

# 学位論文の要約

氏名

新地 浩之

学位論文題目

糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子を活用した糖鎖機能解析及び  
検査診断ツールに関する研究

## 第1章 序論

### (1.1) 蛍光性ナノ粒子

蛍光性ナノ粒子は、直径数 nmの微粒子で、特定の励起光照射下で強い蛍光を発する光学ナノ材料である<sup>1</sup>。従来、蛍光イメージングやバイオセンサーなどの材料として用いられてきた有機蛍光色素分子は、光安定性が低く、蛍光測定中の退色や局所領域に集積した場合の自己消光などが起こるため、これらを利用した長時間の蛍光観察やバイオセンサーへの利用には大きな制限があった。一方、蛍光性ナノ粒子は、光退色が起こりにくく、これまで困難であった長時間の蛍光観察が可能である。また、核酸やタンパク質などの様々な生体関連分子を修飾できるため、これらを活用した蛍光イメージング技術やバイオセンサーなどの開発が期待されている。

蛍光性ナノ粒子の中でも、半導体ナノ粒子は、他の蛍光性ナノ粒子と比べて特に粒径が小さく、球状タンパク質と同程度の大きさの蛍光性ナノ粒子である<sup>2</sup>。半導体ナノ粒子は、他の蛍光性ナノ粒子とは異なり、単一の励起光で異なる波長の蛍光を同時に観察できるため、細胞や生体の蛍光イメージングにおいて多くの情報を一度に得られるという利点がある。また、蛍光性シリカナノ粒子や蛍光性ポリマーナノ粒子などは、粒径の制御が難しく、修飾する化合物の構造や密度の制御も難しいが、半導体ナノ粒子は、チオール基やヒスチジン基などがナノ粒子表面の金属と強く結合する性質を有しており、ナノ粒子の親水化や表面修飾において、これらの官能基を有するリンカーを用いることで粒径の増大を伴わずに修飾する分子の密度や構造を制御することができる。このような特徴を活かして、近年では、癌などの様々な疾病に関連する分子マーカーの探索や高感度バイオセンサー、疾患診断薬などへの応用が検討されており、半導体ナノ粒子の実用化に向けた研究が活発に行われている (図1-1)<sup>3-5</sup>。

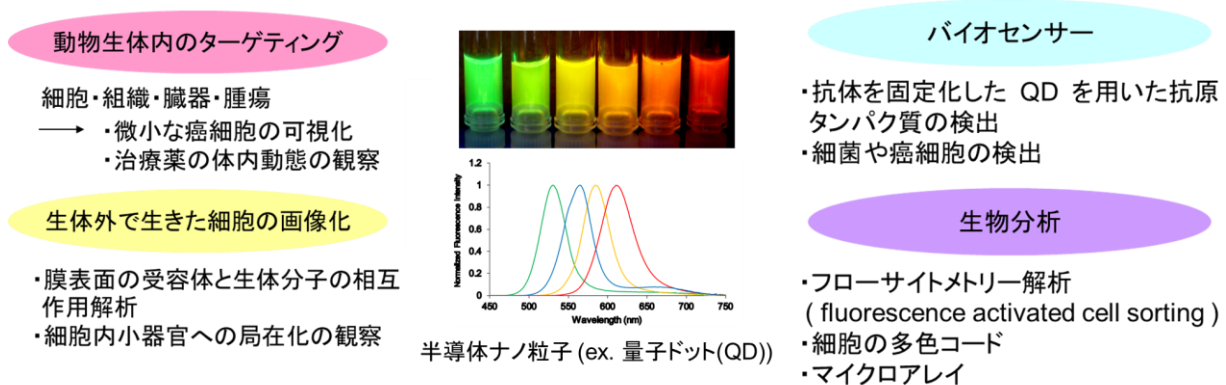


図1-1 半導体ナノ粒子を利用した応用展開

## (1.2) 糖鎖の働き

糖鎖は、ほぼ全ての細胞に存在する生体分子であり、糖タンパク質や糖脂質、プロテオグリカンなどの形で存在する(図1-2)。細胞表層に存在する糖鎖は、特定のタンパク質や糖鎖との相互作用を介して、細胞の分化や増殖、細胞間接着、シグナル伝達などの様々な生命現象に関与する。細胞内においても、糖鎖が糖タンパク質輸送における「タグ」として働くことで、タンパク質のフォールディングや輸送・選別などに関与することが知られている<sup>6,9</sup>。また、細胞表層の糖鎖の構造や発現量は、細胞の種類や分化過程などに応じて動的に変化することも報告されており、糖鎖を疾患のバイオマーカーに利用する研究が活発に行われている<sup>9-12</sup>。

一方、細胞表層の糖鎖や糖鎖受容体は、生理機能だけでなく、細菌やウイルスの感染にも大きく関与することが明らかにされている。細菌やウイルスは、感染を開始する際に、宿主細胞表層の特定の糖鎖に結合したり、細菌やウイルス表層の糖鎖が宿主細胞の糖鎖受容体に結合したりすることで感染を開始する<sup>13</sup>。また、細菌やウイルスが持つ糖鎖が生体内に存在する糖鎖と分子相同性がある場合、自己抗体が生じることがあり、ギラン・バレー症候群などの自己免疫疾患を引き起こすことがあることも報告されている<sup>14</sup>。このような知見から、細菌やウイルスの感染経路の詳細な解析は、画期的な創薬・治療・防疫基盤の開発に繋がると期待されており、近年活発な研究が行われている。

上述のように、糖鎖の構造に由来する生物学的な情報には非常に大きな多様性があり、核酸、タンパク質に次ぐ第3のバイオマーカーとして、近年、大きな注目を集めている。しかし、糖鎖の構造や結合様式は、核酸やタンパク質に比べて非常に複雑な構造であり、また、遺伝情報から糖鎖構造を予想することも困難なため、生体機能に直結した分子構造を特定することは非常に難しい。そのため、核酸やタンパク質に比べて研究が遅れており、未だに解明されていない現象も多く残されている。

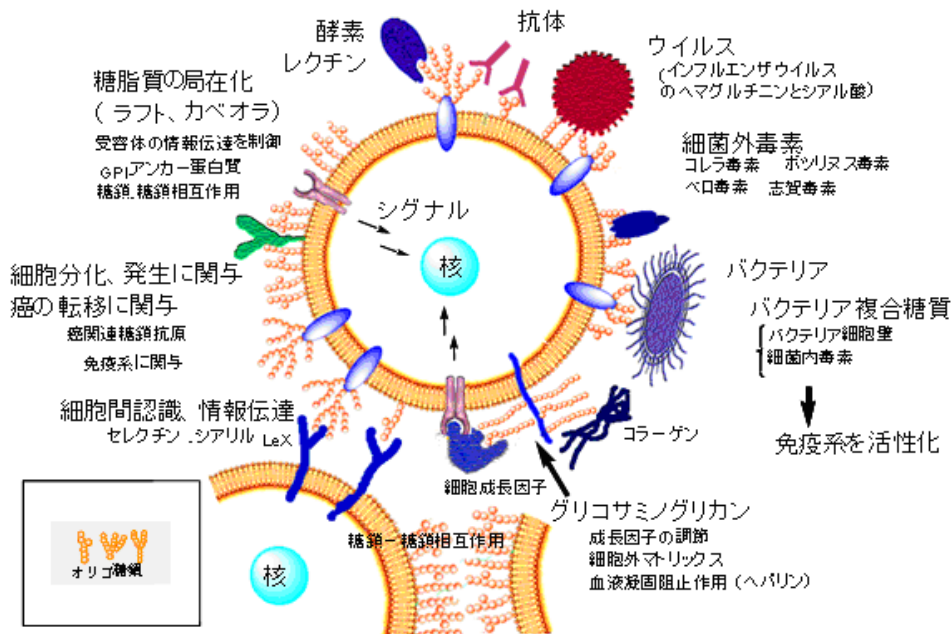


図1-2 細胞表層に発現する糖鎖の役割

## (1.3) 糖鎖機能の解析手法

糖鎖の構造や機能解析の手法として、これまでに様々な解析手法が開発されている。糖鎖の構造解析においては、核磁気共鳴(NMR)法や質量分析(MS)法などが、タンパク質や細胞表層

の糖鎖の発現パターンの解析に関しては、MS法に加え、レクチンアレイ法<sup>15</sup>などが開発され、糖鎖の生理的意義の解明や疾患特異的な糖鎖発現パターンの解析が活発に行われている。また、糖鎖と糖鎖結合性分子との相互作用解析においては、糖鎖マイクロアレイ法<sup>16-19</sup>や水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法<sup>20</sup>、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法<sup>21</sup>などが開発されており、糖鎖結合性タンパク質であるレクチンや毒素などとの分子レベルでの相互作用解析が行われている。一方で、糖鎖と糖鎖結合性分子との相互作用においては、複数の糖鎖が集合化されることで親和性が増強される糖鎖クラスター効果の発揮が重要であるが<sup>22,23</sup>、上述の解析手法では糖鎖の集合化度に関する情報を得ることが難しい。解析に用いる機器類も高価で熟練した技術を必要とするため、利用範囲が限定されており、簡便に分子レベルでの機能解析が行える新たなツールの開発が望まれている。

#### (1.4) これまでの研究成果

当研究室では、糖鎖と糖鎖結合性タンパク質との相互作用解析ツールとして、シュガーチップ<sup>24</sup>や糖鎖固定化金ナノ粒子 (SGNP : Sugar chain-Immobilized Gold Nanoparticles)<sup>25</sup>、糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子 (SFNP : Sugar-chain Immobilized Fluorescence Nanoparticle)<sup>26</sup>を開発しており、これらの解析ツールを応用した簡便な機能解析手法や検査診断法の実用化に向けた応用研究を行っている (図1-3)。

シュガーチップは、チオール基を有する糖鎖リガンド複合体を用いて、最大96種類の糖鎖を固定可能な金チップである。表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置を用いることで、糖鎖-タンパク質間の相互作用を無標識かつリアルタイムにハイスループットの解析を行うことができ、疾患関連タンパク質やウイルスなどに結合する糖鎖の網羅的な解析に利用されている。一方、SGNPは、金ナノ粒子表面に糖鎖リガンド複合体を固定化したナノ粒子であり、レクチンなどの糖鎖結合性タンパク質と混合することで、溶液の色調変化や凝集反応などが起こり、目視で簡便に結合活性評価を行うことができる。また、ウイルスに選択的に結合する糖鎖を固定化したSGNPによるウイルス濃縮法を確立しており、ウイルスの超高感度検出法の実用化に向けた研究が進められている<sup>27</sup>。SGNPと類似した性質を有するSFNPは、蛍光性ナノ粒子である半導体ナノ粒子表面に糖鎖を固定化したナノ粒子である。紫外光照射下で強い蛍光を発するため、有機蛍光色素分子では困難であった細胞表層の糖鎖結合性解析への利用など、イメージングツールとしての応用が期待されている。また、SGNPと同様に、糖鎖結合性タンパク質と凝集する性質を有しており、SGNPより高感度の相互作用解析や疾患関連分子の目視検出ができると期待されている。

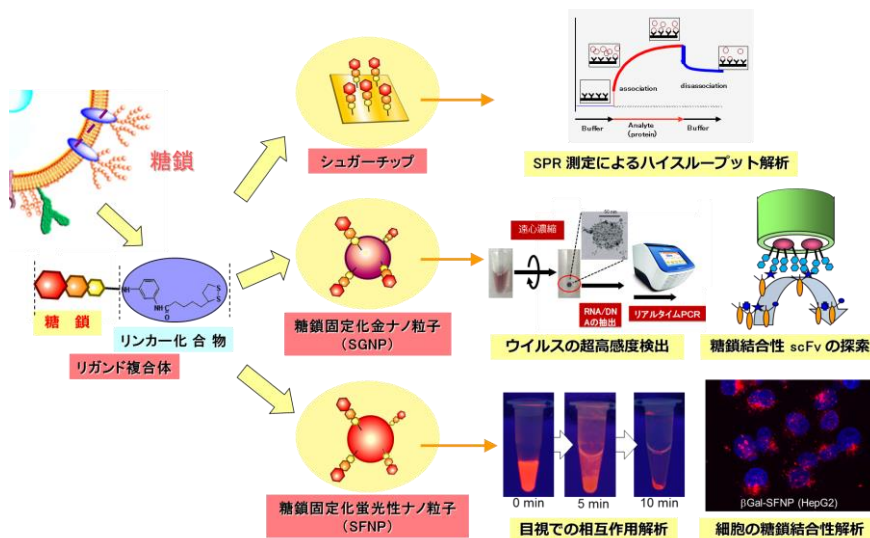


図1-3. これまでの当研究室の研究成果

### (1.5) 本研究の概略

上述のように、これまでに様々な糖鎖機能の解析手法が開発され、生命活動に重要な糖鎖の生理機能や糖鎖が関与する疾患関連分子などが数多く見出されている。しかしながら、これらの手法は、高価な機器と熟練した技術を要するため、簡便な機能解析や臨床応用可能な検査診断ツールの実用化は未だ発展途上である。そこで、本研究では、様々な糖鎖結合性タンパク質との相互作用解析や細胞イメージングなどが可能な糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子 (SFNP)<sup>26</sup>を用いて、簡便で汎用性の高い糖鎖機能解析ツールや検査診断ツールとしての実用化を目指したSFNPの応用について取り組んだ。

まず、簡便なガングリオシドの機能解析ツールへの応用を目指したSFNPとガングリオシド糖鎖結合性タンパク質との相互作用解析について検討した。糖脂質の一種であるガングリオシドの機能発現においては、細胞表層のガングリオシドの集合化による脂質ドメイン構造の形成 (ラフトの形成) が重要だと考えられているが、これまでに開発されている解析手法では、ガングリオシドの集合化度を簡便に評価することが難しい。そのため、これらを簡便に解析できる新たな解析ツールの開発が求められている。そこで、糖鎖構造や糖鎖密度の制御が可能なSFNPに着目し、糖鎖成分にガングリオシド糖鎖を固定化したSFNPを用いたガングリオシド結合性タンパク質との相互作用解析を行い、これらのタンパク質がどのような集合体と優位に相互作用するか検討した。

次に、SFNPの検査診断ツールへの応用を目指した免疫性末梢神経疾患簡易診断法の開発について検討した。免疫性末梢神経疾患の一種であるギラン・バレー症候群 (GBS) やフィッシャー症候群 (FS) は、急速な手足の運動麻痺を示す神経・筋疾患であり、臨床現場ではしばしば脳卒中と誤診される。これらの疾患において、血清中に存在する抗ガングリオシド抗体を、ELISA法を用いて検出することが補助診断として有効であるが、検査会社に検査を依頼した場合、結果の受領までに1週間以上かかることから、新たな迅速簡便な検査診断法の開発が求められている。そこで、SFNPが糖鎖結合性タンパク質と凝集する性質に着目し、ガングリオシド糖鎖を固定化したSFNPを用いた抗ガングリオシド抗体の検出について検討した。

続いて、ZnS-AgInS<sub>2</sub>/ZnSナノ粒子をコアに持つ低毒性SFNPの調製と機能解析および検査診断ツールへの応用について検討した。これまでに開発されたSFNPは、コア成分に細胞毒性の高いカドミウムを含むQDを使用しており、検査診断ツールやイメージングツールへの実用化に向けて、生体毒性や環境負荷の低減が大きな課題となっている。そこで、SFNPのコア成分にカドミウムを含まないZnS-AgInS<sub>2</sub>/ZnS ナノ粒子 (ZAIS/ZnS NP) を用いた低毒性SFNPの調製と、これを用いた免疫性末梢神経疾患簡易診断法への応用について検討した。

### 参考文献

- (1) Yao, J., Yang, M., and Duan, Y., Chemistry, Biology, and Medicine of Fluorescent Nanomaterials and Related Systems: New Insights into Biosensing, Bioimaging, Genomics, Diagnostics, and Therapy. *Chem. Rev.* **114**, 6130-6178 (2014).
- (2) Alivisatos, A. P., Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots *Science*, **16**, 933-937 (1996).
- (3) Michalet, X., *et al.*, Quantum dots for live cells, in vivo imaging and diagnostics. *Science* **307**(5709), 538-544 (2005).
- (4) Medintz, I. L. Uyeda, H.T., Goldman, E. R. and Mattoussi, H., Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mat.* **4** (6), 435-446 (2005).
- (5) Costas-Mora, I., Romero, V., Lavilla, I. and Bendicho, C., An overview of recent advances in the application of quantum dots as luminescent probes to inorganic-trace analysis. *Trends Anal. Chem.*, **57**, 64-72 (2014).
- (6) Varki, A., Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130 (1993).

- (7) Opendakker, G., Rudd, P. M., Ponting, C. P. and Dwek, R. A., Concepts and principles of Glycobiology. *FASEB J.* **7**, 1330-1337 (1993).
- (8) Kamiya, Y., Satoh, T. and Kato, K., Molecular and structural basis for N-glycan dependent determination of glycoprotein fates in cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1820** (9), 1327-1337 (2012).
- (9) Yamamoto, K., Intracellular lectins are involved in quality control of glycoproteins. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* **90** (2), 67-82 (2014).
- (10) Dude, D. H. and Bertozzi, C. R., Glycans in cancer and inflammation -potential for therapeutics and diagnostics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4** (6) 477-488 (2005).
- (11) Narimatsu, H. *et al.* A strategy for discovery of cancer glyco-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics. *FEBS J.* **277** (1) 95-105 (2010).
- (12) Kuno, A. *et al.*, A serum “sweet-doughnut” protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Scientific Reports* **3**, 1065.
- (13) Imberty, A. and Varrot, A., Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18** (5) 567-576 (2008).
- (14) Yuki, N. *et al.* A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J. Exp. Med.* **178**, 771-775 (1993).
- (15) Kuno, A., *et al.* Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. *Nat. Methods* **2** (11), 851-856 (2005).
- (16) Park, S. and Shin, I., Fabrication of carbohydrate chips for studying protein-carbohydrate interactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **41**, 3180-3182. (2002)
- (17) Wang, D., Liu, S., Trummer, B. J., Deng, C. and Wang, A., Carbohydrate microarrays for the recognition of cross-reactive molecular markers of microbes and host cells. *Nat. Biotechn.* **20**, 275-281 (2002).
- (18) Fukui, S., Feizi, T., Galustian, C., Lawson, A. M. and Chai, W., Oligosaccharide microarrays for high-throughput detection and specificity assignments of carbohydrate-protein interactions. *Nat. Biotechn.* **20**, 1011-1017 (2002).
- (19) Oyelaran, O. and Glidersleeve, J. C., Glycan arrays: recent advances and future challenges. *Curr. Op. Chem. Biol.* **13**, 406-413 (2009).
- (20) Pribyl, J., Skladal, P., Quartz crystal biosensor for detection of sugars and glycated hemoglobin. *Anal. Chim. Acta* **530**, 75-83 (2005).
- (21) Mann, D. A., Kanai, M., Maly, D. J. and Kiessling, L. L., Probing low affinity and multivalent interactions with surface plasmon resonance: ligands for concanavalin A. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 10575-10582 (1998).
- (22) Weigel, P. H. *et al.*, Adhesion of hepatocytes to immobilized sugars. A threshold phenomenon. *J. Biol. Chem.* **254**, 10830-10838 (1979).
- (23) Lundquist, J.J. & Toone, E.J., The Cluster Glycoside Effect., *Chem. Rev.* **102**, 555-578 (2002).
- (24) Suda, Y., *et al.* Immobilization and Clustering of Structurally Defined Oligosaccharides for Sugar Chips: An Improved Method for Surface Plasmon Resonance Analysis of Protein–Carbohydrate Interactions. *Bioconjugate Chem.* **17**, 1125-1135 (2006).
- (25) Nakamura-Tsuruta, S., Kishimoto, Y., Nishimura, T., and Suda, Y. One-Step Purification of Lectins from Banana Pulp Using Sugar-Immobilized Gold Nano-Particles. *J. Biochem.* **143**, 833-839 (2008).
- (26) Shinchi, H., *et al.*, Stable sugar-chain immobilized fluorescent nano-particle for probing lectin and cells. *Chem.-Asian J.* **7**, 2678-2682 (2012).
- (27) Zhang, X., *et al.*, Super high sensitive detection of viruses using sugar-chain nano-particles (SGNP). *Polymer preprints.* **53**, 671-672 (2012).



## 第2章 ガングリオシド結合性タンパク質の相互作用解析

### (2.1) 研究背景

ガングリオシドはスフィンゴ糖脂質に分類される糖脂質で、脳組織や神経組織に分布し、様々な生体機能や疾患に関与している<sup>1</sup>。生体内には30種類以上のガングリオシドが存在しており、部位特異的に異なるガングリオシドが発現することで、細胞間認識やシグナル伝達、免疫反応などの生体機能の調節や神経形成や発達などの生命活動に重要な役割を担っている(図2-1)<sup>2-6</sup>。また、ガングリオシドは生体機能の調節だけでなく、細菌類の感染や毒性物質などの受容体として働くことも明らかにされており、疾患に関連するガングリオシド結合性タンパク質分子などの分子レベルでの相互作用解析が近年注目されている<sup>7-10</sup>。

一方、ガングリオシドの機能発現においては、ガングリオシドの集合化による細胞表層の脂質ドメイン構造の形成(ラフトの形成)が重要であると考えられているが<sup>11-14</sup>、ガングリオシドの集合化度の解析は非常に難しい。これまでに、ガングリオシド結合性のタンパク質を用いた組織染色による解析が行われているが、ガングリオシドの集合化度を定量的に評価することは難しく、ガングリオシドの集合化度を簡便に評価できる解析ツールの開発が求められている。

当研究室ではこれまでに、糖鎖と糖鎖結合性タンパク質との相互作用解析ツールとして、シュガーチップや糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子(SFNP)などを開発している。これらは、タンパク質との相互作用が低いことが知られるテトラエチレングリコール(TEG-mono)<sup>15</sup>を用いることで、糖鎖密度を制御できるため、ガングリオシドとの相互作用に必要な集合化度の解析への利用が期待できる。そこで、本研究では、糖鎖構造や糖鎖密度の制御が可能なSFNPに着目し、糖鎖成分にガングリオシド糖鎖を用いたSFNPを調製し、ガングリオシド結合性タンパク質がどのような集合体と優位に相互作用するか検討した。

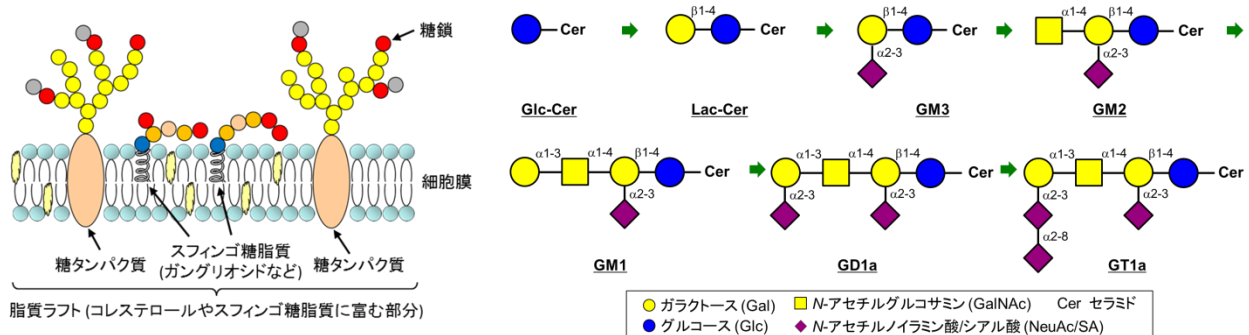


図2-1 細胞膜上のガングリオシド(左)とガングリオシドA系列の生合成経路(右)

### (2.2) 研究概説

まず、ガングリオシド糖鎖を固定化したシュガーチップやSFNPを調製するために、ガングリオシド糖鎖へのリンカー成分の修飾を行った。続いて、定法に従ってシュガーチップを調製し、ガングリオシド糖鎖との相互作用が期待される糖鎖結合性タンパク質を用いたSPR解析を行った。ガングリオシド糖鎖の集合化度は、タンパク質との親和性が低いTEG-monoを用いて糖鎖密度をコントロールしたシュガーチップを調製して評価した。その結果、糖鎖密度と流速によって糖鎖-タンパク質間の相互作用が異なることが分かった。この現象は、拡散律速条件下で見られることから、シュガーチップとタンパク質間に複数の結合モードが存在することが示唆された。複数の結合部位を持つタンパク質とチップ上の糖鎖間では、クラスター効果が主として働くことが考えられ、タンパク質の結合部位の数や配向、またチップ上の糖鎖の距離、配向が相互作用に重要であることが示唆された。一方、6種類の異なるガングリオシド糖鎖を固定化したSFNPを調製し、

レクチンとの凝集実験を行ったところ、固定化したガングリオシド糖鎖の構造によって特異的な凝集体が生成し、SPR解析では観察されなかった相互作用が観測された。また、凝集反応が生じたレクチンとTEG-monoを用いて糖鎖密度をコントロールしたSFNPとの相互作用解析を行ったところ、固定化した糖鎖密度により結合親和性が変化することが分かった。これらの結果から、SFNPはレクチンとの相互作用解析だけでなく、相互作用に必要な糖鎖の集合化度の解析にも利用できることが示唆された。

#### 参考文献

- (1) Sennerholm, R., The Gangliosides. *J. Lipid Res.*, **5** (2), 145-155 (1964).
- (2) Fishman, P. H. and Brady, R. O., Biosynthesis and function of gangliosides. *Science*, **194** (4268), 906-915 (1976).
- (3) Kolter, T., Ganglioside Biochemistry. *ISRN Biochemistry* **2012**, Article ID 506160.
- (4) Hakomori, S., Cell adhesion/recognition and signal transduction through glycosphingolipid microdomain. *Glycoconj. J.*, **17**, 143-151 (2000).
- (5) Hakomori, S., The glycosynapse. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **99**, 225-232 (2002).
- (6) Yu, R. K., Tsai, Y.-T., Ariga, T., Functional Roles of Gangliosides in Neurodevelopment: An Overview of Recent Advances. *Neurochem. Res.*, **37**, 1230-1244 (2012).
- (7) Yanagisawa, K., Odaka, A., Suzuki, N. and Ihara, Y., GM1 ganglioside-bound amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ): A possible form of preamyloid in Alzheimer's disease. *Nat. med.*, **1** (10), 1062-1066 (1995).
- (8) Ariga, T., McDonald, M. P. and Yu, R. K., Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Lipid. Res.*, **49**, 1157-1175 (2008).
- (9) Fishman, P. H., Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. *J. Membr. Biol.*, **69** (2), 85-97 (1982).
- (10) Sixma, T. K. *et al.*, Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature*, **351**, 371-377 (1991).
- (11) Sharom, F. J. and Grant, C. W. M., A model for ganglioside behavior in cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta -Biomembrane-*, **507** (2), 280-293 (1978).
- (12) Simons, K. and Ikonen, E., Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572 (1997).
- (13) Brown, D. A. and London, E., Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts. *J. Biol. Chem.* **275**, 17221-17224 (2000).
- (14) Sonnino, S. Mauri, L. Chigorno, V. Prinetti, A., Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*, **17** (1), 1R-13R (2007).
- (15) Wakao, M., Saito, A., Ohisi, K., Kishimoto, Y., Nishimura, T., Sobel, M., Suda, Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 2499-2504 (2008).

### 第3章 免疫性末梢神経疾患簡易診断法の開発

#### (3.1) 研究背景

免疫性末梢神経疾患は、ウイルスや細菌の感染などにより生じた自己抗体により末梢神経が傷害されることで発症する疾患である。免疫性末梢神経疾患の一種であるギラン・バレー症候群 (GBS) は、急速な手足の運動麻痺を呈する神経・筋疾患の中で最も頻度が高く、特定疾患に指定された指定難病である<sup>1-4</sup>。症状の程度は様々で、予後は良好だと考えられているが、欧米では、GBS患者の約5%が死に至り、約20%は歩行困難などの障害が残ると報告されている<sup>5</sup>。一方、フィッシャー症候群 (FS)<sup>6,7</sup>やBickerstaff型脳幹脳炎 (BBE)<sup>8,9</sup>などはGBSの類縁疾患あるいは亜型として知られているが、予後は良好であり、未治療でも回復傾向を示すことが報告されている。

これらの疾患は、病原因子の一種である *Campylobacter jejuni* などの感染により産生される自己抗体が原因で発症すると考えられており、*C. jejuni* などの菌体外膜に存在するリポオリゴ糖 (LOS) と神経細胞膜表面に存在するガングリオシドの糖鎖部分と分子相同性があることにより自己抗体が産生されると考えられている (図3-1) <sup>10,11</sup>。

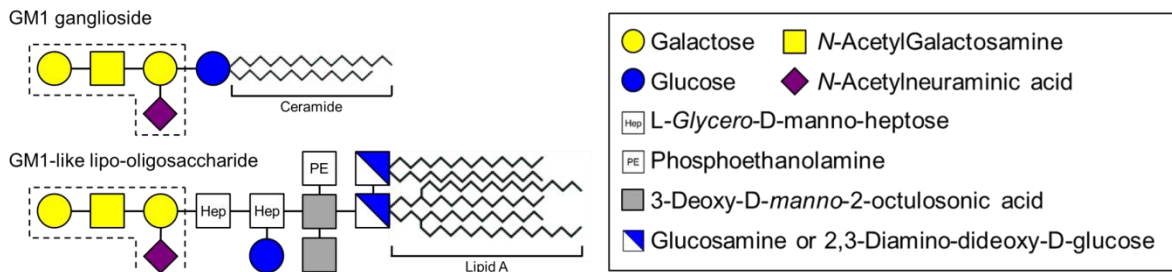


図3-1 GM1 ガングリオシドの糖鎖部分と *C. jejuni* 菌体外膜に存在する GM1 様リポオリゴ糖の分子相同性

免疫性末梢神経疾患の診断は、基本的に病歴や臨床症候に基づいて診断されるが、発症初期には、脳梗塞やポリオなどの症状の類似した疾患との判別が困難な場合が多く、診断を確定するために脳脊髄液検査や電気生理学的検査、抗ガングリオシド抗体検査などの補助診断が必要とされている。これらの補助診断法の中でも、GBSやFS、BBEなどでは、患者血清中に疾患特異的な抗ガングリオシド抗体が検出されることが多く、発症直後に抗体価が最も高くなり、時間の経過とともに低下・消失するため、抗ガングリオシド抗体検査は感度・特異度が高く、有用性が高いと考えられている<sup>12,13</sup>。したがって、GBSではGM1やGM1b、GD1a、GalNAc-GD1aに対するIgG抗体を、FSやBBEではGT1aやGQ1bに対するIgG抗体を検出することが有効だと考えられている<sup>14</sup>。しかしながら、抗ガングリオシド抗体の検出法であるELISA法は熟練した技術を要する上に時間と手間がかかる。検査会社に依頼した場合も、結果の受領までに数日以上かかることから、適切な治療の開始が必然的に遅れてしまうという問題がある。特にGBSにおいては、早期発見による早期治療が重要であるため、抗ガングリオシド抗体を迅速簡便に検出できる新たな診断キットの開発が求められている。そこで、本研究では、ガングリオシド糖鎖を固定化したSFNPを用いて血清中に存在する抗ガングリオシド抗体を検出し、迅速簡便な免疫性末梢神経疾患の診断法へと応用することについて検討した。

## (2.2) 研究概説

まず、ガングリオシド糖鎖を固定化したSFNPを用いて、GBS患者血清中に含まれる抗ガングリオシド抗体との凝集反応について検討した。その結果、ガングリオシド結合性レクチンの場合と同様に、ELISA法で抗ガングリオシド抗体陽性と判定された血清において、抗体に特異的な凝集体が生じることが分かった。この時、生じた凝集体を回収し、SDS-PAGEおよびウエスタンブロッティングを行ったところ、IgG抗体に由来するバンドが検出された。また、ガングリオシド糖鎖を用いた凝集体の生成阻害実験を行ったところ、濃度依存的に凝集体の形成が阻害されたことから、抗体がSFNPの糖鎖部分を認識して、凝集体を形成していることが示唆された。

続いて、糖鎖のタンパク質や抗体などへの結合性は相互作用する糖鎖の密度により変化することが報告されていることから、糖鎖の固定化量を最適化することで凝集体の形成効率を高め、抗体の検出時間を短縮できるか検討した。TEG-monoを用いて、SFNP上の糖鎖密度をコントロールし、血清中の抗体との凝集実験を行ったところ、糖鎖密度を最適化することで検出時間を短縮できることが分かった。次いで、ELISA法との検出感度を比較するために、GBS患者血清50例を含



む血清100例を用いた凝集実験を行った。その結果、本法がELISA法と同等の検出感度で抗ガングリオシド抗体を検出できることが分かった。また、SFNP溶液を用いた場合、血清を混合するだけで数時間以内に抗体の有無を目視で観察できるため、ELISA法に比べて非常に簡便な検査診断法になることが期待でき、臨床現場で有効な診断方法になることが示唆された。近年、癌などの疾患においても血清中に抗糖鎖抗体が存在することが明らかになっている<sup>15,16</sup>。糖鎖構造を自由に変えることができるSFNPは、今後、様々な疾患の診断法への応用が期待でき、幅広い疾患の診断法として利用されることが期待される。

#### 参考文献

- (1) Ilyas, A. A. *et al.*, Serum antibodies to gangliosides in Guillain-Barré syndrome. *Ann. Neurol.*, **23**, 440-447 (1988).
- (2) Yuki, N. & Hartung, H-P. Guillain-Barré Syndrome. *N. Eng. J. Med.*, **366**, 2294-2304 (2012).
- (3) Yuki, N., Tagawa, Y. & Handa, S. Autoantibodies to peripheral nerve glycosphingolipids SPG, SLPG, and SGPG in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Neuroimmunol.*, **70**, 1-6 (1996).
- (4) Pestronk A. Invited review: motor neuropathies, motor neuron disorders, and anti-glycolipid antibodies. *Muscle Nerve.*, **14**, 927-936 (1991).
- (5) Hages R.A.C. *et al.* Immunotherapy for Guillain-Barré syndrome: a systematic review. *Brain***130**, 2245-2257 (2007).
- (6) Fisher C.M. An unusual variant of acute idiopathic polyneuritis (syndrome of ophthalmoplegia, ataxia and areflexia). *N. Engl. J. Med.* **255**, 57-65 (1956).
- (7) Mori, M., Kuwabara, S., Fukutake, T., Yuki, N. & Hattori, T. Clinical features and prognosis of Miller Fisher syndrome. *Neurology* **56**, 1104-1196 (2001).
- (8) Bickerstaff, E.R. & Cloake P.C.P. Mesencephalitis and rhombencephalitis. *Br. Med. J.* **2**, 77-81 (1951).
- (9) Odaka, M. *et al.* Bickerstaff's brainstem encephalitis; clinical features of 62 cases and a subgroup associated with Guillain-Barré syndrome. *Brain* **126**, 2279-2290 (2003).
- (10) Yuki, N. *et al.* Cross-reactive antigen between nervous tissue and a bacterium elicits Guillain-Barre syndrome: molecular mimicry between ganglioside GM1 and lipopolysaccharide from Penner's serotype 19 of *Campylobacter jejuni*. *Biomed. Res.* **13**, 451-453 (1992).
- (11) Yuki, N. *et al.* A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J. Exp. Med.* **178**, 771-775 (1993).
- (12) Kornberg, A.J. *et al.* The clinical correlates of high-titer IgG anti-GM1 antibodies. *Ann. Neurol.* **35**, 234-237 (1994).
- (13) Willson, H.J. *et al.* Inter-laboratory validation of an ELISA for the determination of serum anti-ganglioside antibodies. *Eur. J. Neurol.* **6**, 71-77 (1999).
- (14) Willson, H.J. & Yuki, N. Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain* **125**, 2591-2625 (2002).
- (15) Avichezer, D., Springer, G.F., Schechter, B. & Arnon, R. Immunoreactivities of polyclonal and monoclonal anti-T and anti-Tn antibodies with human carcinoma cells, grown in vitro and in a xenograft model. *Int. J. Cancer.* **72**, 119-27 (1997).
- (16) Wolf M.F., Koerner U., Klumpp B. & Schumacher, K., Characterization of Thomsen-Friedenreich antibody subpopulations from normal human serum, *Tumor Biol.* **8**, 264-72 (1987).

## 第4章 ZnS-AgInS<sub>2</sub>/ZnS ナノ粒子をコアに持つ低毒性SFNPの合成と検査診断ツール及びイメージングツールへの応用

### (4.1) 研究背景

これまでに開発されたSFNPの多くは、コア成分に細胞毒性の高いカドミウムを含むQDを使用しており、検査診断ツールや機能解析ツール、イメージングツールとしての実用化においては、生体に対する毒性や環境負荷の低減が大きな課題となっている。QDの毒性は、酸化によるQDの分解や細胞内での生分解に伴うカドミウムイオンの放出が主な毒性の原因として考えられており<sup>14</sup>、コア成分のQDの毒性を低減するために、QDのポリマーコーティングやZnSなどの低毒性金属の被覆によるコア/シェル化などが行われている<sup>5-7</sup>。しかしながら、いずれの低毒性化法でも生体内で消化を受けた場合には、毒性の発現が懸念されるため、根本的な解決にはならないと考えられる。また、世界中の多くの地域で、近年、カドミウムや水銀、鉛などの重金属を含む材料の使用を制限または禁止する法律が施行されており、カドミウムなどの毒性の高い重金属を含まず、環境負荷の小さい低毒性金属で構成される新たな半導体ナノ粒子の開発が活発に行われている。これまでに、CuInS<sub>2</sub> (CIS)<sup>8,9</sup>やZnS<sup>10</sup>、ZnS-AgInS<sub>2</sub> (ZAIS)<sup>11,12</sup>などの半導体ナノ粒子が開発されており、なかでも、ZAIS ナノ粒子 (ZAIS NP) は、カドミウム系QDと同様に80%以上の量子収率を示すことが報告されている。したがって、ZAIS NPに糖鎖を固定化することによって、強い蛍光を発し、低毒性のSFNPを調製することができると考えられる。

### (4.2) 研究概説

修士論文研究において、SFNPの高い細胞毒性と環境負荷の低減を行うために、上述のZAIS NPをコア成分に持つSFNPの開発について検討している。これまでに、疎水性のZAIS/ZnS NPを親水化処理後、再シェル化し、カドミウム系QDをコアに持つSFNPの調製と同様の方法で安定性の高いSFNPが調製でき、また、カドミウム系QDに比べてZAIS SFNPの毒性が低いことを見出している。一方で、SFNPの調製においては、カドミウム系SFNPに比べて5倍量の糖鎖リガンド複合体が必要であり、ガングリオシド糖鎖など使用した場合、製造コストが高くなるため、実用化を目指す上では、低コスト化が重要な課題であり、糖鎖固定化条件の再検討が必要である。そこで、本研究では、ZAIS/ZnS NPへの糖鎖の固定化条件を再検討し、免疫性末梢神経疾患簡易診断法の実用化やイメージングツールとしての応用に向けたZAIS系SFNPの調製条件を再検討した。

まず、効率良く糖鎖を固定化できる調製条件の検討を行った。糖鎖固定化後の安定性を高めるために重要なZAIS/ZnS NPの再シェル化の条件を検討したところ、再シェル化反応時のpHにより、その後の糖鎖固定化量が変化することが分かり、これまでの40%の糖鎖リガンド複合体量で、効率良く糖鎖を固定化できることが分かった。また、レクチンを用いた凝集実験により、これまでと同様にSFNPとレクチンとの特異的な凝集体が生じることが分かった。調製したSFNPの細胞毒性についても検討したところ、ZAIS系SFNPはカドミウム系SFNPに比べて非常に毒性が低く、250 µg/mL の高濃度のSFNPを加えて24時間培養しても、ほとんど細胞毒性を示さないことが分かった。次いで、調製したSFNPを免疫性末梢神経疾患簡易診断法へと応用するために、ガングリオシド糖鎖を固定化したSFNPを用いて抗ガングリオシド抗体の検出について検討した。その結果、ZAIS系SFNPを用いた場合でもカドミウム系SFNPの場合と同様に、抗ガングリオシド抗体との特異的な凝集体が生じ、目視で血清中の抗体の有無を判定できることが分かった。本研究で調製した低毒性SFNPは、今後、低毒性でより安全性の高い診断ツールとしての実用化が期待される。また、ZAIS系SFNPはその蛍光特性からイメージングツールとしての利用も可能であり、今後、糖鎖受容体の詳細な解析や様々な疾患や感染症のメカニズム解析、さらには糖鎖の結合性を利用した選択的輸送が可能な医薬品の開発研究への応用など、学術面での新しい展開や多方面での実用化を目指したい。

## 参考文献

- (1) Hardman, R., A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Env. Health Persp.* **114**, 116–172 (2006).
- (2) Hoshino, A., *et al.* Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. *Nano Lett.* **4**, 2163–2169 (2004).
- (3) Shiohara, A., Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K., and Yamamoto, K., On the cytotoxicity of quantum dots. *Microbiol. Immunol.* **48**, 669–675 (2004).
- (4) Kim, J., Park, Y., Yoon, T. H., Yoon, C. S., and Choi, K. Phototoxicity of CdSe/ZnSe quantum dots with surface coatings of 3-mercaptopropionic acid or tri-*n*-octylphosphine oxide/gum arabic in *Daphnia magna* under environmentally relevant UV-B light. *Aquatic Toxicol.* **97**, 116–124 (2010).
- (5) Shen, L., Biocompatible Polymer/Quantum Dots Hybrid Materials: Current Status and Future Developments. *J. Funct. Biomater.*, **2**, 355–372 (2011).
- (6) Cho, S. J. *et al.*, Long-Term Exposure to CdTe Quantum Dots Causes Functional Impairments in Live Cells. *Langmuir* **23** (4), 1974–1980 (2007).
- (7) He, Y. *et al.*, Microwave Synthesis of Water-Dispersed CdTe/CdS/ZnS Core-Shell-Shell Quantum Dots with Excellent Photostability and Biocompatibility. *Adv. Mater.* **20**, 3416–3421 (2008).
- (8) Castro, S. L., Bailey, S. G., Raffaele, R. P., Banger, K. K. and Hepp, A. F., Nanocrystalline Chalcopyrite Materials (CuInS<sub>2</sub> and CuInSe<sub>2</sub>) via Low-Temperature Pyrolysis of Molecular Single-Source Precursors. *Chem. Mater.* **15**, 3142–3147 (2003).
- (9) Pons, T., *et al.*, Cadmium-Free CuInS<sub>2</sub>/ZnS Quantum Dots for Sentinel Lymph Node Imaging with Reduced Toxicity. *ACS NANO* **4** (5), 2531–2538 (2010).
- (10) Kuzuya, T., Tai, Y., Yamamuro, S. and Sumiyama, K., (2005) Synthesis of copper and zinc sulfide nanocrystals via thermolysis of the polymeric thiolate cage. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **6**, 84–90.
- (11) Torimoto, T., *et al.*, Facile Synthesis of ZnS-AgInS<sub>2</sub> Solid Solution Nanoparticles for color-Adjustable Luminophore. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 12388–12389 (2007).
- (12) Torimoto, *et al.*, Remarkable Photoluminescence Enhancement of ZnS-AgInS<sub>2</sub> Solid Solution Nanoparticles by Postsynthesis Treatment. *Chem. Commun.* **46**, 2082–2084 (2010).

## 第5章 総括と今後の展望

本研究では、SFNPを活用した糖鎖の機能解析ツールや検査診断ツールへの応用について検討した。その結果、糖鎖結合性タンパク質との相互作用解析ツールや免疫性末梢神経疾患の簡易診断ツールとして利用できることが分かった。SFNPを用いた糖鎖結合性タンパク質との相互作用解析においては、SFNPの糖鎖密度を制御することで、糖鎖結合性タンパク質との相互作用に必要な糖鎖の集合化度を解析できることが示唆された。今後は、ナノ粒子上の糖鎖固定化状態の計算機シミュレーションを行うことで、X線結晶解析では解析できないような糖鎖と糖鎖結合性タンパク質との詳細な相互作用解析が行えると期待できる。一方、SFNPの検査診断ツールとしての利用においては、免疫性末梢神経疾患に関与する血清中の抗ガングリオシド抗体を特異的に検出できることを見出した。近年、ガンをはじめとする様々な疾患において、血清中に抗糖鎖抗体などの糖鎖結合性分子が存在することが明らかにされていることから、糖鎖構造や糖鎖密度の制御が可能なSFNPは、免疫性末梢神経疾患だけでなく、様々な疾患に特異的な糖鎖結合性分子の検出ができると考えられ、今後、幅広い疾患に対する診断ツールとしての応用が期待される。

SFNPの機能解析ツールや検査診断ツールとしての実用化を目指す上では、利用者が安全に使用できることが重要であるため、本研究では、SFNPの低毒性化を目指したカドミウムフリーのSFNP

の調製についても検討した。その結果、カドミウムフリーの半導体ナノ粒子であるZAISナノ粒子への効率的な糖鎖固定化法を見出し、カドミウム系QDをコアに持つSFNPの場合と同様に、免疫性末梢神経疾患の簡易診断ツールとして利用できることを見出した。また、ZAISナノ粒子をコアに持つSFNPは、細胞毒性が低く、環境負荷が小さいため、SFNPの機能解析ツール及び検査診断ツールとして、今後の実用化が期待される。一方で、近年、新たな蛍光性ナノ粒子として、金属成分を含まない炭素材料から構成されるカーボンナノドットやナノダイヤモンドなども報告されている。今後は、SFNPのさらなる低毒性化を目指し、これらの蛍光性ナノ粒子を用いたSFNPの調製についても検討していきたい。

SFNPは紫外光などの照射により強い蛍光を発するため、凝集反応を利用した相互作用解析や検査診断法だけでなく、イメージングツールとしての利用も可能である。したがって、SFNPによる細胞や生体内の糖鎖結合性分子の静的・動的な解析を行うことで、糖鎖が関与する生体機能の解明や糖鎖機能を活用した薬剤の選択的輸送法の開発などにも利用できると考えられ、今後は医薬品開発をはじめとする多方面での応用についても展開していきたい。