンと AGE 群との親和性解析を試みた結果、同一の AGE に対し、ガレクチンの種類によってその親和性が大きく異なっている事が初めて明らかとなった(図3)。特に、ガレクチン8はグリセルアルデヒド-AGE と非常に高い親和性を示し、その親和力はガレクチン3とグリセルアルデヒド-AGE の親和力よりも強い相互作用を示した。また、メチルグリオキサール-AGE との相互作用については、ガレクチン8のみが相互作用を示し、他のガレクチンファミリーは殆ど相互作用を示さなかった。メチルグリオキサールは、グリコリシスによりグルコースからグリセロアルデヒド3リン酸を経由して生じる AGE 群の一つであり、ガレクチン8はこの経路を介した AGE 化の特異的な検出に適している事が明らかとなり、さらにメチルグリオキサール-AGE に起因する関連疾患の予測・モニタリングが可能である事が明らかとなった。また、カルボキシメチルリジン-AGE はガレクチン9と高い相互作用を示し、ガレクチン3やガレクチン8とは弱い相互作用を示した。カルボキシメチルリジン-AGE はグルコースからアマドリ転位を介して生じる AGE 群の一つであり、カルボキシメチルリジン-AGE の検出やカルボキシメチルリジン-AGE に関連する疾患のモニタリングは、ガレクチン9への強い相互作用に加え、ガレクチン8およびガレクチン3への弱い相互作用を確認することで可能である事が本研究により明らかとなった。本研究により開発されたエバネッセント波励起型マイクロスキャナを用いたマイクロアレイチップを用いた解析では、ガレクチン8を中心とした相互作用パターンのみを示した場合は生活習慣病予備群もしくは初期の生活習慣病に該当し、ガレクチン8と複数の AGE 群との相互作用に加えガレクチン9も相互作用を示した場合は初期から中期に渡る生活習慣病に該当し、さらにガレクチン3との強い相互作用が検出された段階で、グリコリシスを介した代謝系の障害に起因する生活習慣病へと症状が進行した事を診断でき、さらにガレクチン9と複数の AGE 群との相互作用が確認された段階で中度から高度の生活習慣病もしくは高い合併症併発リスクがある事を判定する事ができる事が明らかとなった。ガレクチンファミリーは細胞の恒常性維持や免疫系疾患と深く関与している事が知られているが、本研究では各種 AGE に対するガレクチンファミリーの全体の挙動をモニタリングし、生体内の AGE 発生機序と生活習慣病とを関連付けることで生活習慣病の発症リスクやその種類、合併症併発のリスク診断に適応できることを初めて示す事ができた。一連の検出に関する感度および精度については、マイクロスポットの精度に大きく依存するため、スポットする溶液の塩濃度の最適化やスポット後の試料の安定化に向けた湿温度の高精度な制御が必要であり、この点については診断・モニタリングデータの蓄積に向けた課題の一つである。

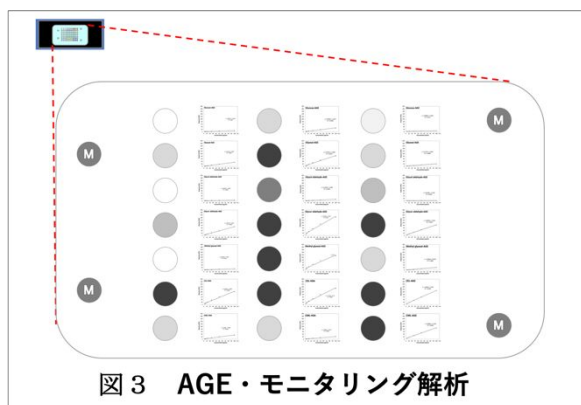


図3 AGE・モニタリング解析

本研究計画全体の後半では、培養細胞を用いた疾患系モデル構築およびマイクロチップにおける評価に必要な、培養細胞の糖質と AGE 関連分子に関する基盤情報解析を計画していたが、研究の前半において既にガレクチンネットワークから生活習慣関連疾患のリスク評価を行う事が可能となったことから、研究の後半では培養細胞を用いたモデル系構築と評価、疾患に関する解析には糖鎖情報が搭載された糖鎖チップを併用する事で解析を展開した。疾患系モデルの培養細胞にはマウス骨格筋由来細胞である C2C12 細胞を用いた。骨格筋はグルコースをエネルギー源として利用するとともに運動状態や栄養状態に依存してグルコースの取り込みを調節し、恒常性を維持しており、グルコースの取り込みにはグルコーストランスポーター4

(GLUT4)が関与している。GLUT4はインスリン刺激や筋収縮が起こるとGLUT4小胞を形成し細胞膜へ移行する。本研究では、このGLUT4小胞輸送に機能していると考えられている液胞タンパク質ソーティング10タンパク質(VPS10p)ドメイン認識受容体ファミリーに分類されるソーティリンの分子特性の解析を行い、さらに生活習慣の乱れに起因する高血糖状態における骨格筋内の糖鎖構造解析も同時に行った。ソーティリンの分子特性解析については代表的な単糖類および二糖類が搭載されたバイオセンシングチップを用いた。分子特性解析の結果ソーティリンは一般的なレクチンの糖親和力と比較すると非常に弱いものの、 α ガラクトースと親和性を示す事が示唆された(図4)。このほか、ソーティリンは6'-HSO₃Gal β 1,4-GalNAcへの親和性も示唆されたが、この結果は糖が搭載されたバイオセンシングチップ上の当該糖質の存在量にも依存する事から、今後更に搭載された糖類の濃度やpH、極性解析などの詳細な検討が必要である。一方で、今回の新規なソーティリンの相互作用特性の結果は、糖のトランスポーターやレセプターが糖質過多によって分子錯乱を生じ、この事が最終的に生活習慣病関連疾患に移行するというリスクを有している事を示す結果であった。ガラクトース含有糖鎖のリソソーム内蓄積が原因の疾患としてファブリー病などがあるが、本研究結果から高血糖状態がソーティリンの分子機能を錯乱する事でリソソームにストレスを与える可能性が十分に考えられる。ファブリー病はガラクトシダーゼが遺伝的に欠損することでスフィンゴ糖脂質が平滑筋や神経細胞系に蓄積する事で生じる疾患であるが、ソーティリンの発現増加に伴い促進される筋分化が高血糖状態によって阻害され、合併症誘発リスクを高めている事が考えられた。生活習慣関連疾患のモニタリングについてはガレクチンファミリーに加えソーティリンなどのVPS10pドメイン認識受容体ファミリーの挙動も同時解析する事で、より信頼度の高い生活習慣関連疾患リスクのモニタリングが可能になると考えられる。

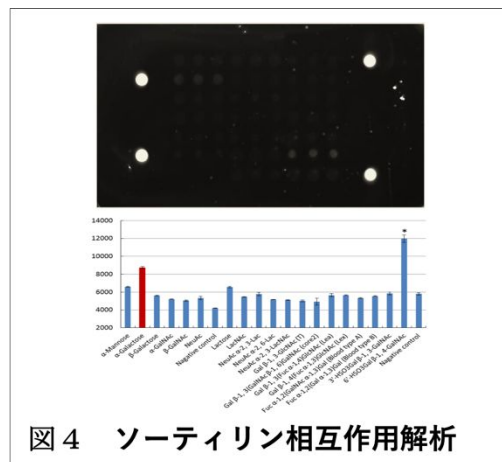


図4 ソーティリン相互作用解析

本研究の最終段階の発展的研究として、通常血糖状態で培養したC2C12細胞(Low glucose: LG)と高血糖状態で培養C2C12細胞(High glucose: HG)の2種類の状態の培養細胞を作成し、ガレクチンファミリーが相互作用を示したAGE群とガレクチンファミリーと結合を示す糖鎖群との関係性について解析を行った。ガレクチンファミリーに最も影響を与える糖鎖構造の特徴として非還元末端側に位置するガラクトースが挙げられる事から、更により深い知見を得るために、本研究ではガラクトース転移酵素1(B4GALT1)およびガラクトース転移酵素2(B4GALT2)の遺伝子発現量解析を行った。結果、B4GALT1およびB4GALT2の両方の転移酵素においてHGの方がLGよりも高い遺伝子発現量を示す事が初めて明らかとなった(図5)。継続的な高血糖状態が誘発する生体内のAGEの生成に伴い、ガレクチンネットワークを介したAGE代謝制御機構が機能している事は本研究において明らかであり、さらにこの機能がガラクトース転移酵素による非還元末端側に位置するガラクトースによってコントロールされている可能性を示す結果が得られた。次に、生活習慣の乱れに起因する生活習慣病患者や軽度の合併症を発症している患者、糖尿病患者などに効果的とされる運動による体質改善について、運動効果と関連疾患との関連性を確認する事を目的として、分化した24時間の運動刺激処理(EPS)を行ったC2C12細胞のB4GALT1およびB4GALT2の遺伝子発現量解析を行った。結果、LG条件下におけるB4GALT1の遺伝子発現量は、EPS処理を行う事によって減少した。またB4GALT2遺伝子の発現量も同様にLG条件下においてEPS処理を行う事により減少傾向を示した。また、この減少傾向はHG条件下においても同様であった。さらにEPS処理の前後において生細胞数の変動に差は認められなかった事から、この遺伝子発現の挙動は生細胞数変動によるものではなく、運動効果によるものである事が明らかとなった。B4GALT1およびB4GALT2は高血糖状態において有意な発現量増加を示すが、増加した遺伝子発現量の増加はEPS処理によって減少する事は無かった。本実験において行ったEPS処理は健康人の短期の運動量に相当するレベルであった事から、高血糖状態における短期での運動効果は効果的ではない事が本研究において示された。

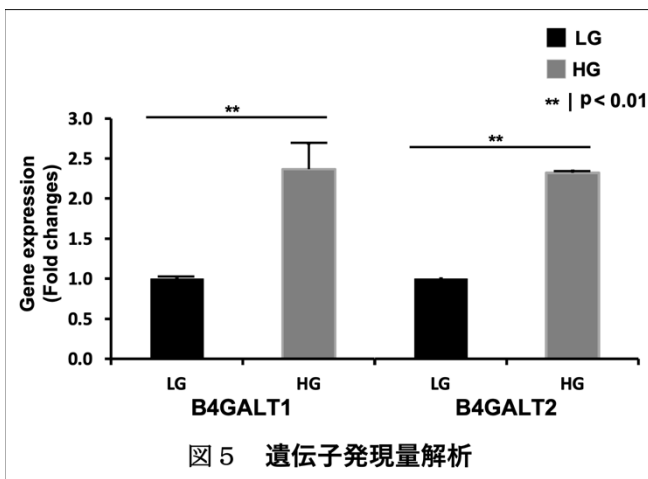


図5 遺伝子発現量解析

本研究を総括し、生活習慣病による運動機能障害の克服をめざした、ガレクチンネットワークを基盤とする運動機能障害の解明と生活習慣のリスク診断が可能なバイオチップの開発とその応用を行い、ガレクチン群と AGE 群との関連性について明らかにする事ができ、細胞内の糖代謝と AGE 化に関連する因子の挙動を明らかにすると共に糖質過多や糖代謝異常に起因するとされる疾患と AGE に関連する合併症併発のリスクを診断する上での重要な知見を得る事ができた。本研究の今後の進展によりさらに多くの情報量を搭載した高精度のマイクロアレイチップを発展的に開発する事で、糖尿病や長期食習慣の乱れなどにより生じる長期高血糖状態が誘発する種々の合併症および AGE 群との関係性についてさらに網羅的に挙動把握が可能となり、さらに、様々な運動強度や運動周期、運動回数などを同時に多階層にモニタリングし、適切な運動負荷を基盤とした生活習慣の改善とその状況把握が可能な新しい概念のバイオセンサ開発が可能となる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Risa Horiuchi, Yukari Nakajima, Shosaku Kashiwada, Nobumitsu Miyanishi. Effects of silver nanocolloids on plant complex type N-glycans in *Oryza sativa* roots. Scientific Reports. 2018, 8:1000. doi: 10.1038/s41598-018-19474-z. (査読有)

Ken-ichi Kawashima, Yuri Ishiuchi, Miki Konnai, Saori Komatsu, Hitoshi Sato, Hideo Kawaguchi, Nobumitsu Miyanishi, Jerome Lamartine, Masugi Nishihara, Taku Nedachi. Glucose deprivation regulates the progranulin-sortilin axis in PC12 cells. FEBS Open Bio. 2016, 7(2):149-159. doi: 10.1002/2211-5463.12164. (査読有)

Risa Horiuchi, Naoki Hirotsu, Nobumitsu Miyanishi. N-glycan transition of the early developmental stage in *Oryza sativa*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2016, 477(3):426-432. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.082. (査読有)

堀内 里紗, 宮西 伸光.
N 結合型糖鎖構造解析から植物の変遷を垣間みる-植物種間に見られる糖鎖構造の多様性-
化学と生物「今日の話題」, 2016, Dec.20th:13-15. (査読無)

〔学会発表〕(計9件)

・国際学会発表

Yoshitaka Akutsu, Takumi Wakisaka, Risa Horiuchi, Kiyoshi Hayashi, Taku Nedachi, Nobumitsu Miyanishi., Gene expression analysis of glycosyltransferases of skeletal muscle cells and its exercised condition in hyperglycemic condition., 29th International Carbohydrate Symposium, Lisbon, Portugal, 2018.

Nana Abe, Risa Horiuchi, Kiyoshi Hayashi, Tadasu Urashima, Nobumitsu Miyanishi., Structural analysis of milk oligosaccharides in bovine colostrum., 29th International Carbohydrate Symposium, Lisbon, Portugal, 2018.

Yoshitaka Akutsu, Takumi Wakisaka, Risa Horiuchi, Takayuki Ishii, Taku Nedachi, Nobumitsu Miyanishi., Structure analysis of N-glycan containing sialic acid of skeletal muscle cells in hyperglycemic condition., 19th European Carbohydrate Symposium (19th EUROCARB), July 2-6, Barcelona, Spain, 2017.

Risa Horiuchi, Naoki Hirotsu, Nobumitsu Miyanishi, (2017) Structural analysis of free-N-glycan in *Oryza sativa* root, 19th European Carbohydrate Symposium (19th EUROCARB), July 2-6, Barcelona, Spain, 2017.

Risa Horiuchi, Naoki Hirotsu, Saman Seneweera, Nobumitsu Miyanishi., N-Glycan analysis of wheat germ exposed to high CO₂ concentration., XXIV International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO 24), August 27-September 1, Jeju, Korea, 2017.

Takumi Wakisaka, Hitoshi Sato, Takayuki Ishii, Risa Horiuchi, Taku Nedachi, Nobumitsu Miyanishi., Comparative analysis of N-glycans in skeletal muscle cells and its exercise condition., Society for Glycobiology (SFG) Annual Meeting, Nov 19-22, New Orleans, USA, 2016.

Risa Horiuchi, Yukari Nakajima, Shosaku Kashiwada, Nobumitsu Miyanishi., N-Glycan transition of early developmental *Oryza sativa* seedlings exposed by silver nanocolloids., Society for Glycobiology (SFG) Annual Meeting, Nov 19-22, New Orleans, USA, 2016.

・国内学会発表

堀内 里紗, 中島 由加里, 柏田 祥策, 宮西 伸光, 銀ナノコロイド曝露を受けたイネ初期生長時における糖鎖の挙動, 第 35 回日本糖質学会年会, 9.1-9.3, 2016.

脇坂 卓実, 佐藤 整, 石井 貴之, 堀内 里紗, 根建 拓, 宮西 伸光, マウス大腿筋由来 C2C12 細胞の糖鎖発現と運動の相関解析, 第 35 回日本糖質学会年会, 9.1-9.3, 2016.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 根建 拓

ローマ字氏名： Taku NEDACHI

所属研究機関名： 東洋大学

部局名： 生命科学部

職名： 教授

研究者番号(8桁)： 50375200

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。