

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670018

研究課題名(和文) RAGE-硫酸化GAG分子間相互作用の阻害活性をもつ革新的低分子創薬

研究課題名(英文) Drug discovery of innovative small molecules with inhibition of RAGE-GAG interaction

研究代表者

菅原 一幸 (Kazuyuki, Sugahara)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：60154449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：以前我々は、コンドロイチン硫酸(CS)が肺に存在するReceptor for Advanced Glycation End-products (RAGE)に結合することで、癌細胞の肺転移が開始することを見出した。そこで本研究では、RAGEとCS鎖の相互作用阻害を示すオリゴ糖調製や合成低分子による創薬シーズの開発を目的とする。癌転移の阻害をするCS-Eを非酵素的に、低分子化する調製法を確立した。さらに、RAGE-CS相互作用の阻害を指標にしたCSオリゴ糖のスクリーニング法を開発した。これらの成果を含め国際誌に原著論文4報、総説2報を発表し、国内・国際学会での発表を5回行った。

研究成果の概要(英文)：Previously, we demonstrated that pulmonary metastasis is initiated by interaction of CS chain on tumor cells with Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) on lung. The aim of this study was to develop the seeds of new drugs, oligosaccharides, and small molecular compounds. It was established the preparation of oligosaccharides by the hydrolysis of CS-E with a subcritical water microreaction system, and the screening methodology for effective oligosaccharides by inhibition of the interaction of CS-E with RAGE. These observations will provide the seeds of new anti-cancer drug.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：コンドロイチン硫酸 RAGE プロテオグリカン 癌 糖鎖創薬

### 1. 研究開始当初の背景

ヘパラン硫酸(HS)の構造をミミックした低分子化合物が癌の増殖に欠かせない血管内皮増殖因子(VEGF)、ヘパリン結合性上皮細胞成長因子(HB-EGF)、腫瘍壊死因子(TNF-)と結合し、抗癌性を示すことを見出した(Basappa *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17, 4928, 2009; Basappa *et al.* Cancer Letters, 297, 231, 2010; Basappa *et al.* PLoS One, 7, e39444, 2012)。一方、HSと同様にプロテオグリカンの糖鎖鎖であるコンドロイチン硫酸(CS)は軟骨に豊富に存在し、骨の分化や発達に関わるが、我々は、*N*-アセチルガラクトサミン(GalNAc)4,6-ジ硫酸構造を含む E 二糖単位をもつ CS-E が、Lewis 肺癌細胞株表面に高発現し、抗 CS-E ファージ抗体あるいは CS-E 多糖鎖をマウスに静注で前投与すると、肺転移が著しく阻害されることを示した(Li *et al.* Journal of Biological Chemistry, 283, 34294, 2008)。そこで、CS-E と特異的に結合する受容体を肺に想定し、CS-E を固相化したアフィニティカラムで、肺の抽出物から CS-E 結合タンパク質を精製し、質量分析で、RAGE を同定した(Mizumoto *et al.* Journal of Biological Chemistry, 287, 18985, 2012)。我々は、RAGE が HS とも強く結合することも示した。本発見は Nature Publishing Group の Science-Business eXchange (2012, 05, 03)に取り上げられ、肺癌転移阻害薬開発の期待が高まっている。RAGE は正常組織では肺に特異的に発現し(Buckley & Ehrhardt, Journal of Biomedicine and Biotechnology, e917108, 2010)、もともとは、非酵素的に糖尿病などで生成する最終糖化タンパク質・Advanced Glycation End-products (AGE)の受容体として発見され、がん・アルツハイマー病・糖尿病・肺線維症・老化など様々な疾患に関与している(Taguchi *et al.* Nature, 405, 354, 2000)。これらを考慮すれば、RAGE と CS および HS 多糖鎖の相互作用がこれらの疾病に深く関与していることを示唆する。

本研究では、肺癌転移阻害を指標とし、RAGE と CS 鎖の構造類似体を網羅的にスクリーニングするが、候補分子は、癌だけではなく、アルツハイマー病・糖尿病・肺線維症・老化などの創薬のシーズを広く発掘できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

我々は肺癌細胞やメラノーマ細胞の肺転移の分子メカニズムの重要な側面を解明した(Mizumoto *et al.* Journal of Biological Chemistry, 2012)。即ち、癌細胞表面に発現している硫酸化グリコサミノグリカン(GAG)多糖鎖の構造に癌性変化が生じ、肺に存在する Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE)と呼ばれる免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーに補足され、転移が開始することを世界に

先駆けて示した。RAGE は、癌以外にも、アルツハイマー病、糖尿病、動脈硬化、炎症、肺線維症など多くの疾患の発症や病態と関連する。本研究では、RAGE と糖鎖の相互作用阻害を分子基盤とした、従来に無い、抗がん剤以外にも応用の可能性がある、オリゴ糖や合成低分子による革新的な創薬シーズを開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 低分子化合物ライブラリーの構築：申請者の研究室でポストドク(2005-2008)だった Basappa 博士(インド Bangalore 大学 Assistant Prof.)を研究協力者として加え、有機化学合成によって、新規ヘテロ環低分子化合物を合成した。

(2) 転移阻害活性をもつ CS 由来オリゴ糖画分の大量調製：硫酸化 GAG オリゴ糖から RAGE-CS 多糖鎖相互作用を阻害するオリゴ糖を調製する。大量生産には、イカ軟骨由来のコンドロイチン硫酸 E タイプを最近開発した、マイクロケミカルプロセス法(菅原ら, 特願 2012-035546)で低分子化し、ゲル濾過クロマトグラフィーで分画し精製することで調製した。

(3) RAGE-CS-E 相互作用の阻害を指標にした低分子化合物と CS オリゴ糖のスクリーニング：転移阻害の指標となる評価系では、CS-E の糖鎖還元末端をピオチンヒドラジドと EDC でピオチン化し、それをストレプトアビジンでコートした 96 穴のプラスチックプレートに固相化した後、そこに免疫グロブリンの Fc ドメインのタグを結合させた組み換え体 RAGE を結合させる。RAGE の CS-E への結合の検出はアルカリフォスファターゼとプロテイン A の融合タンパク質を 96 穴中で Fc ドメインに結合させ、最終的にアルカリフォスファターゼの発色基質の分解を比色定量した。

(4) 癌細胞を用いた低分子化合物および CS-E オリゴ糖のスクリーニング：癌細胞としては、転移能の高いルイス肺癌細胞(LLC)、B16 メラノーマ細胞等を用い、浸潤能の測定は、BioCoat Matrigel invasion chamber を用いて、cell culture insert (インサート)の上部に細胞懸濁液および被検物質を加え、26 時間後、インサートの下面に移動した細胞を染色し、浸潤した細胞数を数えた。また、肺癌細胞をマウスから尾静脈注射し、オリゴ糖鎖や低分子化合物が肺への転移を阻害するかを調べた。

(5) 低分子化合物および CS-E オリゴ糖の癌細胞転移阻害効果およびアミロイド -RAGE 阻害活性の評価：癌細胞としては、肺に転移するマウス由来のルイス肺癌細胞(LLC)、B16 メラノーマ細胞を用いる。マウスに予め、

被検物質を投与し、その 30 分後に癌細胞を静脈注射し、3 週間後に開腹し、肺を調べ、転移能の抑制効果を評価する。また、本研究で発掘する RAGE-GAG 結合阻害活性を有する低分子化合物に関してアミロイド -RAGE 阻害活性を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 40 種類余りの新規ヘテロ環低分子化合物を合成した。

(2) 大量の CS-E をマイクロケミカルプロセス法により、水と高温・高圧の条件下で部分分解し、様々なサイズの異なるオリゴ糖鎖を生成した。さらに、ゲルろ過クロマトグラフィーによって、分画・精製した。

(3) 上記で精製した CS-E オリゴ糖鎖を用いて、RAGE-CSE の結合を阻害する assay 系を確立した。また、RAGE と CS-E との結合を阻害する鎖長は、8 ~ 10 糖であることが分かった。

(4) CS-E 由来オリゴ糖が肺癌細胞株の転移と浸潤を阻害することを見出した。

(5) CS 鎖を分解する新規 CS 分解酵素と脱硫酸化酵素を海洋生物から発見し、同定を行った (論文 )

(6) CS-プロテオグリカンの一つである受容体型チロシンホスファターゼが癌の増殖に関わる血管内皮増殖因子の受容体になっていることを見出した (論文 )

(7) 低身長・脊柱側彎症・短腕症・などの骨格異常を示す患者が CS を含むグリコサミノグリカンの橋渡しする四糖結合領域の合成に関わるグルクロン酸転移酵素-I の変異によって発症することを発見した (論文 )

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Birgit S. Budde, Shuji Mizumoto, Ryo Kogawa, Christian Becker, Janine Altmüller, Holger Thiele, Franz Rüschemdorf, Mohammad R. Toliat, Gerrit Kaleschke, Johannes M. Hämmerle, Wolfgang Höhne, Kazuyuki Sugahara, Peter Nürnberg, Ingo Kennerknecht, "Skeletal dysplasia in a consanguineous clan from the island of Nias/Indonesia is caused by a novel mutation in B3GAT3", **Human Genetics**, 査読有, in press, 2015 (DOI: 10.1007/s00439-015-1549-2).

Marina Koutsoumpa, Evangelia Poimenidi, Evangelia Pantazaka, Christina Theodoropoulou, Angeliki Skoura, Vasileios Megalooikonomou, Nelly Kieffer, Jose Courty, Shuji Mizumoto, Kazuyuki Sugahara, and Evangelia

Papadimitriou, "Receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta is a functional binding partner for vascular endothelial growth factor", **Molecular Cancer**, 査読有, 14(1), 2015, article #19.

Wenshuang Wang, Wenjun Han, Xingya Cai, Xiaoyu Zheng, Kazuyuki Sugahara, and Fuchuan Li, "Cloning and characterization of a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate 4-O-endosulfatase from a marine bacterium", **Journal of Biological Chemistry**, 査読有, 290(12), 2015, 7823-7832.

Wenjun Han, Wenshuang Wang, Mei Zhao, Kazuyuki Sugahara, and Fuchuan Li, "A novel eliminase from a marine bacterium that degrades hyaluronan and chondroitin sulfate", **Journal of Biological Chemistry**, 査読有, 289(40), 2014, 27886-27898.

Basappa, Kanchugarakoppal S. Rangappa, Kazuyuki Sugahara, "Roles of glycosaminoglycans and glycanmimetics in tumor progression and metastasis", **Glycoconjugate Journal**, 査読有, 31(6-7), 2014, 461-467.

Shuji Mizumoto, Kazuyuki Sugahara, "Glycosaminoglycans are functional ligands for Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) in tumors", **FEBS Journal**, 査読有, 280(10), 2013, 2462-2470.

[学会発表] (計 5 件)

Kazuyuki Sugahara and Shuji Mizumoto, 「Mechanism of glycosaminoglycan-mediated tumor metastasis (Invited lecture)」, The 27th International Carbohydrate Symposium (ICS27), 2014.1.15、Indial Institute of Science (Bangalore, India).

Peraphan Pothacharoen, Duriya Fongmoon, Shuji Mizumoto, Kazuyuki Sugahara, Prachya Kongtawler, 「Development of novel monoclonal antibodies against chondroitin sulfate, and their application to glycobiology and glycopathology」, The 5th annual conference for Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (5th ACGG), 2013.10.14-18, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, (Thailand).

Rangappa KS, Basappa, Mantelingu K, Sadashiva MP, Feng Li, Gautam Sethi, Kazuyuki Sugahara, 「Novel Class of Tetrahydropyridine-fused Pyrazoles, Isoxazolines, and HS-Mimetic Small Molecules as Anti-cancer Agents」, The 14th tetrahedron symposium, 2013.7.25-28, Millennium Gloucester Hotel London

Kensington (Vienna, Austria).

Kazuyuki Sugahara, Jun Takahashi, Shuji Mizumoto, 「Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) Functions as Receptor for Sulfated Glycosaminoglycans (GAGs): Anti-RAGE Antibody or Sulfated GAGs Inhibit Lung Metastasis of Tumor Cells」, 22nd International Symposium on Glycoconjugates (Glyco22)、2013.6.28、Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences Dalian, China).

Kazuyuki Sugahara, Shuhei Yamada, Shuji Mizumoto, Keiichiro Matsushima, Haruo Ura, Nobuyuki Miyamoto, 「Mass preparation of oligosaccharides with intestinal absorption capacity by hydrolysis of chondroitin sulfate polysaccharides with subcritical water microreaction system」, The 13th International Conference on Functional and Medical Foods with Bioactive Compounds: Science and Practical Applications held jointly with The First International Symposium of Academic Society for Functional Foods and Bioactive Compounds, 2013.05.12, The Kyoto Prefectural University of Medicine (Kyoto).

〔図書〕(計1件)

Kazuyuki Sugahara, “Novel chondroitin sulfate oligosaccharide motifs as biomarkers: insights into their involvement in brain development”, **Biochemical Roles of Eukaryotic Cell Surface Macromolecules (Advances in Experimental Medicine and Biology)**, 査読有, 842, 2015, 165-183.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)  
該当なし

取得状況(計0件)  
該当なし

〔その他〕  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅原 一幸 (SUGAHARA Kazuyuki)  
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・学術研究員

研究者番号：60154449

### (2) 研究分担者

水本 秀二 (MIZUMOTO Shuji)  
名城大学・薬学部・助教

研究者番号：40443973

(3) 連携研究者  
該当なし