

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17136

研究課題名（和文）心筋線維化の評価・治療のための糖鎖マーカー開発を目指したグライコプロテオミクス

研究課題名（英文）Analysis of cardiac fibrosis-related glycoproteins for glyco-medicine

研究代表者

岡谷 千晶 (Nagai-Okatani, Chiaki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：30633648

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：心不全をもたらす心筋線維化の評価及び治療のため、心筋線維化の定量的マーカー及び線維化を担う心臓筋線維芽細胞の特異的マーカーが必要である。本研究では、タンパク質上の糖鎖修飾に注目し、疾患モデル細胞・動物および心疾患患者の心筋線維化に伴い、どのような糖鎖変化が生じているのかを明らかにした。本研究により、組織中の心臓筋線維芽細胞における糖鎖変化を再現するためには、複数の細胞のクロストークが重要であることが示唆された。また、今後の心臓筋線維芽細胞マーカーの探索や心臓ホメオスタシスにおける糖鎖の意義を理解する上で重要な知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、心筋線維化と関連した糖鎖変化およびその糖鎖変化を示す糖タンパク質群を明らかにした。本成果により、これらの糖鎖変化を指標とした、新たな診断法や治療法の開発への応用が期待できる。また、これらの糖鎖変化とタンパク質の機能異常との関連性を詳細に調べることで、新たな心筋線維化の発症・進展メカニズムが明らかになる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：For assessment and therapy of cardiac fibrosis, its quantitative biomarker and myofibroblast-specific marker are needed. In this study, to elucidate cardiac fibrosis-related glycoproteins, we investigated a cell model of cardiac fibrosis and failing hearts of animals and patients with cardiac diseases. This study unveiled cardiac fibrosis-related changes in protein glycosylation and provided candidate N- and O-glycoproteins attached with the disease-related glycans. This study also provided the cellular and molecular mechanism underlying cardiac fibrosis, including the significance of intercellular crosstalk in cardiac fibrosis-related glycosylation alterations. These findings will facilitate the development of a specific marker of myofibroblasts and the understanding of significance of protein glycosylations in cardiac homeostasis.

研究分野：糖鎖医工学、グライコミクス、グライコプロテオミクス

キーワード：心筋線維化 糖タンパク質 拡張型心筋症 高血圧性心不全 レクチンマイクロアレイ 質量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの心疾患で認められる心筋線維化は、コラーゲン線維タンパク質を含む細胞外マトリックス (ECM) の過剰沈着を特徴とし、心筋構造の破綻により心機能を減弱させることで心不全をもたらす。そのため、心不全の進展予防や治療に向けた、心筋線維化制御法の開発が強く求められている。また、その推進に必要な心筋線維化の早期検出法・定量的評価法の確立が重要課題となっているが、未だ臨床応用された心筋線維化マーカーはない。これらの主要因として、心筋線維化に伴う病的 ECM 産生を担う細胞である、筋線維芽細胞の特異的マーカーが確立されていないことが挙げられる。現状、筋線維芽細胞マーカーとして α -smooth muscle actin (α SMA) が汎用されている。しかし、 α SMA は、他細胞でも発現し特異性が低い、筋線維芽細胞の特定亜集団でしか発現していない、細胞骨格タンパク質で細胞表層マーカーや分泌性マーカーとしては使用できない、という問題点がある。そのため、心筋線維化の実態解明及び評価・治療への応用のため、筋線維芽細胞の特異的マーカーとして利用できる膜タンパク質や分泌性タンパク質の同定が強く求められている。

(2) 糖鎖修飾は、主要なタンパク質の翻訳後修飾であり、「細胞の顔」として細胞の状態によって変化することから、疾患マーカー・治療法の有力な開発ターゲットである。我々は、拡張型心筋症モデルマウス心臓では、レクチンの一種 *Wisteria floribunda agglutinin* (WFA) 結合性の N 型糖鎖を有する ECM 糖タンパク質が心筋線維化部位特異的に増加することを見出し、これがタンパク質の発現量増加 (量的変化) ではなく、糖鎖変化 (質的变化) によることを実証した (Nagai-Okatani *et al. Lab Invest* 2019)。WFA 結合性糖鎖は正常組織では発現量が非常に低く、コラーゲン線維タンパク質には認められないことから、WFA は「出来上がった線維」ではなく「線維をつくる活性」の評価に有用な心筋線維化検出プローブであるといえる。また、心筋線維化の過程で出現する筋線維芽細胞の由来は主に線維芽細胞であるという報告がある。これらの知見から、心臓線維芽細胞を由来とする心臓筋線維芽細胞のグライコプロテオームには線維化と関連した糖鎖変化が生じ、その線維化関連糖鎖を有する糖タンパク質は、線維化活性を高感度かつ定量的に評価できるマーカーになり得ると強く示唆された。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、心筋線維化の早期検出・定量的評価・治療法の確立を目指し、心筋線維化の中心的役割を担う、心臓線維芽細胞由来の心臓筋線維芽細胞にて特異的に発現するマーカー糖タンパク質を同定することである。つまり、心臓筋線維芽細胞で特異的に発現する糖鎖 (心筋線維化関連糖鎖) を有する分泌性糖タンパク質は、血液診断等の低侵襲的・定量的評価のための心筋線維化マーカーへの応用が期待できる。また膜糖タンパク質は、筋線維芽細胞の細胞表層マーカーとして、イメージングによる検出や薬剤治療への応用が期待できる。

(2) 従来の疾患マーカータンパク質の開発では、タンパク質の量的変化に注目したプロテオミクスによる探索が主流である。しかし、ECM タンパク質を含む多くのタンパク質は、正常組織・線維化組織の両方で発現する。そこで本研究では糖鎖変化という「タンパク質の質的变化」に注目した。この糖鎖を基軸としたマーカー開発戦略では、疾患に伴い発現する糖鎖 (心筋線維化関連糖鎖) をレクチン等の糖鎖特異的プローブで検出する方法と、マーカータンパク質を抗体等の特異的プローブで検出する従来法とを組み合わせることで、従来法よりも鋭敏で特異性の高い検出が期待できる。

3. 研究の方法

(1) ヒト細胞モデルを用いた、心筋線維化関連糖鎖変化の解析

ヒト心臓線維芽細胞からの心筋線維化モデル細胞の作出条件を最適化し、作出したヒト心筋線維化モデル細胞と対照細胞から調製したタンパク質試料を用い、レクチンアレイにて比較糖鎖プロファイル解析を行った。またレクチンプロット解析およびレクチン捕集実験を行い、レクチンアレイ解析結果の妥当性検証を行った。

(2) ヒト組織標本を用いた、心筋線維化関連糖鎖変化の検証

(1) で同定した心筋線維化関連糖鎖認識レクチンを用い、拡張型心筋症患者の心臓組織標本を用いた組織染色を行うことで、モデル細胞で認められた糖鎖変化の検証、および、より心筋線維化領域に特徴的な糖鎖変化を認識するレクチンの選別を行った。

(3) ラット心不全モデルを用いた、心筋線維化関連糖鎖変化の解析

他の心疾患における心筋線維化も評価可能なレクチンの選出を目的として、高血圧性心不全モデルラットでの心筋線維化に伴う糖鎖変化を検討した。また、その糖鎖変化を示す糖タンパク質の候補について検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト細胞モデルを用いた、心筋線維化関連糖鎖変化の解析

ヒト心臓線維芽細胞を用いた心筋線維化モデルの作出法として、transforming growth factor- β 1 (TGFB1) 刺激群、macromolecular crowding (MMC) 刺激群、MMC+TGFB1 刺激群の3種類を検討し、非刺激の対照群 (CT) と比較した。既報と同様に、MMC 刺激による procollagen から mature collagen へのプロセッシング亢進、および TGFB1 刺激による α SMA 発現亢進が MMC 共存下では増強されること、を確認した。最適化した刺激条件で作出した心筋線維化モデル細胞を用い、各群 N=3 として3回の実験を行い、それらの糖鎖プロファイルを用いて主成分分析を行ったところ、TGFB1 刺激よりも MMC 刺激により糖鎖プロファイルが大きく変化することを見出した (図1)。解析した45種のレクチンのシグナル強度を群間で比較したところ、培養上清では、MMC 刺激により5種のレクチンが顕著なシグナル増加を示した (Fold change > 2, $p < 0.05$)。一方、細胞ライセートでは、MMC 刺激により3種類のレクチンが顕著なシグナル低下を示し、増加を示すレクチンは見られなかった。興味深いことに、線維化刺激によりシグナルが増加したレクチンの中に、拡張型心筋症モデルマウスの解析から心筋線維化関連レクチンとして同定した WFA は含まれていなかった。

続いて、これらの心筋線維化関連糖鎖認識レクチンを用いて、レクチンプロット解析およびレクチン捕集実験を行い、糖鎖プロファイル解析の結果の妥当性を検証した。その結果、レクチン2種について線維化刺激に伴う結合糖タンパク質の増加を確認できた。

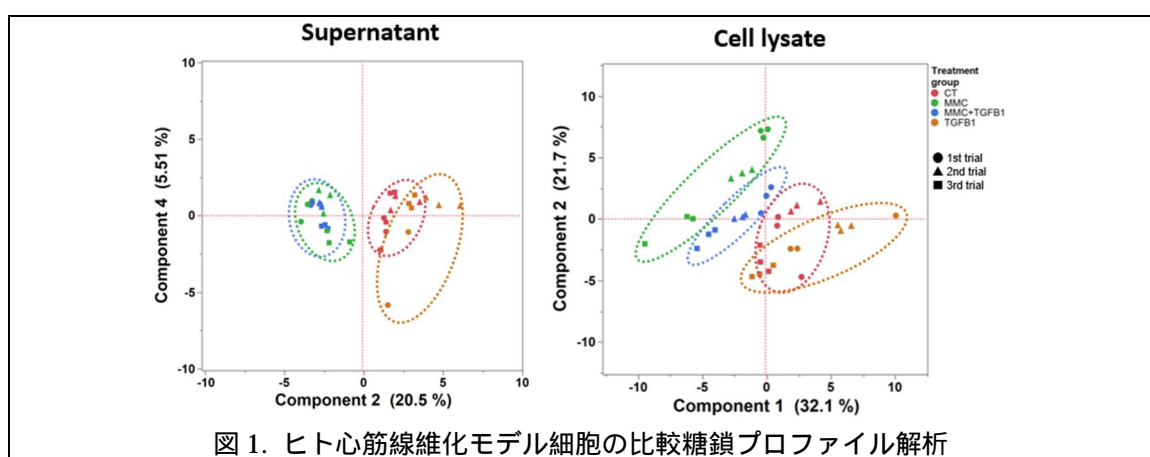


図1. ヒト心筋線維化モデル細胞の比較糖鎖プロファイル解析

(2) ヒト組織標本を用いた、心筋線維化関連糖鎖変化の検証

心筋線維化モデル細胞を用いた実験で認められた糖鎖変化を検証するため、共同研究機関より提供された拡張型心筋症患者の心臓病理組織標本について、線維化刺激でシグナル増加したレクチン5種およびWFAを用いて組織染色を行った。既存の線維化検出法であるアザン染色との比較の結果、WFAを含むレクチン3種が線維化領域に選択的な染色を示した。また線維化領域特異的なWFA染色がPNGase F消化により消失したことから、WFA結合糖鎖はN型であることが分かり、拡張型心筋症モデルマウスと同様の糖鎖変化がヒトでも生じていることが確認できた。

(3) ラット心不全モデルを用いた、心筋線維化関連糖鎖変化の解析

拡張型心筋症モデルマウスおよび患者の心臓組織の線維化領域で認められた糖鎖変化が、他の心疾患における心筋線維化においても見られるかを検討するため、共同研究機関より提供された高血圧性心不全モデルDahlラットの心臓FFPE組織切片を用いた組織染色を行った。WFA染色パターンは既存の線維化検出法であるマッソントリクローム染色部位と非常に類似したことから、本モデルにおいても心筋線維化の検出にはWFAが有用であることが示された。

次に、WFA結合糖鎖以外の糖鎖修飾の変化を調べるため、Dahlラット心不全群 (HS) と対照群 (LS) の心臓FFPE組織切片を用いた比較糖鎖プロファイル解析を行った。その結果、WFA陽性の線維化領域でシグナルが増加するレクチン1種の同定に成功した。その特異性から、心筋線維化に伴いN型糖鎖だけでなくO型糖鎖も構造変化することを新たに見出した (図2)。

次に、これらの糖鎖変化を示すキャリアタンパク質を推定するため、当該レクチンと候補糖タンパク質の特異的抗体を用いた組織染色を実施した。この検討により、拡張型心筋症モデルマウスのグライコプロテオーム解析により見出されたN型糖タンパク質が、Dahlラット心臓でも心筋線維化領域で当該レクチンと共染色され、心筋線維化に関連した糖鎖変化を示すことが示唆された。また、O型糖タンパク質候補については、Dahlラット心臓FFPE組織切片のRNA-seq遺伝子発現解析にて心不全群で発現亢進するタンパク質のうち、既存情報よりO型糖タンパク質であると推定される糖タンパク質を選出した。これらの糖タンパク質と当該レクチンとの共染色を検討することで、2種類のO型糖タンパク質上の糖鎖変化が示唆された。以上より、心筋線維化に伴う糖鎖変化とそのキャリアタンパク質に関する知見が得られた。

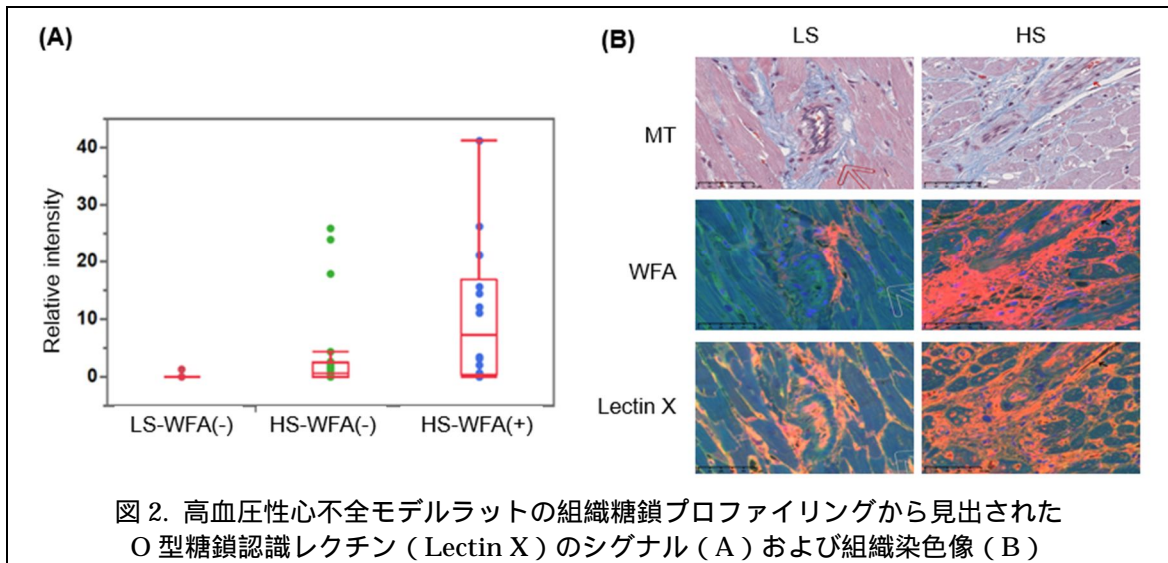


図 2. 高血圧性心不全モデルラットの組織糖鎖プロファイリングから見出された O 型糖鎖認識レクチン (Lectin X) のシグナル (A) および組織染色像 (B)

以上(1)~(3)の検討より、WFA は生物種や心疾患の成因に依らず、組織切片を用いた心筋線維化の検出に有用であることが示唆された。一方、心臓線維芽細胞を用いた心筋線維化モデルでは、WFA のシグナル増加は認められず、本モデルを用いた心臓筋線維芽細胞のマーカーに資する糖タンパク質の同定には至らなかった。一方、本検討から、組織における糖鎖変化を再現するためには、線維芽細胞だけでなく他種の細胞による影響が重要であることが分かった。本研究により、今後の心臓筋線維芽細胞のマーカーに資する糖タンパク質の探索、および心筋線維化における糖鎖変化の意義を理解する上で、重要な知見が得られたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiono Takahiro*, Nagai-Okatani Chiaki*, Kuno Atsushi	4. 巻 4
2. 論文標題 Application of Glycan-Related Microarrays	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Comprehensive Glycoscience (Second Edition)	6. 最初と最後の頁 134 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-819475-1.00059-6	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 Nagai-Okatani Chiaki*, Zou Xia, Fujita Noriaki, Sogabe Isami, Arakawa Kouiti, Nagai Misugi, Angata Kiyohiko, Zhang Yan, Aoki-Kinoshita Kiyoko F., Kuno Atsushi*	4. 巻 20
2. 論文標題 LM-GlycomeAtlas Ver. 2.0: An Integrated Visualization for Lectin Microarray-based Mouse Tissue Glycome Mapping Data with Lectin Histochemistry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Research	6. 最初と最後の頁 2069 ~ 2075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.0c00907	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 該当する
1. 著者名 Boottanun Patcharaporn#, Nagai-Okatani Chiaki#*, Nagai Misugi, Ungkulpasvich Umbhorn, Yamane Shinjiro, Yamada Masao, Kuno Atsushi*	4. 巻 415
2. 論文標題 An improved evanescent fluorescence scanner suitable for high-resolution glycome mapping of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 6975 ~ 6984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-023-04824-2	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 Nagai-Okatani Chiaki*, Zou Xia, Matsuda Atsushi, Itakura Yoko, Toyoda Masashi, Zhang Yan, Kuno Atsushi*	4. 巻 2460
2. 論文標題 Tissue Glycome Mapping: Lectin Microarray-Based Differential Glycomic Analysis of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Sections	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 161 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2148-6_10	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 該当する

1. 著者名 岡谷千晶	4. 巻 35
2. 論文標題 心筋線維化における糖鎖変化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO CLINICA	6. 最初と最後の頁 99-101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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26件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 岡谷 千晶、富岡 あづさ、助川昌子、藤田弥佳、富永 大介、坂上 弘明、久野 敦、梶 裕之
2. 発表標題 Glyco-RIDGE法によるマウス組織糖タンパク質の部位特異的N型糖鎖修飾の大規模分析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会 (JPrOS2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡谷 千晶、藤田 典昭、曾我部 勇、荒川 康一、板倉 陽子、豊田 雅士、安形 清彦、富永 大介、木下聖子、久野 敦
2. 発表標題 LM-GlycomeAtlas Ver.2.1: レクチンを利用した組織グライコーム・データベースのアップデート
3. 学会等名 トーゴの日シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nagai-Okatani Chiaki
2. 発表標題 Multi-faceted glycomics and glycoproteomics: toward the comprehensive understanding of spatial protein glycosylation
3. 学会等名 3rd Australasian Glycoscience Symposium (3rd AGS) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nagai-Okatani Chiaki, Kuno Atsushi, Kaji Hiroyuki
2. 発表標題 Multi-faceted glycomics and glycoproteomics: toward the comprehensive understanding of spatial protein glycosylation
3. 学会等名 10th Asia-Oceania Human Proteome Organization (AOHUPO) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nagai-Okatani Chiaki, Matsuda Atsushi, Wagatsuma Takanori, Kaji Hiroyuki, Yamazaki Ken, Sakamoto Michiie, Hattori Yukio, Kuno Atsushi
2. 発表標題 A multi-faceted system for differential glycoprotein analysis: toward the discovery of disease-related glycosylation alterations using tissue crude samples
3. 学会等名 HUPO ReCONNECT 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡谷 千晶
2. 発表標題 医療応用に向けた糖タンパク質の解析技術の開発
3. 学会等名 The 8th Symposium for Women Researchers (第8回SWR) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡谷 千晶、Zou Xia、藤田 典昭、曾我部 勇、荒川 康一、永井 美杉、安形 清彦、Yan Zhang、木下聖子、久野 敦
2. 発表標題 組織グライコムマップデータベースLM-GlycomeAtlasの組織染色データ表示に関する改良
3. 学会等名 日本プロテオーム学会 2021年大会 (JPrOS2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nagai-Okatani Chiaki, Zou Xia, Fujita Noriaki, Sogabe Isami, Arakawa Kouiti, Nagai Misugi, Angata Kiyohiko, Zhang Yan, Aoki-Kinoshita Kiyoko F, Kuno Atsushi
2. 発表標題 Update on LM-GlycomeAtlas: An integrated visualization for mouse tissue glycome mapping data with lectin histochemistry
3. 学会等名 HUPO Connect 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡谷千晶、木下聖子、藤田典昭、佐藤隆、安形清彦、久野敦
2. 発表標題 組織グライコムマップデータベースLM-GlycomeAtlasの開発
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡谷千晶、富永大介、富岡あづさ、坂上弘明、合田徳夫、洪繁、久野敦、梶裕之
2. 発表標題 GRable Version 1.0 : Glyco-RIDGE法による部位特異的グライコフォーム解析自動化ソフトウェアの開発
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2023年大会 (JPrOS2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡谷千晶、Boottanun Patcharaporn、永井美杉、藤田典昭、新町大輔、安形清彦、藤田晶大、木下聖子、久野敦
2. 発表標題 Glycoinformatics Workshop: LM-GlycomeAtlas ver 2.1
3. 学会等名 GLYC026 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡谷千晶、坂上弘明、藤田晶大、富岡あづさ、富永大介、木下聖子、久野敦、梶裕之
2. 発表標題 GlyCosmos PortalツールとしてのGlyco-RIDGE解析自動化ソフトウェア「GRable」の開発
3. 学会等名 DICP研究交流会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Boottanun Patcharaporn、岡谷千晶、川西邦夫、中務智文、石津智子、久野敦
2. 発表標題 Spatially Different Alterations of N- and O-glycosylations in Rat Hearts with Hypertensive Heart Failure
3. 学会等名 15th HOPE Meeting (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------	---------