

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659754

研究課題名(和文) グライコプロッティング法を用いた糖尿病網膜症関連糖鎖の探索

研究課題名(英文) Analysis of N-glycans associated with diabetic retinopathy

研究代表者

石田 晋 (Ishida, Susumu)

北海道大学・医学(系)研究科(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) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：核酸と蛋白質に続く第三の鎖状生命分子として、糖鎖分子が近年注目されている。蛋白質の受ける糖鎖修飾は「翻訳後修飾」の中でも重要なプロセスであり、糖鎖構造の変化は蛋白機能にも影響を与える。本研究において、我々は硝子体中のN型糖鎖を網羅的に解析する手法を検討した。非糖尿病網膜症(黄斑上膜、黄斑円孔)患者20例における血漿中と硝子体中のN型糖鎖を比較検討したところ、糖鎖量は硝子体中では血漿中と比較して統計学的有意に低かった。また、硝子体中と血漿中の双方で最も多く含まれていたN型糖鎖は共通であり、その構造は(Hex)2(HexNAc)2(NeuAc)2+(Man)3(GlcNAc)2であった。

研究成果の概要(英文)：Glycans are biopolymers bearing biological information and regarded as the third major class of cellular macromolecules, following nucleic acids and proteins. Glycosylation is an important process of post-translational modification that changes the functions of proteins. In this study, we analyzed the profile of N-glycans in human vitreous fluid obtained from patients with non-proliferative vitreoretinal diseases such as epiretinal membrane and macular hole (n=20). The concentration of N-glycans in vitreous samples was significantly lower compared with those in plasma samples. In both samples, predominant N-glycan was common and the structure is [(Hex)2(HexNAc)2(NeuAc)2+(Man)3(GlcNAc)2].

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：糖尿病網膜症 糖鎖 グライコプロッティング

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病網膜症の病態

超高齢社会を迎えた我が国では今後罹病期間の長い糖尿病患者が増え、そして合併症の一つである糖尿病網膜症 (diabetic retinopathy, DR) の罹患率も増加の一途をたどることがすでに疫学上明らかとなっている。DR は、糖尿病によって生じる網膜細小血管障害を原因として発症する疾患である。本症はその病期進行とともに多彩な臨床所見を呈するが、その病態機序は網膜の細小血管構築の破壊、血流障害にともなう虚血、そしてそれに対する生体の代償機転である眼内血管新生が一連の変化として生じるものである。進行例では視機能喪失をきたすため、早期発見および適切な治療介入が重要な疾患であり、その病態メカニズムの解析および新規治療標的の探索は急務と言える。

(2) 第三の生命鎖 糖鎖

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。ヒトゲノム計画によって遺伝子配列が決定された結果、蛋白質の半数以上が糖鎖修飾を受けることが明らかとなり、糖鎖修飾は蛋白質の機能調節に重要な役割を持つ「翻訳後修飾」の中でも重要な現象として広く認識されるようになった。また、糖鎖構造の変化が蛋白機能に影響を与えることはよく知られており、erythropoietin や intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 などの分子は糖鎖構造の変化によってその機能が亢進すると報告されている。これらの分子は DR の病態に関与することがすでに明らかとされており、本疾患においてもこのような病態関連分子に糖鎖変化が生じているかは大変興味深い点である。以上より、糖尿病における糖鎖変化を検討することは、その病態のさらなる理解や新しい治療標的分子の発見につながる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、DR 眼内における糖鎖変化の検討をおこなう前段階として、non-DR 患者の血漿および硝子体液を対象にその糖鎖プロファイルを解析することをその目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血漿および硝子体液のサンプリング

北海道大学病院眼科で硝子体手術を施行される non-DR 患者 20 例 (黄斑上膜 9 例および黄斑円孔 11 例) より、血液・硝子体液の検体採取をおこなった。男女比は 1:1 であった。血液検体は入院中ルーチンでおこなう血液検査の際に、硝子体液は前述の手術中に採取されるために、対象患者には本検体採取による追加の侵襲的検査は生じない。また、本研究計画は北海道大学病院高度先進医療支援センターによる自主臨床研究の承認を得ている (承認番号 011-0172)。

(2) 臨床検体を用いたグライコプロッティング法解析

non-DR 患者群の血漿および硝子体液における糖鎖をグライコプロッティング法 (図 1) により網羅的に解析し、比較検討する。本法は、アルデヒド基に速やかに求核付加するヒドラジド基を高密度で表面に持つビーズを、酵素処理によって予め根元の蛋白質から切断した糖鎖を含む試料溶液と反応させ糖鎖のみを担体に共有結合させる。これにより夾雑物を完全に洗浄して糖鎖のみを精製することができる手法である。そして、得られた糖鎖をビーズから切り離した後、質量分析に供することで網羅的な糖鎖解析をおこなう。

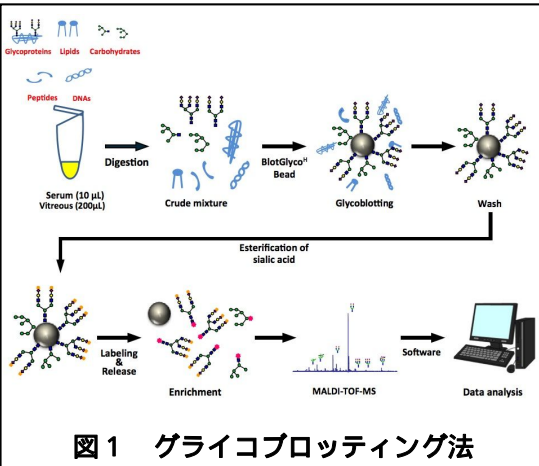


図 1 グライコプロッティング法

4. 研究成果

(結果)

(1) 血漿と硝子体液における糖鎖の比較

図 2 に血漿および硝子体液における糖鎖解析の一例を示す。

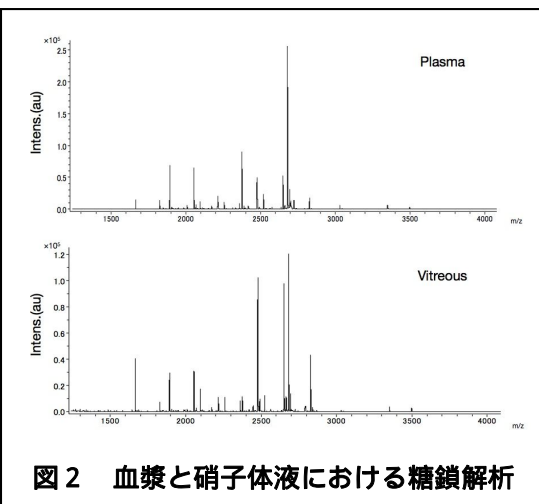


図 2 血漿と硝子体液における糖鎖解析

硝子体中では 13 種類の糖鎖が検出され、全ての糖鎖が血漿中で検出された 32 種類の糖鎖に含まれていた。それぞれの糖鎖の組成を比較すると、血漿中および硝子体中で最も多く含まれていた糖鎖は共に (Hex)₂(HexNAc)₂(NeuAc)₂+ (Man)₃(GlcNAc)₂ で共通であった (図 3)。同糖鎖は、硝子体中では 37.2 ± 3.1%、血漿中では 39.7 ± 1.1%

含まれていたが、その他の糖鎖については、硝子体と血漿の間で組成の異なるものが複数存在した(図4)。

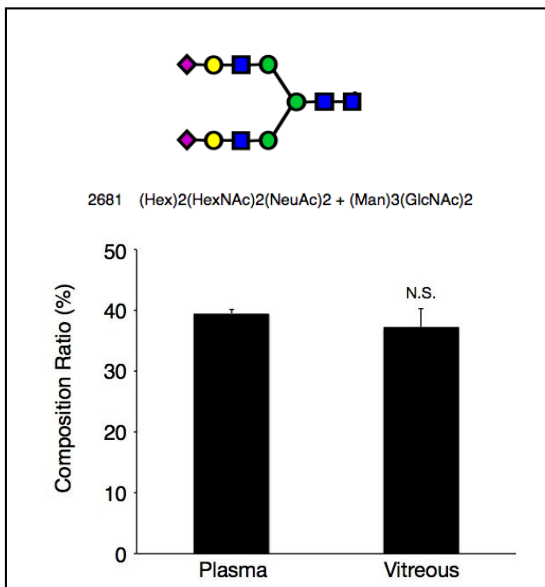


図3 血漿および硝子体に最も多く含まれていた糖鎖 (上図) その糖鎖構造。(下図) その含有率は血漿および硝子体液において同等であった。

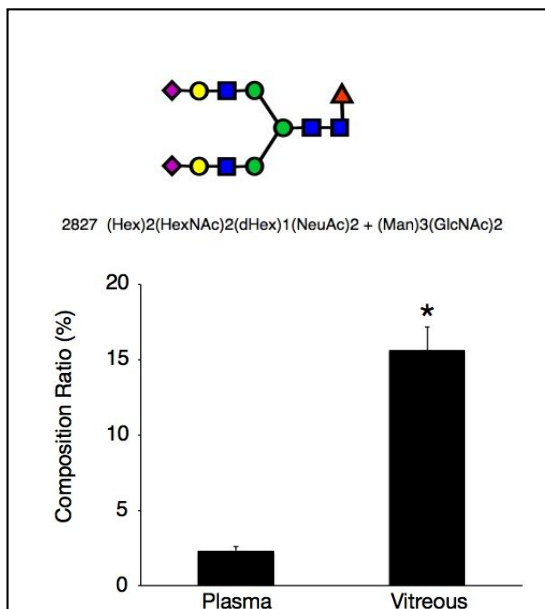


図4 血漿と比較して硝子体におけるその組成比が高かった糖鎖の一例 (上図) その糖鎖構造。(下図) その含有率は硝子体液において高かった ($P < 0.05$)。

また、単位蛋白当たりの糖鎖量は硝子体中では $132.3 \pm 29.1 \text{ pmol}/100 \mu\text{g protein}$ ($n=20$)、血漿中では $713.6 \pm 29.3 \text{ pmol}/100 \mu\text{g protein}$ ($n=20$)であり、硝子体中では血漿中と比較して統計学的有意に低かった(図4, $P < 0.001$)。

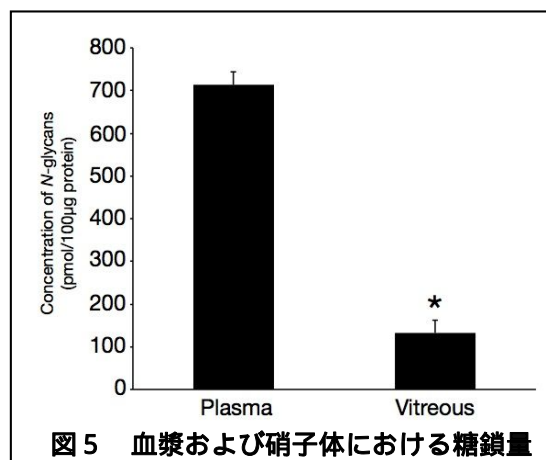


図5 血漿および硝子体における糖鎖量

(2) 硝子体中の糖鎖の比較

単位蛋白当たりの糖鎖量は、男性では $121.0 \pm 33.1 \text{ pmol}/100 \mu\text{g protein}$ ($n=10$)、女性では $143.6 \pm 49.5 \text{ pmol}/100 \mu\text{g protein}$ ($n=10$)であり、統計学的に有意な差は認めなかった ($P=0.80$)。

同様に、黄斑円孔群の単位蛋白当たりの糖鎖量は $120.8 \pm 45.5 \text{ pmol}/100 \mu\text{g protein}$ ($n=11$)、黄斑上膜群では $146.2 \pm 35.6 \text{ pmol}/100 \mu\text{g protein}$ ($n=9$)であり、2群間に統計学的に有意な差は認めなかった ($P=0.50$)。

また、糖鎖の組成について検討した結果、最も多く含まれていた糖鎖は全ての群で共通しており 2681 (Hex)2(HexNAc)2(NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2であった。さらにその他の糖鎖の組成についても男女間、黄斑円孔/黄斑上膜間で有意な差を認めたものはなく、各群の糖鎖の組成は類似していた。

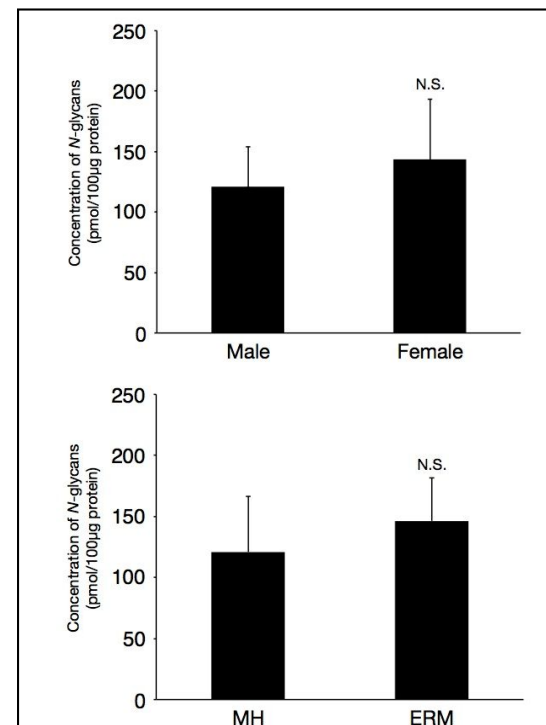


図6 各群における糖鎖濃度の比較 (上図) 男女間における比較 (下図) 黄斑円孔(MH)と黄斑上膜(ERM)における比較。

(考察)

本研究において、硝子体液におけるグライコプロット法を用いた糖鎖解析法を確立した。これまで同検体における糖鎖解析を網羅的におこなった報告はなく、本検討は硝子体液でも網羅的な糖鎖解析が可能であることを示し、眼科領域における糖鎖研究のさきがけとなるものである。本検討結果によって、1) 硝子体中の蛋白あたりの糖鎖量は血漿中の5分の1程度と少ないこと、2) 眼内には血漿成分とは独立した N-glycan のプロファイルが存在すること、3) non-DR 患者の硝子体中糖鎖は、男女間あるいは黄斑円孔患者と黄斑上膜患者間で差がないこと、つまり今後 DR 患者の硝子体液における糖鎖プロファイルとの比較をおこなうにあたり、同一のコントロール群として用いることができることを示唆していた。

今後は本検討結果を基礎データとして、DR 患者の眼内における糖鎖プロファイルの変化を検討する予定である。

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1件)

Saori Inafuku, Kousuke Noda, Maho Amano, Tetsu Ohashi, Chikako Yoshizawa, Wataru Saito, Atsuhiko Kanda, Shin-ichiro Nishimura, and Susumu Ishida, A Comparison of N-glycan Profiles in Human Plasma and Vitreous Fluid, Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 査読有, in press.

〔学会発表〕(計1件)

Takashina S, Noda K, Amano M, Saito W, Nishimura S, Ishida S. Profile analysis of glycans in human vitreous. APVRS (8th Asia Pacific Vitreo-retina Society) Congress / 52nd Annual Meeting of Japanese Retina and Vitreous Society: Nagoya, Japan; 2013/12/6-8

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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・大学院医学研究科・教授
研究者番号：10245558

(2)研究分担者

西村 伸一郎 (NISHIMURA, Shin-ichiro)
北海道大学・先端生命科学研究科・教授
研究者番号：00183898

天野 麻穂 (AMANO, Maho)
北海道大学・創成研究機構・特任助教
研究者番号：80365808

(3)連携研究者

なし