

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651232

研究課題名（和文） 「細胞診断分子」を用いる糖鎖疾患診断法の開発

研究課題名（英文） Development of a new diagnostic method by using "diagnosis molecule" for a disease with carbohydrate abnormality

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

研究成果の概要（和文）：「細胞診断分子」であるドデシルラクチドを細胞培養の培地に加え、数時間で細胞内の糖鎖合成の状態が観察できることを見出した。ドデシルラクチドと同時に糖鎖合成に影響する分子を投与すると、細胞内での糖鎖合成の変化を観察できた。また、糖タンパク質の糖鎖にドデシル基を結合させても、糖鎖の伸長が容易に確認できた。さらに、フルオラスグリコシドを用いても同様のことができることが分った。

研究成果の概要（英文）：It was shown that saccharide synthesis in the cell can be observed in several hours by adding dodecyl lactoside as "The molecules which diagnose a cell" to the culture medium. When a molecule which affects on saccharide synthesis was added with dodecyl lactoside, change of saccharide synthesis was easily observed. The conjugate of oligosaccharide of glycoprotein and dodecyl chain could be used for the analysis of chain elongation of oligosaccharide. Moreover, it could be done with fluoruous glycoside.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：診断薬探索、糖鎖診断、糖鎖、生体分子、細胞・組織、酵素

1. 研究開始当初の背景

病変組織から得られる細胞や薬剤を投与した細胞では、様々な代謝異常が起こっている。このことは生命活動そのものに大きく影響するため、早急な診断と治療が望まれている。病気の診断の一例にバイオマーカーが挙げられる。バイオマーカーは病変した細胞に特有の化合物（タンパク質、糖鎖など）であり、バイオマーカーを利用した診断は、通常、血液などの体液中に放出された微量の化合物を検出することにより行われる。例えば、癌マーカーのオリゴ糖などがこれにあたる。しかしながら、血中の化合物の量が少ないうえに狭雑物が多く、病変前の正常な状態における代謝物からの変化値として測定される

ため、明確な Threshold を決めることが困難である。一方、薬剤の副作用として観察される代謝異常に関しても、薬剤投与前の正常な代謝物からの変化値として測定されるため、揺らぎが大きく、解明が難しい。

我々はこれまでに、長鎖アルキルグリコシドを細胞培養の培地中に加えることによって、細胞内に取り込まれた後、ゴルジ体に輸送され、糖転移酵素の作用を受けて糖鎖伸長が行われた後に再び培地中に放出されることを見出している（このことを利用した糖鎖生産技術の開発研究は NEDO プロジェクトにおいて行った）。従って、病変した細胞に長鎖アルキルグリコシドを投与すると、現時点での（病変後の）糖転移酵素の働き（即ち、

糖代謝異常)をダイレクトに観察することが可能になると考えられる。さらに、この方法は薬剤投与による糖代謝異常にも応用することが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、病変細胞に「細胞診断分子」を投与することによって、病変細胞の代謝異常(特に糖鎖異常)に関する知見を得、診断に用いることができるかどうかについて検討する。また、薬剤投与と同時に「細胞診断分子」を投与することによって、細胞に対する薬剤の副作用をより明確に観察する手法を開発する。

細胞の外側(培地)に投与した両親媒性分子(長鎖アルキルグリコシド)が細胞膜を通過して細胞内で修飾された後、再び細胞膜を通過して細胞外(培地中)へ出てくることを利用して、細胞の診断に使おうとする点が本研究における新規なアイデアである。長鎖アルキル基の長さ(炭素数)を調整することによって、ヒト細胞の細胞膜を自由に通過できる分子を構築することがこれまでにない斬新なアイデアである。即ち、細胞膜との親和性を適度に保つことによって、細胞膜に自由に入って行き、且つ自由に出てくるのが可能となる。我々の行った予備的な実験では、細胞膜を単純化したモデルであるリポソームを用いて、炭素数の異なるグリコシドを添加すると、リポソーム中に取り込まれる長鎖アルキルグリコシドの割合は炭素数と直線関係にあり、C17で60%、C15で40%、C14で25%、C12で5%であった。この実験結果は、炭素数が11か12程度の長鎖アルキルグリコシドが細胞膜を自由に出入りすることができるため、診断分子として最も適していることを示唆している。本研究は、この細胞膜を自由に出入りできる分子が細胞内において細胞の状態をどれだけ反映して修飾され、どれだけ有用な情報を提示するのか、について探ることを主要な目的としており、疾患の新規な診断方法を探求する極めてチャレンジングなテーマである。

これまでの診断法では、細胞そのものを可溶化して得られる微量成分を精製して分析するのが通例であるが、本研究で開発する手法を用いれば、複雑な精製や微量分析が必要なくなる点が極めて新しい。即ち、CTやMRIなどといった医療に用いられている機器分析手法と同じように、組織や細胞に働きかけるインプットに対応するアウトプットを測定することにより、選択的なシグナルを測定できるようになる。このような手法で物質を用いてに行っている例としては、放射性同位元素を有するチミジン取り込み等の例が挙げられるが、同位元素や蛍光化合物を用いない方法としては、本研究の方法が卓越してい

ると思われる。

本診断方法の特に優れている点は以下の2点である。まず、病変によって起こる異常な糖鎖の生成が増幅される。本手法で「細胞診断分子」として用いる長鎖アルキルグリコシドは細胞膜を比較的自由に出入りできるため、細胞内で生成する異常糖鎖は細胞外へと運び出され、結果として次から次へと異常糖鎖が合成されては細胞外へ運び出されていくこととなる。このことは、長鎖アルキルグリコシドにおける親水-疎水のバランスが細胞膜中と培地中の双方で同程度の安定性を示すことに起因すると推察される。具体的には、炭素数12の化合物を用いることによって達成できる。この「増幅作用」が診断に取って有利であることは明らかである。しかも、細胞を非破壊のまま解析できるため、細胞内に存在する非常に多くの種類の化合物に邪魔されることなく分析を行うことができる。2点目は、既に病変している時点での代謝異常のみを観察できる点である。通常の解析法では、病変する前の正常な状態で作られた化合物(この場合は糖鎖)も多く含まれていて、病変による異常糖鎖が微量の場合、正常化合物の陰に隠れてしまう可能性もあるが、本研究の方法では、インプットされる「細胞診断分子」には病変後の修飾だけが起こるため、観察されるアウトプットが細胞の状態を直接反映することになる。このことは、本手法が細胞の糖鎖合成に対する薬物の副作用(ある意味での病変)にも適用可能であることを意味する。即ち、薬剤投与と同時に細胞診断分子を投与することによって、薬剤に起因する糖代謝異常を正確に知ることができる。例えば、治療薬として使われるシアリダーゼ阻害剤の存在下、脳神経細胞が作り出すガングリオシド(ガングリオシドはシナプス形成に重要な糖脂質である)に異常があるかないか等を観察することも可能になるとと思われる。

3. 研究の方法

まず、炭素数12のドデシルラクトシドを「細胞診断分子」として、細胞への取り込み、ゴルジ体への輸送、糖転移反応の有無、細胞外への放出、という4つの過程について、それぞれに要する時間と効率を詳細に調べ、最適な診断条件を確立する。次に、病変のモデル系として酵素阻害剤などの薬剤を投与した細胞を用いて、ドデシルラクトシドの「細胞診断分子」としての可能性を探る。さらに、実際の病変細胞として糖鎖異常の知られている筋ジストロフィーを起こした細胞やガン化した細胞を用いて、同様の診断を試みる。また、ラクトシド以外の糖(グルコサミンやガラクトサミン、ラクトサミンなど)もドデシル体を合成し、診断に用いる。さらに、よ

り簡便にモニターすることを目的として、フルオロアルキル基の導入も試みる。

4. 研究成果

【最適な診断条件を確立する】

ドデシルラクトシドを細胞培養の培地に添加すると、細胞内に取り込まれ、ゴルジ体に輸送された後、糖転移酵素の作用で糖鎖伸長が起こり、再び細胞膜を通過して細胞外に放出される。

細胞への取り込み、ゴルジ体への輸送、糖転移反応の有無、細胞外への放出、という4つの過程それぞれについて、まずは要する時間を測定した。培地中へのドデシルラクトシド（診断分子）の添加から一定時間後の細胞画分と培地画分のグリコシド化合物の組成を分析することにより、診断に要する時間を推定した。取り込みに要する時間は、細胞内のプライマー濃度変化を測定することで推定した。ゴルジ体への輸送は、蛍光ラベルした化合物によって調べた。また、糖転移反応に関しては、細胞画分と培地画分の糖鎖伸長化合物の時間変化量を調べることで推定した。まずは単純化したモデルとして、ラクトースにシアル酸が転移した3糖のみを与えるB16メラノーマ細胞を用いて行った。さらに、放出速度に関しては、細胞画分と培地画分に存在する糖鎖伸長化合物の比の時間変化によって推定した。B16以外の細胞を用いて、複雑な構造の糖鎖についても時間変化を追うことによって、糖転移反応の効率を計算した。

【薬剤投与における細胞の糖代謝異常を診断分子で測定する】

病変のモデル系として酵素阻害剤などの薬剤を投与した細胞を用いて、ドデシルラクトシドの「細胞診断分子」としての可能性を探った。GI-1細胞、ONS-76細胞、MDCK細胞、Cos7細胞、RERF細胞などの細胞培養系に、酵素阻害剤であるツニカマイシン、カスタノスペルミン、デオキシノジリマイシン（ガラクトノジリマイシンとマンノジリマイシンなども含む）、各種シアリダーゼ阻害剤（タミフルなど）、フッ素化糖やデオキシ糖の他、ペニシリン等の抗生物質を投与し、前述のドデシルラクトシドの同時投与により、糖鎖伸長の変化を観察した。薬剤を投与した群と投与していない群でのドデシルグリコシド画分のHPTLCプロフィールを比較することにより、薬剤投与による影響（細胞の糖代謝異常）を測定した。

【糖タンパク質糖鎖の異常合成を診断する】

実際の病変細胞として糖鎖異常の知られている筋ジストロフィーを起こした細胞を用いて、同様の診断を試みた。筋ジストロフィーを起こしている細胞では、ジストログリカンと呼ばれる糖タンパク質の糖鎖部分に

異常が見られる。本研究では、この糖タンパク質における糖鎖異常が糖転移酵素の働きの変化によるものだと考え、まずは筋ジストロフィーを起こしていない細胞にドデシル（N-アセチルグルコサミン）マンノシドを投与して、ジストログリカン糖鎖の形成を観察した。本研究で用いるドデシル（N-アセチルグルコサミン）マンノシドは、ドデシルラクトシドのラクトース部分をGlcNAcManという別の二糖に置き換えた化合物であり、化学合成して用いた。

【フルオラスグリコシドを用いて診断する】

ドデシルラクトシドの炭化水素（ドデシル基）の一部をフルオロアルキル基で置き換え、同様の分析を行うとともに、より簡便な診断法について検討した。フルオロアルキル基は「フルオラス性」という特殊な性質を持ち、水とも有機溶媒とも混合しない。そのため、細胞などの生体試料から得られる複雑な混合物からの単離精製が比較的容易である。本研究では、フルオラスグリコシドを投与した細胞培養の培地から得られた糖鎖伸長生成物の分離を、フルオラスアルコールによる抽出またはフルオラスシリカゲルによる極小カラムクロマトグラフィーにより行った。この方法でのサンプル調整が可能となれば、パストゥールピペット程度の大きさのフルオラスシリカゲルカラムを通すだけでよいので、HPTLCの前処理が極めて簡素化されることになる。

また、フルオロアルキル基の疎水性を評価した。疎水性を示す長鎖アルキル基として、炭化水素にフルオロアルキル基が結合したハイブリッドタイプの長鎖アルキル基を用いて、フルオロメチル基の疎水性を評価した。通常、フルオロカーボンと混合しないが、親水基を結合させた両親媒性の化合物同士は、水から逃れようとする力で混合することが可能である。このことを利用して、ハイブリッドタイプの長鎖アルキル基を有するオリゴ糖（ラクトシド）を用いて、フルオロメチル基の疎水性を評価した。具体的には、 $F(CF_2)_m-(CH_2)_n-O-Lactose$ 分子の m と n を変化させた両親媒性化合物の表面張力を測定することにより、臨界ミセル濃度を計算した。このことによって、細胞膜中において (CF_2) が (CH_2) の1.5倍の疎水性を有することが判った。その結果、細胞膜を自由に入出力できる細胞診断分子として最適な長さのフルオロアルキル基を求めることができた。次に、フルオロアルキル基が実際に診断に使えるかどうかを確かめるため、フルオラスに変えたことによる糖鎖伸長効率など（取り込み速度など）を検討した。その結果、フルオラス基を用いても、糖鎖を有する化合物は細胞内の糖鎖伸長を測る診断分子として使えることが分った。

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6件)

- ①Y. Shimura, J. Suzuki, M. C. Z. Kasuya, K. Matsuoka, K. Hatanaka, A novel method for the production of sialylparagloboside, *Helv. Chim. Acta*, 査読有, Vol.95, 2012, pp67-75.
DOI: 10.1002/hlca.201100246
- ②Y. Shimura, J. Suzuki, M. Muraoka, M. C. Z. Kasuya, K. Matsuoka, K. Hatanaka, Large Scale Biosynthesis of Ganglioside Analogues by RERF-LC-AI Cells Cultured in *HYPERFlask*, *Preparative Biochem. Biotech.*, 査読有, Vol.42, 2012, pp378-392.
DOI: 10.1080/10826068.2011.627971
- ③M. Tojino, M. Mori, M. C. Z. Kasuya, K. Hatanaka, A. Kawaguchi, K. Nagata, T. Shirai, M. Mizuno, Immobilization of fluoros oligosaccharide recognized by influenza virus on polytetrafluoroethylene filter, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, Vol.22, 2012, pp1251-1254.
DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.11.057
- ④Y. Shimura, J. Suzuki, M. Muraoka, M. C. Z. Kasuya, K. Matsuoka, K. Hatanaka, Influence of passage number on glycosylation of alkyl lactosides by MDCK cells, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, Vol.114, 2012, pp552-555.
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.06.007
- ⑤M. C. Kasuya, S. Nakano, R. Katayama, and K. Hatanaka, Evaluation of the Hydrophobicity of Perfluoroalkyl Chains in Amphiphilic Compounds That Are Incorporated into Cell Membrane, *J. Fluorine Chem.*, 査読有, Vol.132, 2011, pp202-206.
DOI: 10.1016/j.jfluchem.2011.01.004
- ⑥R. Kojima, M. C. Z. Kasuya, K. Ishihara, K. Hatanaka, Physicochemical Derivory of Amphiphilic Copolymers to Specific Organelles, *Polym. J.*, 査読有, Vol.43, 2011, pp718-722.
DOI: 10.1038/pj.2011.49

[学会発表] (計6件)

- ①Y. Nishiyama, K. Hatanaka, an Efficient Method in Searching for Glycosylation Regulating Compounds, 26 International Carbohydrate Symposium, 7/24/2012, Madrid (Spain).
- ②M. Mizuno, K. Koichi, M. C. Z. Kasuya, K. Hatanaka, Synthesis of Hybrid Glycopeptide, 26 International Carbohydrate Symposium, 7/24/2012, Madrid (Spain).
- ③T. Kimura, K. Miyamura, M. C. Z. Kasuya, K. Hatanaka, Effect of Aglycon Structure on Glycosylation by Cells, 26 International Carbohydrate Symposium, 7/24/2012, Madrid (Spain).
- ④K. Hatanaka, Incorporation of Alkyl and Fluoroalkyl Glycosides into Cell Membrane and Production of Glycolipid Analogues, *Groupe d'Etude et de Recherche en Lipidomique*, 10/27/2011, Lyon (France).
- ⑤K. Hatanaka, Incorporation of Fluoroalkyl Glycosides to Cell Membrane and Saccharide Chain Elongation by Cellular Enzymes, *International Symposium on Fluorous Technologies 2011*, 12/1/2011, Hong-Kong (China).
- ⑥R. Katayama, M. C. Z. Kasuya, K. Hatanaka, Liposomal Uptake of Fluorescent Fluoroalkyl Glycoside, *International Symposium on Fluorous Technologies 2011*, 12/1/2011, Hong-Kong (China).

[図書] (計2件)

- ①K. Hatanaka, Incorporation of Fluorous Glycosides to Cell Membrane and Saccharide Chain Elongation by Cellular Enzymes, *Topics in Current Chemistry* 308, Special Issue "Fluorous Chemistry" edited by Istvan T. Horvath (Published by Springer), pp291-306 (2011).
DOI: 10.1007/128_2011_276
- ②M. C. Z. Kasuya, K. Hatanaka, Melanoma Cell Factory for Glycolipid Production, *Breakthroughs in Melanoma Research* edited by Yohei Tanaka (Published by InTech), pp103-118 (2011).

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.chembio.t.u-tokyo.ac.jp/labs/hatanaka.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし