

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11736

研究課題名(和文)健康長寿糖鎖を介した慢性炎症の制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regulation mechanisms of chronic inflammation mediated by characteristic glycans associated with extreme human longevity

研究代表者

三浦 ゆり (Miura, Yuri)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長

研究者番号：00216574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らがこれまでに発見した「健康長寿糖鎖」の生物学的な意義を明らかにし、健康長寿あるいは老化のメカニズムを解明することを目的とした。本研究では、長期縦断コホートを用いた観察研究と、糖転移酵素の遺伝子改変を用いた検証研究を行った。その結果、超百寿者に多い健康長寿糖鎖は、糖尿病性認知機能低下に関連して減少する傾向にあることが明らかになった。超百寿者は、糖尿病が少なく、加齢による認知機能低下が抑制されることが知られている。これらより、健康長寿糖鎖が究極の老化の「結果」として出現しているのではなく、認知機能の維持など健康長寿の「要因」に関連している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では健康長寿糖鎖の生物学的な意義を明らかにするため、長期縦断調査を用いた観察研究と糖鎖リモデリングマウスを用いた検証研究を行うことを目的とした。長期縦断調査を用いたグライコプロテオミクスにより、糖尿病性認知機能低下において健康長寿糖鎖が減少する傾向にあることを明らかにし、健康長寿糖鎖が認知機能の維持など健康長寿の「要因」に関連する可能性を示唆した。現在進行中の慢性炎症に関する観察研究や糖鎖リモデリングマウスを用いた検証研究により、さらに健康長寿糖鎖の健康長寿達成への寄与が明らかになれば、これらの糖鎖をバイオマーカーとする高齢者の健康管理システム開発に発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the biological significance of N-glycans associated with successful aging, and the mechanisms of healthy aging. We performed the observational study using a longitudinal cohort study for elderly people, and the validation study using genetically modified animals. In observational study, we examined the characteristic altered N-glycopeptides associated with diabetic cognitive impairment, and indicated that multi-branched and highly sialylated glycans, which were associated with successful aging, were decreased. In semi-super centenarians (SSCs) who are considered to accomplish successful aging, it was reported that diabetes was very rare and that age-related cognitive impairment was suppressed. Accordingly, these results might suggest that N-glycans associated with successful aging emerged in SSCs not as a result of extremely senescence, but as a factor of successful aging such as the suppression of age-related cognitive impairment.

研究分野：プロテオミクス・グライコミクス

キーワード：健康長寿 糖鎖 グライコプロテオミクス 血漿タンパク質 長期縦断コホート 慢性炎症 質量分析  
老化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

糖鎖修飾はヒトのタンパク質の約 60%に起きる最も頻度の高い翻訳後修飾であり、分岐や繰り返しなど複雑で多様な構造をもつ。この多様な糖鎖修飾は、健康状態を反映してその構造が変化することが知られており、ガンやリウマチ、アルツハイマー病など様々な疾患によって変化する。また老化のような、もっと微妙な生物学的変化を反映して変化するとも知られている。研究代表者らはこれまで、生物学的変化のマーカーとしての糖鎖修飾に着目し、健康な超百寿者(105歳以上)の血漿グライコミクス解析(糖鎖の網羅的解析)により、超百寿者に特徴的な糖鎖構造である「健康長寿糖鎖」(高分岐高シアル酸糖鎖)を発見した。さらに、健康長寿糖鎖が結合しているタンパク質(キャリアタンパク質)の一つが、ハプトグロビンであることを明らかにした。しかしながら、この健康長寿糖鎖の出現が、究極の老化の「結果」であるのか、あるいは健康長寿の「要因」となるものであるのかは、明らかではない。また、健康長寿糖鎖がハプトグロビンの機能にどのような影響を及ぼしているのかも明らかではない。もし健康長寿糖鎖が老化の結果として出現しているのではなく健康長寿の要因であるならば、健康長寿糖鎖を増やすことが健康な高齢期を迎えるための重要なメッセージとなる可能性があり、この「問い」を解決することは喫緊の課題である。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、この「健康長寿糖鎖」の生物学的な意義、すなわち健康長寿のどのような生理的状态を反映しているのか、またこれらの糖鎖を増やすことが健康の維持につながるのかを明らかにし、健康長寿あるいは老化のメカニズムを解明することを目的とする。そして、糖鎖を介した新たな健康管理システムや新たな老化制御につなげることを目指す。本研究は、老化の背景には糖鎖に含まれる情報および認識機序の変化があるという独自のアイデアに基づいて、糖タンパク質や糖鎖の機能と健康長寿という新たな問題に取り組んでいる。健康長寿糖鎖を利用した新たな健康管理システムや新たな老化制御への展開を目指す本研究は、従来の基礎老化研究からは得られない健康な超高齢社会の実現に向け道を切り拓くものである。

## 3. 研究の方法

長期縦断コホートをを用いた健康長寿糖鎖の生物学的意義に関する観察研究

### 1) 健康長寿糖鎖と慢性炎症との関連性について

高齢者の長期縦断コホート(SONIC: Septuagenarians, Octogenarians, Nonagenarians Investigation with Centenarians)の参加者(初回調査時に70歳)の中から、炎症の指標であるC-reactive protein (CRP)が6年間連続的に増加したグループを抽出し解析対象者群とした。また、CRPが増加しなかったグループについて解析対象者との傾向スコアマッチングを行い、対照者群を抽出した。

### 2) 糖尿病性認知機能低下に伴う糖鎖変化について

SONICの参加者(初回調査時に70歳)の中から、3回の調査とも糖尿病の指標であるヘモグロビンA1cが基準値以上で、さらに認知機能の指標であるMoCA-Jスコアが連続的に低下した人を解析対象者とした。初回調査(認知機能低下前)と6年後追跡調査(認知機能低下後)の血漿タンパク質について比較解析を行い、糖尿病性認知機能低下との関連が示唆される血漿タンパク質糖鎖を調べた。まず、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析(2S-DIGE)により、認知機能の低下に伴って変化する血漿タンパク質スポットを明らかにした。タンパク質を同定した後、これらの中からN-型糖鎖をもつ血漿タンパク質18種類に絞り、LC-MS/MSを用

いたグライコプロテオミクスを行った。

#### 糖転移酵素の遺伝子改変による健康長寿糖鎖の生物学的意義に関する検証研究

糖鎖を合成するのは糖転移酵素である。そこで、高分岐糖鎖の合成に関わる GlcNAc 転移酵素 V (GnT-V)のトランスジェニックマウスを用いて、高分岐高シアル酸糖鎖を多くもつ「糖鎖リモデリングマウス」の作製を目指した。

#### 4. 研究成果

##### 長期縦断コホートをを用いた健康長寿糖鎖の生物学的意義に関する観察研究

###### 1) 健康長寿糖鎖と慢性炎症との関連性について

関東 SONIC 70 歳調査の対象者の中から、初回から 6 年後の追跡調査まで 3 回の調査全てに参加した人を抽出した。次に、炎症マーカー (CRP: C-reactive protein) が 6 年間連続的に増加したグループを抽出した。その中から病歴等を調べて感染症やリウマチなどの炎症性疾患に罹患している参加者を除き、解析対象者とした。CRP が増加しなかったグループの中から炎症性疾患に罹患している参加者を除き、解析対象者と傾向スコアマッチングを行って、対照群を抽出した。

今後は、マッチング後の解析対象者 26 名と対照群 26 名の初回調査及び 6 年後追跡調査の血漿について糖鎖解析を行う。また、炎症性メディエーター (IL-6 や TNF- など) や SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) 関連因子を測定する。多変量解析を用いて慢性炎症と糖鎖変化について明らかにし、健康長寿糖鎖と慢性炎症亢進との関連性を考察する。

###### 2) 糖尿病性認知機能低下に伴う糖鎖変化について

SONIC 70 歳調査の対象者の中から、初回から 6 年後の追跡調査まで 3 回の調査全てに参加した人を抽出した。その中から 3 回の調査全てで糖尿病の指標であるヘモグロビン A1c が基準値以上の人を抽出し、さらに認知機能の指標である MoCA-J スコアが連続的に低下した人を解析対象者 (認知機能低下群) とした。また対照として、ヘモグロビン A1c が基準値以上の人の中から認知機能が 6 年間維持された人 (認知機能維持群) を抽出した。

認知機能低下群において初回調査時 (認知機能低下前) と 6 年後追跡調査時 (認知機能低下後) に採血した血漿について、2D-DIGE を用いたプロテオミクスを行い、認知機能低下前後の血漿タンパク質スポットの発現変化を調べた。同様に、認知機能維持群においても 6 年間の変化を調べ、認知機能低下との関連が示唆されるタンパク質スポットの変化を明らかにした。タンパク質を同定した後、N-型糖鎖をもつ血漿タンパク質を 18 種類選び、グライコプロテオミクスを行った。

認知機能低下群において初回調査時と 6 年後追跡調査時の血漿タンパク質について消化酵素を用いてペプチドに分解し、濃縮脱塩を行って LC-MS/MS で分析した。多変量解析により 6 年間に变化した糖ペプチドを明らかにした。認知機能維持群についても同様に解析し、認知機能の低下に関連することが示唆される糖ペプチドを明らかにした。その結果、超百寿者に多い高分岐高シアル酸含有糖鎖 (健康長寿糖鎖) が、糖尿病性認知機能低下においては減少する傾向にあることが明らかになった。

超百寿者は糖尿病が少なく、一般高齢者に認められる加齢に伴う認知機能低下が遅いことが知られている [Arai Y, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2014]。従って、今回解析した糖尿病性認知機能低下群は、健康長寿を達成している超百寿者とは真逆の健康状態であると考えられる。超百寿者に多い「健康長寿糖鎖」が、糖尿病性認知機能低下に関連して減少したこと

は、健康長寿糖鎖が「究極の老化」の指標ではなく、認知機能の維持などのような「健康長寿の要因」に関連している可能性を示唆するのかもしれない。

#### 糖転移酵素の遺伝子改変による健康長寿糖鎖の生物学的意義に関する検証研究

高分岐高シアル酸糖鎖を多くもつ「糖鎖リモデリングマウス」を作製するため、ヒト GnT-V トランスジェニックマウス凍結胚の供与を受け、解凍後、飼育を行った。しかしながら、肝臓、腎臓、膵臓を採取して GnT-V mRNA の発現（リアルタイム PCR）、GnT-V タンパク質の発現（ウエスタンブロット）、及び GnT-V の酵素活性の指標となる高分岐糖鎖の発現（レクチンブロット）を調べたところ、mRNA は発現が確認できたがタンパク質の発現と酵素活性の増加は認められなかった。そのため、この方法を断念し、*in vivo* トランスフェクションによる糖鎖リモデリングマウスの作製に取り組んでいる。

現在進行中の慢性炎症に関する観察研究や糖鎖リモデリングマウスを用いた検証研究により、さらに健康長寿糖鎖の健康長寿達成への寄与が明らかになれば、これらの糖鎖をバイオマーカーとする高齢者の健康管理システム開発に発展することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 三浦ゆり、津元裕樹、遠藤玉夫	4. 巻 56
2. 論文標題 プロテオミクスを用いた健康長寿バイオマーカーの探索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 999-1003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14894/faruawpsj.56.11_999	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三浦ゆり、津元裕樹、遠藤玉夫	4. 巻 92
2. 論文標題 健康長寿とグライコミクス	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 343-348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦ゆり、川上恭司郎、井出野佑太、増井幸恵、稲垣宏樹、小野口航、津元裕樹、梅澤啓太郎、新井康通、池邊一典、石崎達郎、神出計、権藤恭之、遠藤玉夫
2. 発表標題 血しょうタンパク質糖鎖修飾の健康寿命延伸を目指すバイオマーカーとしての可能性
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦ゆり
2. 発表標題 糖鎖からみた健康長寿
3. 学会等名 第41回日本基礎老化学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦ゆり
2. 発表標題 健康長寿の糖鎖マーカー 健康な超高齢社会の実現に向けて
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津元裕樹、西風隆司、関谷禎規、梅澤啓太郎、川上恭司郎、岩本慎一、田中耕一、三浦ゆり、遠藤玉夫
2. 発表標題 シアル酸結合様式特異的誘導体化法を用いたO-結合型糖ペプチド解析法の開発
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦ゆり、川上恭司郎、井出野佑太、増井幸恵、稲垣宏樹、津元裕樹、梅澤啓太郎、新井康通、池邊一典、石崎達郎、神出計、権藤恭之、遠藤玉夫
2. 発表標題 縦断コホートをを用いた糖尿病性認知機能低下のグライコプロテオミクス
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2021年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津元裕樹、西風隆司、梅澤啓太郎、川上恭司郎、早川禎宏、三浦ゆり、遠藤玉夫
2. 発表標題 シアル酸結合様式特異的誘導体化法を用いたヒト血漿タンパク質の糖ペプチド解析
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------