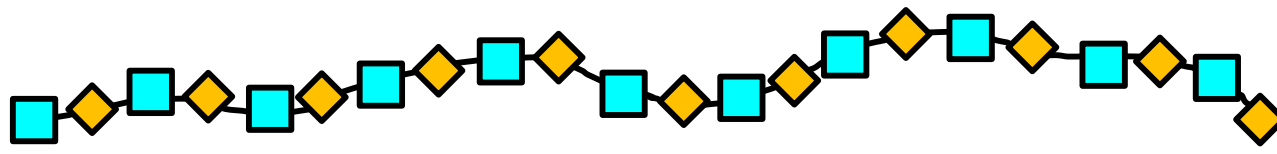


脳の炎症とグリコサミノグリカン分解酵素

東京理科大学薬学部薬学科
病態分析化学研究室
東 恭平

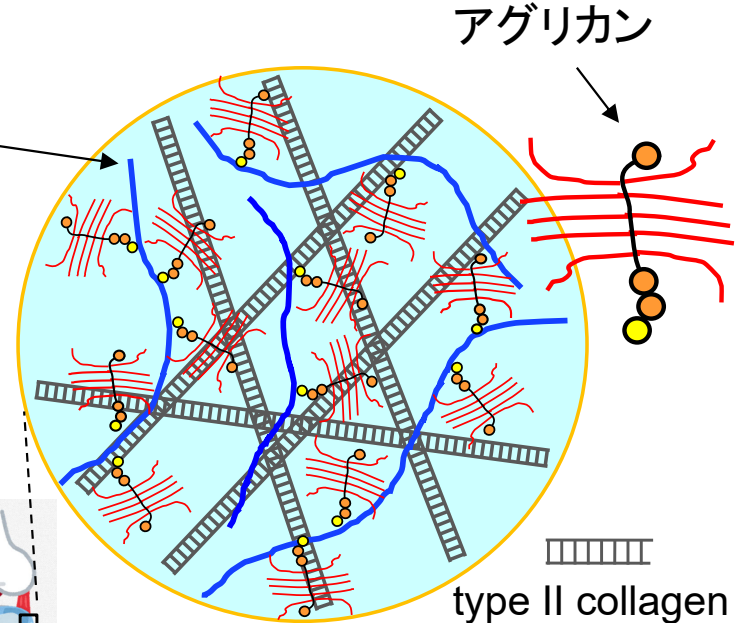
グリコサミノグリカンとプロテオグリカン



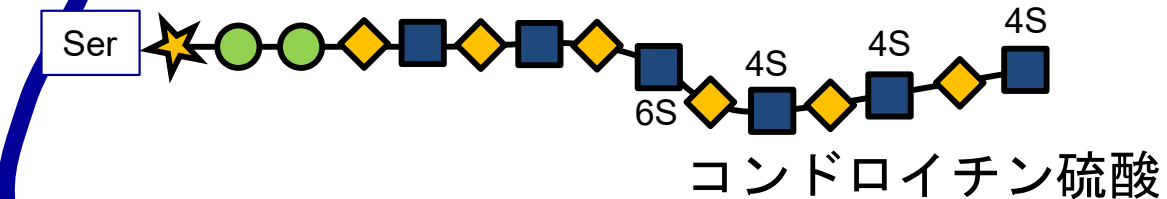
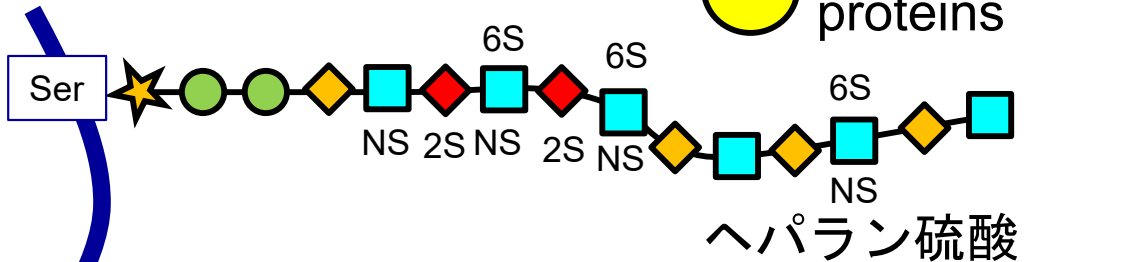
ヒアルロン酸

シンデカンなど

FGFs, VEGF, PDGF, HGF, BMP2, Shh, Ihh, MK, PTN, L-selectin, N-CAM etc.



PROTEOGLYCANS



◆ GlcA ◆ IdoA ■ GlcNAc ■ GalNAc

ウロン酸

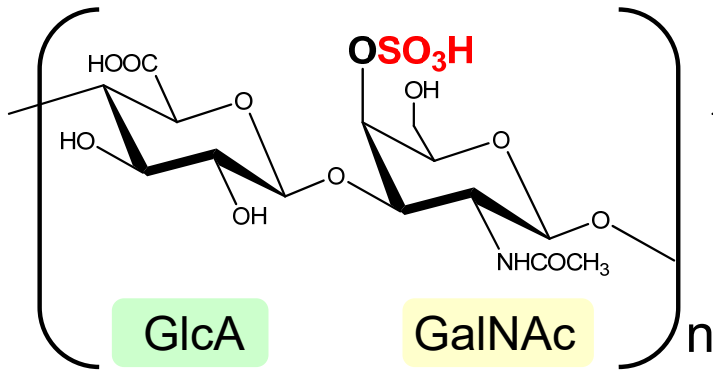
アミノ糖

Plasma membrane

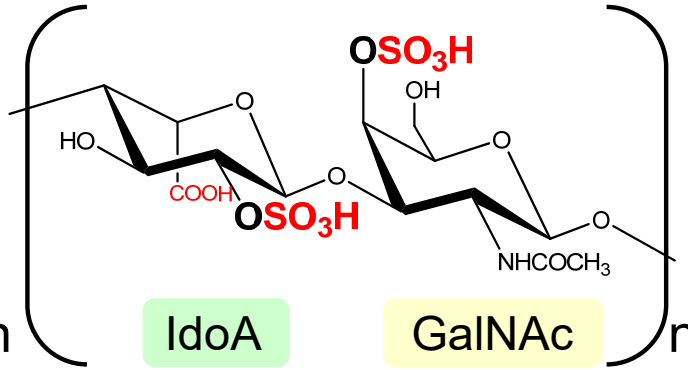
- 軟骨の保護
- 肌のハリ・保湿
- 分化・形態形成
- 神経軸索伸長
- 細胞接着
- 免疫制御
- 創傷治癒
- 抗血液凝固

グリコサミノグリカンの分類と構成糖

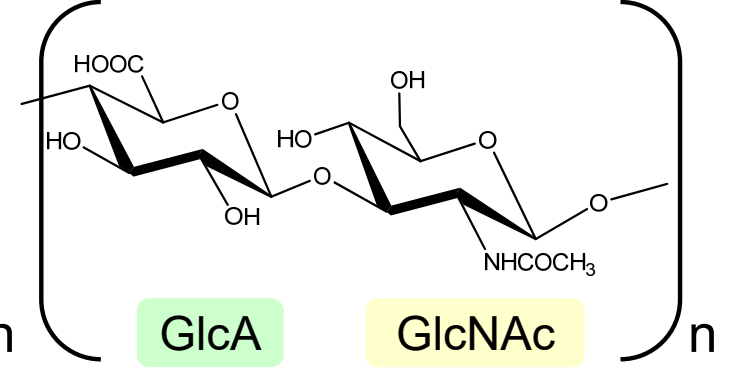
コンドロイチン硫酸



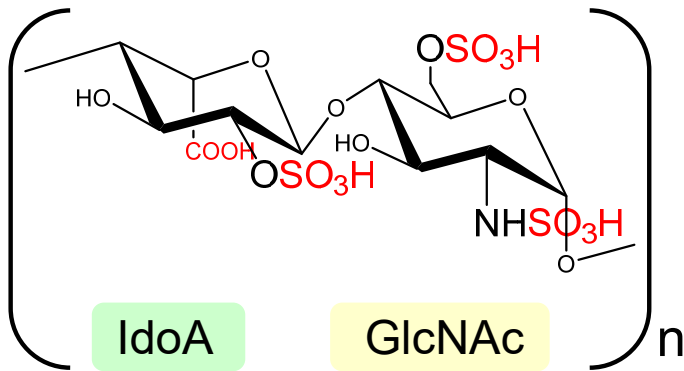
デルマタン硫酸



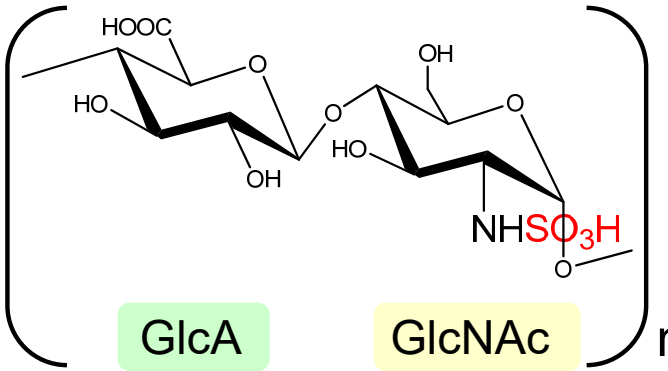
ヒアルロン酸



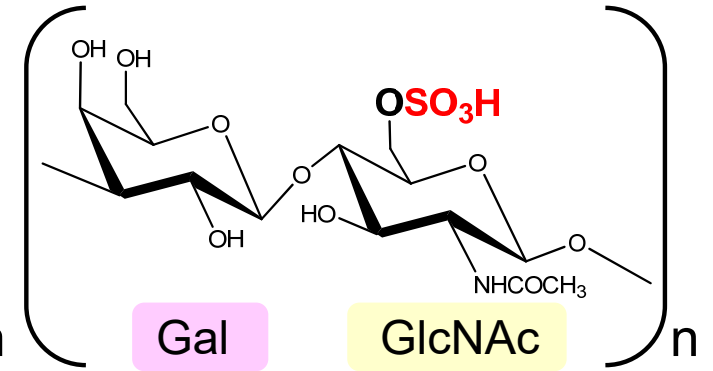
ヘパリン



ヘパラン硫酸



ケラタン硫酸



uron酸

GlcA: glucronic acid

IdoA: iduronic acid

中性糖

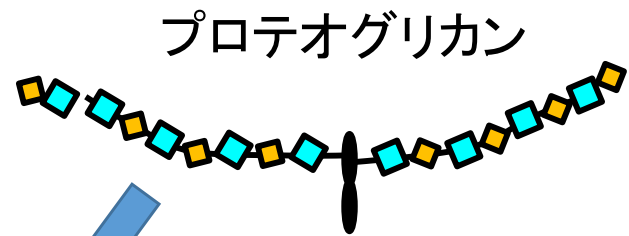
Gal: Galactose

アミノ糖

GlcNAc: *N*-acetyl-D-glucosamine

GalNAc: *N*-acetyl-D-galactosamine

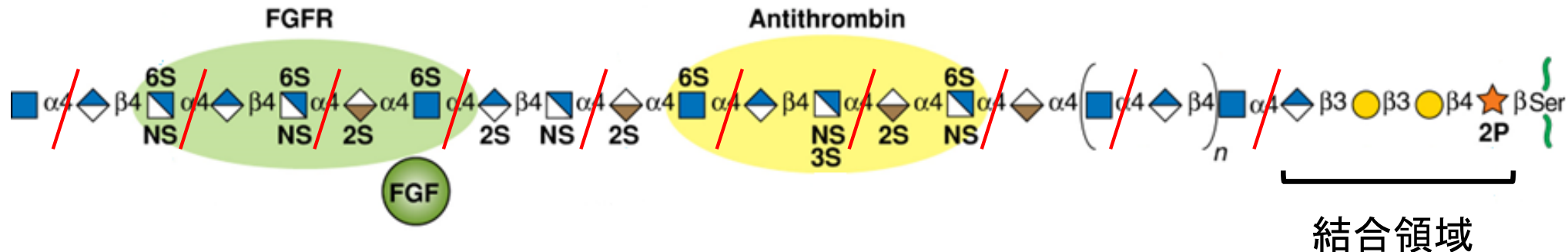
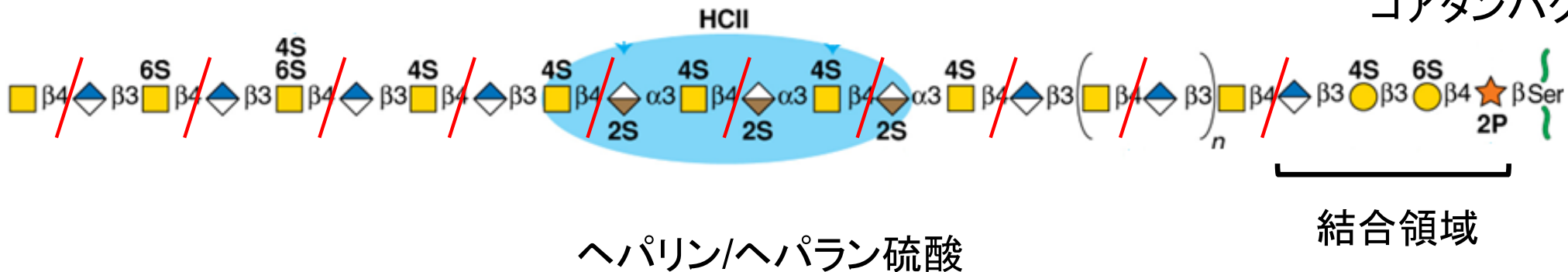
グリコサミノグリカン構造



コンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸



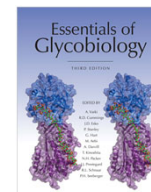
コアタンパク質



特徴

- 鎖長が不均一。
- 二糖あたりの硫酸基の数、位置が異なる。
- 硫酸化やイズロン酸の位置はある一定のルールがある。

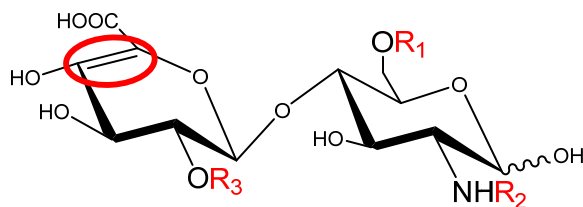
グリコサミノグリカン鎖は糖鎖構造が複雑で構造解析が難しい。



分析に用いられる微生物由来グリコサミノグリカン分解酵素とその特徴

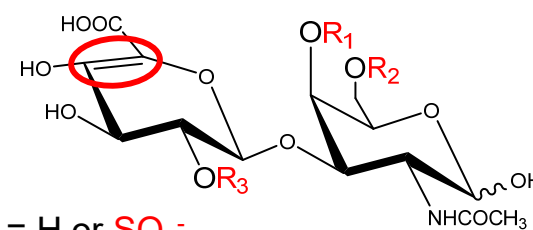
	微生物	種類	基質	pH	生成物
ヘパリンリアーゼ	<i>Flavobacterium heparinum</i>	I (エンド型)	高硫酸化 (ヘパリン: HP)	7.0	
	<i>Flavobacterium heparinum</i>	II (エンド型)	高硫酸化 (ヘパリン・アカラン硫酸)	7.0	
	<i>Flavobacterium heparinum</i>	III (エンド型)	低硫酸化 (ヘパラン硫酸: HS)	7.0	
コンドロイチナーゼ	<i>Proteus vulgaris</i>	ABC (エンド+ エキソ)	コンドロイチン硫酸/デルマタン 硫酸/ヒアルロン酸	8.0/8.0/ 6.2	不飽和二糖
	<i>Flavobacterium heparinum</i>	ACI (エンド型)	コンドロイチン硫酸/ ヒアルロン酸	7.3/6.0	
	<i>Arthrobacter aurescens</i>	ACII (エキソ型)	コンドロイチン硫酸/ ヒアルロン酸	6.0-8.0	
	<i>Flavobacterium heparinum</i>	B (エンド型)	デルマタン硫酸	8.0	
ヒアルロニダーゼ	<i>Streptomyces hyalurolyticus</i>	(エンド型)	ヒアルロン酸	6.0	不飽和四糖 /六糖

HS/HP
不飽和二糖



$R_1, R_3 = \text{H or } \text{SO}_3^-$ $R_2 = \text{Ac or } \text{SO}_3^-$

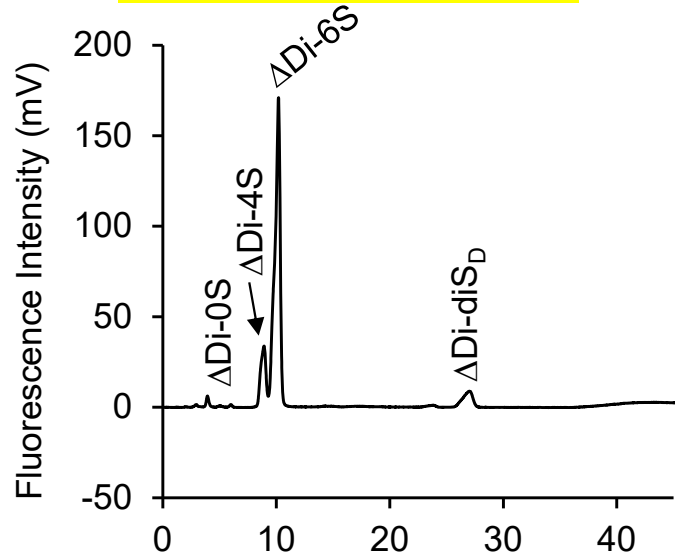
CS/DS
不飽和二糖



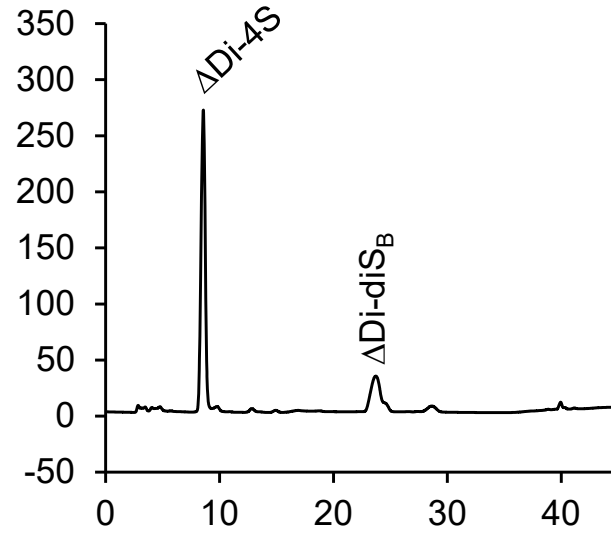
$R_1, R_2, R_3 = \text{H or } \text{SO}_3^-$

ポストカラム誘導体化法を用いた不飽和二糖分析

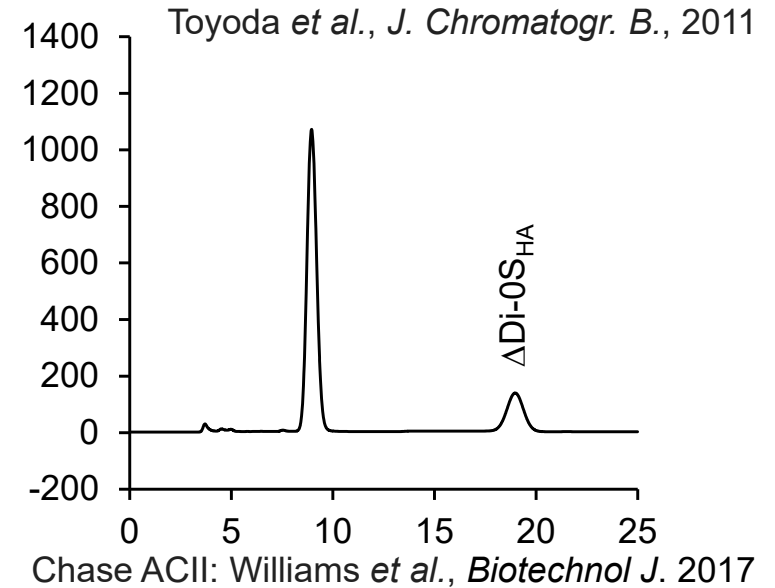
コンドロイチン硫酸



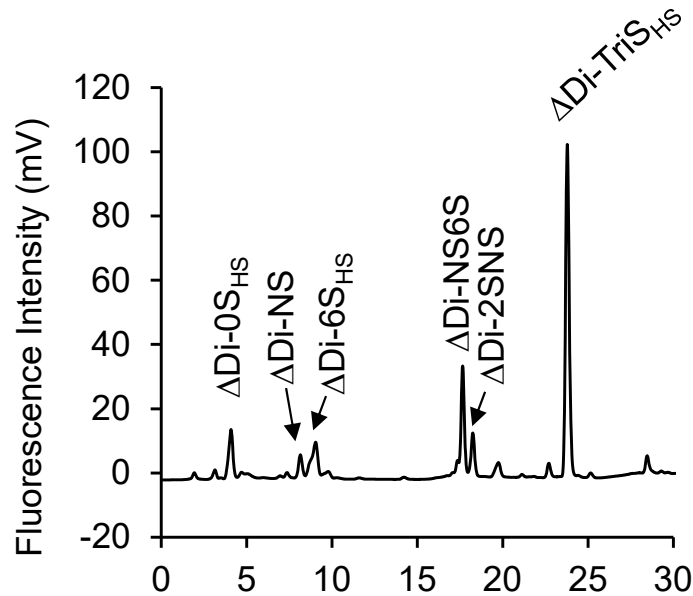
デルマタン硫酸



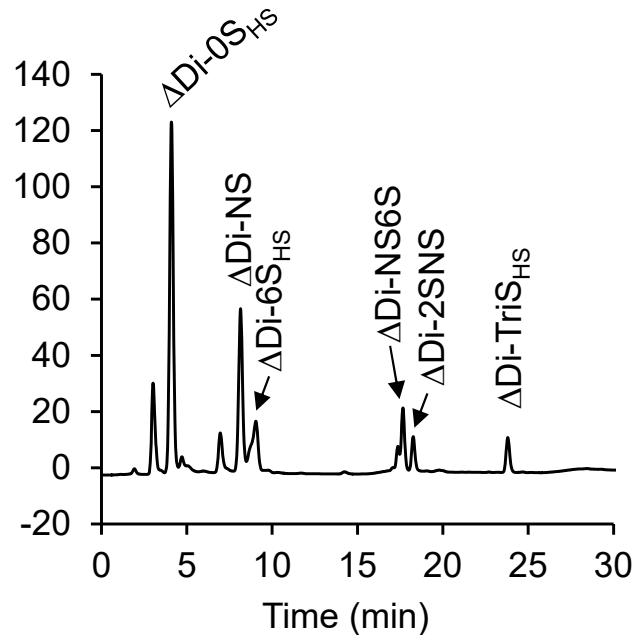
ヒアルロン酸



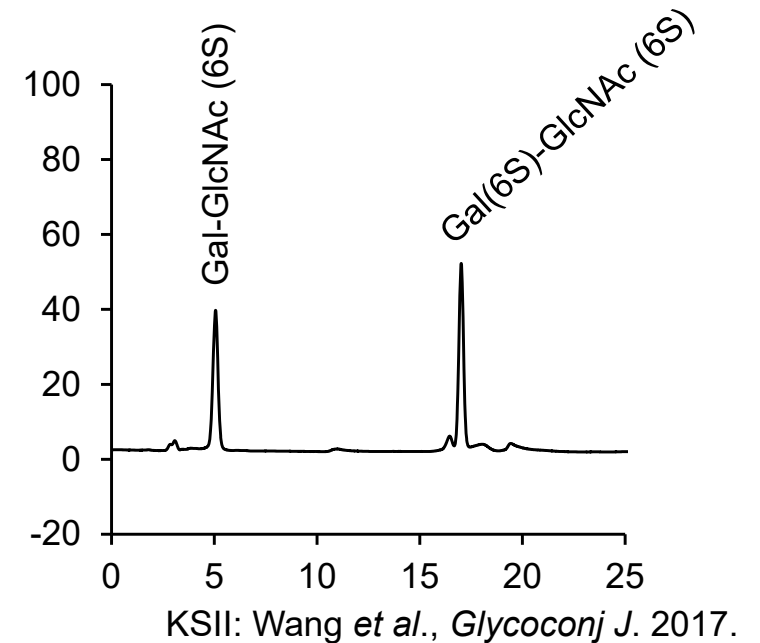
ヘパリン



ヘパラン硫酸

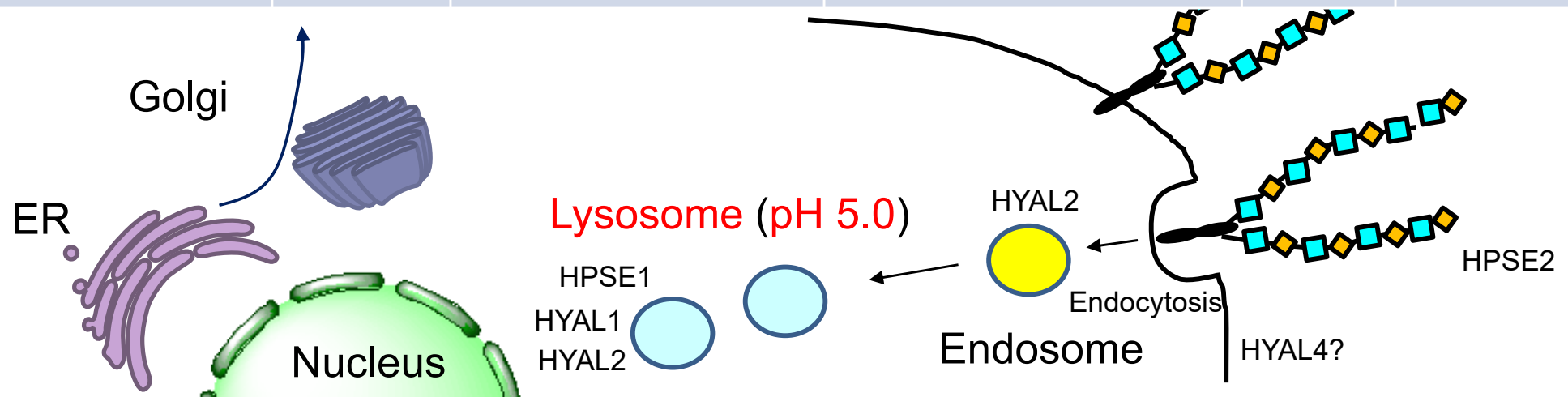


ケラタン硫酸



代表的な動物由来グリコサミノグリカン分解酵素とその特徴

	種類	局在	基質	pH	生成物
ヘパラーゼ (エンド型)	HPSE1	血管内皮、血小板、胎盤、免疫細胞	ヘパラン硫酸	4.0	オリゴ糖
	HPSE2	普遍的に発現?	ヘパラン硫酸への結合○ 切断×	-	-
ヒアルロニダーゼ (エンド型)	HYAL1	普遍的に発現+ 血漿 + 尿	コンドロイチン硫酸/ ヒアルロン酸	4.0/4.0	4糖
	HYAL2	普遍的に発現	ヒアルロン酸	3.8	オリゴ糖 (20 kDa)
	HYAL3	精巣、骨髄で強く発現	ヒアルロン酸?	-	?
	HYAL4	胎盤、精巣、骨格筋	コンドロイチン硫酸	4.5-5.0	4糖
	PH-20 (SPAM1)	精巣	コンドロイチン硫酸/ ヒアルロン酸	4.0/4.5	4糖



血液中のグリコサミノグリカン代謝は早い

→ GAG代謝は恒常性の維持に重要である。

GAG	種	組織	T _{1/2}
ヘパラン硫酸	ラット	卵巣顆粒膜細胞	3-8時間
ヘパリン	ヒト	血液	30-40分
コンドロイチン硫酸	マウス	血液	~13分
ヒアルロン酸	ヒト	血液	3-6分
	ヒツジ	血液	2-7分
	ウサギ	血液	2-5分
	ヒト	硝子体	10~30日
	ウサギ	関節	1日
	ウサギ	骨格筋	1.25日
	ウサギ	皮膚	2日

ムコ多糖症

Zhou et al., 2020,
Intractable & Rare Diseases Research

Items	Subtypes	Deficient enzyme	Mutaation of Gene	Locus	GAGs	Clinical features
MPS I	Hurler Syndrome	α -L-iduronidase	<i>IDUA</i>	4p16,3	HS, DS	Severe. Skeletal deformation, coarse facial features, hepatosplenomegaly, cardiac diseases, respiratory diseases, cognitive retardation, ocular disorders
	Hurler/Scheie Syndrome					Intermediate
	Scheie Syndrome					Mild
MPS II	Hunter syndrome	iduronate-2-sulfatase	<i>IDS</i>	Xq28	HS, DS	Skeletal deformation, coarse facial features, hepatosplenomegaly, cardiac diseases, respiratory diseases, cognitive retardation, ocular disorders
MPS III	A	heparan-N-sulfatase	<i>SGSH</i>	17q25,3	HS	Cognitive retardation, behavioral problems
	B	α -N-acetylglucosaminidase	<i>NAGLU</i>	17q21.2	HS	
	C	α -glucosaminidase acetyltransferase	<i>HGSNAT</i>	8p11.21-p11.1	HS	
	D	N-acetylglucosamin-6-sulfatase	<i>GNS</i>	12q14,3	HS	
MPS IV	A	N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase	<i>GALNS</i>	16q24,3	KS, CS	Skeletal deformation, corneal clouding
	B	β -galactosidase	<i>GLB1</i>	3p22,3	KS	
MPS VI		N-acetylgalactosamine-4-sulfatase	<i>ARSB</i>	5q13-14	DS, C4S	Skeletal deformation, coarse facial features, may have normal intelligence
MPS VII		β -glucuronidase	<i>GUSB</i>	7q11,21	DS, HS, C4S, C6S	Hydrops fetalis
MPS IX		Hyaluronidase 1	<i>HYAL1</i>	3p21,3	HA	Periarticular masses, mild short stature

グリコサミノグリカン分解酵素遺伝子の欠損又は変異による表現型

> PLoS One. 2009;4(4):e5181. doi: 10.1371/journal.pone.0005181. Epub 2009 Apr 10.

Newly generated **heparanase** knock-out mice unravel co-regulation of heparanase and matrix metalloproteinases

肝臓と腎臓においてMMP2とMMP9の発現が増加

Case Reports > Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 May 25;96(11):6296-300.

doi: 10.1073/pnas.96.11.6296.

Mutations in **HYAL1** a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX

Periarticular soft tissue masses, mild short stature, an absence of neurological or visceral involvement

> FASEB J. 2019 Dec;33(12):14440-14449. doi: 10.1096/fj.201900889RRR. Epub 2019 Oct 31.

SPAM1/HYAL5 double deficiency in male mice leads to severe male subfertility caused by a cumulus-oocyte complex penetration defect

Accumulation of sperm on the outside of the cumulus-oocyte complex

> Am J Hum Genet. 2010 Jun 11;86(6):957-62. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.04.016.

Loss-of-function mutations in **HPSE2** cause the autosomal recessive urofacial syndrome

常染色体劣性 尿路顔症候群

HPSE2はHPSE1の活性を阻害する機能があり、HPSE2遺伝子の欠損によりHPSE1の活性が強まるためと考えられている。

Guo et al., Hum. Mol. Genet., 24, 2015.

> Genet Med. 2022 Mar;24(3):631-644. doi: 10.1016/j.gim.2021.10.014. Epub 2021 Nov 30.

Elucidating the clinical spectrum and molecular basis of **HYAL2** deficiency

Orofacial clefting, facial dysmorphism, congenital heart disease, and ocular abnormality

> Matrix Biol. 2008 Oct;27(8):653-60. doi: 10.1016/j.matbio.2008.07.006. Epub 2008 Aug 14.

Hyaluronidase 3 (**HYAL3**) knockout mice do not display evidence of hyaluronan accumulation

グリコサミノグリカンの分解又は産生亢進に関わる疾患

組織	ヘパラーゼ
脳	癌
	脳梗塞
	脳出血
	アルツハイマー病
肺	癌
	敗血症→肺障害
	慢性閉塞性肺疾患 (COPD)
心血管	アテローム性動脈硬化症
肝臓	癌
	線維化
胆管	癌
膵臓	癌
乳房	癌
腎臓	タンパク質尿
	腎不全
	糖尿病性腎症
膀胱	癌
腸	癌
	炎症性腸疾患
卵巣	癌
関節	

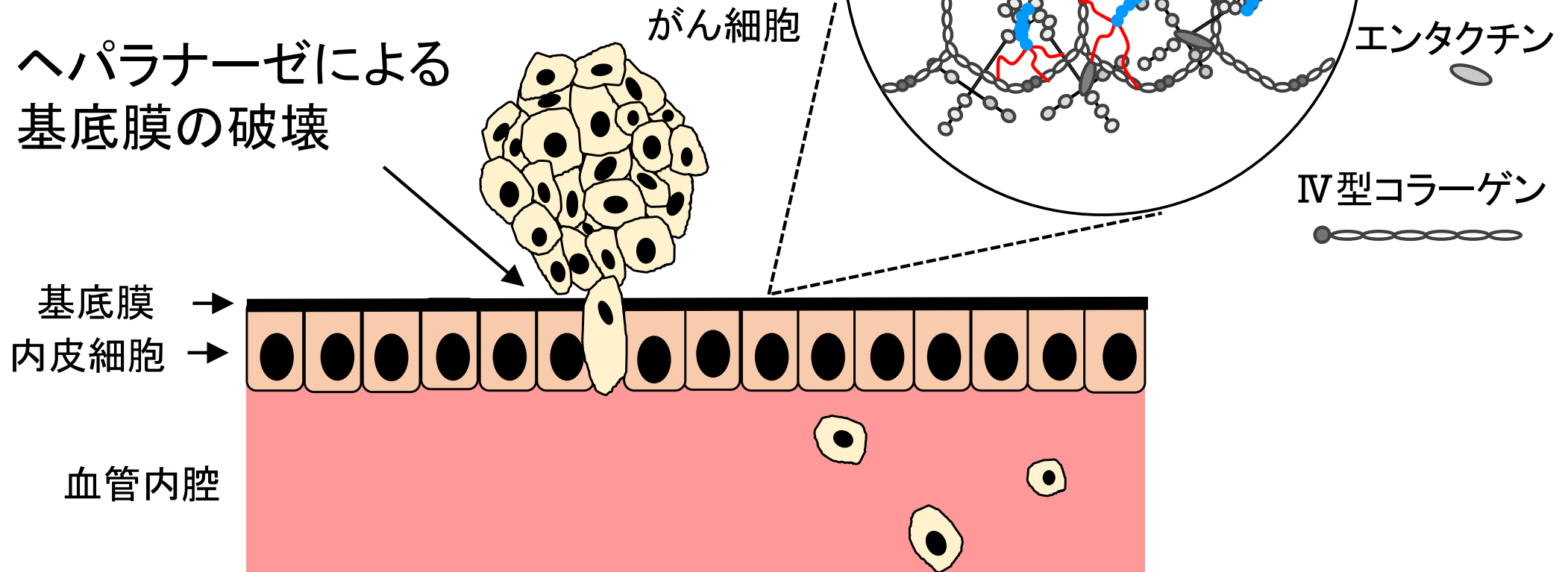
組織	ヒアルロニダーゼ	ヒアルロン酸
脳	癌	癌
	脳梗塞	脳梗塞
	脳出血	脳出血
	アルツハイマー病	アルツハイマー病
肺	癌	
	急性呼吸窮迫症候群 (ARDS)	慢性閉塞性肺疾患 (COPD)
心血管	アテローム性動脈硬化症	
肝臓	慢性肝障害	
	C型肝炎ウイルス	C型肝炎ウイルス
胆管		癌
膵臓		癌
乳房	癌	
腎臓		
膀胱	癌	
腸	癌	
卵巣		
関節	リウマチ	リウマチ

癌転移におけるヘパラーゼの役割

がん転移過程

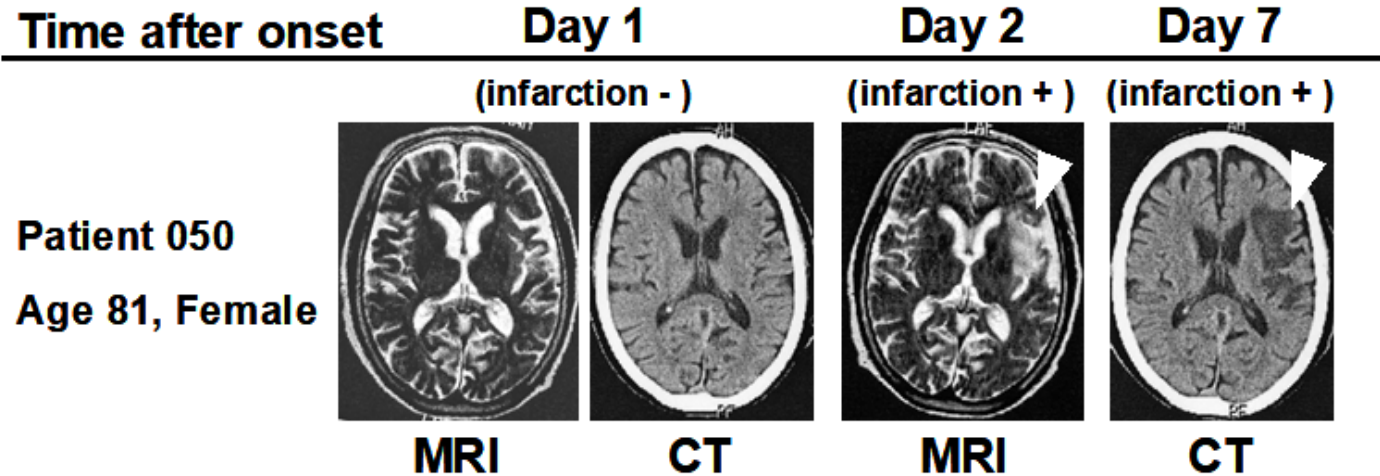
- 1) がん細胞がヘパラーゼ分泌
- 2) ヘパン硫酸の分解
- 3) 基底膜の物質透過性亢進
- 4) がん細胞が血管内に浸潤
- 5) 他の部位への転移・増殖

ヘパラーゼによる基底膜の破壊



研究紹介

脳梗塞



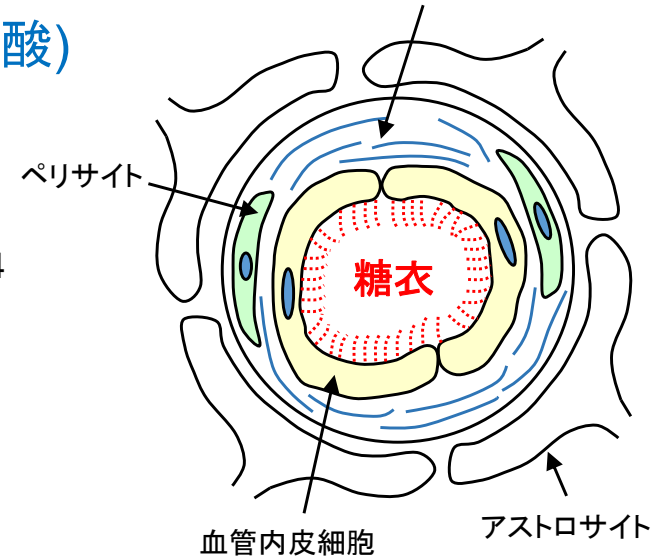
Tomitori et al, *Stroke*, 2005, 36, 2609-2613

- 脳血管がつまることで起きる虚血壊死により大きな炎症が惹起される疾患。
- 日本人の死亡原因第4位であり、予後が悪い。
- 脳梗塞発症後の第一選択はtPAであるが、治療時間枠が発症4.5時間以内という制約があり、その治療開始可能時間を延ばす治療法の開発が必要とされている。
- 国内では、活性酸素種を除去する脳保護薬エダラボンが急性期に投与されているが、炎症を完全に抑え込めていない。

糖衣損傷による炎症増悪機構

血管内皮細胞における糖衣 (ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸) の機能: 血液中を循環する白血球の不要な接着を妨げる。

基底膜 (細胞外マトリックス)



タンパク質尿

Garsen et al., *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2014

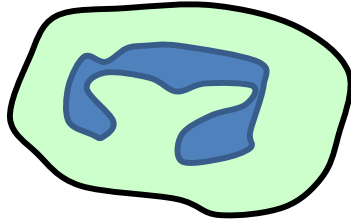
糖尿病性腎症

Gil et al., *Diabetes*, 2012

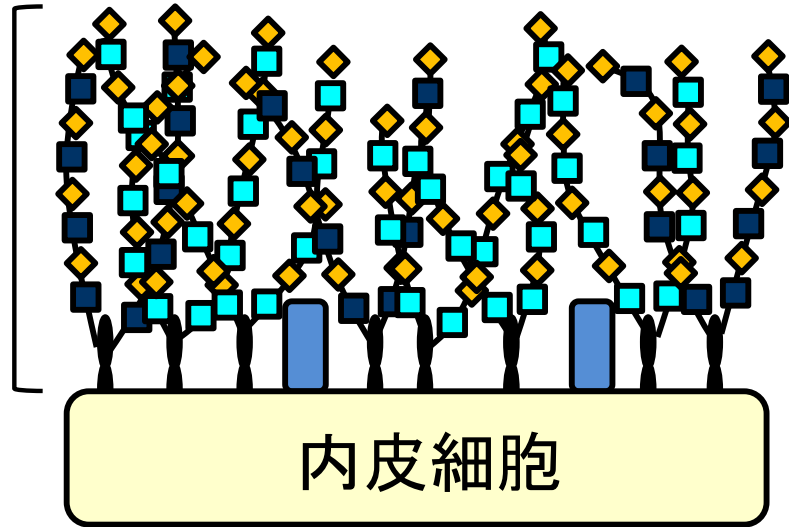
敗血症による急性肺障害

Schmidt et al., *Nat. Med.*, 2012

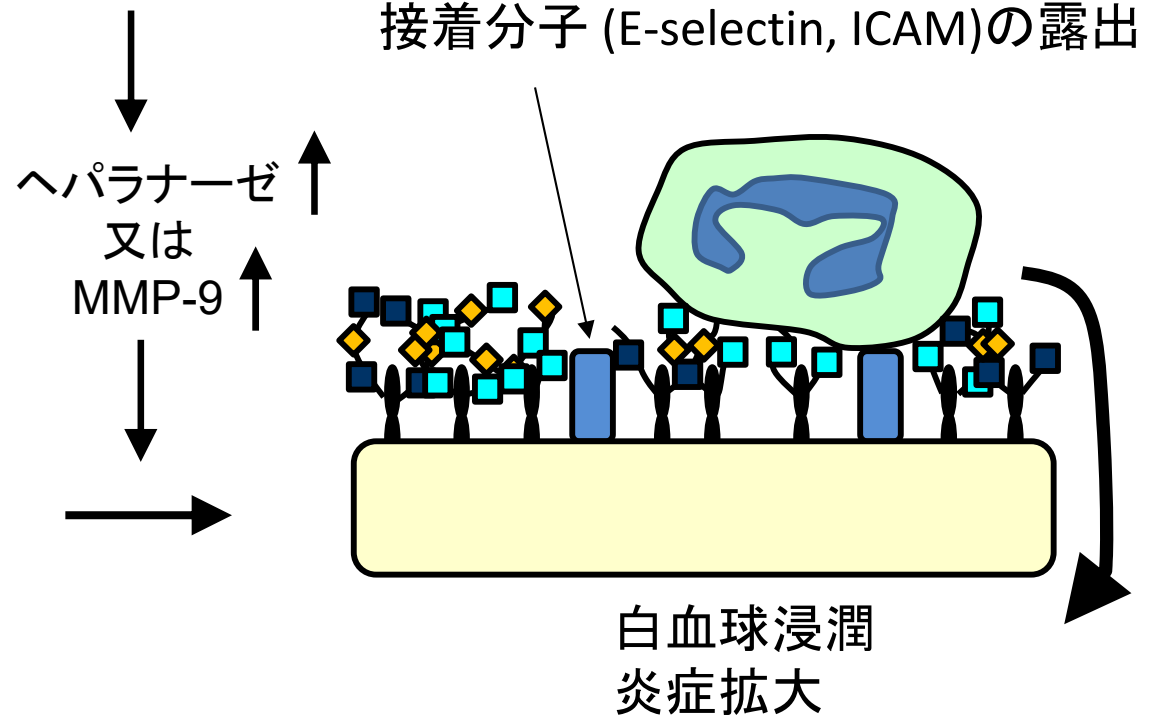
白血球



糖衣 (プロテオグリカン)



CS: ■ ◆ ■ ◆ ■ ◆
HS: ■ ◆ ■ ◆ ■ ◆

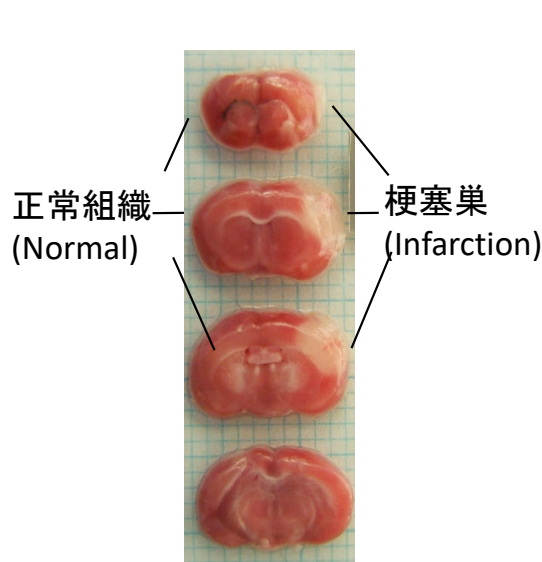
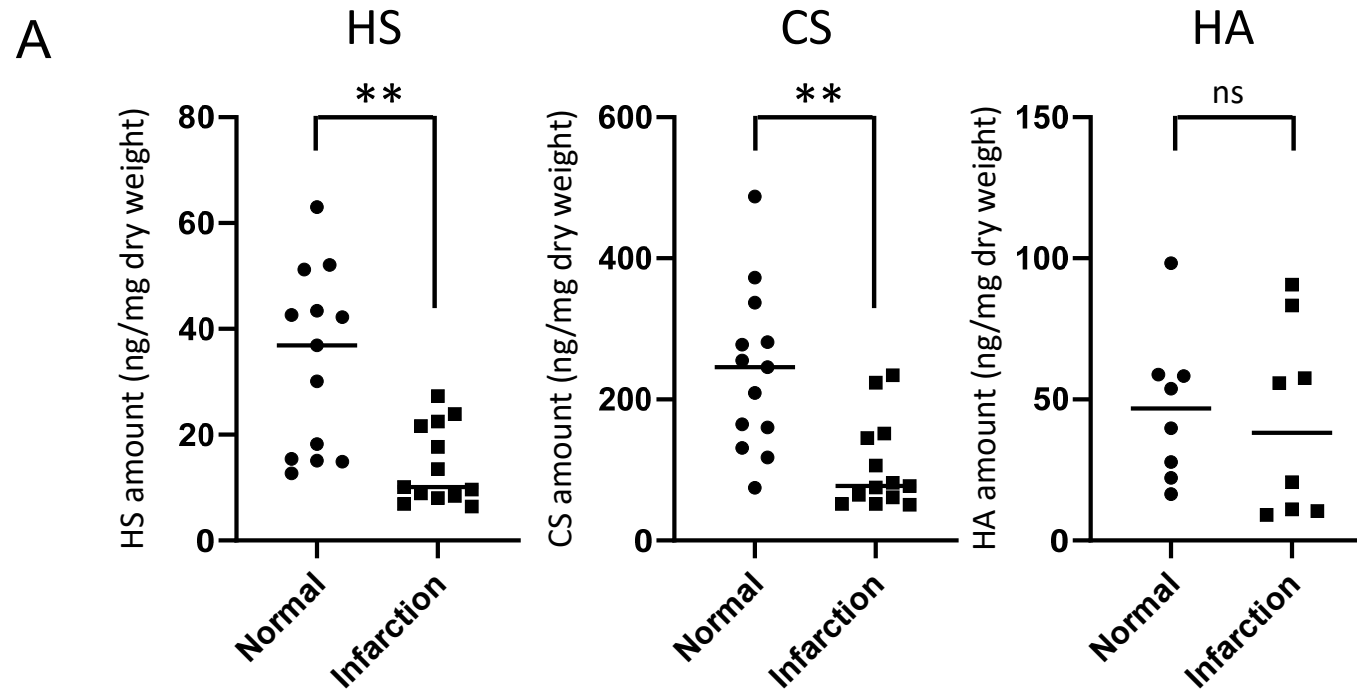


接着分子 (E-selectin, ICAM) の露出

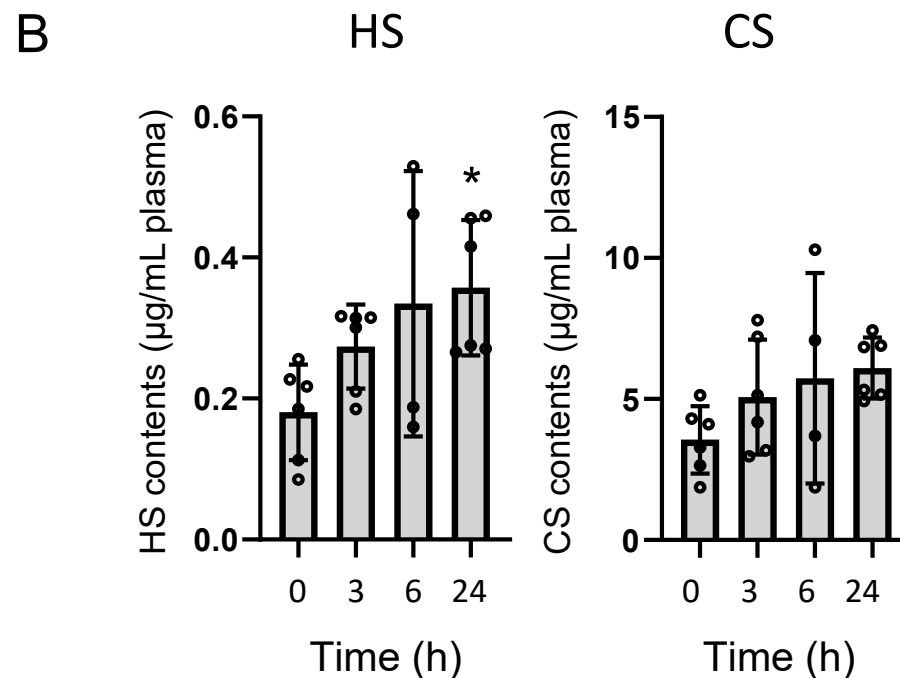
ヘパラーゼ ↑
又は
MMP-9 ↑

白血球浸潤
炎症拡大

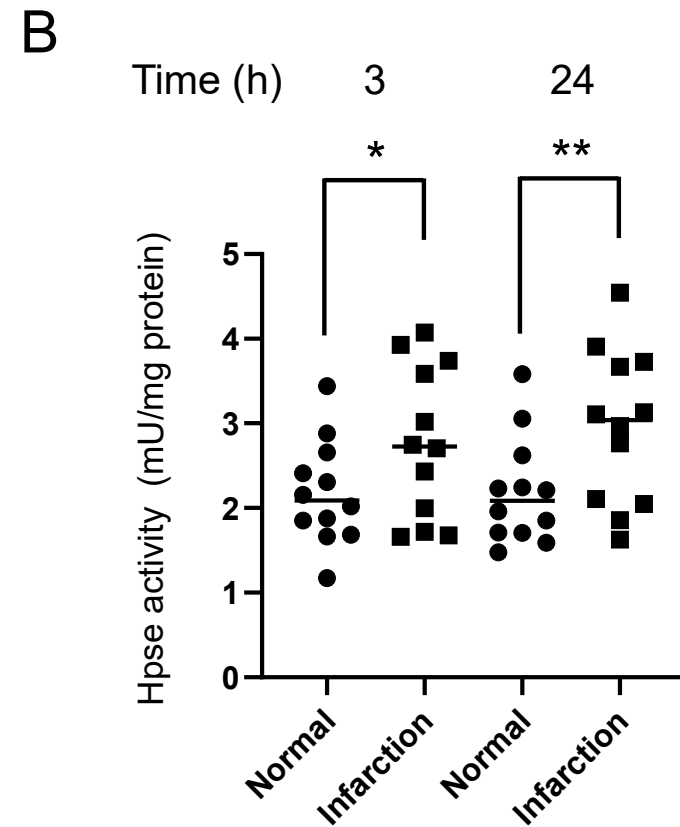
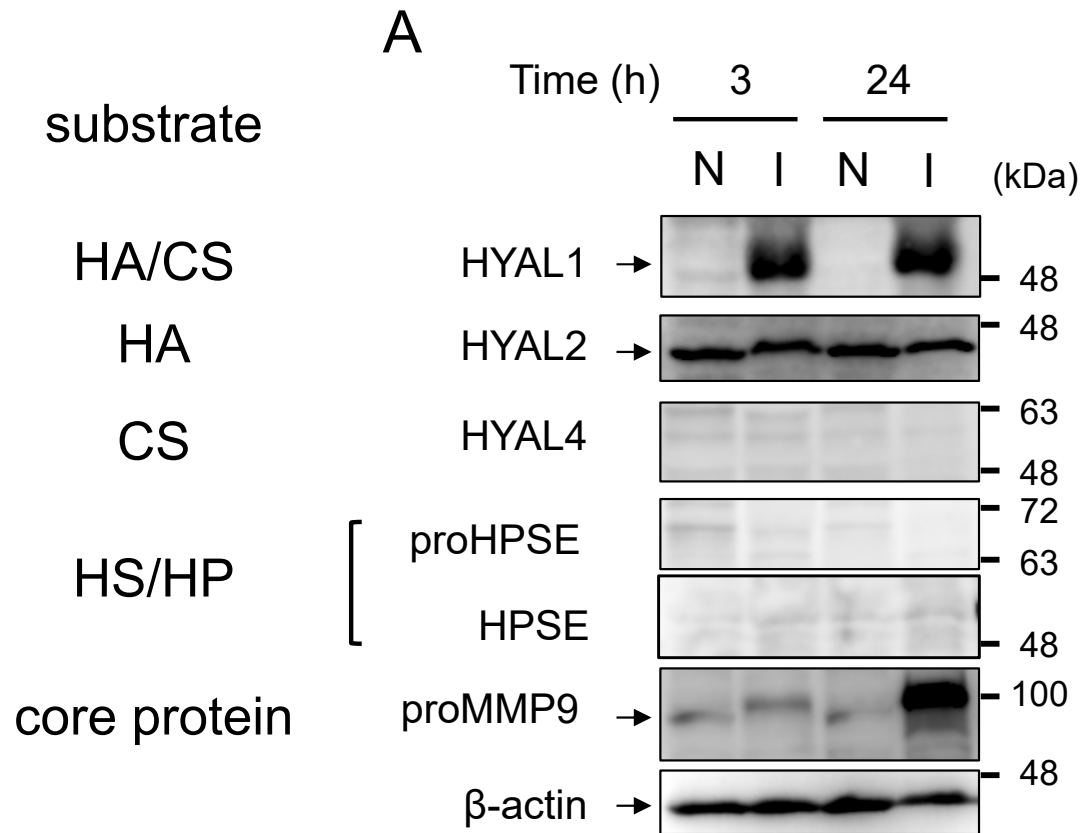
脳梗塞はGAGの分解を引き起こす



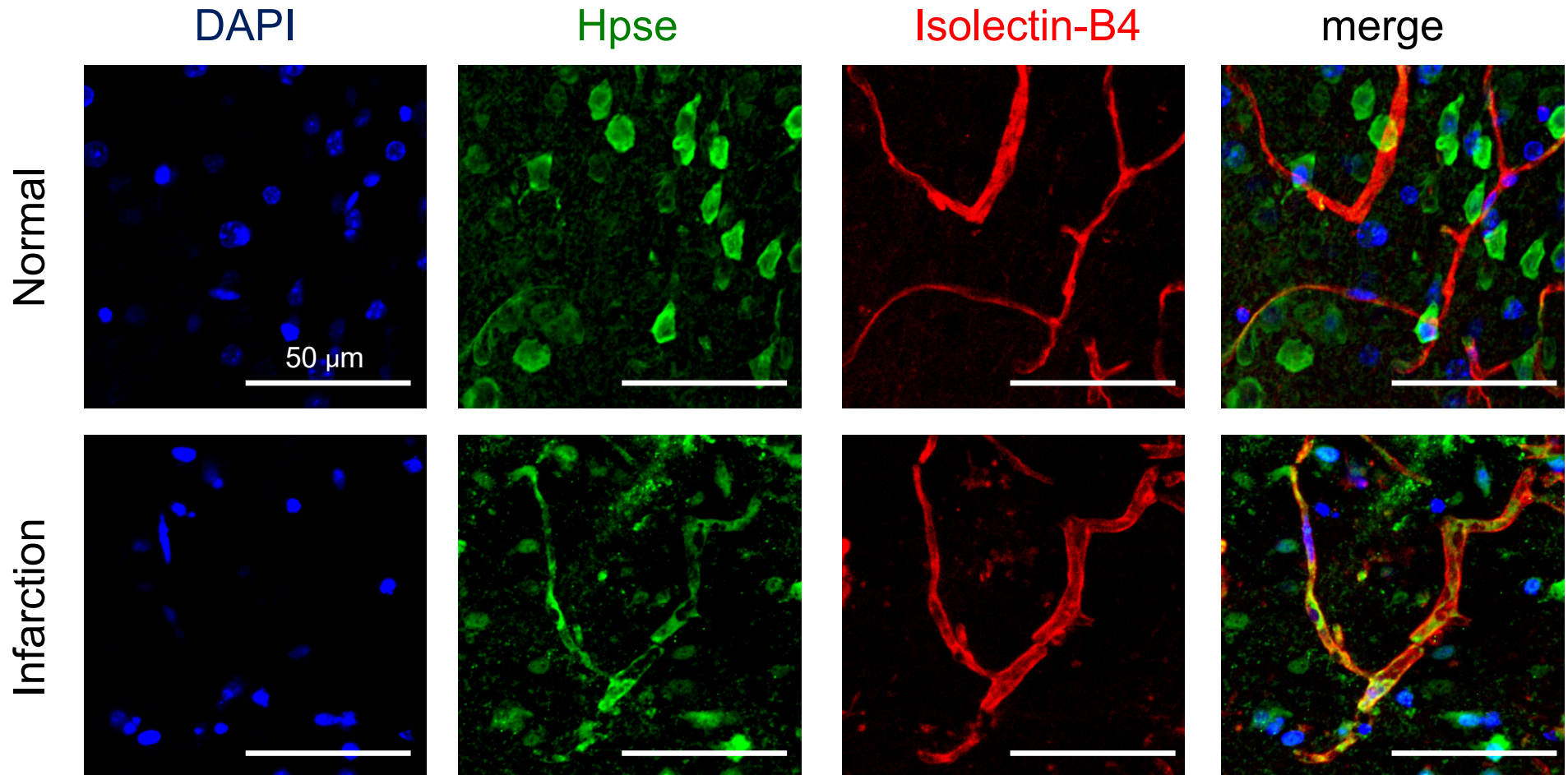
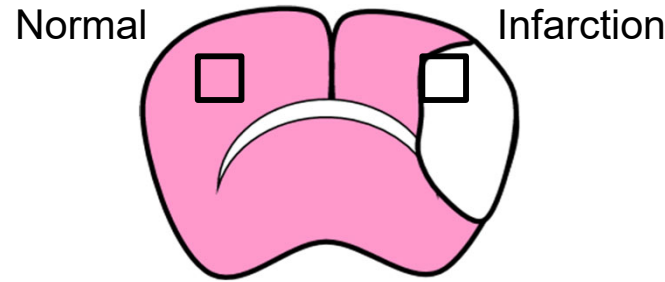
Photochemically induced thrombosis (PIT)法で作製



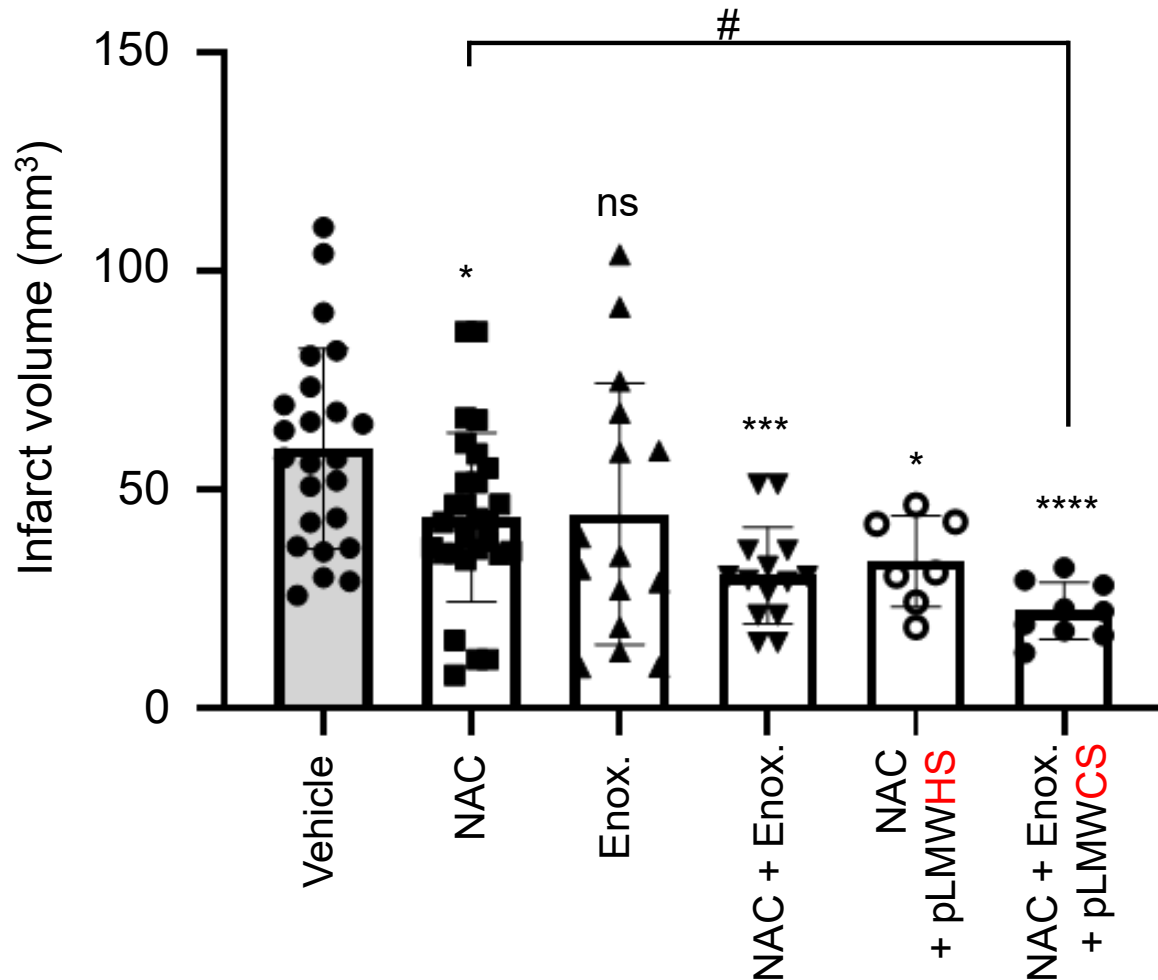
脳梗塞はHYAL1の発現増加とHPSE活性を誘導する



脳梗塞は脳毛細血管におけるHPSEの発現を亢進する



低分子GAGはNACとの併用で相加的に脳梗塞体積を減少させる



NAC: N-アセチルシステイン

Enox.: エノキサパリン

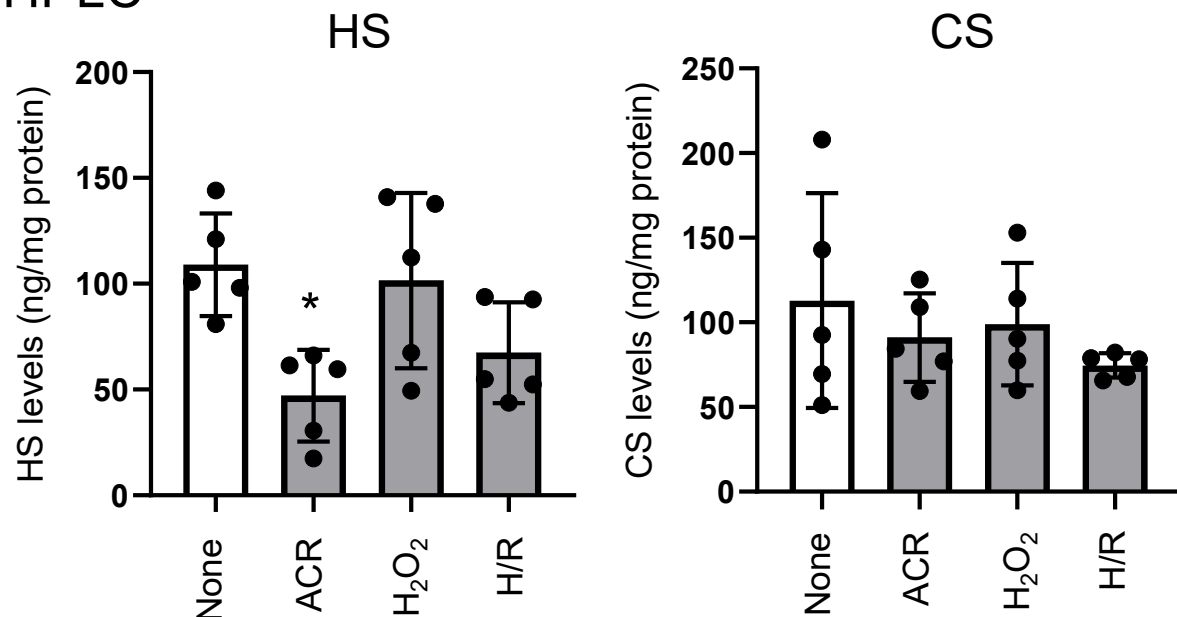
pLMWHS: 光分解で調製した
低分子ヘパラン硫酸

pLMWCS: 光分解で調製した
低分子コンドロイチン硫酸

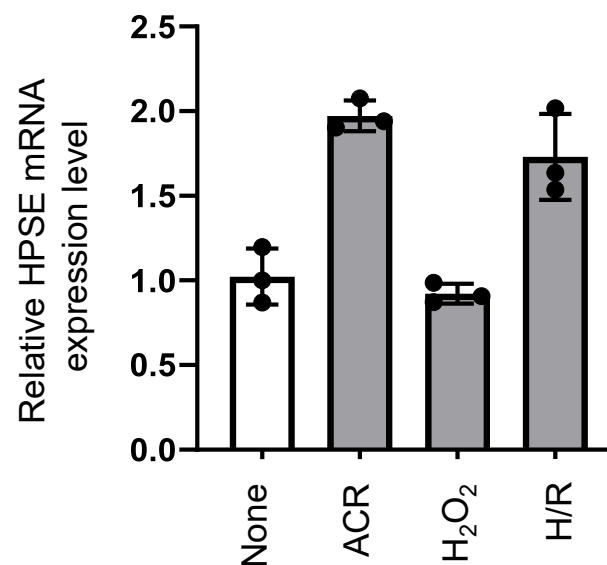
→ 血管内腔の糖衣分解は、炎症増悪に関与することが示唆された。

ヒト脳毛細血管内皮細胞のGAGに対する酸化ストレスの効果

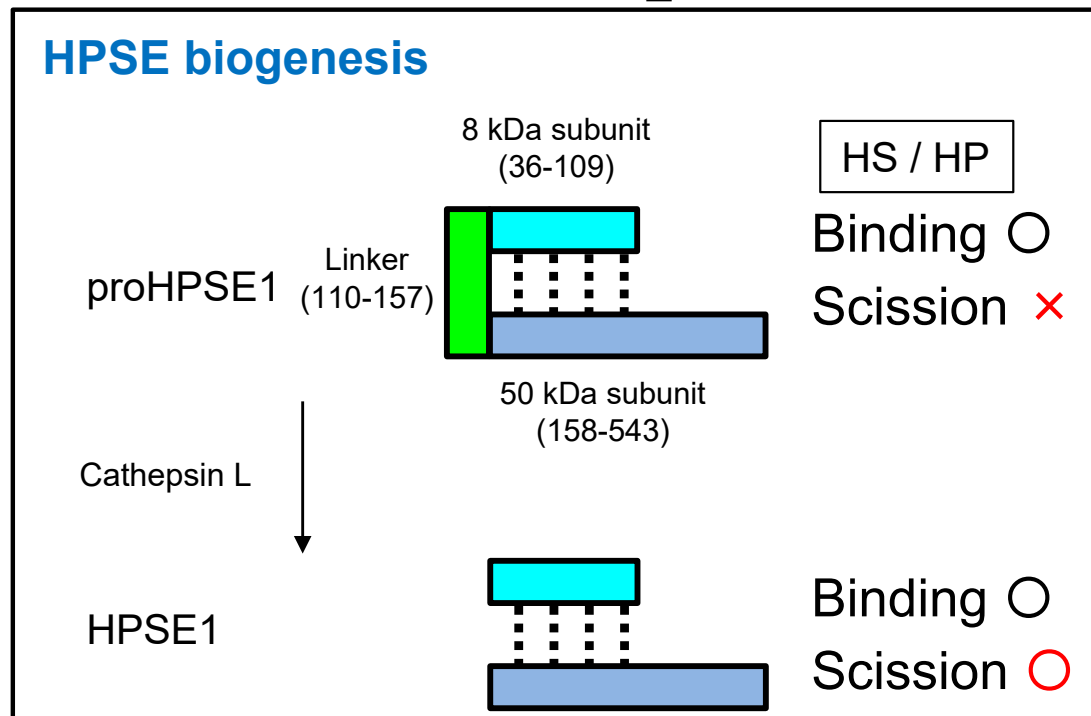
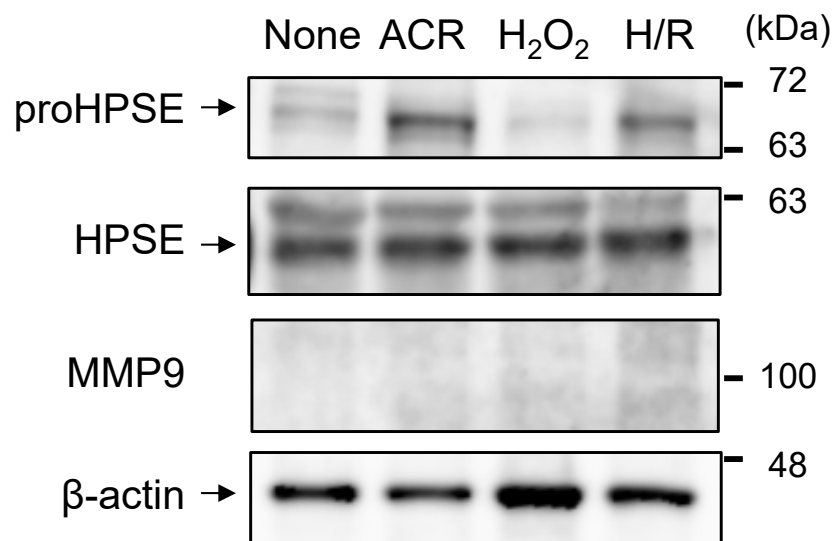
A. HPLC



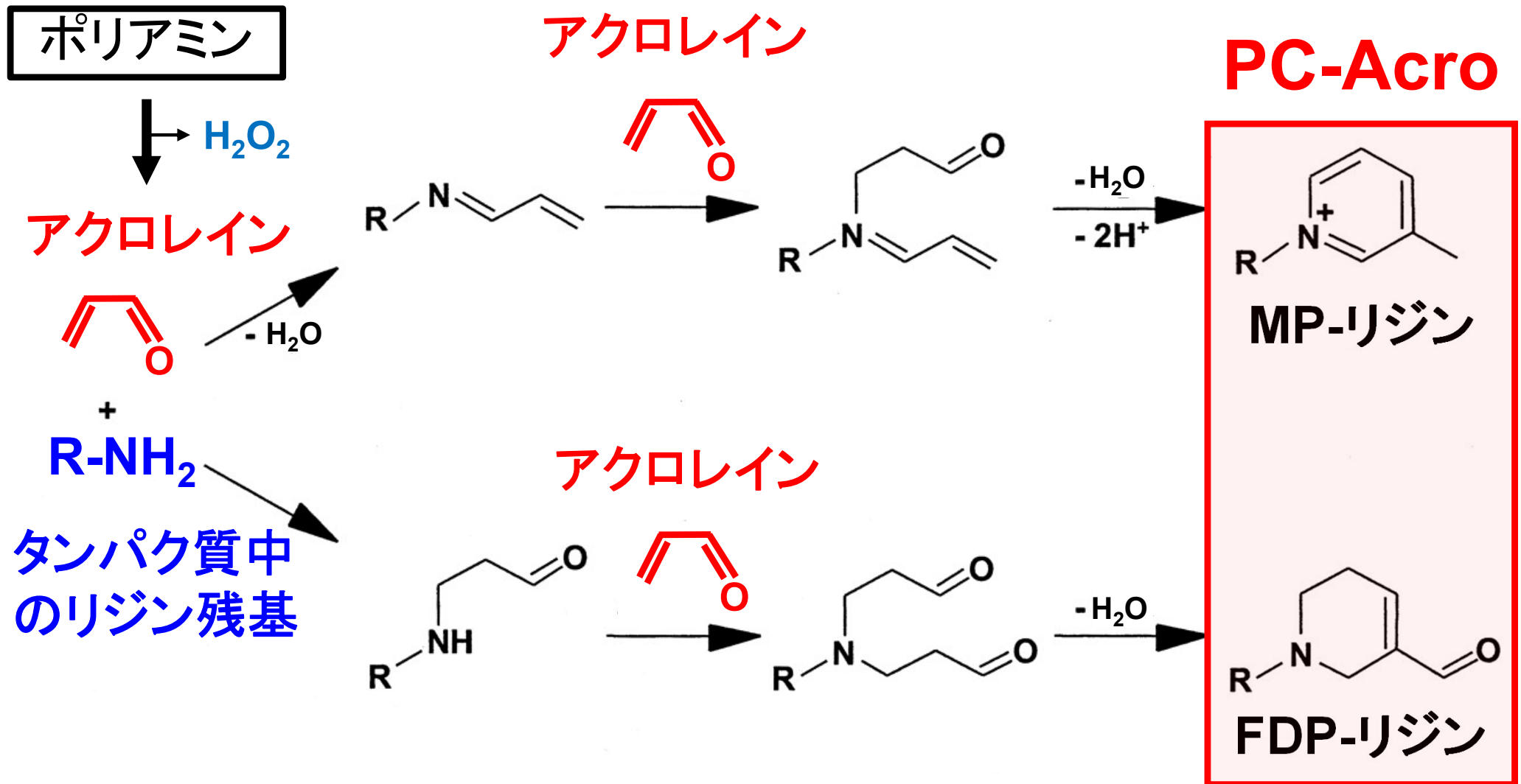
B. mRNA



C. WB



タンパク質抱合型アクロレイン(PC-Acro)の形成



MP-リジン : N^ϵ -(3-methylpyridinium)-リジン

FDP-リジン : N^ϵ -(3-formyl-3,4-dehydropiperidino)-リジン

HPSE活性に対するアクロレインの効果

A

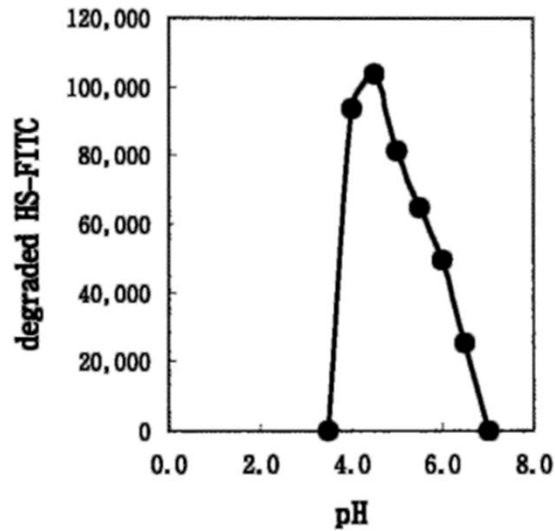
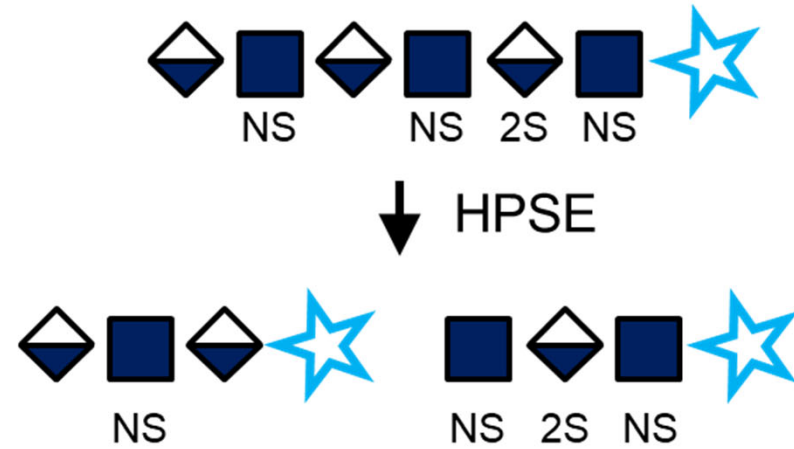


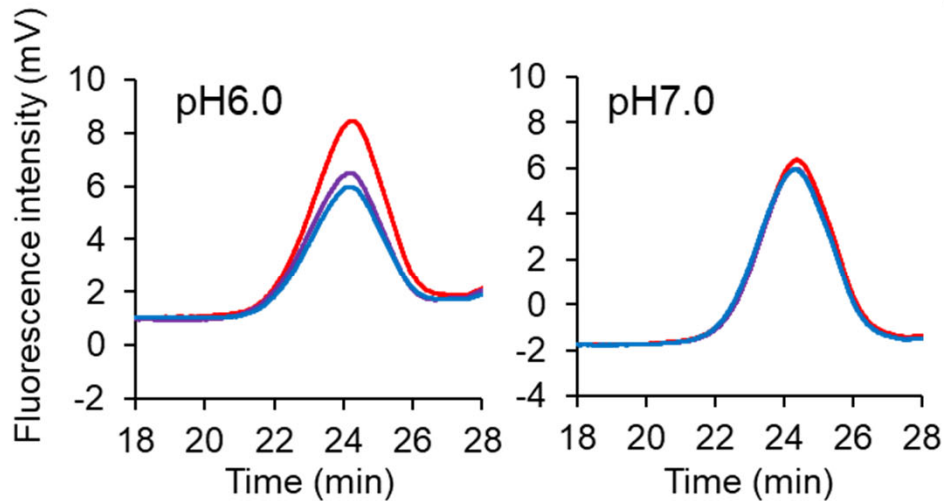
FIG. 3. pH dependence of heparanase activity. Heparanase activity toward FITC-HS was analyzed by gel permeation chromatography at various pH values.

Toyoshima and Nakajima, *J. Biol. Chem.* 1999;274:24153-2460

B

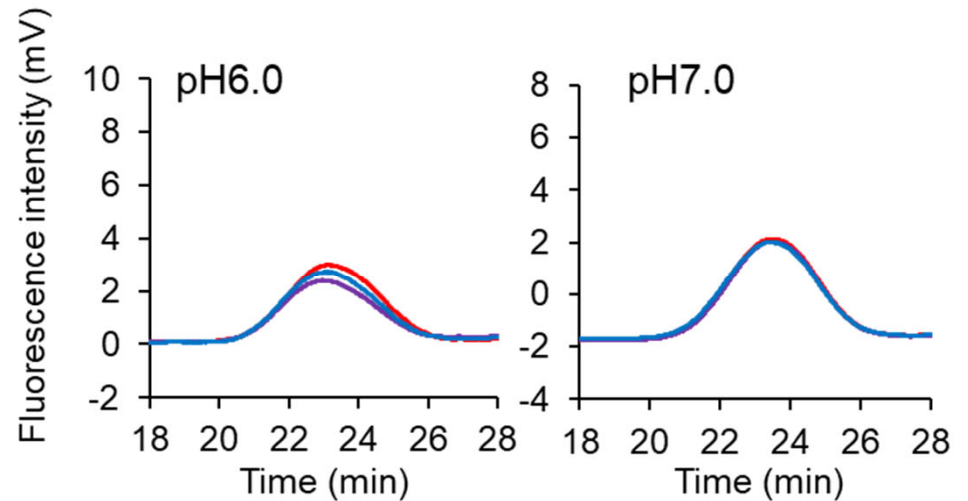


C



— cell lysate (2.5 μ g) — + ACR (100 μ M) — + ACR (500 μ M)

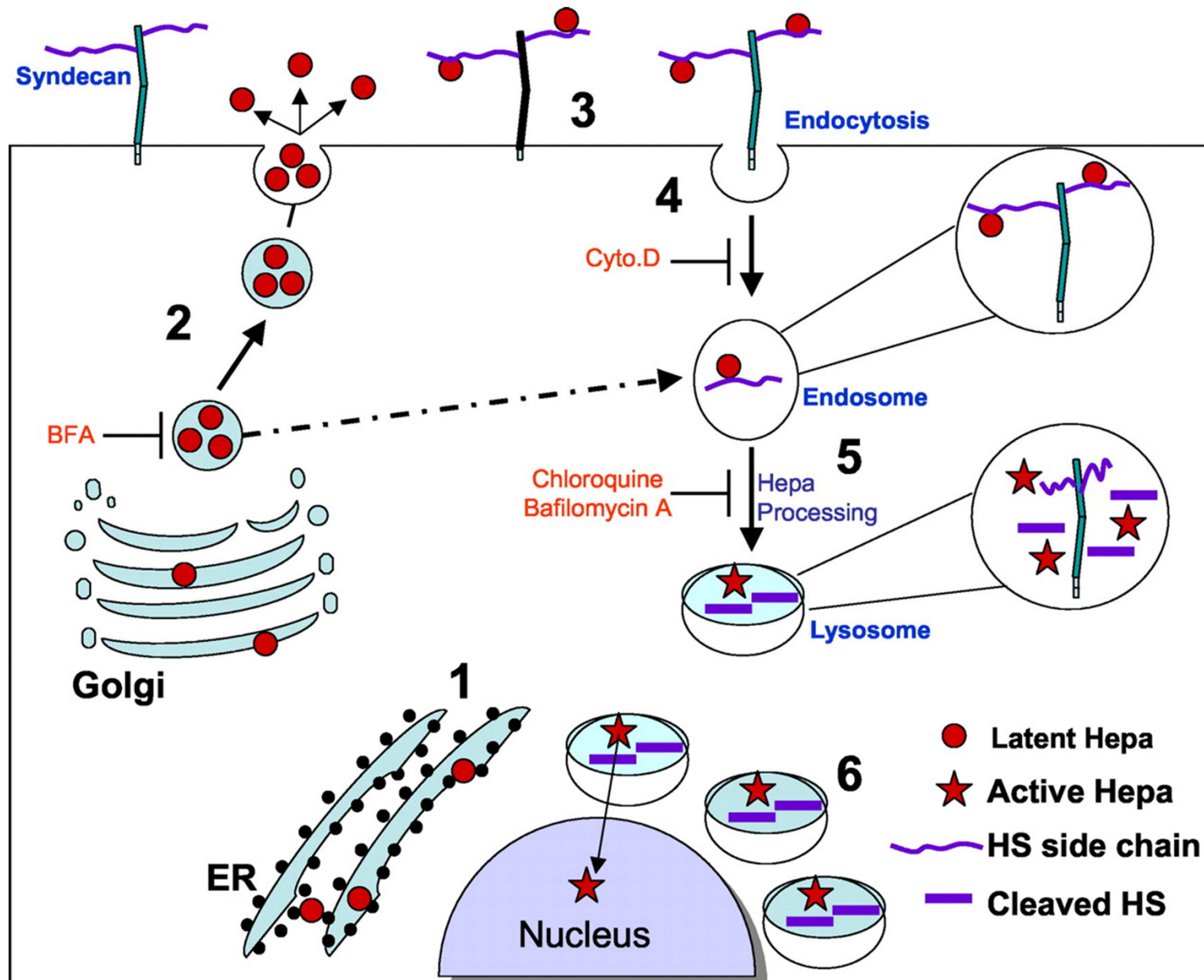
D



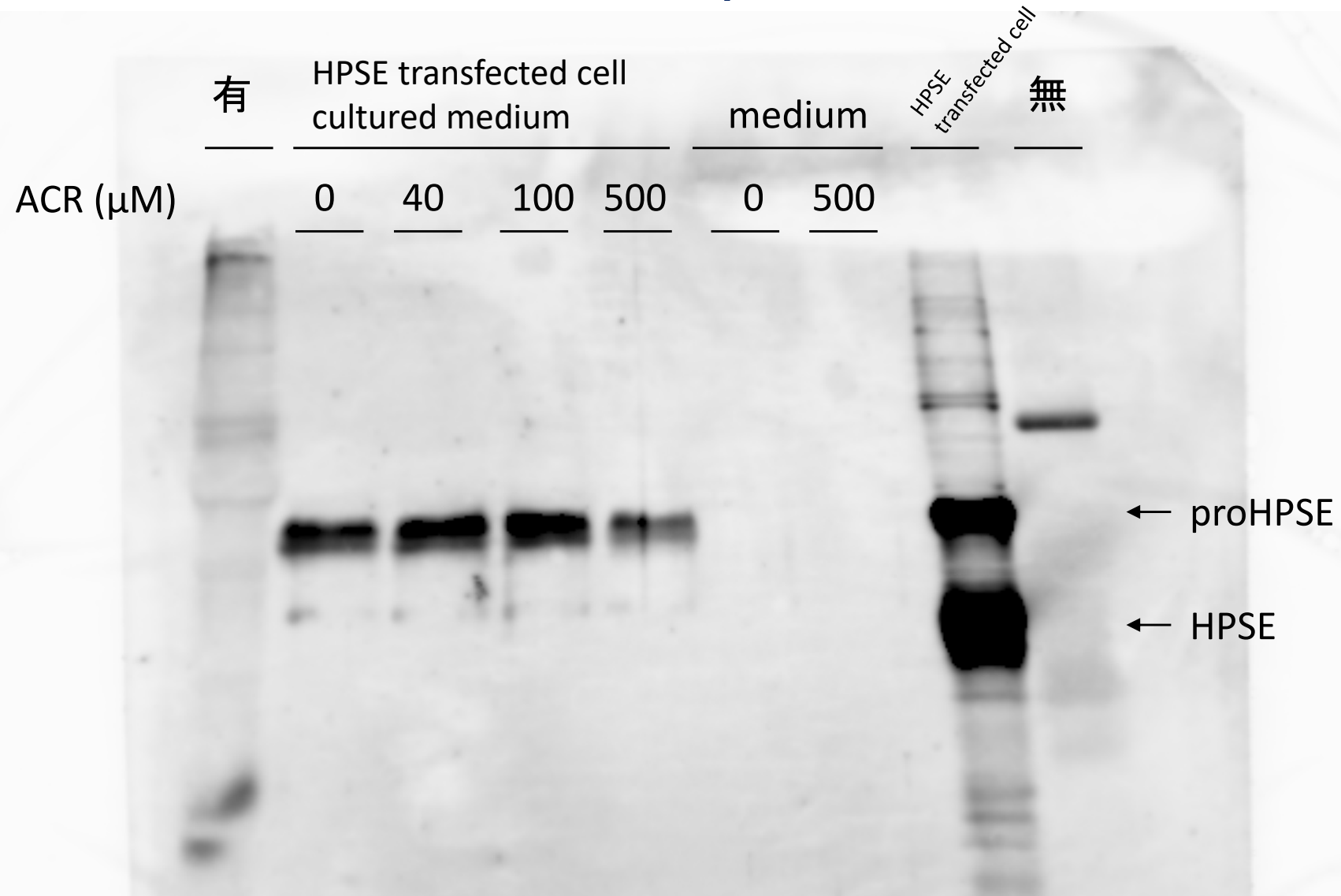
— cell lysate (2.5 μ g) — + H₂O₂ (100 μ M) — + H₂O₂ (500 μ M)

Ko et al., *J. Biol. Chem.*, 2020

ヘパラーゼの細胞内局在とプロセッシング



培地にヘパリンを添加するとproHPSEのみ回収できる



HEK293細胞に
HPSE1 cDNA → **ヘパリン**添加 → 培養液回収 → アクロレイン添加
を形質導入

アクロレインはproHPSE の糖鎖切断活性を増加させる

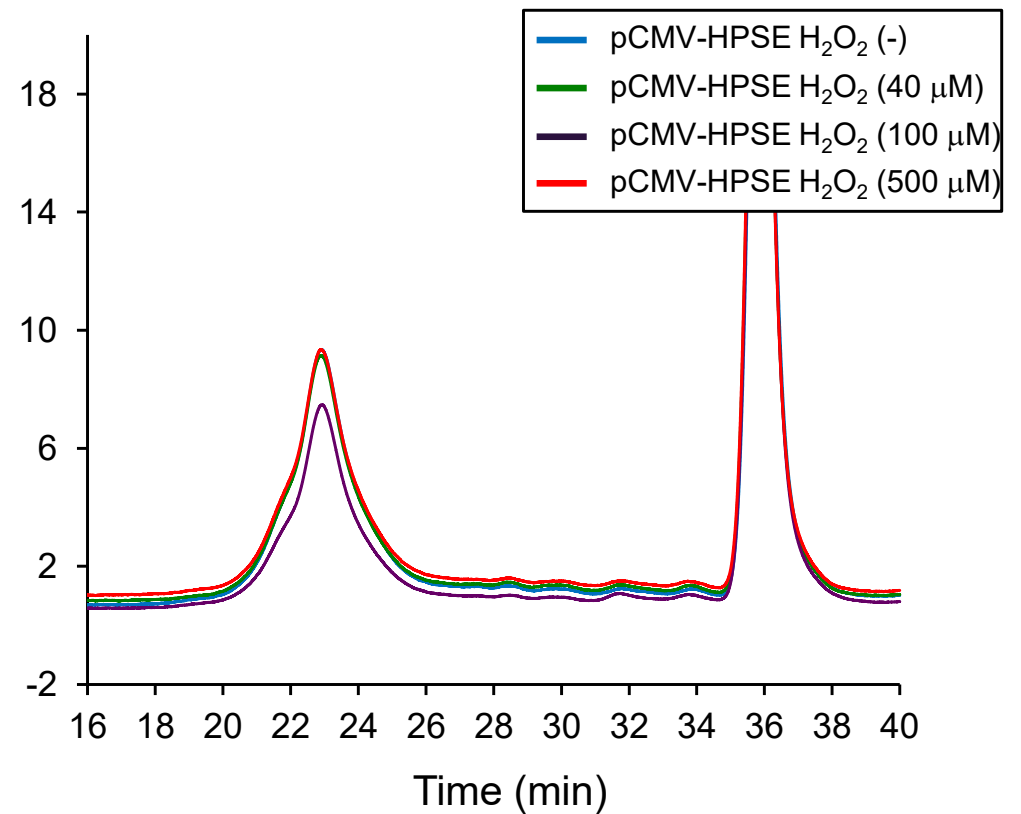
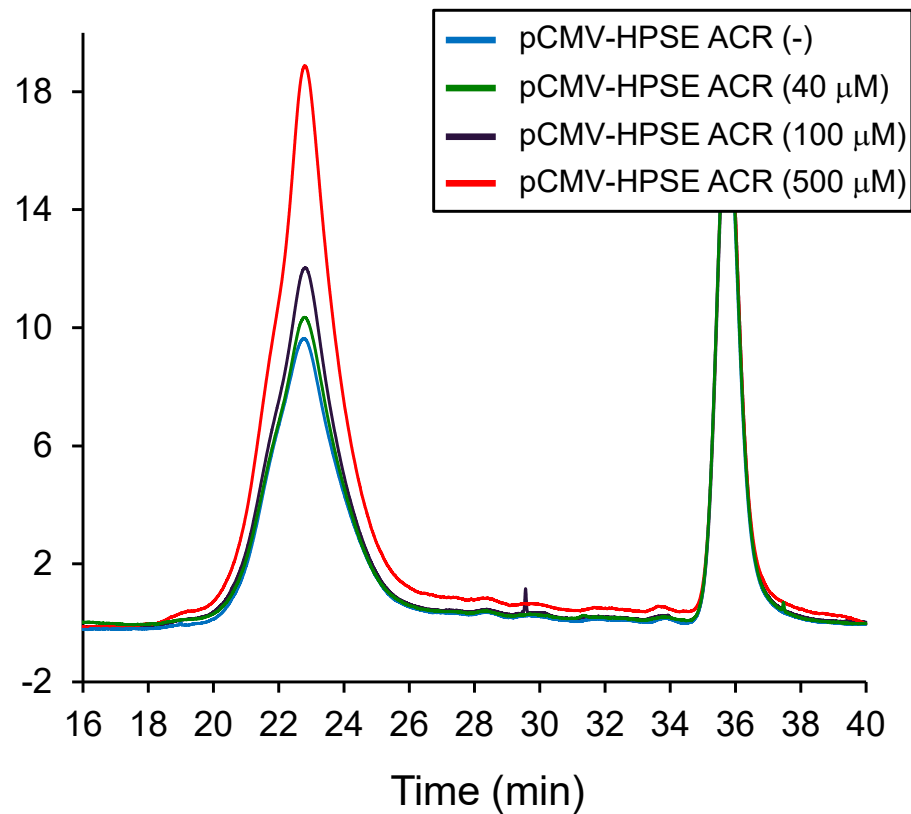
HEK293細胞に
HPSE1 cDNAを
形質導入

培養液中に
ヘパリン添加

培養液回収

proHPSE1を含
む培養液にア
クロレイン添
加

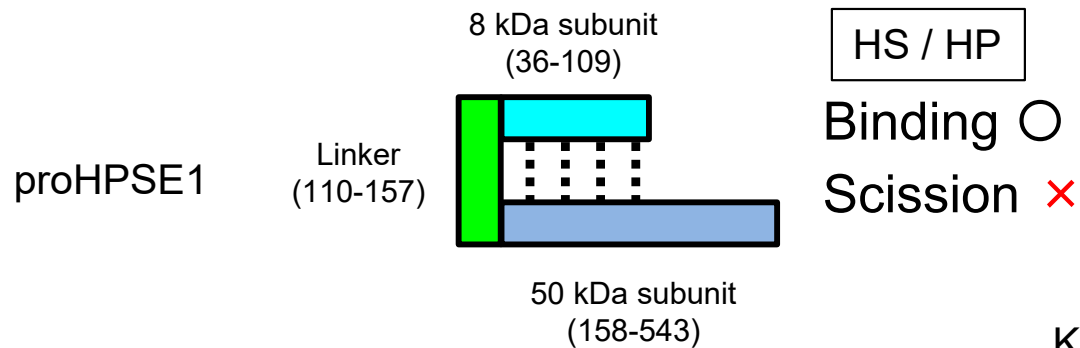
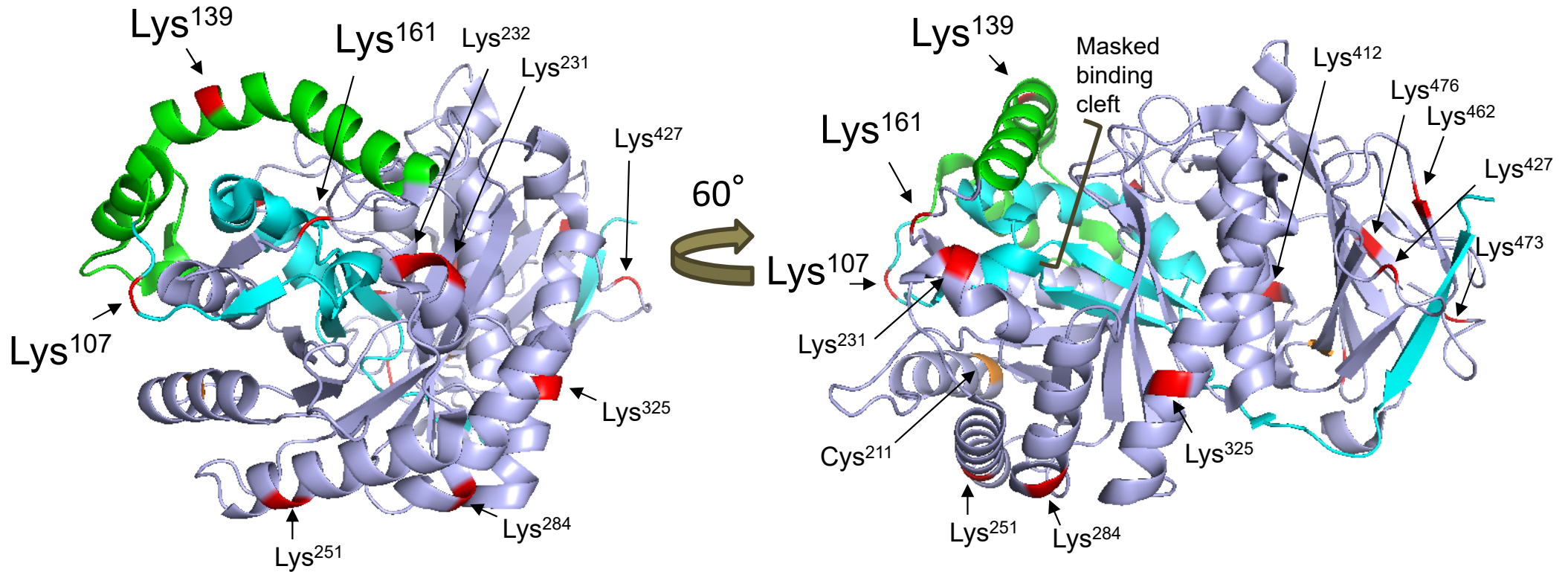
糖鎖抽出 +
ポストカラム
HPLC



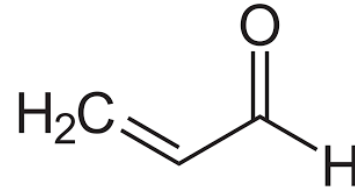
proHPSE におけるアクロレインの結合部位

HPSEの結晶構造 Wu *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2015, **22**, 1016-1022

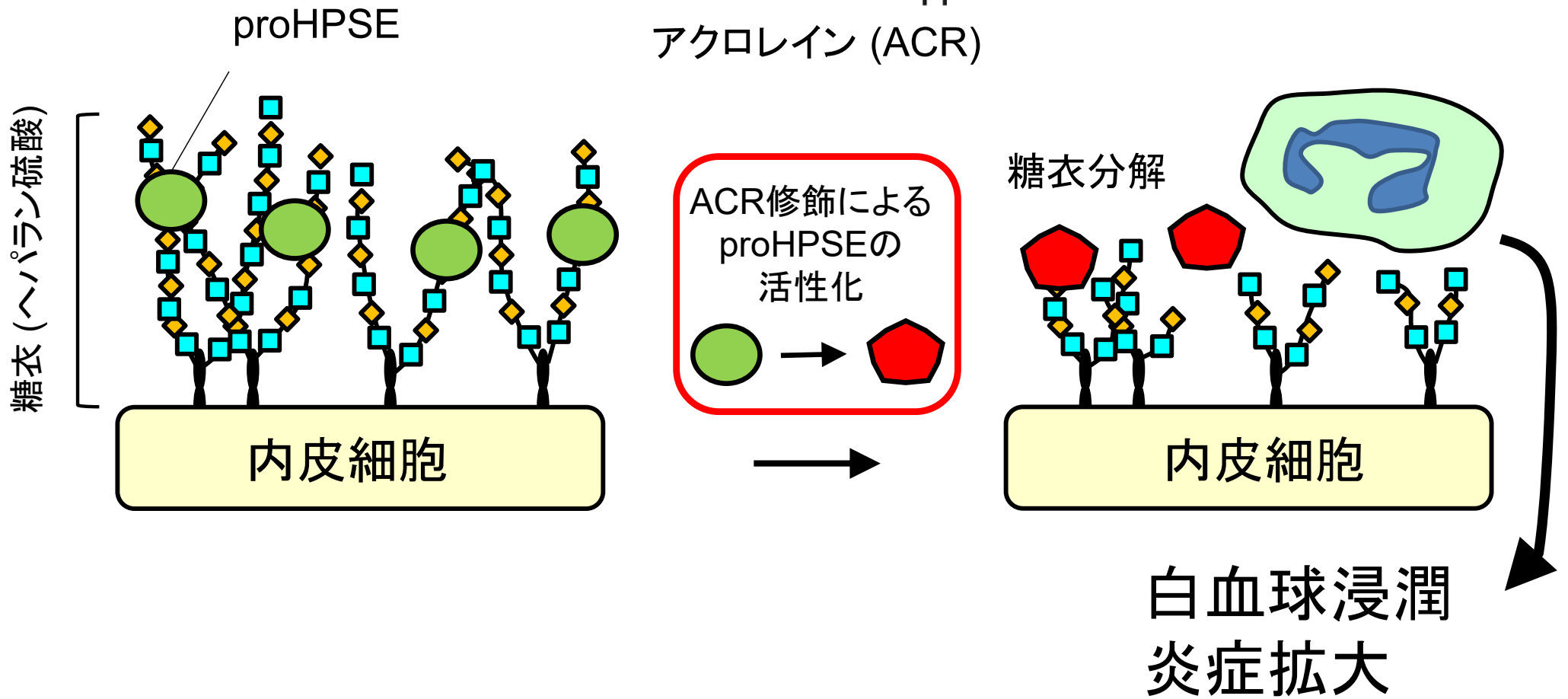
proHPSEの結晶構造 Wu *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2017, **13**, 867-873



脳梗塞により産生されたアクロレインは proHPSEの活性を亢進する



アクロレイン (ACR)



まとめ

- 脳梗塞巣のHSやCSは、HPSEやHYAL1の発現増加に伴って分解されることが明らかとなった。
- 梗塞巣でのHSやCSの分解は、炎症増悪と密接に関与していることが明らかになった。
- アクロレイン修飾を受けたproHPSEは、中性条件下でも糖鎖切断活性を示すことが示唆された。