

して、PCRにかける。PCRだけでウイルスが同定できない場合には、DNAのシーケンスを行い、同定する。このシステムの有効性をまず1型ヒト単純ヘルペスウイルスに対して適用した。図9に示すように、ウイルスを培養し、ウイルスのレセプターであるヘパリン（あらかじめアレイタイプのシュガーチップで決定）を固定化したSGNPを混合し、遠心分離後、沈殿物を水に分散させ、それをリアルタイムPCRで調べた。

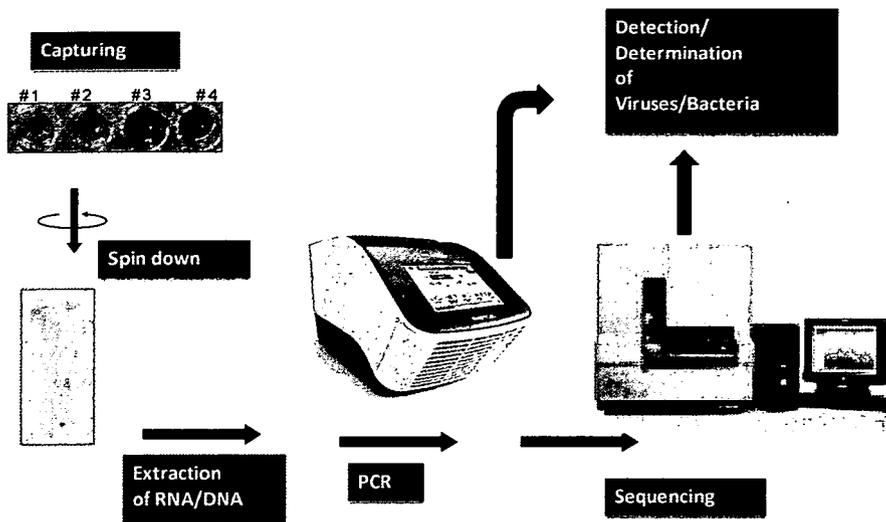


図8 選択的ウイルスの濃縮と超高感度分析システムの概念

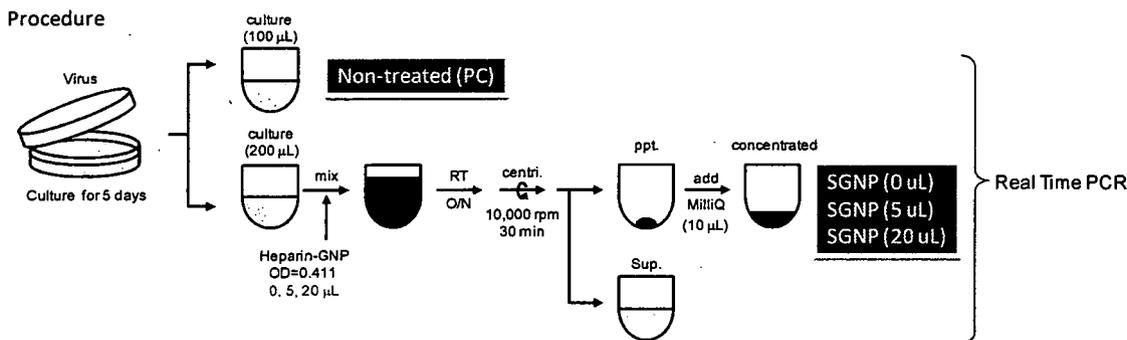


図9 ヘパリン固定化SGNPによるウイルス濃縮実験の流れ

結果を図10に示す。SGNPの濃度が多すぎると蛍光消光が起こり、PCRの検出に用いるインターカレーター-の蛍光強度が低下するが、SGNPを加えた場合は、10サイクル程度早くヘルペスウイルスのDNAが増幅されたこと、すなわち1000倍程度の濃縮が達成されたことが判明した。

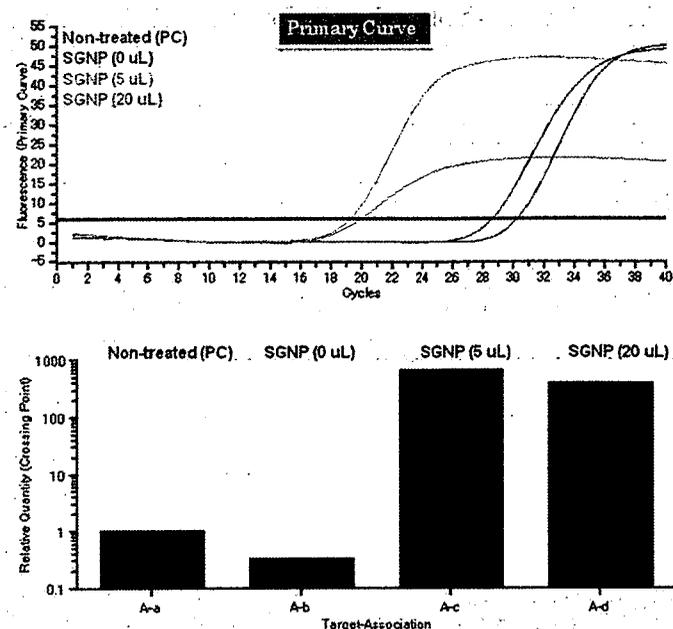


図 10 ヘパリン固定化SGNPによるウイルス濃縮実験

◎参考文献など

- [1] Varki, A.(1999) *in Essentials of Glycobiology*, (Eds.: Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, pp. 57-68, and references therein.
- [2] Suda, Y., Nishimura, T., Kishimoto, Y., Yamashita, S., Sato, M., Uetani, M., Hamamatsu, M., Saito, A., Wakao, M., Murray-Wijelath, J., Wijelath, E., Strand, K., Sobel, M. (2005) Advanced analytical systems for the binding interaction of structurally defined oligosaccharides with proteins/cells: use of surface plasmon resonance (SPR) or gold nanoparticles (GNP), *Glycoconjugates J.* 22, 201.
- [3] Sugar-Immobilized Gold Nano-Particles (SGNP): Novel Bioprobe for the On-Site analysis of the Oligosaccharide-Protein Interactions, Suda Y, Kishimoto Y, Nishimura T, Yamashita S, Hamamatsu M, Saito A, Sato M, Wakao M., *Polymer Preprints*, 47(2), 156-157 (2006).
- [4] Immobilization and Clustering of Structurally Defined Oligosaccharides for Sugar Chips: An Improved Method for Surface Plasmon Resonance Analysis of Protein-Carbohydrate Interactions, Suda Y, Arano A, Fukui Y, Koshida S, Wakao M, Nishimura T, Kusumoto S, Sobel M., *Bioconjug Chem.*, 17(5), 1125-1135 (2006).
- [5] 隅田泰生、荒野明男、楠本正一、マイケルソベール、リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法、特開 2004-155762、WO 2004/022565 A1
- [6] 隅田泰生、荒野明男、林秀樹、楠本正一、マイケルソベール、多岐用途型リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法、特開 2004-157108、WO 2004/022583 A1
- [7] 隅田泰生、楠本正一、荒野明男、リンカー化合物およびリガンド並びにオリゴ糖鎖の固定化方法および蛋白質分析用の支持体、特開 2003-83969
- [8] 隅田泰生、西村知晃、岸本裕子、中川裕美、新規糖固定化金属ナノ粒子およびこれを用いて糖-タンパク質相互作用を測定する方法、並びに糖-タンパク質相互作用体からタンパク質を

◎研究発表

1. 論文発表

- 1) M. Hashimoto, M. Furuyashiki, R. Kaseya, Y. Fukada, M. Akimaru, K. Aoyama, T. Okuno, T. Tamura, T. Kirikae, F. Kirikae, N. Eiraku, H. Morioka, Y. Fujimoto, K. Fukase, K. Takashige, Y. Moriya, S. Kusumoto, Y. Suda, "Evidence of immunostimulating lipoprotein co-existing in natural lipoteichoic acid fraction", *Infect. Immun.*, **75**(4), 1926-1932(2007)
- 2) Y. Fujimoto, M. Iwata, N. Imakita, A. Shimoyama, Y. Suda, S. Kusumoto, K. Fukase, "Synthesis of immunoregulatory *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide partial structures", *Tetrahedron Lett.*, **48**, 6577-6581(2007)
- 3) H. Kariya, A. Kiyohara, S. Masuda, Y. Yoshihara, M. Ueno, M. Hashimoto, Y. Suda, "Biological roles of carboxymethyl-chitin associated for the growth factor production", *J. Biomed. Mater. Res.*, **83A**, 58-63(2007)
- 4) 隅田泰生,「糖鎖アレイ」, マイクロアレイ・バイオチップの最新技術 第12章 (伊藤嘉浩監修), (株) シーエムシー, 2007年12月
- 5) M. Hashimoto, K. Takashige, M. Furuyashiki, K. Yoshidome, R. Sano, Y. Kawamura, S. Ijichi, H. Morioka, H. Koide, N. Oku, Y. Moriya, S. Kusumoto, Y. Suda, "Enhancement of antitumor activity of OK-432 (Picibanil) by Triton X-114 phase partitioning", *International Immunopharmacology*, **8**, 12-19(2008)
- 6) N. Sasaki, K. Okishio, K. Ui-Tei, K. Saigo, A. Kinoshita-Toyoda, H. Toyoda, T. Nishimura, Y. Suda, M. Hayasaka, K. Hanaoka, S. Hitoshi, K. Ikenaka, and S. Nishihara, "Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells", *J. Biol. Chem.*, in press
- 7) M. Wakao, A. Saito, K. Ohishi, Y. Kishimoto, T. Nishimura, M. Sobel, Y. Suda, "Sugar Chips Immobilized with Synthetic Sulfated Disaccharides of Heparin/Heparan Sulfate Partial Structure", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, in press
- 8) S. Nakamura-Tsuruta, Y. Kishimoto, T. Nishimura and Y. Suda, "One-Step Purification of Lectins from Banana Pulp Using Sugar-immobilized Gold Nano-Particles (SGNPs)", *Journal of Biochemistry*, in press

2. 学会発表 (シンポジウムなど)

- 1) Y. Suda, T. Nishimura, Y. Kishimoto, S. Yamashita, M. Shigeta, S. Takahashi, M. Wakao, A. Saito, T. Kondo, R. Saruwatari, K. Ohishi, Y. Takahashi, S. Nakamura-Tsuruta, H. Ishida, H. Okuno, H. Tsutsui, "Advanced Analytical Systems for the Binding Interaction of Sugar Chains with Proteins, Cells or Viruses: Sugar Chips and Sugar Chain-Immobilized Gold Nano-Particles", XIX International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO-19), *Glycoconjugate Journal*, **24**(6,7), 272, 2007年7月
- 2) M. Ando, T. Komori, T. Yoshikawa, A. Imamura, H. Ishida, M. Kiso, Y. Suda, "Systematic Synthesis of Functional Oligosaccharide Probes for Sugar_Chips" XIX International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO-19), *Glycoconjugate Journal*, **24**(6,7), 315, 2007年7月
- 3) S. Nakamura-Tsuruta, Y. Kishimoto, T. Nishimura, Y. Suda, "One-Step Purification of Lectins Using Sugar-Immobilized Gold Nano-Particles(SGNPs)", XIX International Symposium on Glycoconjugates

- (GLYCO-19), Glycoconjugate Journal, 24(6,7), 368, 2007年7月
- 4) Y. Suda, M. Wakao, Y. Takahashi, A. Saito, T. Kondo, R. Saruwatari, K. Ohishi, S. Nakamura-Tsuruta, T. Nishimura, Y. Kishimoto, M. Shigeta, S. Takahashi, H. Ishida, H. Tsutsui, H. Okuno, "Sugar Chips and Sugar Chain-immobilized Gold Nano-Particles: Towards a Diagnosis for Influenza Virus Strains", XIX International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO-19), Glycoconjugate Journal, 24(6,7), 385, 2007年7月
 - 5) M. Wakao, S. Watanabe, T. Ogawa, K. Suzuki, T. Yumino, T. Myogadani, A. Saito, K. Muta, M. Kimura, K. Kajikawa, Y. Suda, "Development of Optical Fiber-Type Sugar Chip for Localized Surface Plasmon Resonance Apparatus", XIX International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO-19), Glycoconjugate Journal, 24(6,7), 397, 2007年7月
 - 6) 隅田 泰生, インフルエンザウイルス株の検査法を目指して一シュガーチップと糖鎖固定化金ナノ粒子, 第56回高分子討論会 予稿集, 56, 5415-5416, 2007年9月
 - 7) 仮屋 博敬, 増田 真吾, 吉原 雄祐, 上野 勝, 橋本 雅仁, 隅田 泰生, カルボキシメチルキチンによる TGF-beta1 を介した軟骨形成の誘導, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会), BMB2007 講演要旨集, 323, 2007年12月
 - 8) 橋本 雅仁, 本田 大士, 梶山 健次, 隅田 泰生, 永田 真紀, 九町 健一, 阿部 美紀子, 内海 俊樹, 一酸化窒素誘導性 *Mesorhizobium loti* 由来リポ多糖の研, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会), BMB2007 講演要旨集, 542, 2007年12月
 - 9) 俵積田 一樹, 斎藤 敦, 隅田 泰生, 橋本 雅仁, *Bacteroides fragilis* 由来免疫調整リポプロテインの同定, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会), BMB2007 講演要旨集, 846, 2007年12月
 - 10) 隅田 泰生, 若尾 雅広, 高橋 優子, 齊藤 彰寛, 近藤 宇男, 大石 紘, 鶴田-中村 祥子, 西村 知晃, 岸本 裕子, 山下 早希子, 石田 秀治, 奥野 寿臣, ウイルスの糖鎖結合性を利用したウイルス株の識別, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会), BMB2007 講演要旨集, 727, 2007年12月
 - 11) 古屋鋪舞子, 高重 克洋, 小出 裕之, 奥 直人, 守屋 陽一郎, 橋本 雅仁, 隅田 泰生, トリトン X-114 相分離法による OK-432 (ピシバニール) の抗腫瘍活性の向上, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会), BMB2007 講演要旨集, 823, 2007年12月
 - 12) 村岡 賢, 伊東 祐二, 橋口 周平, 馬場 昌範, 有馬 直道, 隅田 泰生, 中島 敏博, 杉村 和久, 抗体ファージライブラリによる HTLV 感染細胞に対するヒト抗体の単離とそのアポトーシス誘導能, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会), BMB2007 講演要旨集, 830, 2007年12月
 - 13) 鶴田(中村) 祥子, 岸本 裕子, 西村 知晃, 奥野 寿臣, 隅田 泰生, 糖鎖固定化金ナノ粒子(SGNPs)を用いた糖結合タンパク質の1ステップ精製, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会), BMB2007 講演要旨集, 558, 2007年12月
 - 14) 若尾 雅広, 倉橋 佳江, 渡辺 省伍, 小川 智央, 弓野 猛, 牟田 健一, 斎藤 敦, 梶川 浩太郎, 隅田 泰生, 多チャンネル光ファイバー型シュガーチップによる糖鎖相互作用解析, 日本化学会第88回春季年会, 2008年3月

◎知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 若尾 雅広, 隅田 泰生, 小川 智央, 「支持体に対する金属微粒子膜の形成方法及び局在プラズモン共鳴センサ」, 特開 2007-240463, 公開日 : 2007 年 9 月 2 日
- 2) 隅田 泰生, 西村 知晃, 岸本 裕子, 鶴田 祥子, 「病原微生物の濃縮方法」, 特願 2007-307044, 出願日 : 2007 年 11 月 28 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

「シュガーチップを用いた検査・診断技術の開発」

平成19年度分担研究報告書

糖尿病やその合併症診療への応用

分担研究者 片桐 秀樹 東北大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

食生活の欧米化に伴い急増する肥満・2型糖尿病は、動脈硬化症・網膜症・腎症・神経障害といった重篤な合併症を招き、大きな社会問題となっている。これらの合併症には有効な治療法が乏しく、また、早期診断のための簡便な検査法も少ない。そこで、我々は、肥満・糖尿病の機序の解明と治療法の開発とそれに関連した合併症発症の機序の解明と早期診断法・根治治療法を開発を目標として、本研究を進めている。肥満・糖尿病については、動物実験により、体内の備わった過栄養時の肥満を防ぐ機構を発見したが、その機構の慢性的な活性化が、肥満時における高血圧の発症に関与することを見出した。この機序は、メタボリックシンドロームの病態の理解および新しい治療法開発のターゲットになりうるものと考えられる。次に、過栄養時の膵β細胞における糖鎖修飾について解析を進めており、肥満から糖尿病につながる機序を検討している。糖尿病性合併症に関しては、実際の患者血清を用いて、シュガーチップによる糖鎖結合蛋白の網羅的な解析を行っている。採血条件を揃えた状態で検討を行うことにより、患者間のばらつきの軽減に努め、昨年度認めたそれぞれの合併症でその糖鎖結合蛋白の検出パターンの変化の確認検討を行っている。以上、モデル動物から実際の患者サンプルまでを用い、昨年度に引き続き、糖尿病やその合併症の新たな診断、および、治療法の開発に向けた検討を発展させている。

A. 研究目的

生活習慣の欧米化や運動不足などにより、肥満に基づく糖尿病患者の増加が社会的な問題になっている。内臓肥満は、耐糖能異常（糖尿病）、高血圧、高脂血症をしばしば合併し動脈硬化を発症しやすい点から、これらをまとめた概念は、メタボリックシンドロームとして注目を大きく集めている。さらに、糖尿病は、細小血管にも傷害を起し、細小血管合併症として、網膜症・腎症・神経障害を生ずる。これらの患者の急激な増加は、失明や人工透析などの重篤な合併症は、医療・福祉の点からも、医療経済の点からも重大な

社会問題となっている。そこで、莫大な数の糖尿病患者をスクリーニングし合併症が進展しないうちに早期に発見する必要があるが、特に、網膜症や神経障害・動脈硬化症については、簡便な早期診断法はなく、合併症の診断を遅らせ、重篤な合併症患者の増加につながっている。

また、最近になって、肥満や過栄養状態で、膵β細胞における糖鎖修飾に変化が生じることが報告されており、このような栄養状態の変化は、全身の各組織でさまざまな糖鎖修飾およびそれを認識する蛋白の変化を起しうるものと考えられる。そこで、本研究では、

1. 肥満の発症機序を解明し、新規治療法の開発につなげる。2. 膵β細胞におけるタンパク糖鎖修飾について検討する。3. 糖鎖結合タンパクの糖尿病合併症（網膜症・腎症・神経障害）との関連を患者サンプルを用いて検討し、早期診断の簡便な検査法の開発、さらには、新規治療法の開発につなげることを目的とする。

B. 研究方法

1. モデルマウスを用いて、肥満・糖尿病を発症させたマウスの肝臓に、アデノウイルスによる遺伝子導入を行い、その改善効果を検討し、肥満・糖尿病、メタボリックシンドロームの病態・発症機序の解明や治療法開発につなげる。
2. 肥満の際のインスリン分泌不全に膵β細胞におけるタンパクの糖鎖修飾不全が関与することが報告されている。そこで、高脂肪食を負荷し肥満を誘発したマウスの膵ランゲルハンス島を採取し、糖鎖結合タンパクを解析することにより、肥満時における糖尿病発症の機序解明および治療法開発につなげる。
3. 東北大学病院糖尿病代謝科に通院中の糖尿病患者から血清を採取し、シュガーチップを用いて、血清中に存在する糖鎖結合蛋白を検討する。網膜症・腎症・神経障害・動脈硬化症の有無・進展度により、糖鎖結合蛋白の変化を見出し、この変化した結合蛋白を解析することで、合併症の発症機序の解明及び早期発見のための検査法の開発を試みる。
4. 倫理面への配慮：本研究における動物実験は、東北大学動物実験指針に基づいて実施し、東北大学大学院医学系研究科動物実験

委員会や組換えDNA安全専門委員会の承認を受けている。また、患者サンプルを用いた検討については、「糖尿病合併症と糖鎖結合蛋白における臨床研究」として、東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会にて承認を受けている。

C. 研究結果

1. 自律神経ネットワークの肥満・糖尿病病態への関与

昨年度、アデノウイルスを用いて、肝臓にPPAR_γの遺伝子導入を行うことにより、実験的に急速に脂肪肝を誘発させたところ、基礎代謝の増加、末梢脂肪組織での脂肪分解の亢進、インスリン抵抗性の改善をともなう糖尿病の改善が起こることを報告した。さらに、この肝臓から他臓器・組織への遠隔臓器への効果は、迷走神経肝枝切断や同神経の求心路遮断を行っておくと、完全に抑制されることから、迷走神経求心路さらには交感神経遠心路という、自律神経ネットワークにより、伝えられることを明らかとした。このことは、肝臓はエネルギー蓄積状態のセンサーとして働き、過栄養状態を感知して迷走神経を介して脳にその信号を送り、脂肪の燃焼・基礎代謝の増加を誘導することで肥満を予防・改善させる過栄養防御機構が体には備わっていることを意味する。

一方、肥満の状態になると、交感神経系の慢性的な活性化状態となり、これが高血圧の発症にもつながっていることが知られている。そこで、この肥満防御機構の血圧に与える影響を検討した。肝PPAR_γ発現により、モデルマウスの血圧は上昇し、逆に肥満モデルにおいて肝PPAR_γ発現を抑制すると、肥満にともなう血圧の上昇は抑制された。さらに、肥満

モデルマウスやラットでの迷走神経肝枝の切断や求心路遮断により、肥満に伴う血圧上昇はほぼ完全に予防され、我々が肥満防御機構として発見した自律神経系ネットワークシステムが、高血圧というメタボリックシンドロームの主要な病態の発症に関与していることが示された。これらの成果は、肥満・糖尿病、メタボリックシンドロームの総合的な病態の理解・解明につながるものであり、またその結果、新たな治療のターゲットを創生することにも寄与するものと考えられる。

2. 膵β細胞からのインスリン分泌に及ぼす糖鎖修飾タンパクの影響

糖鎖修飾不全を惹起させる遺伝子組み換えマウスにおいて、膵β細胞からのインスリン分泌が障害されていること、さらに、肥満モデルの膵β細胞においても同様の糖鎖修飾不全が起こっていることが最近報告された。そこで、我々は、マウスに高脂肪食を負荷し、肥満を誘発させた上で、膵ランゲルハンス島を採取し、シュガーチップを用いて、糖鎖結合タンパクの解析・同定を試みている。マウス膵ランゲルハンス島は細胞数が限られており、糖鎖結合タンパクの解析に必要な量のタンパクの採取に苦労したが、ようやく、糖鎖結合タンパクの解析に必要な量の膵ランゲルハンス島ライセートを回収することが出来た。このサンプルを用いて、肥満の際の膵ランゲルハンス島における糖鎖結合タンパクについて、解析を行うことを計画している。

3. 糖尿病患者における糖鎖結合タンパクの変化の検討

東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会での、患者血清を用いる本研究の承認に基づき、検討を行っている。昨年度の解析で、患者血清のサンプル調整の最適化を行った。ま

た、東北大学病院糖尿病代謝科通院の糖尿病患者のうちから重症の糖尿病性合併症をもつ患者と合併症を有しない糖尿病患者とで比較解析を行った。今年度は、血清採取を入院患者とし、血糖コントロールが改善された状態における早朝空腹時に限定し、採血条件を揃えた状態で検討を行うことにより、患者間のばらつきの軽減に努めている。昨年度に認められた正常者と合併症を有する糖尿病患者との間の糖鎖結合タンパクのパターンに違いについてその確認検討を行っており、さらに症例数を増やして検討を進める予定としている。

D. 考察

摂食・エネルギー消費といった全身のエネルギー代謝を調節する機構として、自律神経系、特に、求心路を介した末梢からのシグナルが重要であることが明らかとなった。これまでは、アディポカインやインスリンなどのホルモン系が臓器間の代謝情報の中心と考えられてきたが、これらの成果は、末梢・中枢神経系を介したネットワークが、代謝調節には重要であることを示したものである (Endocr J 2007)。そこで、我々は、脳が、自律神経求心路を介して、末梢の代謝状態についての情報を得、全身の代謝恒常性を保つための管制塔の役割を果たしているという仮説を提唱している (Circ Res 2007)。この機構を活性化することにより、肥満・糖尿病を改善させる新たな治療法が開発できるものと考えられる。この分子機構の解明は新たな創薬につながると考えられ、また、機器装着による神経活性化とあわせ、まったく新しい視点からの、過栄養時代の糖尿病に対する治療法の開発につながることを期待できる (Pharmacol Ther 2008)。

さらに、今回の我々の研究により、この自

律神経ネットワークの活性化は、肥満の際の血圧上昇につながる事が明らかとなった。肝 PPAR_α 発現に起因し高血圧を発症するこのメカニズムは、まさに、メタボリックシンドロームの中心病態である高血圧の発症機序を解明するものであり、治療法開発の意味からも重要なものであると考えられる。

これらはインスリン抵抗性とそれにつながる病態に対するものであるが、一般的には、膵β細胞からのインスリン分泌が亢進することで糖尿病までは発症しない。しかし、肥満の際、その一部は最終的にはインスリン分泌不全を来すことになり、糖尿病となる。この機構に、糖鎖修飾タンパクの影響が関与している可能性がある。我々が現在解析している膵ランゲルハンス島におけるタンパク糖鎖修飾やその結合タンパクの変化を同定する事は、肥満の際糖尿病を発症する機序の解明につながるのみならず、糖尿病を発症しやすい肥満やそうでない肥満の検索および糖尿病発症を予防する方法の開発につながる可能性があると考えられる。

また、実際の糖尿病合併症患者の血清において糖鎖結合蛋白に変化が見られる傾向があり、それを採血条件を定めたサンプルを用いて検証しているところである。を認めており、全く未知の合併症発症機序の解明や新規の簡便な診断法の開発につながる可能性が考えられる。

E. 結論

本研究では、上記のように、モデルマウスを用いた実験から実際の患者から得たサンプルの検討まで、多方面から糖尿病の病態の理解や治療法開発に向けた検討を行っている。更なる研究により、新たな視点からの肥満・

糖尿病治療法の開発・実践につなげていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Takahashi R, Ishihara H, Takahashi K, Tamura A, Yamaguchi S, Yamada T, **Katagiri H**, Oka Y. (2007) Efficient and controlled gene expression in mouse pancreatic islets by arterial delivery of tetracycline-inducible adenoviral vectors. *J. Mol. Endocrinol.* 38: 127-36.
- Hasegawa Y, Ogihara T, Yamada T, Ishigaki Y, Imai J, Uno K, Gao J, Kaneko K, Ishihara H, Sasano H, Nakauchi H, Oka Y, **Katagiri H**. (2007) Bone Marrow (BM) Transplantation Promotes Beta Cell Regeneration after Acute Injury through BM Cell Mobilization. *Endocrinology* 148: 2006-15.
- Yamada T, **Katagiri H**. (2007) Avenues of Communication between the Brain and Tissues/Organs Involved in Energy Homeostasis. *Endocrine J.* 54: 497-505.
- **Katagiri H**, Yamada T, Oka Y. (2007) Adiposity and Cardiovascular Disorders: Disturbance of the Regulatory System Consisting of Humoral and Neuronal Signals- *Circ Res.* 101: 27-39.
- Ono H, Sakoda H, Fujishiro M, Anai M, Kushiyama A, Fukushima Y, **Katagiri H**, Ogihara T, Oka Y, Kamata H, Horike N, Uchijima Y, Kurihara H, Asano T. (2007) Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP) induces AKT activation, thereby enhancing anti-apoptotic, glycogen synthetic and glucose uptake pathways. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293:C1576-85.
- Yamada T, Imai J, Ishigaki Y, Hinokio Y, Oka Y, **Katagiri H**. (2007) Possible relevance of HLA-DRB1*0403 haplotype in insulin autoimmune

syndrome induced by α -lipoic acid, used as a dietary supplement. *Diabetes Care* 30: e131.

- Yamada T, Oka Y, **Katagiri H.** (2008) Communications between the Brain and Peripheral Tissues/Organs Involved in Energy Homeostasis -Potential Therapeutic Targets for Obesity and Metabolic syndrome- *Pharmacol Ther.* 117(1):188-98.
- Okimoto H, Ishigaki Y, Koiwa Y, Hinikio Y, Ogihara T, Suzuki S, **Katagiri H.**, Ohkubo T, Hasegawa H, Kanai H, Oka Y. (2008) A novel method for evaluating human carotid artery elasticity: possible detection of early stage atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 196: 391-7
- Nedachi T, Kadotani A, Ariga M, **Katagiri H.**, Kanzaki M (2008) Ambient Glucose Levels Qualify the Potency of Insulin Myogenic Actions by Regulating SIRT1 and FoxO3a in C2C12 myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* in press
- Ariga M, Nedachi T, **Katagiri H.**, Kanzaki M (2008) Functional role of sortilin in myogenesis and development of insulin-responsive glucose transport system in C2C12 myocytes. *J Biol Chem* in press
- Yamaguchi S, Ishihara H, Yamada T, Tamura A, Usui M, Tominaga R, Munakata Y, Satake C, **Katagiri H.**, Tashiro F, Aburatani H, Tsukiyama-Kohara K, Miyazaki J, Sonenberg N, Oka Y (2008) ATF4-Mediated Induction of 4E-BP1 Contributes to Pancreatic Beta Cell Survival under Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Metab.* in press

2. 学会発表 (シンポジウムなど)

- **片桐秀樹** シンポジウム 生体内での膵

細胞再生を目指した治療法開発 第46回日本生体医工学会 2007年4月25日 仙台

- **片桐秀樹** 学会賞 (リリー賞) 受賞講演 自律神経系を介した臓器間ネットワークによる糖・エネルギー代謝の協調的調節機構 第50回日本糖尿病学会 2007年5月24-26日 仙台
- 石垣泰、沖本久志、檜尾好徳、**片桐秀樹**、岡芳知 シンポジウム6 肥満コントロールの重み付け 第50回日本糖尿病学会 2007年5月24-26日 仙台
- 山田哲也、**片桐秀樹**、岡芳知 シンポジウム9 自律神経系を介する協調的エネルギー代謝調節機構 第50回日本糖尿病学会 2007年5月24-26日 仙台
- **片桐秀樹** シンポジウム「Metabolic Information Highway~糖尿病・メタボリックシンドローム研究の新展開~」東北バイオサイエンスシンポジウム2007年6月4日 仙台
- **片桐秀樹** 研究奨励賞受賞講演 臓器間連関によるインスリン抵抗性改善機構 第80回日本内分泌学会学術総会 2007年6月14-16日 東京
- **片桐秀樹** 教育講演 Metabolic Information Highway~メタボリックシンドローム研究の新展開~ 第62回日本体力医学会大会 2007年9月15日 秋田
- **片桐秀樹** シンポジウム3 臓器・細胞間クロストークによるエネルギー代謝制御 自律神経を介した臓器(組織)間代謝情報ネットワーク 第28回日本肥満学会 2007年10月19-20日 東京
- **片桐秀樹** 特別講演 糖尿病・メタボリックシンドローム研究の新展開 山梨科学アカデミー交流大会 2007年11月26日 山梨
- **片桐秀樹** シンポジウム メタボリックシ

- ンドロームー臓器間連関と分子メカニズムー
2S4-2 自律神経系による臓器間代謝情報ネットワーク機構 BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会 合同大会) 2007年12月12日 東京
- **片桐秀樹** シンポジウム 肝からの神経シグナルによる臓器間代謝情報ネットワーク 第22回日本糖尿病・肥満動物学会 2008年2月8日 東京
 - **片桐秀樹** レクチャー糖尿病診療の将来 エネルギー代謝維持機構を標的とした治療開発 第42回糖尿病学の進歩 2008年2月16日 高松
 - **片桐秀樹** 特別講演 ランチョンセミナー Metabolic Information Highway～肥満・糖尿病研究の新展開～ 第7回日本内分泌学会東海支部学術集会2008年2月23日 名古屋
 - **片桐秀樹** 自律神経を介した臓器間代謝情報ネットワーク 自然科学研究機構生理学研究所研究会 「中枢・末梢臓器間連携による摂食、エネルギー代謝調節」自律神経を介した臓器間代謝情報ネットワーク 2008年2月28-29日 岡崎
 - Yamada T., **Katagiri H.** Autonomic nerve circuits modulate energy and glucose metabolism. Okazaki Symposium 2007 on Obesity and Diabetes, Apr 14-15, 2007 Okazaki, Japan
 - Ariga M., Nedachi T., **Katagiri H.**, Kanzaki M. Functional Role of Sortilin in Myogenesis and the Development of Insulin-Responsive Glucose Transport System in C2C12 Myocytes. American Diabetes Association, 67th Scientific Sessions, June 22-26, 2007 Chicago, IL, USA
 - Imai J., **Katagiri H.**, Suzuki T., Oka Y. Activation of Hepatic ERK Pathway Promotes Pancreatic Beta Cell Proliferation. American Diabetes Association, 67th Scientific Sessions, June 22-26, 2007 Chicago, IL, USA
 - **Katagiri H.** Inter-organ communication via autonomic nerve circuits modulates systemic energy and glucose metabolism. The 25th JES Summer Seminar on Endocrinology & Metabolism, July 17-18, 2007 Awaji, Japan
 - Imai J., **Katagiri H.**, Oka Y. Activation of Hepatic ERK Pathway Promotes Pancreatic Beta Cell Proliferation. Office of Life Sciences/National University of Singapore – Tohoku University/Centre of Excellence Joint Symposium, Sep 5-7, 2007 Singapore
 - Yamada T., **Katagiri H.**, Uno K., Oka Y. Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience, Oct 5-8, 2007 Kyoto, Japan
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他 (研究に関する新聞記事等)
2008年2月18日・22日テレビ報道
テレビ朝日系 「東北大学の世紀・糖尿病に挑む」で紹介

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

「シュガーチップを用いた検査・診断技術の開発」

平成19年度分担研究報告書

シアル酸含有オリゴ糖鎖の合成

分担研究者 石田 秀治 岐阜大学応用生物科学部・教授

研究要旨

シアロ糖鎖の系統的な合成を進めた。まず、ボツリヌス毒素の受容体となる小腸上皮細胞上のムチン型糖鎖を系統的に合成した。また、質量分析による糖鎖二次構造解析法の確立を目的として、結合位置、アノマー位の立体化学の異なるシアリルガラクトースの糖鎖ライブラリーの構築に取り組んだ。

A. 研究目的

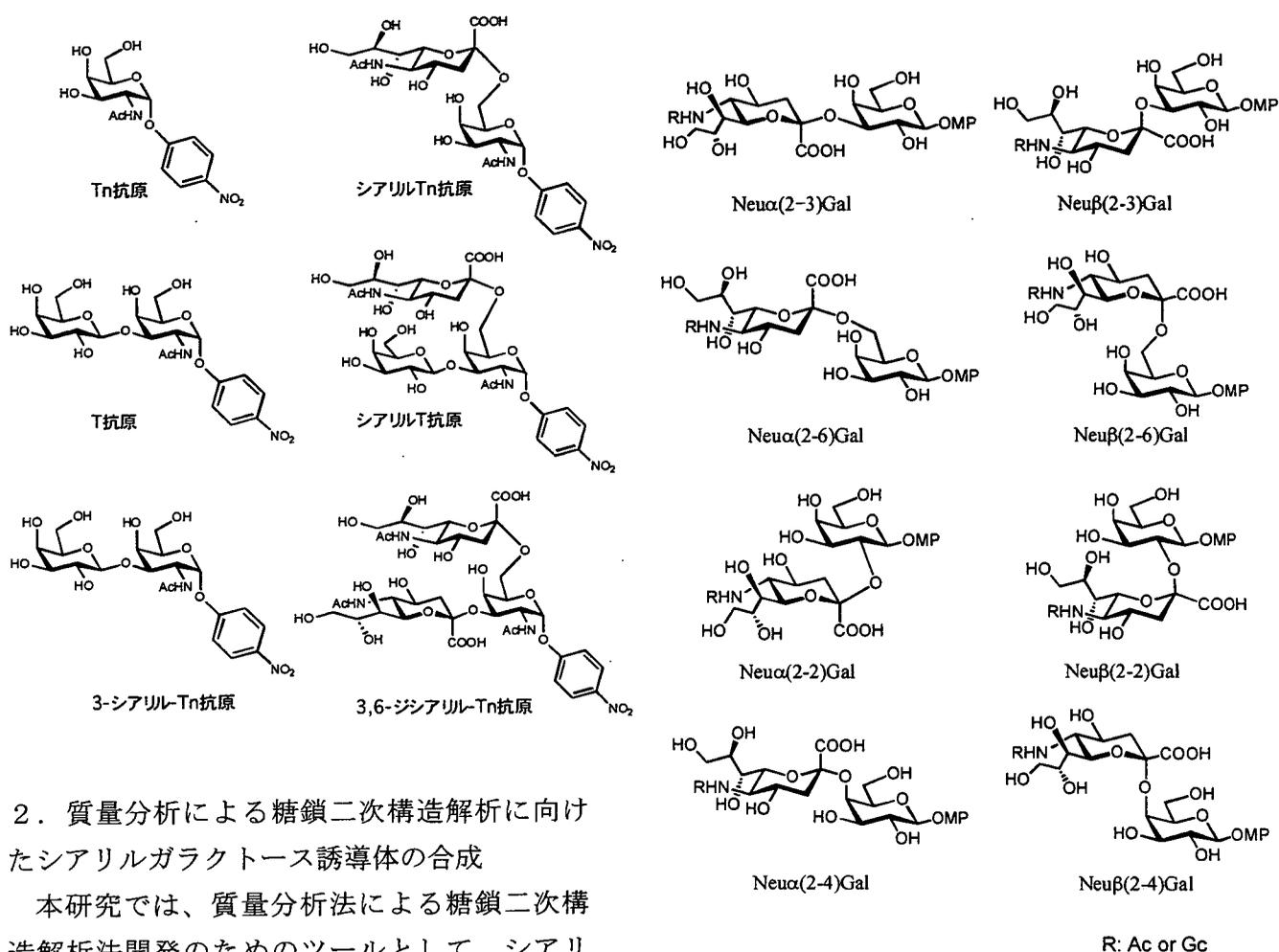
シアル酸を含む糖鎖（シアロ糖鎖）は、糖脂質ガングリオシドや糖タンパク質糖鎖として細胞表層に存在し、様々なタンパク質との相互作用によって多彩な生体機能を発現する。しかし一般に、細胞表層にごく微量存在するガングリオシドやシアロ糖タンパク質は分子多様性の物質であり、天然から純粋な単一化合物を得ることはきわめて難しい。このことが構造と機能についての厳密な解明を阻んできた。筆者らは、この困難な問題を解決するために天然型ガングリオシドはもとより、誘導体や類縁体の系統的合成法を確立し、得られた多彩な合成標品を糖鎖プローブ（さぐり針）として用いることで、多様な糖鎖の生物機能を「分子のレベル」で解き明かし、広く医学・生物学への応用を目指している。

アル酸を強く認識し、ムチン型糖鎖と共に細胞内へ移行することが明らかになっている。本機構を明らかにするために、天然型及び非天然型ムチン型糖鎖（下図）を化学的手法を用いて合成した。まず、「DTBS 効果」を利用して、ガラクトサミンの C-1 位に α -結合で PNP 基を導入し、その後保護基の変換を経て、それぞれの目的化合物に対応する適切な糖受容体へ導いた。その後、ガラクトース及びシアル酸との縮合反応により、目的とする化合物全ての合成に成功した。

B. 研究方法、結果

1. ボツリヌス毒素のリガンド探索に向けた小腸上皮細胞上のムチン型糖鎖の合成

ボツリヌス毒素は、小腸粘膜に存在するシ



2. 質量分析による糖鎖二次構造解析に向けたシアリルガラクトース誘導体の合成

本研究では、質量分析法による糖鎖二次構造解析法開発のためのツールとして、シアリルガラクトース誘導体ライブラリーの合成を目指した。目的化合物として設定したシアリルガラクトース誘導体は、シアル酸とガラクトースの結合位置（4種類）、シアル酸のアノマー位の立体化学（2種類）、シアル酸の分子種（2種類）の全ての組み合わせを含む、全16種類である（下図参照）。ガラクトースの2,3,4,6位を適切に保護した受容体と、5位アミノ基をTroc基で保護したシアル酸供与体を、適切な溶媒を用いて縮合することによって、目的とする二糖を得た。その後、Troc基からアセチル（Ac基）、グリコリル（Gc）基に変換し、更に水酸基の保護基を脱保護することにより、目的化合物に導いた。SA(2-2)Gal, SA(2-4)Galについては、収率が十分でなく、条件の最適化が必要である。

C. 研究発表

1. 論文発表

- Fujikawa, K., **Ishida, H.** and Kiso, M.: Synthesis of ganglioside GM3 analog carrying phytoceramide by employing intramolecular glycosylation as a key reaction. *Carbohydr. Res.*, 2008 submitted.
- Imamura, A., Yoshikawa, T., Komori, T., Ando, M., Ando, H., Wakao, M., Suda, Y., **Ishida, H.** and Kiso, M.: Design and synthesis of versatile ganglioside probes for carbohydrate microarrays. *Glycoconjugate J.*, 2008, in press.
- Imamura, A., Ando, H., **Ishida, H.** and Kiso, M.: DTBS(di-tert-butylsilylene)-directed α -galactosyl

- ation for the synthesis of biologically relevant glycans. *Curr. Org. Chem.*, 2008, in press.
- Komori, T., Ando, T., Imamura, A., Li, Y.-T., **Ishida, H.** and Kiso, M.: Design and efficient synthesis of novel GM2 analogues with respect to the elucidation of the function of GM2 activator. *Glycoconjugate J.*, 2008, in press.
- Yoshikawa, T., Kato, Y., Yuki, N., Yabe, T., **Ishida, H.** and Kiso, M.: A highly efficient construction of GM1 epitope tetrasaccharide and its conjugation with KLH. *Glycoconjugate J.*, 2008, in press.
- Yoon, S.-J., Ikeda, S., Sadilek, M., Hakomori, S., **Ishida, H.** and Kiso, M.: Self-recognition of N-linked glycans with multivalent GlcNAc, determined as ceramide mimetic conjugate. *Glycobiology*, **17(9)**, 1007-1014, 2007.
- Ishibashi, Y., Nakasone, T., Kiyohara, M., Horibata, Y., Sakaguchi, K., Hijikata, A., Ichinose, S., Omori, A., Yasui, Y., Imamura, A., **Ishida, H.**, Kiso, M., Okino, N. and Ito, M.: A novel endoglycoceramidase hydrolyzes oligogalactosylceramides to produce galactooligosaccharides and ceramides. *J. Biol. Chem.*, **282(15)**, 11386-11396, 2007.
- Yu, J., Sawada, T., Adachi, T., Gao, X., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., **Ishida, H.**, Kiso, M. and Tsubata, T.: Synthetic glycan ligand excludes CD22 from antigen receptor-containing lipid rafts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **360**, 759-764, 2007.
- Sawada, T., Hasimoto, T., Nakano, H., Suzuki, T., Suzuki, Y., Kawaoka, Y., **Ishida, H.** and Kiso, M.: Influenza viral hemagglutinin complicated shape is advantageous to its binding affinity for sialosaccharide receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **355**, 6-9, 2007.
- Takaku, H., Ishida, H.-K., Fujita, M., Inazu, T., **Ishida, H.** and Kiso, M.: A chemical synthesis of GlcNAc β (1-4)GlcUA-UDP to elucidate the catalytic mechanism of hyaluronic acid synthesis (HAS). *Synlett*, **5**, 818-820, 2007.
2. 学会発表 (シンポジウムなど)
- Abdu-Allah, H.H.M., Yu, J., Lu, Z., Tsubata, T., **Ishida, H.** and Kiso, M.: Design, synthesis, and structural activity relationships of novel sialosides as CD22-specific inhibitors. The Eleventh Membrane Research Forum. (February 21, 2008, Kyoto).
- Magesh, S., Moriya, S., Suzuki, T., Miyagi, T., **Ishida, H.** and Kiso, M.: Towards the selective inhibition of human plasma-membrane associated sialidase (NEU3) for therapeutic value. Kyoto. (February 21, 2008, Kyoto).
- Fujikawa, K., **Ishida, H.** and Kiso, M.: Development of an efficient synthetic method of ganglioside GM3 as a cell membrane component. The Eleventh Membrane Research Forum. (February 21, 2008, Kyoto).
- Fujikawa, K., **Ishida, H.** and Kiso, M.: Efficient synthesis of GM3 analog by employing intramolecular glycosylation. 14th European Carbohydrate Symposium. (September 2-7, 2007, Luebeck, Germany).
- Ishida, H.** and Kiso, M.: Development of novel methods to construct glycolipids and glycopeptides. NIPER-ACCT (I) 2007 CARBO-XXII. (December 13-15, 2007, Punjab, India).
- Yoshikawa, T., Yuki, N., Yabe, T., **Ishida, H.** and Kiso, M.: A synthesis of GM1 epitope-KLH conjugate for elucidation of the pathogenic mechanism of the Guillain-Barré Syndrome. XIX International Symposium on Glycoconjugates. (15-20 July 2007, Cairns, Australia).

- Sato, T., Imamura, A., **Ishida, H.** and Kiso, M.: Di-tert-butylsilylene-Directed α -Selective Synthesis of p-Nitrophenyl T-antigen analogs. XIX International Symposium on Glycoconjugates. (15-20 July 2007, Cairns, Australia).
- Ando, M., Komori, T., Yoshikawa, T., Imamura, A., **Ishida, H.** and Kiso, M.: Systematic synthesis of functional oligosaccharide probes for sugar_chips. XI International Symposium on Glycoconjugates. (15-20 July 2007, Cairns, Australia).
- Abdu-Allah, H.H.M., Tsubata, T., **Ishida, H.** and M., Kiso: Design and synthesis of novel sialosides as potential CD22-specific inhibitors. XIX International Symposium on Glycoconjugates. (15-20 July 2007, Cairns, Australia).
- S. Magesh, T. Suzuki, T. Miyagi, H. Ishida and M. Kiso: Design and library synthesis of human sialidase NEU3 selective inhibitors, 第27回日本糖質学会年会、August 1-3, 2007.
- 今村彰宏, H. Attrill, P. R. Croker, D. M. F. Aalten, 安藤弘宗, **石田秀治**, 木曾真: 合成ガングリオシドプローブを用いたSiglec-7との共結晶構造解析. 第27回日本糖質学会年会、August 1-3, 2007.
- 吉川武、野原偏弘、**石田秀治**、木曾真: 生理活性糖鎖への蛍光標識FITCの効率的導入法の開発、第27回日本糖質学会年会、August 1-3, 2007.
- 大野ひろみ、佐藤哲郎、中村紀夫、西河淳、**石田秀治**、木曾真: ボツリヌス毒素のリガンド探索に向けたムチン型糖鎖の合成と生物活性、第27回日本糖質学会年会、August 1-3, 2007.
- 小森達也、**石田秀治**、木曾真: GM2 activatorの作用機構解明を目的とした新規GM2類縁体の設計と合成、第27回日本糖質学会年会、August 1-3, 2007.
- 澤田敏彦、橋本智裕、鈴木徹、中野博文、**石田秀治**、木曾真、鈴木康夫: 非経験的フラグメント分子軌道法によるインフルエンザHAとシアロ糖鎖の相互作用解析、第27回日本糖質学会年会、August 1-3, 2007.
- 藤川紘樹、**石田秀治**、木曾真: 分子内グリコシル化を利用したフィトスフィンゴシン含有GM3の合成. 第27回日本糖質学会年会、August 1-3, 2007.
- Abdu-Allah, H.H.M., 鏑田武志, **石田秀治**, 木曾真: CD22特異的阻害剤としての新規シアロシドの設計と合成、日本ケミカルバイオロジー研究会 第2回年会、京都、May 9-10, 2007.
- 今村彰宏, H. Attrill, P. R. Croker, D. M. F. van Aalten, 安藤弘宗, **石田秀治**, 木曾真: ガングリオシドGT1b糖鎖プローブの合成とSiglec-7との共結晶構造解析: 日本ケミカルバイオロジー研究会 第2回年会、京都、May 9-10, 2007.
- 澤田敏彦、橋本智裕、中野博文、鈴木徹、**石田秀治**、木曾真: ab initio フラグメント分子軌道法によるインフルエンザHAとシアロ糖鎖の相互作用解析、2007年度大会 日本農芸化学会、東京、March 24-27, 2007.
- 今村彰宏、安藤弘宗、**石田秀治**、木曾真: ガングリオシドGQ1bの合成に向けた方法論の開発と応用: 2007年度大会 日本農芸化学会、東京、March 24-27, 2007.
- 佐藤哲郎、大野ひろみ、今村彰宏、**石田秀治**、木曾真: ビフィズス菌由来endo-alpha-N-acetylgalactosaminidase特異的基質の設計と合成: 2007年度大会 日本農芸化学会、東京、March 24-27, 2007.
- 藤川紘樹、**石田秀治**、木曾真: 分子内グリコシル化を利用した効率的糖脂質合成法の開発: 2007年度大会 日本農芸化学会、東京、March 24-27, 2007.
- 高久博直、石田秀樹、藤田雅也、稲津敏行、**石田秀治**、木曾真: ヒアルロン酸合成酵素の詳細な反応機構解明を目的とした、UDP-2糖の合成. 2007年度大会 日本農芸化学会、東京、March 24-27, 2007.

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

「シュガーチップを用いた検査・診断技術の開発」

平成19年度分担研究報告書

オリゴ糖を用いたウイルス感染症の診断技術の開発

分担研究者 奥野壽臣 兵庫医科大学・准教授

研究要旨

インフルエンザウイルスのシアル酸への結合をオリゴ糖チップを用いた表面プラズモン共鳴で検出した。各種ウイルス株結合の定量的な解析を行い、株間の相違を結合パターンにより差別化出来るか否かを検討した。また同様に、ヘパリン系およびコンドロイチン系糖鎖結合チップに対する単純ヘルペスウイルス1、2型の結合を調べた。さらに、ヘパリン系糖鎖結合金ナノ粒子を用いて、単純ヘルペスウイルスの濃縮精製を試みた。インフルエンザウイルスではトリ型とヒト型の区別は可能であったが、株間の区別は困難であった。逆に単純ヘルペスウイルスでは型間区別は不可能であったが、株間の区別は可能であった。また、金ナノ粒子を用いることによって感染性のある単純ヘルペスウイルスを濃縮することが出来た。

A. 研究目的

インフルエンザウイルス（Flu）はこれまで何度も世界的大流行を引き起こし、また毎年流行においても多数の犠牲者を出してきた。さらに致死率の高い新型のトリFluが出現し、世界的大流行が懸念されている。流行を防ぐためには迅速な診断が不可欠である。Fluは糖鎖に結合するため、シアル酸を含む種々の糖鎖を結合させたチップを用いてFluの診断が可能か否かを調べる目的でこの研究を行った。

現在までヒトヘルペスウイルスは8種類知られており、ほとんどの人はそれらをすでに体内に持っている。そして抵抗力が落ちた時にウイルスが再活性化して様々な病気を引き起こす。これも迅速な診断が不可欠であるが、特に単純ヘルペスウイルス1型と2型（HSV-1、HSV-2）の鑑別は容易ではない。HSVはヘパリン系糖鎖に結合することが知られているので、Fluと同様の方法でそれらの鑑別診断が可能か否かを調べることを試みた。また、実験室レベルで扱

うウイルスの簡便な濃縮精製に糖鎖結合金ナノ粒子（SGNP）が使用できれば研究の進展に大きな力になり得るので、その可能性をHSVを用いて調べた。

B. 研究方法

1.使用ウイルス：
（インフルエンザウイルス）

H1N1型Flu

A/Beijing/262/95、A/Osaka/7/2006、
A/Osaka/39/2006、A/Osaka/40/2006

H3N2型Flu

A/Aichi/2/68、A/Fukuoka/1/70、
A/Guizhou/54/89、A/Kitakyushu/159/93、
A/Memphis/1/71、A/Niigata/102/81、
A/Panama/2007/99、A/Sydney/5/97、
A/Tokyo/6/73、A/Wyoming/3/2003、
A/Yamanashi/2/77、A/Osaka/6/2006、
A/Osaka/10/2006、A/Osaka/11/2006、
A/Osaka/24/2006

H2N2型Flu

A/Okuda

トリ Flu

A/Duck/HK/2415/76(H3N2)

A/Duck/313/4/78(H5N3)

(単純ヘルペスウイルス)

1型 (HSV-1)

CHR3 (実験室株)

KBT (臨床株)

FJT (臨床株)

SSK (臨床株)

2型 (HSV-2)

MS (実験室株)

MT (臨床株)

MY (臨床株)

FW (臨床株)

2.シュガーチップ：シアル酸を含む各種オリゴ糖 (Flu 解析のため：下記の①～⑧、HSV 解析のため：下記の⑨～⑳) を、固着させた基盤 (シュガーチップ) を作成し、ウイルスを添加した後、その結合を表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance, SPR) で測定した。

3.金ナノ粒子：シアル酸を含むオリゴ糖 (下記の⑧) を固着させた金ナノ粒子を作成し、ウイルスを添加したのち遠心し、その沈澱パターンを観察した。

4.オリゴ糖鎖：

①Ga β 4Gc-mono

②Ga β 4GcNAc β 6Gc-mono

③SA23Ga β 4Gc-mono

④SA26Ga β 4Gc-mono

⑤SA23Ga β 3GcNAc β 6Gc-mono

⑥SA26Ga β 3GcNAc β 6Gc-mono

⑦SA23Ga β 4GcNAc β 6Gc-mono

⑧SA26Ga β 4GcNAc β 6Gc-mono

⑨GcNS6S α 4GcA β 6Gc

⑩GcNS6S α 4IdA2S α 6Gc

⑪GcNS α 4DGcA β 6Gc

⑫GcNS α 4IdA2S α 6Gc

⑬GcA β 3GaNAc4S6S β 6Gc

⑭Heparin

⑮Chondroitin

⑯Chondroitin A

⑰Chondroitin B

⑱Chondroitin C

⑲Chondroitin D

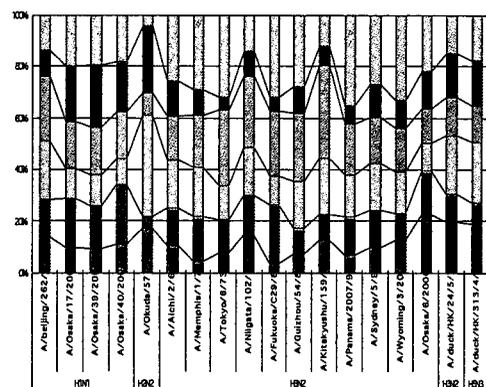
⑳Chondroitin E

3.ウイルス濃縮精製：

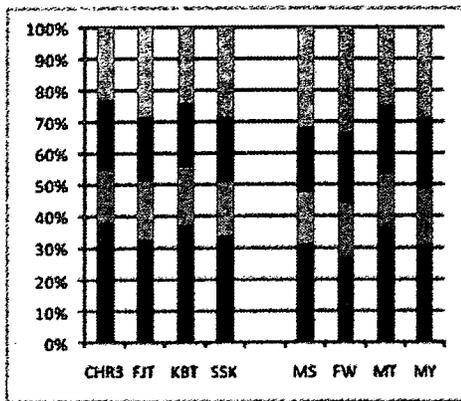
ヘパリン結合 SGNP と HSV-1 (CHR3 株) を混合し、遠心沈澱させた。沈澱を同量の培養液で混合した後、結合ウイルス量を測定した。

C. 研究結果

トリ細胞 (有精卵) に馴化したウイルス株 (Okuda) とトリ型ウイルスはトリ型のシアル酸に強く結合し、ヒトの分離株の一部 (H3N2: Fukuoka, Gouzhou, Kitakyushu, Memphis, Panama, Tokyo) はヒト型のシアル酸に強く結合した。しかし、他のヒト由来株 (H1N1: Beijing, Osaka/7, Osaka/39, Osaka/40; H3N2: Aichi, Niigata, Sydney, Wyoming, Osaka/6, Osaka/10, Osaka/11, Osaka/24, Tokyo) では SA23 と SA26 の両方に同程度の結合を示した。

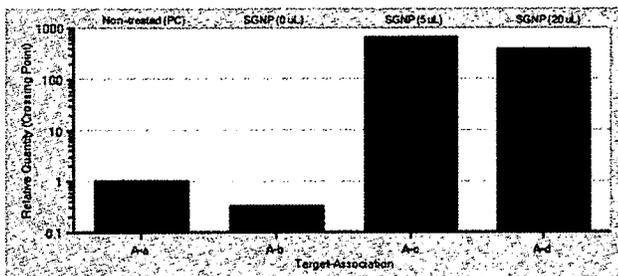


HSV のシュガーチップへの結合パターンは、CHR3、KBT、MT が、MS、SSK、FJT、FW がそれぞれ類似のパターンを示した。



実験を繰返しても各株の反応パターンは変わらなかった。

SGNP に結合した HSV-1 の量は、遠心沈澱以前の量の約 1,000 倍であった。



また、SGNP から感染性粒子が回収できた。

D. 考察

ヒト型 Flu のいくつかはヒト型のシアル酸への結合が有意にみられたが、その他のヒト型 Flu では明らかな傾向は見られなかった。さらに多くの臨床分離株を用いた解析が必要であると思われ、現在実施中である。これに反し、トリ型 Flu はトリ型のシアル酸への結合が有意であったので、ヒト型とトリ型の区別には有効であるかもしれない。

シュガーチップでは HSV-1 と-2 の明らかな区別は不可能であったが、各株間の区別には可能であるかもしれない。

ヘパリン結合 SGNP は HSV-1 の濃縮精製に有用であった。他のウイルスにも応用できる可能性がある。

E. 研究発表

1.論文発表

1) Hashimoto, M., Furuyashiki, M., Kaseya, R., Fukuda, Y., Akimaru, M., Aoyama, K., Okuno, T., Tamura, T., Kirikae, T., Kirikae, F., Eiraku, N., Morioka, H., Fujimoto, Y., Fukase, K., Takashige, K., Moriya, Y., Kusumoto, S., Suda Y. Evidence of immunostimulating lipoprotein existing in the natural lipoteichoic acid fraction. Infect Immun, 75: 1926-1932, 2007.

2) Otani, N. and Okuno, T. Human herpesvirus 6 infection of CD4(+) T-Cell subsets. Microbiol Immunol, 51: 993-1001, 2007.

2.学会発表

1)大谷成人, 馬場宏一, 奥野寿臣 : 水痘帯状疱疹ウイルスに対する細胞性免疫の評価。第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007

2) Otani, N., Song, X., Shao, H. and Okuno, T : Antiviral activity of Dandelion (Taraxacum Officinale) extract against herpes simplex virus (HSV). The 32nd International Herpesvirus Workshop, 2007, Asheville.

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
「シュガーチップを用いた検査・診断技術の開発」
平成19年度分担研究報告書

てんかん等の脳疾患への応用

分担研究者 加藤啓子 大阪府立大学生命環境科学研究科

研究要旨

申請者らは、側頭葉てんかんのモデル〔扁桃体キンドリング〕マウスを利用することで、難治てんかんに関与する分子を探索し、難治化の予防を目指した、難治化早期診断検査法の開発を試みてきた。本研究では、シュガーチップが、難治てんかん発症に連動した発現変動を示す、内在性レクチンを検出した。このことは、難治てんかん発症に関連した内在性レクチンの同定を可能にすると共に、シュガーチップを用いたてんかんの難治化早期診断法に門戸を開いた。

A. 研究目的

てんかんの罹患率は、人で約1%（日本全体で約100万人）、犬で3-5%と非常に高く、特に人では、その3分の1の患者で薬剤による発作制御が困難となる“難治てんかん”に進行する。難治てんかんに到った場合、通常の社会生活を送ることが困難となる場合も多く、難治化の予防は切実な課題であり、難治化に向かうかどうかをできるだけ早期に発見することが重要である。一方で、難治てんかんの5割を占める側頭葉てんかんは、海馬・扁桃体・側頭葉に発作の発火点を持つてんかんであり、申請者は、側頭葉てんかんのモデル〔扁桃体キンドリング〕マウスを作成し、難治てんかんに関与する分子を探索してきた。申請者の作成する扁桃体キンドリングは、一日一度の軽微な刺激を十数日繰り返すことにより、てんかん発作を誘導するもので、慢性の難治てんかんを誘導するモデルである。このモデルを用いて、難治てんかん発症に関連する分子群の同定及びそれら分子群のてんかん関与機構について研究を進めている。本研究では、てんかん発症機構に関わる分子基盤を構築する上で、シュガーチッ

プを用いた、糖鎖及び糖鎖結合因子の同定をおこない、糖鎖を用いた難治てんかん早期検査システムの開発を目指している。

本年度は、難治てんかん発症に連動した発現を示す内在性レクチンの同定を目指した。平成18年度、48種の糖鎖構造を含むシュガーチップを用い、てんかんモデルマウスと手術後未刺激マウスとの比較を行った結果、Sia(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-6)Glcがてんかんモデルで最も高い反応性を示した。この構造は、本申請者が以前に明らかにしたてんかん誘導関連シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)によりシアル酸修飾を受ける糖鎖構造であった。以上のことから、本年度は、Sia(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc構造を持つSGNPに着目し、内在性レクチンの同定を試みた。

B. 研究方法

B-1. 方法

B-1-1. てんかんモデルマウス作成

8週令オスDDYマウスを購入し、1週間の輸送ストレス除去の後、てんかんモデルマウスを作成した。マウスは、イソフルラン麻酔下で脳固定台に固定

後、扁桃体にマイナス極〔berga: 後方-2 mm, 右側3 mm, 深部4.5 mm〕を、頭蓋骨下にプラス極〔berga: 前方-1.5 mm, 左側1.5 mm〕を挿入後、電極は歯科用セメントにより固定した。1週間の手術ストレスを除いた後、一日一度、軽微な刺激(450-700 μ A, 200 μ sec duration, 60Hz, 2sec)を行い、約4週間かけて、てんかんモデルマウスを作成した。

B-1-2. マウス脳ホモジネート調整

てんかんモデル(kindling)マウス、手術後未刺激(sham)マウス、未処理(control)マウスから、大脳皮質前部領域、大脳皮質後部と海馬領域、視床領域の3領域に分け、それぞれを20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl 中でホモジネート後遠心分離を行った。その上清を可溶性画分(A)とし、その沈渣を20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.2% Triton X-100により、再びホモジネート後遠心分離を行い、その上清をTriton画分(T)とした。

B-1-3. SGNPを用いた内在性レクチン・アフィニティー精製

B-1-2で調整した、各画分を2mg/mlに調整後、Sia(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc-SGNPあるいは、Gal(β 1-4)GlcNAc-SGNPと混合し、4 $^{\circ}$ C一晩反応させ、70,000 rpm 30分遠心後、SGNPを洗浄し、0.2N HClで溶出し、銀染色を行った。

C. 研究結果

C-1. 視床領域

視床領域から調整したホモジネートにおける、シュガーチップの結果を以下に記す。てんかんモデルマウスにおいて、Le(x)が、3.4倍(てんかんTriton画分 $\delta R=64.0$); GalNAc(α 1-6)Glcで、5.7倍(てんかんTriton画分 $\delta R=50.7$); Sia(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc(β 1-6)Glcで、6.1倍(てんかんTriton画分 $\delta R=23.1$); Sia(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-6)Glcで、7.1倍(てんかん可溶性画分 $\delta R=69.1$)まで亢進していた。特に、最後のSia(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-6)Glcは、最

も δR 値が高いうえ、てんかん増強率も高かった。そこで、視床領域から調整したホモジネート画分において、SGNPを用いた内在性レクチン・アフィニティー精製をおこなった。てんかんモデルマウスに特異的なバンドを確認したが、同定までには至らなかった。

C-2. 大脳皮質前部領域

大脳皮質前部領域から調整したホモジネートにおける、シュガーチップの結果を以下に記す。てんかんモデルマウスにおいて、Le(x)が、shamの4倍のシグナル強度(δR)を示し、このときのkindling可溶性画分は $\delta R=42.3$ であった。さらに、Sia(α 2-6)Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-6)Glcは、shamの3倍であった。またこのときのてんかんTriton画分は $\delta R=68.9$ であった。

D. 考察

シュガーチップを利用することにより、難治てんかん発症に連動した発現を示す内在性レクチンの存在が明らかとなった。このことにより、難治てんかんへの進行を早期に知るための検査法の可能性を示すことができた。その一方で、SGNPを用いた内在性レクチン・アフィニティー精製によるてんかんモデルマウスに特異的なバンドは、検出できなかった。ただし、本年度は、大脳皮質前部領域から調整したホモジネートを用いた実験を行うことができなかったこと及び、視床由来のホモジネート画分の試行数も少なかったことから、内在性レクチンの同定には、さらなる検討が必要と考えられる。

以下に今後残された検討課題を列記する。

- 1) てんかんモデルマウス脳ホモジネートの大量調整を行うことで、今回同定できなかった特異的バンドの同定を目指す。
- 2) 抽出をHClではなく、糖による溶出を試みる。
- 3) SGNPに加えて、シュガーチップに