

令和元年5月21日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05838

研究課題名(和文)細胞の老化や病変における糖鎖マーカーの探索と薬剤スクリーニング

研究課題名(英文) Search of carbohydrate marker in aging or the lesion of cells and the drug screening

研究代表者

畑中 研一 (Hatanaka, Kenichi)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：70167584

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、糖鎖プライマー法を用いて培養細胞の糖鎖合成をモニターし、細胞の老化や病変によって糖鎖構造にどのような変化をもたらされるのかを明らかにすることを試みた。また、糖誘導体を用いて糖鎖合成を変化させ、細胞機能を制御することも試みた。老化細胞においてはガングリオシドGM2型糖鎖の増加や中性糖脂質Gb3型糖鎖の蓄積が示唆された。また、4位のヒドロキシル基をフッ素で置換したN-アセチルガラクトサミンやガラクトースを用いて悪性化したガン細胞の糖鎖合成をモニタリングした。さらに、フッ素化ガラクトースには細胞増殖を阻害する働きがあることを新たに発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖は遺伝子の情報に直截支配されないため、生体の状態を反映して変化する。例えばガンの悪性化によっても糖鎖構造が変化するが、悪性化の結果として糖鎖が変化する場合と糖鎖の変化が原因で悪性化する場合がある。本研究では、細胞の老化やガン化に伴う糖鎖の変化をモニタリングすると同時に、フッ素化糖を投与して糖鎖構造を変化させ、細胞機能を変えることを試みた。その結果、フッ素化ガラクトースを投与すると、ガン細胞を殺さず増殖を抑えることを見出した。これまでの抗ガン剤がガン細胞を殺すことを目的としていたのに対して、ガン細胞の増殖を抑えるだけなので、副作用の小さい新しいタイプの抗ガン剤となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, the carbohydrate synthesis of the cultured cell was monitored using the saccharide primer method, and what kind of change was brought in saccharide chain structure by aging and the lesion of the cell was investigated. In addition, the change of carbohydrate structures and the control of cell functions by using monosaccharide analogs. The increase in ganglioside GM2 type saccharide chain and the accumulation of the neutral glycolipid Gb3 type saccharide chain were suggested in the aging cell. In addition, using N-acetyl galactosamine and galactose which substituted a hydroxyl group of the C-4 position for fluorine atom, saccharide chain biosynthesis of the malignant cancer cell was monitored. Furthermore, New function of the fluorinated galactose was discovered. It was the inhibitory effect of cell proliferation.

研究分野：糖鎖生命工学

キーワード：糖鎖 老化 ガン化 フッ素化糖 細胞増殖

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

1. 研究開始当初の背景

生体分子のうち、タンパク質は DNA の遺伝情報から直接合成される(複製 転写 翻訳)のに対して、糖鎖はタンパク質である酵素が働いて合成される。即ち、生体が置かれている環境(内的環境や外的環境)の変化は、タンパク質では「発現量の違い」に反映され、糖鎖では「構造の違い」に反映される。糖鎖合成は複数の酵素(糖転移酵素)が働いて合成されるため、「種々の構造の糖鎖の量」を観察することが生体の変化を捉えることに繋がる。

本研究では、生体における老化やガン化(病変)が糖鎖構造にどのように反映されるのかについて「糖鎖プライマー法」を用いて細胞レベルで解析する。それによって、老化やガン化の指標となる糖鎖を見つけ出すことを目的とする。

「糖鎖プライマー法」は、本研究者が山形達也博士らと共に開発した方法であり、糖鎖の簡便な合成法に使われてきた。「糖鎖プライマー法」とは、長鎖アルキル基を有する単糖や二糖を細胞培養している培地に投入し、細胞によって取り込まれた後に細胞内の酵素で糖鎖伸長され、生成物が再び培地中に放出される糖鎖合成法である(下図)。



本研究では、このような糖鎖プライマー法を、様々な糖鎖の合成に用いるのではなく、細胞の状態を変えることによって変化するオリゴ糖組成をモニタリングすることに用いる。糖鎖プライマー法を糖鎖合成のモニタリングに用いる際の利点を以下に示す。

(1) 細胞を破壊することなくオリゴ糖鎖をモニタリングすることができる。通常、細胞内に存在する糖鎖の構造や量を調べる場合には、細胞を破壊(ホモジナイズ)した後に糖鎖のみを精製するという煩雑な操作が必要であるが、糖鎖プライマー法では糖鎖伸長物が細胞外(培地中)に放出されるため、ごく簡便な抽出のみで糖鎖を観察することができる。

(2) ごく微量の糖鎖を観察しようとする場合、シグナルを増幅してモニタリングすることができる。糖鎖プライマーは、細胞内にて糖鎖伸長を受けた後に細胞膜に留まらずに細胞外に放出されるために酵素に対して生成物阻害がかからず、その結果として細胞内の糖鎖合成を増幅して観察することが可能となる。

(3) 糖鎖プライマー法を用いると、老化誘導因子の投与直後やガン性変化などの病変直後、或いは薬剤探索の研究における薬剤投与直後の変化のみを観察することができる。通常の細胞における細胞内の糖鎖組成(種々の糖鎖構造とその量)は細胞の置かれている環境の変化に伴い変化しているが、実際に観察できる糖鎖組成は環境変化前の糖鎖組成に環境変化後の糖鎖組成を加えたものとなる。一方、糖鎖プライマー法では、糖脂質の脂質部分が天然物とは異なるため、プライマー投与後の糖鎖合成のみを観察することが可能となる。

以上のように、糖鎖プライマー法は、細胞内の糖鎖合成をモニタリングする優れた方法といえる。特に、環境変化後の糖鎖合成のみを観察できるのがこの方法の最大の特長である。

2. 研究の目的

(1) 細胞の老化に伴う糖鎖組成の変化を明らかにする。累積分裂回数(PDL)の異なる細胞における糖鎖組成を観察することによって、細胞老化の指標となる糖鎖構造を確定する。また、細胞の種類を変化させ、細胞別の老化指標糖鎖を調べる。さらに、細胞老化に伴って糖鎖組成の変化が起こる累積分裂回数を種々の細胞について調べ、老化までに要する分裂回数(何回分裂すると老化するのかということ)が細胞の種類によってどのように異なるのかを確認する。一方、過酸化水素などの老化誘導因子を投与した際の細胞老化を糖鎖組成の変化によってモニタリングし、細胞老化を誘導する条件を明らかにする。

(2) 細胞のガン化に伴う細胞組成の変化を明らかにする。細胞はがん化すると、ガラクトース転移酵素やN-アセチルガラクトサミン転移酵素の活性が変化して、糖鎖構造が変化することが知られている。本研究では、細胞のガン化に伴う糖脂質組成の変化(特に、末端にガラクトースやN-アセチルガラクトサミンを有する糖鎖の量)を調べる。また、ガン細胞の悪性化を亢進するとされる糖鎖の制御を行い、新規な抗ガン剤開発の足がかりとする。具体的には、N-アセチルガラクトサミン転移酵素の阻害剤となる化合物(フッ素化N-アセチルガラクトサミン)を合成する。

(3) (2)と同様に、フッ素化ガラクトースを用いて糖鎖合成と細胞機能を調べる。

3. 研究の方法

(1) 老化細胞における糖鎖マーカの探索

ヒトの繊維芽細胞は *in vitro* での培養が容易であり、50-100 回程度分裂するとそれ以上分裂しなくなるという性質を示すため、細胞老化研究のモデルとしてよく用いられている。本研究では、東京都老人総合研究所(現:健康長寿医療センター)で樹立された TIG 細胞を用いる。TIG 細胞のうち、肺由来の TIG-1、筋肉由来の TIG-2M、皮膚由来の TIG-121 を用いて糖鎖合成をモニタリングする。これら 3 種類の細胞に糖鎖プライマー(ドデシルラクトシド)を投与し、分裂回数や由来組織の違いによって合成される糖鎖の組成がどのように変化するかを観察する。因みに、ヒト繊維芽細胞はガングリオシド系糖脂質である GM3 や GD3 を高発現し、GM2 や GD1a といったガングリオシドも発現していることが知られている。

細胞培養における細胞老化の指標としては通常「継代数 (passage number)」が用いられることが多いが、継代数はその細胞株が何回継代されたものかを示す数字であり、細胞が何回分裂したかという情報を含まない。そのため本研究では、より厳密に細胞増殖の履歴を表す指標として PDL (population doubling level) を用いる。PDL とは、 $\log_2(N/N_0)$ (ここで N_0 は播種時の細胞数で N は培養終了時の細胞数) の値を累計したものであり、細胞老化を表す指標として継代数よりも適していると考えられる。例えば、1 回の継代により細胞数が 4 倍になったとすると、PDL の値は 2 だけ増加する。

本研究では、3 種類の TIG 細胞について老化の指標となる PDL が異なる細胞のストックを複製し、それぞれに糖鎖プライマー(ドデシルラクトシド)を加えることにより、老化に伴う糖鎖組成の変化を観察する。

(2) ガン化細胞における糖鎖マーカの探索

ガン細胞に糖鎖プライマー法を投与し、ガン細胞で合成される糖脂質の組成をモニタリングすることによって、ガンマーカを探索する。初年度は、N-アセチルガラクトサミン転移酵素の活性が変化することが分かっている Renal Cell Carcinoma 由来細胞について、細胞を培養している培地中に糖鎖プライマー(ドデシルラクトシドまたはその誘導体)を投与することにより、N-アセチルガラクトサミンを含むオリゴ糖鎖(文献では非還元末端に N-アセチルガラクトサミンを有するヘプタサッカライド)が確認できることを LC-MS を用いて検討する。

一方、NIH/3T3 細胞(繊維芽細胞)についても同様の実験を行う。NIH/3T3 細胞はマウスの胎児皮膚から分離した培養細胞で、ガン細胞ではないが、コンフルエントに培養するとガン化することが知られている。この性質を利用して、コンフルエントになっているものに対して糖鎖プライマーを投与し、糖鎖伸長生成物を精製して両者の糖鎖組成を解析し、ガン化の前後における糖脂質糖鎖のプロフィールを比較する。

(3) ガン化細胞におけるマーカの制御(新規抗ガン物質の開発)

ガン細胞の悪性化を亢進する糖脂質(オリゴ糖)の発現制御を試みる。具体的には、糖脂質糖鎖のうち N-アセチルガラクトサミンを含むオリゴ糖の生合成を制御する。ここでは、N-アセチルガラクトサミン転移酵素を制御する薬剤の開発を行う。フッ素原子を有する単糖が糖転移酵素の阻害剤として働くことが報告されているので、フッ素化 N-アセチルガラクトサミンを化学合成し、糖転移酵素阻害活性を検証する。さらに、フッ素化ガラクトースを用いても同様のことを調べる。

4. 研究成果

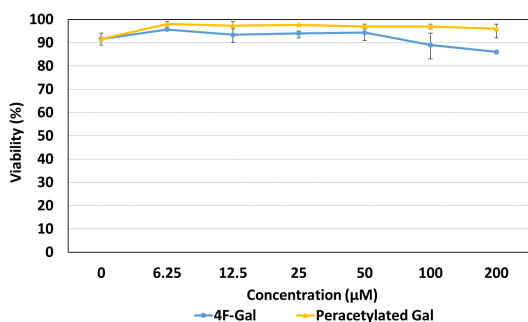
(1) 細胞老化によって糖鎖構造にどのような変化がもたらされるのかを明らかにすることを試みた。累積分裂回数(PDL)の異なるヒト正常線維芽細胞 TIG-1 に対し、様々なスフィンゴ糖脂質の前駆体であるラクトシルセラミドを模したアルキルラクトシドを投与し、48 時間培養した後、培地から糖鎖伸長生成物を逆相 SPE で抽出し、イオン交換 SPE によって酸性化合物と中性化合物を分離した。順相カラムを用いた LC-MS により構造解析を行い、検出された各化合物のマスプロトグラムのピーク面積を基にして、若い細胞(PDL が 40 程度)と老化細胞(PDL が 60 以上)との間で、糖鎖伸長生成物の定量比較を行なった。その結果、老化細胞におけるガングリオシド GM2 型糖鎖の増加や、中性糖脂質 Gb3 型糖鎖の蓄積が示唆された。また、培養環境が糖鎖合成に与える影響を明らかにすることを目的として、酸素供給源として有用であると期待されるフルオラス溶媒を用いた液/液界面培養系における糖鎖合成の評価も行った。培地とフルオラス溶媒との界面において培養したマウスメラノーマ B16 細胞について、ラクトシルセラミドを投与し、解析を行った。ドデカフルオロヘプタノール/D-MEM 培地の二層からなる培養系においては、細胞内への糖鎖プライマーの取り込みが見られなかったのに対し、パーフルオロアルカン/D-MEM 培地の系では、ポリスチレン容器で培養した場合と同様に、B16 細胞によって Lac-C12 プライマーにシアル酸が付加し、ガングリオシド GM3 型へと伸長するという事を見出した。パーフルオロアルカンを用いた場合に、内在性の GM3 がより多く細胞内にとどまっているということも示されたため、フルオラス溶媒と接していることにより細胞膜の透過性が影響を受けている可能性が考えられる。

(2) 悪性度が高い腎細胞ガンに特異的に高発現し、その悪政度亢進に関わる事が示唆されている糖鎖に着目し、糖アナログを用いた糖転移酵素阻害剤を用いてその発現量を抑制することで腎細胞ガンの悪性度を低減させることを目的として研究を行なった。N-アセチルガラクトサ

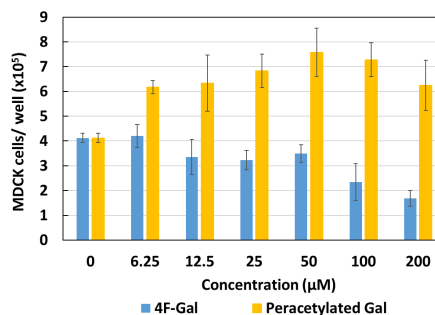
ミンの4位のヒドロキシ基をフッ素原子で置換した4-FGalNAcと6位のヒドロキシ基をフッ素原子で置換した6-FGalNAcを合成し、活性を調べた。先ず細胞毒性がないことを確かめ、糖鎖プライマー法を用いて、悪性度の高い腎ガン細胞の糖鎖合成への影響を調べたところ、6-FGalNAcが細胞内の糖鎖合成に影響を及ぼすのに対して、4-FGalNAcは影響しないことが分かった。6-FGalNAcによって発現量が制御された糖鎖の構造は解析中である。

(3) ガラクトースの4位のヒドロキシ基をフッ素で置換してアセチル化した化合物4-FGalを投与すると、腎ガン細胞であるMDCK細胞やCOS7細胞において細胞増殖を阻害する効果が見られた。細胞の生存率は90%以上であり、4-FGalに細胞毒性はないことがわかった。特に、4-FGalの濃度が200 μ Mのとき、48時間後の細胞数は播種した細胞数とほとんど変わらず細胞の生存率は90%であった。即ち、高濃度の4-FGal存在下においては、生存したまま増殖しないという結果を得た。このことは、ガン細胞を増殖させることなく生かしておくことで、副作用の少ない抗ガン剤となる可能性を示す。この現象は腎ガン細胞に顕著に見られ、肝細胞であるHepG2細胞では弱い増殖阻害が見られる。一方、メラノーマであるB16細胞では増殖抑制はかからなかった。

4-FGal には細胞毒性がない



4-FGal は細胞増殖を抑制する



5. 主な発表論文など

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Amane Sutoh, Maria Carmelita Z. Kasuya, Kenichi Hatanaka, Cellular glycosylation of amphiphilic saccharide primer in liquid/liquid interface culture system employing fluoruous solvents, *Journal of Fluorine Chemistry*, 査読有、186 巻、2016、76-79
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2016.06.011>

〔学会発表〕(計 3 件)

C.Kikuchi, M.Z.Kasuya, A.Tsuchida, A.Matsuda, K.Hatanaka, Saccharide primer detects glycolipid biosynthetic trend in renal cell carcinoma, 28th International Carbohydrate Symposium (国際学会) ニューオリンズ (アメリカ合衆国)、2016年7月19日

M.Z.Kasuya, K.Hatanaka, Optimized production of glycolipids using saccharide primer and animal cells cultured with fluoruous solvent, 28th International Carbohydrate Symposium (国際学会) ニューオリンズ (アメリカ合衆国)、2016年7月19日

園部恵理、粕谷マリアカルメリタ、畑中研一、フッ素置換糖アナログの合成と細胞増殖阻害、第37回日本糖質学会年会(仙台)、2018年8月30日

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし