

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659183

研究課題名(和文)炎症性サイトカイン受容体の糖鎖修飾を標的とした新規抗炎症治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel anti-inflammation therapy against deglycosylation of proinflammatory cytokine receptors.

研究代表者

田中 信之(Tanaka, Nobuyuki)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80222115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、解糖系阻害剤2-Deoxy-D-glucose (2-DG)が、解糖系の阻害ではなく、マンノース代謝からタンパクの糖鎖修飾(N-結合型鎖)を抑制することで、炎症性サイトカイン受容体の糖鎖修飾を抑制し、そのことで炎症反応が抑えられるということを明らかにした。実際に、2-DGやtunicamycin等の糖鎖修飾阻害剤を投与することで、細胞及びマウス個体でのIL-6やTNF- α の受容体への結合と応答が阻害された。更に、炎症性腸疾患、敗血症、関節リウマチ等のマウスモデルの発症を抑制する結果を得た。よって、糖鎖修飾を標的として炎症性疾患を効果的に治療することが可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Anti-proinflammatory cytokine therapies directed against interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α are major advancements in treating inflammatory diseases. We found that the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose (2-DG) attenuated cellular responses to IL-6 by inhibiting N-linked glycosylation of the IL-6 receptor gp130. Aglyco forms of gp130 failed to bind IL-6 and to activate downstream signals. Surprisingly, 2-DG completely inhibited dextran sodium sulfate-induced colitis, a mouse model for inflammatory bowel disease. We found that 2-DG also inhibited signals for TNF- α and IL-1 β , and accordingly prevented death by another inflammatory disease, LPS shock. Finally, orally administered 2-DG alleviated laminarin-induced arthritis in the SKG mouse an experimental model for human rheumatoid arthritis. Our results suggest that glycosylation of proinflammatory cytokine receptors is a potential target to alleviate inflammatory responses.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学・

キーワード：炎症性疾患 炎症性サイトカイン 炎症性サイトカイン受容体 糖鎖修飾 シグナル伝達 抗炎症療法

1. 研究開始当初の背景

我々は、癌抑制因子 p53 による癌化抑制の分子機構を p53 の標的遺伝子の解析から行ってきた (Science, 288,1053-1058,2000; Genes Dev.,17,2233-2238,2003)。更に、p53 が細胞のグルコース代謝のレベルを制限していること、p53 の機能が消失するとこの制御が外れて IKK-NF- κ B-GLUT3 の誘導の経路が活性化し、グルコース代謝が亢進することを発見した。更に、p53 欠胎児線維芽細胞は ras 癌遺伝子単独で oncogenic transformation を来すが、この現象にグルコース代謝の亢進が必須であり、癌化に重要であることを明らかにした (Nat. Cell Biol.,10,611-618,2008)。癌細胞が解糖系を主なエネルギー源として増殖していることは Warburg 効果として古くから知られているが、グルコース代謝そのものが亢進するためには IKK-NF- κ B 経路の活性化が重要であること示した。更に、グルコース代謝の亢進が NF- κ B 経路を介してグルコース代謝を亢進させるポジティブフィードバック機構が存在すること、その機構は IKK β の O-GlcNAc 修飾によることを発見しており (PNAS,106, 3431-3436,2009)、癌はこの機構を使って膨大なエネルギーを作り出していると考えられた。そこで、発癌の過程でのグルコース代謝の役割を解析する目的で、マウス炎症誘発癌に対する解糖系阻害剤 2-DG の効果を検討したところ、2-DG が全く炎症を起こさなくなるという新しい現象を見いだした。更に、その機構が炎症性サイトカイン受容体の糖鎖修飾の抑制によるものであることを発見した。

2. 研究の目的

既に、2-DG 処理細胞は細胞内に GDP-mannose が蓄積していることを見いだしており、2-DG によりマンノース付加反応が阻害されていることが推測され、特に半減期の非常に短い炎症性サイトカイン受容体の糖鎖修飾に影響が出ると考えられる。そこで、その詳細な分子機構と、どのような受容体シグナルに影響するのかを調べ、この治療による効果の検討を行う。同時に、様々なマウス炎症疾患モデルを用いて、その効果を検討する。実際、TNF 受容体スーパーファミリーである RANK 経路の抑制も観察している。現在、抗炎症に効果のある投与量では体重減少は見られておらず、副作用の少ない治療法であると考えているが、長期投与における影響も調べる。更に、マンノース代謝の中間代謝分子や GDP-mannose に修飾を加えて解糖系を阻害しないで糖鎖修飾を抑制する分子の開発を行っていく。

炎症性サイトカイン受容体の糖鎖修飾を標的とした抗炎症治療はこれまでに全く無い概念であり、極めて独自の研究である。炎症性疾患の治療に抗サイトカイン療法が有効なことは知られており、臨床にも広く用いら

れているが、抗体等のタンパクを用いた治療であり、高価であると共に有効性の限界がある。一方、本治療は広範な炎症性サイトカインを抑制し、また経口投与でも有効であることを確認しており、安価であり極めて有用な治療法であると考えている。

3. 研究の方法

炎症性サイトカイン受容体の糖鎖修飾を標的とした抗炎症治療の原理・応用法を研究し、将来の臨床応用を目指す。そのため、2-DG の糖鎖修飾抑制の標的となる酵素の同定を行う。同時に、糖鎖修飾阻害が及ぼす効果について、種々のサイトカインシグナル経路を網羅的に解析して、その効果、副作用の判定についても行う。更に、炎症疾患モデルマウスを用いて 2-DG の効果を調べる。更に RANKL/RANK 経路への抑制効果も解析する。発癌に対する炎症の抑制効果の効果を炎症誘発癌の発症及び p53 欠損マウスを用いて解析する。更に、解糖系に影響しないで糖鎖修飾を抑制する分子を、マンノース代謝の中間代謝分子や GDP-mannose に修飾を加えてその抑制効果を調べることで開発する。

4. 研究成果

炎症性疾患、特に難治性の自己免疫性疾患である慢性関節リウマチや炎症性腸疾患に、炎症性サイトカインに対する分子標的治療が、効果的に行われている。しかし、これらの治療はタンパクを用いたもので、高価であり投与法も限定されており、安価で容易に用いられる薬剤の開発が求められている。我々は、培養細胞で解糖系の阻害剤である 2-deoxy-D-glucose (2-DG) が炎症性サイトカイン IL-6 による下流のシグナル伝達分子 JAK1, JAK2, Tyk2 の活性化と転写因子 STAT3 の活性化を阻害することを見いだした。どのような機構で IL-6 シグナルを阻害するかを解析した所、2-DG が IL-6 受容体である gp130 の分子量の低下を引き起こすことを発見した。この減少は糖鎖修飾が外れたものであり、D-マンノースを過剰投与することで阻害された。更に、解糖系の阻害効果は D-マンノースでは解除されない事、2-DG による IL-6 シグナルの抑制効果は D-マンノースによって阻害される事から、解糖系の阻害ではなく、糖鎖修飾の阻害によってシグナルを抑制する事が推測された。実際、他の糖鎖修飾阻害剤である tunicamycin でも gp130 の糖鎖修飾や IL-6 シグナルを阻害する事、tunicamycin 同様の ER ストレス誘発剤であり糖鎖修飾を阻害しない thapsigargin では阻害効果が見られないことから、糖鎖修飾阻害によって IL-6 シグナルを阻害する事を明らかにした。IL-6 受容体のこのような糖鎖修飾阻害は TNF- α 受容体でも観察され、IL-6 や TNF- α の

受容体への結合が阻害されることを見いだしている。2-DG は 2-deoxy-D-mannose でもあり、高マンノース型糖鎖修飾の阻害が炎症性サイトカインシグナルの阻害を引き起こしていると推測された。更に、マウス個体での効果を解析した結果、2-DG 投与後に IL-6 を注射し、腹腔マクロファージでの gp130 の糖鎖修飾阻害と IL-6 誘導遺伝子の発現抑制が起こる事を見だし、マウス個体でも影響する事を明らかにした。

このようなシグナル阻害は、他の代表的炎症性サイトカインである IL-1 β でも観察された。そこで、ヒト炎症性腸疾患モデルである DSS (dextran sulfate sodium) 腸炎に対する効果を調べた。その結果、2-DG により DSS 腸炎を完全に抑制出来ることを見いだした (図 1)。更に、2-DG に加えて D-マンノースを大量に投与すると解糖系の阻害効果は変わらないが、糖鎖修飾の阻害効果は減弱するが、DSS 腸炎においても D-マンノースにより 2-DG の治療効果が減弱することを見いだしてい

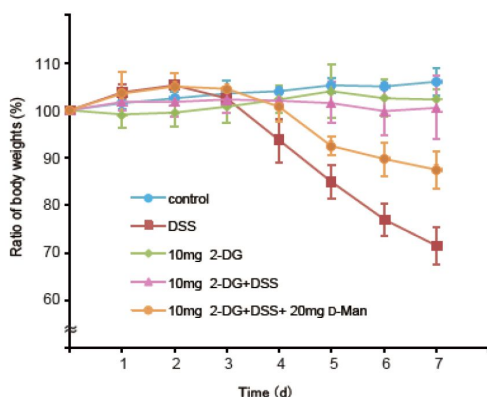


図1 DSS腸炎に対する2-DGの治療効果

DSSによる体重減少(赤)は2-DG連日注射により完全に阻害される(緑)が、マンノース大量投与により阻害効果は減弱する。

る。このことから、2-DG による糖鎖修飾の阻害が炎症の治療に重要ではないかと考えられた。そこで、他の糖鎖修飾剤である tunicamycin を用いたところ、tunicamycin は毒性が強いが腸炎自身は阻害された。このことから、糖鎖修飾の阻害が炎症性サイトカインの抑制によって炎症の治療に有効であると考えられた。更に、ヒト敗血症モデルである LPS (lipopolysaccharide) 投与によるマウス個体死も 2-DG 腹腔内投与により効果的に抑制できた。次に、投与方法を検討し、飲水中に混ぜて経口投与しても、腹腔内マクロファージの gp130 の糖鎖修飾が阻害されることを見いだした。そこで、ヒト慢性関節リウマチのモデルである SKG マウスのラミナリン投与による関節炎発症に対する効果を経口連日投与によって観察したところ、効果的に抑制できることを見いだした。また、3ヶ月連続投与による体重減少や血液生化学検査での異常等の副作用は見られていない。現在、これらの解析結果をまとめて、論文として投稿中である。

その他に有効なシグナルの抑制効果を検討した結果、2-DG が RANK の糖鎖修飾を阻害し、

RANKL シグナルを阻害する事を見いだしていることから、骨粗しょう症モデルに対する効果を検討している。更に動脈硬化や他の自己免疫疾患に対する阻害効果も検討すること考えており、現在検討中である。

更に、癌は炎症によって引き起こされる事が知られているが、高頻度に腫瘍が発生する p53 欠損マウスに 2-DG を経口で投与し続けると、腫瘍の発生が抑制された。また、家族性大腸腺腫症のモデルマウスである min マウスでの大腸腫瘍の発生も抑制した。このことから、高発癌リスクの症例での癌発生の抑制に有効ではないかと推測された。

これらの結果から、炎症性サイトカイン受容体の糖鎖修飾を標的とした抗炎症治療はこれまでに全く無い概念であり、極めて独自の研究である。炎症性疾患の治療に抗サイトカイン療法が有効なことは知られており、臨床にも広く用いられているが、抗体等のタンパクを用いた治療であり、高価であると共に有効性の限界がある。一方、本治療は広範な炎症性サイトカインを抑制し、また経口投与でも有効であることを確認しており、安価であり極めて有用な治療法であると考えている。また、これまでの解析の結果からマンノース付加反応を阻害することが重要であると想定されるので、これを標的とした副作用の少ない新しい治療薬の開発が可能となると考えている。現在までの解析から、このような治療薬の開発は、糖(特にマンノース)に修飾を加えたものを調べることで可能となると考えている。

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3件)

Yamauchi S, Hou YY, Guo AK, Hirata H, Nakajima W, Yip AK, Yu CH, Harada I, Chiam KH, Sawada Y, Tanaka N, Kawauchi K.

p53-mediated activation of the mitochondrial protease HtrA2/Omi prevents cell invasion. J Cell Biol. 2014, 31:1191-207.

Guo AK, Hou YY, Hirata H, Yamauchi S, Yip AK, Chiam KH, Tanaka N, Sawada Y, Kawauchi K. Loss of p53 enhances NF- κ B-dependent lamellipodia formation. J Cell Physiol. 2014, 229:696-704.

Nakajima W, Hicks MA, Tanaka N, Krystal GW, Harada H. Noxa determines localization and stability of MCL-1 and consequently ABT-737 sensitivity in small cell lung cancer. Cell Death Dis. 2014,5:e1052.

〔学会発表〕(計 14 件)

- 1) 田中 信之 : Role of enhanced glycolysis in oncogenic transformation in culture cells and tumor development. 第 71 回日本癌学会学術総会 シンポジウム「Signal transduction and cancer therapy」, 札幌、2012
- 2) 阿部芳憲、田中 信之 : 新規 hedgehog シグナル伝達分子 WDR77 は EGFR シグナルの下流での STAT3 活性化による新しい Gli 活性化機構と細胞の癌化にも関与する. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌、2012
- 3) 中嶋 亘、田中 信之 : 癌遺伝子 E1A 発現細胞における BH3-only 因子 Noxa/Puma によるアポトーシス誘導機構の解析. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌、2012
- 4) 阿部芳憲、川村健治、田中 信之 : 新規 hedgehog シグナル伝達分子 WDR77 による癌化に関わる STAT3 を介した新規 Gli1 活性化機構. 第 35 回日本分子生物学会年会、博多、2012
- 5) 照沼美沙紀、中嶋 亘、浅野由三、武内 進、川端博秋、田中 信之 : アポトーシス誘導因子 Noxa タンパクの機能制御と癌化の抑制における役割. 第 35 回日本分子生物学会年会、博多、2012
- 6) 中嶋 亘、田中 信之 : アポトーシス促進因子 Bax の BH2 ドメインによる制御と活性化機構の解析. 第 35 回日本分子生物学会年会、博多、2012
- 7) 谷村篤子、上原郁野、田中 信之 : DSS 誘発腸炎マウスモデルでの p53-p21 経路の抑制. 第 35 回日本分子生物学会年会、博多、2012
- 8) 上原郁野、谷村篤子、田中 信之 : サイトカインレセプターの糖鎖修飾阻害による抗炎症作用の解析. 第 35 回日本分子生物学会年会、博多、2012
- 9) 田中 信之 : p53 による解糖系の制御とその癌抑制における役割. 第 35 回日本生化学会大会 シンポジウム「がん代謝：がん研究の新たな展開」、博多、2012
- 10) 田中 信之 : p53 の機能欠損によって引き起こされる解糖系の亢進の癌化及び腫瘍増殖における役割. 第 36 回 日本分子生物学会年会、神戸、2013 ワークショップ 低酸素バイオロジーの最前線；代謝調節による細胞機能制御
- 11) 阿部芳憲、田中 信之 : MEP50/PRMT5 複合体は転写因子 Gli1 の制御を介して癌細

胞の増殖だけでなく癌幹細胞様細胞の維持に関わる. 第 36 回 日本分子生物学会年会、神戸、2013

- 12) 谷村篤子、上原郁野、中里 茜、田中 信之 : 炎症誘発の発癌過程における p53-p21 経路抑制の抑制. 第 36 回 日本分子生物学会年会、神戸、2013
- 13) 武内 進、中嶋 亘、中野なおこ、阿部芳憲、弦間昭彦、田中 信之 : EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌における HIF-1 の役割とゲフィチニブ感受性メカニズム. 第 36 回 日本分子生物学会年会、神戸、2013
- 14) 上原郁野、谷村篤子、田中 信之 : サイトカインレセプターの糖鎖修飾阻害による発癌抑制効果の検討. 第 36 回 日本分子生物学会年会、神戸、2013

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 信之 (Tanaka Nobuyuki)
日医大・老人研・免疫・教授
研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：