

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15728

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症における血管内皮増殖因子受容体の糖鎖変化

研究課題名(英文) Analysis of N-glycans on vascular endothelial growth factor receptor-2 in diabetic retinopathy

研究代表者

石田 晋 (Ishida, Susumu)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：10245558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖尿病網膜症の病態責任分子である血管内皮増殖因子(VEGF)の受容体 VEGFR-2上のN型糖鎖構造に関する検討をおこなった。既存データベースとの照合をおこなった結果、培養ヒト網膜血管内皮細胞におけるVEGFR-2由来のN型糖鎖16ピークについて、その糖鎖構造を推定することができた。しかしながら、糖尿病網膜症における病態変化の一つである低酸素条件に24時間曝露した培養したヒト網膜血管内皮細胞では、VEGFR-2上のN型糖鎖構造に変化を検出できなかった。

研究成果の概要(英文)：Vascular endothelial growth factor (VEGF), a potent angiogenic and vascular permeability factor, plays a significant role in the pathogenesis of diabetic retinopathy. In the current study, we analyzed the structures of N-glycans on the receptor of VEGF, VEGFR-2. On the basis of preexisting database for glycan structure, the 16 structures of N-glycans on VEGFR-2 were identified in human retinal microvascular endothelial cells (HRMECs). However, no alteration of N-glycans was found on VEGFR-2 in HRMECs cultured under hypoxic condition, one of the representative pathological condition in diabetic retinopathy, for 24 hours compared to that under normoxic condition.

研究分野：眼科学

キーワード：血管内皮増殖因子受容体-2 N型糖鎖 糖尿病網膜症 低酸素

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は壮年期における主要な中途失明原因の一つである。現在では、網膜光凝固術や硝子体手術などの既存療法の改良に加え、本症の病態責任分子である血管内皮増殖因子(VEGF)に対する生物学的製剤(抗VEGF製剤)が実臨床に導入され、その治療成績も向上しつつある。しかしながら、抗VEGF製剤の使用には低頻度ではあるがいくつかの合併症リスクがあり、また抗VEGF製剤にも抵抗性を示す症例も存在するため、本症に対する新規治療の探索は現在もなお幅広く展開されている。

近年、核酸、蛋白質に続く第三の鎖状生命分子として、糖鎖分子が注目されている。蛋白質の半数以上には糖鎖が付加されており、その構造変化は蛋白機能の異常につながる事が知られている。悪性腫瘍に関する研究領域では、VEGFの受容体 VEGFR-2 上のシアル酸含有 N 型糖鎖変化が腫瘍血管新生において重要な役割を演じていることが報告されている。また、過去に我々は糖尿病網膜症患者の硝子体中でシアル酸含有 N 型糖鎖が増加することを報告した(Inafuku S et al. *Curr Eye Res.* 2015)。そこで、糖尿病網膜症病態における VEGFR-2 上の N 型糖鎖変化を調べることは病態に対するさらなる理解や新規創薬につながると考え、本研究を計画した。

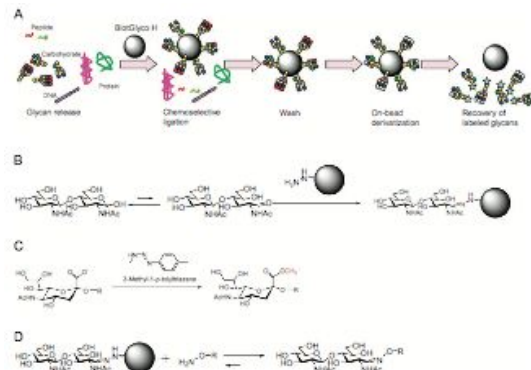
2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病網膜症の病態責任分子 VEGF に対する受容体である VEGFR-2 上の N 型糖鎖構造を同定すること、また糖尿病類似条件下でヒト網膜血管内皮細胞を培養した場合に、定常条件下で培養した場合と比較して VEGFR-2 上の N 型糖鎖構造に変化が生じるかを検討することである。

3. 研究の方法

ヒト網膜血管内皮細胞より細胞抽出液を

調整し、免疫沈降法により VEGFR-2 を単離し、PNGase F (Peptide-N-Glycosidase F) によって処理することで、N 型糖鎖を切断遊離させ、ヒドラジドビーズによる N 型糖鎖の捕捉を行って、標識試薬との交換反応によって N 型糖鎖を回収した(グライコプロット法、図 1)。同サンプルを質量分析に供して得られたスペクトルについて、データベースに照合して VEGFR-2 上の N 型糖鎖の構造を推定した。次に、ヒト網膜血管内皮細胞を糖尿病類似条件として低酸素(1%酸素濃度)条件下で 24 時間培養したものと、対照群として定常条件下で 24 時間培養したもので、糖鎖構造に変化があるかどうかについて検討した。



(図 1: グライコプロット法の基本的プロトコール)

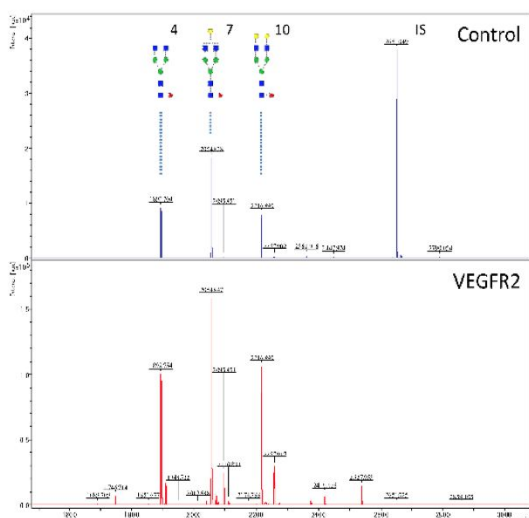
(A)プロトコール全体、(B)ヒドラジドビーズによる還元性糖鎖成分の選択的捕捉反応、(C)シアル酸のカルボキシル基のメチル化、(D)標識試薬との交換反応

< 引用文献 >

Nishimura S. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 2011 (219-71)

4. 研究成果

ヒト網膜血管内皮細胞における VEGFR-2 由来の N 型糖鎖 16 ピークについて、データベースと照合し、以下の糖鎖構造を推定することができた(図 2)。



(図 2 : グライコプロッティング法により得られた MALDI-TOF MS スペクトル内部標準物質 (IS) と主要なピークに推定構造とピーク No. を示した)

- (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
- (HexNAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2
- (Hex)1 (HexNAc)1 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
- (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
- (Hex)1 (HexNAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2
- (HexNAc)3 + (Man)3 (GlcNAc)2
- (Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
- (Hex)2 (HexNAc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2
- (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
- (Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
- (Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
- a(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
- b(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuGc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
- (Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
- a(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1

- (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
- b(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)2
- (NeuGc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
- a(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1
- (NeuGc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
- b(Hex)3 (HexNAc)2 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2
- (GlcNAc)2
- a(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1
- (NeuGc)2 + (Man)3 (GlcNAc)2
- b(Hex)3 (HexNAc)2 (NeuAc)1 (NeuGc)1 + (Man)3 (GlcNAc)2

また、ヒト網膜血管内皮細胞を低酸素条件下で培養したものと、定常条件下で培養したものでは、24 時間では糖鎖構造に変化がないことがわかった。どちらの条件下においても、最も多い糖鎖構造は、

(Hex)1(HexNAc)2(Deoxyhexose)1+(Man)3(GlcNAc)2 であり、2 番目に多い糖鎖構造は、(Hex)2(HexNAc)2(Deoxyhexose)1+(Man)3(GlcNAc)2 であり、3 番目に多い糖鎖構造は、(HexNAc)2(Deoxyhexose)1+(Man)3(GlcNAc)2 と、共通していた。

現在、VEGFR2の単離精度を確認するために、免疫沈降後の細胞抽出液に対してウエスタンブロットングを施行後、VEGFR2に相当する250kDaのバンドに関して液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置による解析を行っている。今後は、ヒト網膜血管内皮細胞からVEGFR2を精度よく単離する方法についてもさらに検討を行っていく予定である。

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 4 件)

石田 晋、神田 敦宏、糖尿病網膜症における血管新生因子ガレクチン-1 による病態形成への関与、日本眼科学会雑誌、

査読無、121 巻、160-162、2017、
<http://journal.nichigan.or.jp/PastC/PastCo?year=2017&vol=121&number=2&ma=0>

Kanda A, Ishida S.
Receptor-associated prorenin system contributes to development of inflammation and angiogenesis in proliferative diabetic retinopathy. *Inflamm Regen*. 査読有、36 : 22、2016、doi: 10.1186/s41232-016-0027-0

Kinoshita S, Noda K, Saito W, Kanda A, Ishida S. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor-B in proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol*. 査読有、94:e521-523、2016、doi: 10.1111/aos.12969.

Dong Y, Dong Z, Kase S, Ando R, Fukuhara J, Kinoshita S, Inafuku S, Tagawa Y, Ishizuka ET, Saito W, Murata M, Kanda A, Noda K, Ishida S.
phosphorylation of alphaB-crystallin in epiretinal membrane of human proliferative diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol*. 査読有、9:1100-1105、2016、doi: 10.18240/ijo.2016.08.03.

[学会発表](計 6 件)

Ishida S. Galectin-1: Novel biomarker and angiogenic factor in diabetic retinopathy. 14th Congress of the International Ocular Inflammation Society (IOIS),2017

Ishida S. Galectin-1: Novel biomarker and angiogenic factor in diabetic

retinopathy. Workshop on Diabetic Retinopathy. Global Ocular Inflammation Workshops (GOIW),2017

神田 敦宏、董 陽子、野田 航介、齋藤 航、石田 晋、糖尿病網膜症における新規血管新生因子ガレクチン-1の発現調節メカニズム、第121回日本眼科学会総会、2017

Ishida S. Roles of (Pro)renin receptor in the pathogenesis of diabetic retinopathy. 2016 Autumn Meeting of Ophthalmological Society of Taiwan (TOS), 2016

Ishida S. ATP6AP2/ (pro)renin receptor contributes to glucose metabolism via stabilizing the pyruvate dehydrogenase E1 subunit. XX Biennial Meeting of the International Society for Eye Research (ISER), 2016

石田 晋、董 陽子、野田 航介、齋藤 航、神田 敦宏、糖尿病網膜症における血管新生因子ガレクチン-1による病態形成への関与、第22回日本糖尿病眼学会総会、2016

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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

石田 晋 (ISHIDA, Susumu)

北海道大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10245558

(2)研究分担者

西村 紳一郎 (NISHIMURA, Shinichiro)

北海道大学・先端生命科学研究院・教授

研究者番号：00183898

野田 航介 (NODA, Kousuke)

北海道大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90296666