

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08266

研究課題名(和文) 嚢胞性腎疾患群の細胞増殖における希少糖ヌクレオチドの意義解明

研究課題名(英文) Significance of rare nucleotide sugar in of cell proliferation of cystic kidney disease

研究代表者

中嶋 和紀 (Nakajima, Kazuki)

岐阜大学・糖鎖生命コア研究所・准教授

研究者番号：10442998

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)：本研究では、単糖機能性食品に着目して、希少糖ヌクレオチドを介する嚢胞性腎疾患群の予防療法開発とバイオマーカー探索を行った。親水性相互作用クロマトグラフィーを用いるメタルフリーな希少糖ヌクレオチド解析システムを構築し、2-デオキシグルコースを添加したメラノーマ細胞から、GDP-デオキシマンノースを検出した。またGDP-マンノースに非依存的な糖鎖変化を探索した結果、UDP-マンノースは1-2結合したマンノシル化に関与する可能性が期待された。さらに嚢胞腎モデルラットを用いて尿糖タンパク質の解析を行い、CA9-19を有する糖タンパク質がPKDの診断マーカーになりえることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は癌の個別化治療において着目されているマンノース療法を嚢胞腎に適用することを目指している。その一環で、希少糖ヌクレオチドの分析法開発と生化学的な意義解明、および糖鎖バイオマーカー開発を行ってきた。その効果は、糖鎖に基づいたPKDに対する予防療法や、治療の予後予測マーカーの確立につながる。本研究では、PKDにおけるUDP-マンノースやGDP-デオキシマンノースの意義を明らかにできなかったが、一方で発見された尿中の糖鎖変化は、キャリアータンパク質を同定することにより、癌と嚢胞腎を迅速に識別する早期診断マーカーにつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to propose preventive therapy for PKD, focusing on monosaccharide functional foods such as mannose via glycosylation. First, we have developed a hydrophilic interaction chromatography-ESI-MS/MS method for discovering rare-nucleotide sugars. UDP-deoxy-mannose and GDP-deoxy-mannose were detected in melanoma cell line supplemented with 2-deoxy glucose, by predicting multi-reaction monitoring method. On the other hands, UDP-mannose was expected to involve alpha1-2-mannosylation in N-glycan biosynthesis, by glycomics of Lec15 cell line supplemented with mannose. We also found different profiles of CA9-19 epitopes in urinary glycoproteins during PKD progression, indicating that the possibility of glycoprotein biomarkers in early diagnosis of PKD.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：嚢胞性腎疾患群 糖ヌクレオチド グライコプロテオミクス グルコース代謝 細胞増殖 糖鎖バイオマーカー

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 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

嚢胞性腎疾患群は腎全体に無数の嚢胞が発生する遺伝性の腎疾患である。その病因はポリシスチン *PKD1* という糖タンパク質が遺伝的に欠損して、細胞増殖が亢進して嚢胞が拡大、病態が悪化する。バソプレシン受容体阻害剤(トルバプタン)は唯一の治療薬として病態進行を遅らせる目的で用いられる。しかしトルバプタンには多尿など日常生活に支障をきたす副作用があることや、薬価が高いことが問題になっている。

「糖鎖修飾」はリン酸化などと同様に普遍的なタンパク質の翻訳後修飾である。タンパク質の多くは糖鎖修飾を受けて初めて機能を発揮する。最近では、常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)患者において、マンノース糖鎖代謝酵素(*Alg9*, *PMM2*)の遺伝子変異が見出された(Fedeles et al. *Nat. Genetics*, 2011)。糖タンパク質糖鎖の異常がその病態形成に関わることが報告されている(Inoue et al. *JASN*, 2014)、そのメカニズムは殆ど不明である。

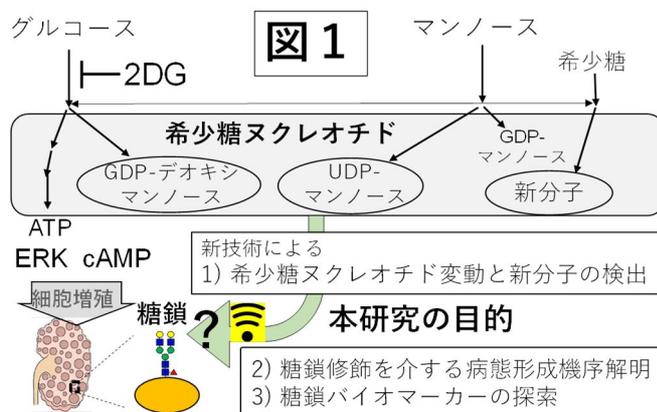
2-デオキシグルコース(2DG)はADPKDの新たな治療標的として着目されている。2DGはグルコース代謝を阻害してATP産生を抑制、サイクリックAMP(cAMP)などを介して細胞増殖を抑えられている(Rowe et al. *Nat. Med.*, 2013)。

これらの単糖代謝は、糖ヌクレオチドを介して糖鎖の発現と密接に連動する。例えば、2DGからGDP-デオキシマンノースが作られ、その希少糖ヌクレオチドがアスパラギン結合型糖鎖の分解を誘導することが明らかにされている(Harada et al. *Cell Reports*, 2020)。このことからPKDにおいても、希少糖ヌクレオチドが「鍵」として病態形成に関わることが示唆される。

マンノースは、PKDの治療や予防において有望な候補物質の一つである。マンノースは毒性が少ないだけでなく、腫瘍増殖を抑える作用がある(Gonzalez et al. *Nature*, 2018)。レアシュガー(希少糖)として知られるD-アロースも腫瘍増殖を抑える作用が報告されている(Noguchi et al. *Tohoku. J. Exp. Med.* 2016)。以上のような理由から、マンノースを中心とする「糖鎖」や「希少糖ヌクレオチド」シグナルの解明は、糖鎖を介した病態機序解明やバイオマーカー探索に有用と考えた。

### 2. 研究の目的 (図1)

近年、グルコースやフルクトース以外の単糖が着目され、2DGが嚢胞腎の細胞増殖を抑える効果があることが明らかにされている。そのメカニズムの一つとして糖鎖修飾を介する制御が重要であると考えられるが、未解明のままである。本研究では申請者が見出した「GDP-2-デオキシマンノースやUDP-マンノース」が鍵となる分子と考え、細胞増殖が亢進している嚢胞性腎疾患群の病態抑制機序を理解してゆく。具体的には、希少糖ヌクレオチドの探索技術を構築し、糖鎖修飾における意義と、病態への関与およびバイオマーカー探索を行うことが目的である。



### 3. 研究の方法

#### (1) 希少糖ヌクレオチドの測定法

本研究では過去に最適化した糖ヌクレオチドの一斉定量法(Nakajima et al. *Glycobiology*, 2010, *Mol. Cell. Proteomics*, 2013)を土台に、希少糖ヌクレオチド探索法へアップデートを行った。細胞株はメラノーマ細胞(B16)あるいは、嚢胞腎患者由来遠位尿管細胞株(W9-12)を用いて、各希少糖を加えた細胞から代謝産物を抽出、高速液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)を用いて糖ヌクレオチドを測定した。

## (2) 希少糖ヌクレオチドを介する糖鎖修飾の解析

GDP-マンノースは Dol-P-Man の合成酵素によってドリコールリン酸マンノースに代謝され、マンノシル化に用いられる。本研究では、GDP-マンノースに非依存的な糖鎖修飾を探るため、Dol-P-Man 合成酵素を欠損した細胞株(Lec15)にマンノースを添加して、UDP-マンノースに依存的な糖鎖変化を探索した。糖鎖変化の検証実験は、マンノース認識レクチンを用いる細胞染色や、キャピラリーアフィニティー電気泳動により行った。

## (3) 嚢胞腎モデル動物の尿中糖タンパク質の解析

ネフロン癆モデルラット(Cy ラット)から 6 週齢以降 18 週齢まで 2 週ごとに時系列で採尿した (n=2)。得られた尿をアセトン沈殿した後、CA9-19 抗体や抗 O-GlcNAc 化抗体に対するウエスタンブロットなどを行った。

## 4. 研究成果

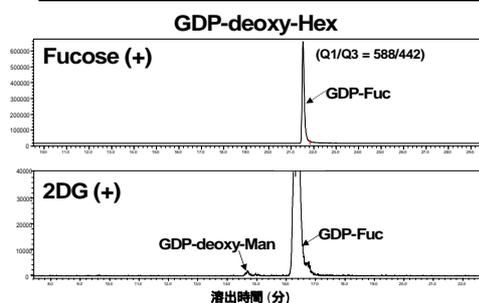
### (1) 希少糖ヌクレオチドの測定法

本研究では親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)による 3 種類の分離カラムを検討した。特に、分析システムへの糖ヌクレオチドの吸着に注意をして、メタルフリーのシステムを構築、さらにメタルフリーのアミドカラムも採用した。微量分子の探索実験は、マンノースから類縁される糖ヌクレオチドの構造を予測して、想定される分子群の全 Multi-reaction monitoring (MRM)の条件を構築した。

メラノーマ細胞にフコースおよび 2DG を添加して微量分子を検出した結果を示す(図 2)。8 種の予測 MRM により測定したところ、2DG の添加時において GDP-deoxy-Man が検出された。この GDP-deoxy-Man は HILIC により GDP-フコースと良好に分離されていた。本実験系は希少糖ヌクレオチドの探索実験に有用であることが明らかになった。

**図 2**

	Precursor ion(Q1)	Product ion(Q3)
[GDP-Hex ]	604.1	442
	604.1	362
[GDP-dHex]	588.1	442
	588.1	362
[GDP-pentose]	574.1	442
	574.1	362
[GDP-HexNAc]	655.1	442
	655.1	362



### (2) 希少糖由来の糖ヌクレオチド誘導体の探索

天然に存在しない希少糖は機能性食品として実用化が進んでいる。本研究では希少糖の生理機能解明を目的として、希少糖由来の希少糖ヌクレオチドを探索した。メラノーマ細胞株に約 10 種類の希少糖(D-アロース、D-プシコース、D-タガトースなど)を加えて、未知ピークを検出した。まず D-アロースを添加したところ UDP-GlcNAc が著しく減少すること、それに伴いタンパク質の O-GlcNAc 化に影響がみられた。

D-アロース添加時には UDP-アロースが生じる可能性が期待された。そこで、予想される UDP-アロースの標準品を、無保護ヌクレオチド二リン酸と D-アロースのクロスカップリングを介して化学合成を行った。その化学合成品とは一致しなかったことから、UDP-アロースは存在しないことが明らかになった。

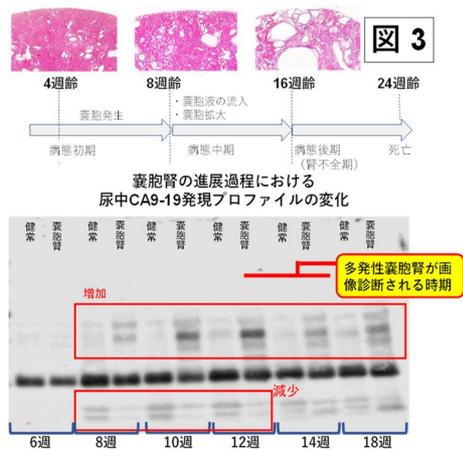
### (3) UDP-マンノース由来糖鎖修飾反応の探索

本研究ではマンノース認識レクチンを用いた検討により、 $\alpha$ 1-2 結合したマンノシル化に UDP マンノースが関わっている可能性が示唆された。現在、レクチンに対する糖鎖エピトープの同定ならびに、UDP-マンノース依存的な糖鎖変化およびキャリアタンパク質の同定を進めている。

#### (4) UDP-マンノース由来糖鎖修飾反応の探索

Cy ラットから時系列に採尿したタンパク質試料を用いて、CA9-19 糖鎖や O-GlcNAc 化糖鎖を有する糖タンパク質の変化を観察した。その結果、8 週齢以降で、CA9-19 糖鎖をもつ微量成分の糖タンパク質の発現が増加・減少していた (図 3)。

本研究で見出した微量な CA9-19 糖タンパク質は、特異的な早期診断マーカーとして期待されるため、現在、グライコプロテオミクスによってキャリアタンパク質の同定を進めている。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Umezawa F, Natsume M, Fukusada S, Nakajima K, Yamasaki F, Kawashima H, Kuo CW, Khoo KH, Shimura T, Yagi H, Kato K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Cancer Malignancy Is Correlated with Upregulation of PCYT2-Mediated Glycerol Phosphate Modification of -Dystroglycan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 6662
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23126662.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ohyama Y, Yamaguchi H, Ogata S, Chiurlia S, Cox SN, Kouri NM, Stangou MJ, Nakajima K, Hayashi H, Inaguma D, Hasegawa M, Yuzawa Y, Tsuboi N, Renfrow MB, Novak J, Papagianni AA, Schena FP, Takahashi K.	4. 巻 25
2. 論文標題 Racial heterogeneity of IgA1 hinge-region O-glycoforms in patients with IgA nephropathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.105223	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Saitoh S, Takaki T, Nakajima K, Wo B, Terashima H, Shimo S, Nguyen HB, Thai TQ, Kumamoto K, Kunisawa K, Nagao S, Tojo A, Ohno N, Takahashi K.	4. 巻 18
2. 論文標題 Treatment of tubular damage in high-fat-diet-fed obese mice using sodium-glucose co-transporter inhibitors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plos One	6. 最初と最後の頁 e0281770.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0281770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kinishita M, Nakajima K, Yamamoto S, Suzuki S.	4. 巻 418
2. 論文標題 High-throughput N-glycan screening method for therapeutic antibodies using a microchip-based DNA analyzer: a promising methodology for monitoring monoclonal antibody N-glycosylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anal Bioanal Chem	6. 最初と最後の頁 4727-4738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00216-021-03434-0	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 Ryuge A, Kosugi T, Maeda K, Banno R, Gou Y, Zaitso K, Ito T, Sato Y, Hirayama A, Tsubota S, Honda T, Nakajima K, Ozaki T, Kondoh K, Takahashi K, Kato N, Ishimoto T, Soga T, Nakagawa T, Koike T, Arima H, Yuzawa Y, Minokoshi Y, Maruyama S, Kadomatsu K.	4. 巻 6
2. 論文標題 Basigin deficiency prevents anaplerosis and ameliorates insulin resistance and hepatosteatosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e142464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.142464.	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 Kidoguchi S, Kitada K, Nakajima K, Nakano D, Ohsaki H, Kittikulsuth W, Kobara H, Masaki T, Yokoo T, Takahashi K, Titze J, Nishiyama A	4. 巻 289
2. 論文標題 Hepatocellular carcinoma induces body mass loss in parallel with osmolyte and water retention in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sci	6. 最初と最後の頁 120192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2021.120192	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 Koseki T, Nakajima K, Iwasaki H, Yamada S, Takahashi K, Doi Y, Mizuno T	4. 巻 115
2. 論文標題 Baseline uric acid levels and steady-state favipiravir concentrations are associated with occurrence of hyperuricemia among COVID-19 patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Infect Dis	6. 最初と最後の頁 218-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijid.2021.12.324	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 Farshadyeganeh P, Nazim M, Zhang R, Ohkawara B, Nakajima K, Rahman MA, Nasrin F, Ito M, Takeda JI, Ohe K, Miyasaka Y, Ohno T, Masuda A, Ohno K	4. 巻 20
2. 論文標題 Splicing regulation of GFPT1 muscle-specific isoform and its roles in glucose metabolisms and neuromuscular junction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 107746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.107746	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 Iwamoto S, Kobayashi T, Hanamatsu H, Yokota I, Teranishi Y, Iwamoto A, Kitagawa M, Ashida S, Sakurai A, Matsuo S, Myokan Y, Sugimoto A, Ushioda R, Nagata K, Gotoh N, Nakajima K, Nishikaze T, Furukawa JI, Itano N	4. 巻 15
2. 論文標題 Tolerable glycometabolic stress boosts cancer cell resilience through altered N-glycosylation and Notch signaling activation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Death Dis	6. 最初と最後の頁 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-024-06432-z	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8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 中嶋和紀
2. 発表標題 HILL-ion mobility-ESI-MS/MSシステムにおける希少糖ヌクレオチドの探索
3. 学会等名 第41回日本糖質学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中嶋和紀
2. 発表標題 糖異性体の分離技術を駆使した希少糖ヌクレオチドの探索
3. 学会等名 第95回日本生化学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuki Nakajima
2. 発表標題 High-throughput analytical system for tracing nucleotide sugar-driven glycosylation
3. 学会等名 JSPS Core-to-Core Program, UGLIP Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中嶋和紀、木下充弘、星雅人、高橋和男
2. 発表標題 HILIC-ESI-MS/MSによる希少糖ヌクレオチドの探索
3. 学会等名 第40回 日本糖質学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuki Nakajima
2. 発表標題 Platform for rapid plasma N-glycoproteomics using magnetic beads and application for biomarker discovery
3. 学会等名 Protein Metrics, Japanese User Group Meeting (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 半澤健、他那、村上怜子、門松健治、中嶋和紀
2. 発表標題 ヒューマングライコームプロジェクト：疾患糖鎖関連カタログを作成する迅速グライコプロテオミクス基盤の検討
3. 学会等名 第48回医用マススペクトル学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuki Nakajima, Ken Hanzawa, Reiko Murakami
2. 発表標題 Magnetic beads-based method of plasma N-glycoproteomics toward automated analysis
3. 学会等名 Society for Glycobiology 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuki Nakajima
2. 発表標題 Screening and quantification of low abundance nucleotide sugars by HILICESI- MS/MS to trace rare sugar-driven glycosylation
3. 学会等名 Glyco26 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 中嶋和紀	4. 発行年 2023年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 8
3. 書名 嚢胞性腎疾患群における糖代謝を介する糖鎖シグナルの意義, 腎臓内科	

1. 著者名 村上 怜子・中嶋 和紀	4. 発行年 2023年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 3
3. 書名 糖ペプチドマップベースの迅速グライコプロテオミクス基盤、Medical Science Digest	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://medical.jiji.com/topics/2621">https://medical.jiji.com/topics/2621</a> <a href="https://www.fujita-hu.ac.jp/news/j93sdv00000gdz0.html">https://www.fujita-hu.ac.jp/news/j93sdv00000gdz0.html</a>
--

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
研究 分 担 者	長尾 静子  (Nagao Shizuko)  (20183527)	藤田医科大学・病態モデル先端医学研究センター・教授   (33916)	
研究 分 担 者	高橋 和男  (Takahashi Kazuo)  (90631391)	藤田医科大学・医学部・教授   (33916)	

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