

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：84404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890306

研究課題名(和文)糖鎖修飾変動に基づく心不全関連タンパク質の網羅的同定と新規心不全マーカーへの応用

研究課題名(英文)Glycoproteomic approach for identification of heart failure-related proteins as a novel biomarker

研究代表者

永井 千晶(Nagai, Chiaki)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：30633648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：心不全の治療法の開発には、重症度を定量的に評価することのできるバイオマーカーが必須である。本研究では、グライコプロテオーム解析により、既存マーカーと併用できる新規心不全マーカーの同定を目指した。

まず、高血圧性心不全モデルラットの左心室において、心肥大および心不全の進行に伴い特徴的な変動を示す糖鎖構造を同定した。この解析から、糖鎖修飾の変動に寄与する糖脱離酵素の血中活性が新規の肥大マーカーとなる可能性が示された。さらに、同定した糖鎖修飾の変動を示す糖タンパク質を左心室組織および血漿から探索した結果、マーカー候補として40以上の心不全関連糖タンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：To develop a therapeutic strategy for heart failure, a novel biomarker which enables to quantify the degree of the disease is highly required. In the present study, we aimed to identify a novel biomarker which could serve as a valuable supplement to the existing markers for more accurate diagnosis and prognosis of heart failure, using a glycoproteomic approach.

We first analyzed a glycosylation profile in the left ventricle of hypertension-induced rats during cardiac hypertrophy and heart failure, identifying altered glycan structures reflecting the degree of the disease. Our data also indicated that plasma enzymatic activity of a deglycosylation enzyme responsible for the characteristically altered glycosylation would be a novel biomarker for hypertrophy. In addition, glycoproteomic analysis targeting the left ventricle and plasma identified over 40 glycoproteins related to heart failure as biomarker candidates.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：心不全 バイオマーカー グライコプロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 新規心不全マーカーの必要性

心不全は、心臓のポンプ機能低下により末梢組織に必要な血液量を供給できない状態を指し、多様な要因により発症する。心不全に対する抜本的治療法がないのが現状であり、治療法の開発が強く求められている。心不全の治療法開発を困難にしているのは、心不全が多様な要因により心筋細胞の調節機能が破綻した終末像であるという特徴にある。そのため、心不全の有効な治療法を開発し、治療効果を適切に評価するためには、成因ごとの病態や心筋細胞で生じる生理変化を正確かつ定量的に診断できるマーカーが不可欠である。

心不全マーカーとしては、心不全の重症化に伴い心臓での発現が増加する生理活性ペプチド、B型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)が臨床で汎用されている。血中BNP濃度は心筋への圧・容量負荷に対する良い指標となるが、心不全の発症・重症化での心筋細胞の生理変化は読み取れず、心不全の病型を判別することはできない。病型や病態、予後、治療効果を正確かつ総合的に評価するためには、新たな心不全マーカーが必要である。

(2) 疾患マーカー探索のストラテジー

疾患マーカーの探索には、プロテオーム解析が多用されている。不全心を対象としたプロテオーム解析の報告例もあるが、未だ上記の条件を満足する心不全マーカーは同定されていない。従来プロテオーム解析のように「タンパク質の量的変動」を指標とすると、多量に存在するタンパク質の妨害により、同定できるタンパク質が限定される。

タンパク質上のリン酸化や糖鎖修飾などの翻訳後修飾は、生命活動の制御において重要な役割を担う。そのため、翻訳後修飾の分子機構が破綻し、異常な修飾を有するタンパク質が生じることが、疾患の発症や重症化に関与する。そこで、疾患マーカー探索では、翻訳後修飾の変動という「タンパク質の質的変動」を指標とした解析が多くの実績を挙げている。特に、哺乳類の糖タンパク質の約半分は分泌性であることから、血中で検出できるマーカー探索において、糖鎖修飾が注目されている。疾患マーカー探索に糖鎖修飾が利用されている例として有名な疾患は、がんであり、腫瘍の種類により特徴的な糖鎖構造が認められる。一方、心不全では、グライコームにおける糖鎖プロファイルにはどのような変動が生じるかということは未だ調べられていなかった。

一方、心不全状態ではBNP前駆体(proBNP)のN末端領域にO-結合型糖鎖が付加すること、および、プロセシング部位の近傍にこの糖鎖修飾が付加するとfurinによる活性型BNP-32へのプロセシングが阻害されることが明らかとなった。また、心不全患者の血中では、proBNP/BNP-32の比率が上昇していることが

見出された。これらの知見から、心不全患者の心筋細胞では糖鎖修飾異常が生じており、心筋細胞で産生されたproBNPは正常なプロセシングを受けず血中に分泌され、活性型BNP-32の産生が減少するため重症化につながると考えられる。このモデルをproBNPからプロテオームに拡張すると、心不全状態の心筋細胞内では、多様なタンパク質で糖鎖修飾が変動し、その質的変動が心不全状態を反映する指標となると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、既存の心不全マーカー、BNPとは異なる心筋の生理変化を検出可能とする、新規の心不全診断用血液マーカーの開発を目指した。上述の背景から、糖鎖修飾の変動を指標とした心不全マーカーが有効であると考えられた。そこで、本研究ではまず、心不全状態の心臓では、どのような糖鎖修飾の変動が生じているかを明らかにすることを目的とした。グライコームにて心不全の重症度と相関のある特徴的な糖鎖量の変動が認められた場合、その糖鎖修飾の概要を同定する。そして、その糖鎖修飾の変動を指標としたグライコプロテオーム解析を実施し、心不全に関連した糖タンパク質を網羅的に同定する。同定された糖タンパク質について、量的・質的変動と心不全病態との相関性、局在、血中での測定可否を検討することにより、血液マーカーとなる候補タンパク質を絞り込む。

3. 研究の方法

(1) 実験対象

本研究では、高血圧性心不全モデルであるDahl salt-sensitiveラットを実験対象とした。このモデルでは、継続的な高塩摂取により、慢性高血圧を発症し、圧・容量負荷による心肥大を呈し、やがて心不全に至る。このモデルの8% NaCl食(high-salt; HS)群と0.3% NaCl食(low-salt; LS)群をそれぞれ心不全群・対照群とした。HS群では、12週齢では顕著な心肥大を認めるが心機能は維持されており、16週齢では顕著な心機能低下が認められ、心不全状態となる。本研究では、高血圧性心不全にて特に負荷が大きくかかり顕著な肥大が認められる左心室(LV)を解析対象とした。

(2) ANPの血漿直接測定系の構築

ラット・マウスなどのモデル動物では、利用できる血漿量が限られるため、高感度のANP定量法が必要とされる。そこで、2種類のANP特異的抗体を用いた化学発光酵素免疫測定法によるANP定量法を構築した。

(3) 糖鎖遺伝子の発現変動解析

心不全の進行に伴う糖鎖修飾の分子機構の変動を調べるため、糖鎖の付加および脱離に関与する酵素をコードする85の糖鎖遺伝

子についてLVでの遺伝子発現を、HS群とLS群の群間で比較解析した。qPCRアレイを用いたスクリーニングの後、有意な変動が認められた遺伝子について、別プライマーを用いたqPCRおよびウエスタンブロット解析、酵素活性測定を行い、評価検討した。

(4) LVと血漿のグライコームの糖鎖プロファイリング

心不全の進行によりグライコームにおいて認められる変動の特徴を調べるため、糖鎖プロファイルを解析した。LV組織ライセートと7種類の多量タンパク質を除去した血漿に対して、45種のレクチンを用いたレクチンマイクロアレイにより群間で比較解析した。

(5) グライコпротеオーム解析による心不全関連糖タンパク質の同定

(3)、(4)の解析により同定された心不全に特徴的な糖鎖修飾の変動に注目し、グライコпротеオーム解析を実施した。

具体的には、(3)の解析により、糖鎖修飾の変動の検出に最適なレクチンが同定できる。そこで、当該レクチンカラムを用いたアフニティー精製により回収した糖タンパク質を用いて、蛍光二次元電気泳動法(2D-DIGE)による群間比較解析を実施した。また、別の方法として、二次元電気泳動後のサンプルをPVDF膜に転写し、SYPRO Rubyによる総タンパク質染色の後、当該レクチンを用いたレクチンプロットングを実施し、タンパク質量に対して糖鎖量が変動するタンパク質を検出する。これらの解析から、変動が認められたスポットについて、ゲルからの切り出し、脱糖鎖処理、トリプシン消化の後、質量分析を行い、タンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) ANPの血漿直接測定系の構築

全ANP分子型を認識する高力価ポリクローナル抗体を固相化抗体とし、アルカリホスファターゼ標識した検出抗体と組み合わせて使用した。固相化抗体Fc領域への非特異的結合を低減するため、抗体を固相化後、ポリエチレングリコール修飾(PEG化)した。固相化抗体のPEG化により、低濃度領域の検量線の直線性が改善し、感度が向上した。測定範囲は0.1-250 pM、検出限界は0.13 pMであった。感度、精度、確度、特異性、再現性に優れ、血漿を直接測定可能であるANP測定系が構築できた。本測定系は、検出抗体をヒトANP各分子型に対する特異的抗体に変更することにより、ヒトでの個別測定に適用できることが示唆された。測定系の構築で有効性が示された固相化抗体のPEG化は、簡便でIgG抗体に広く適用可能であるため、今後の測定系構築での応用が期待される。

(2) 心不全に特徴的な糖鎖修飾構造の同定

qPCRアレイによる糖鎖遺伝子の発現変動

解析の結果、HS群では9の糖鎖遺伝子の発現が顕著に増加していた。それらの糖鎖遺伝子は下記の通り分類された。

ムチン型O-結合型糖鎖の生合成の最初のステップであるN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を付加する3種のGALNTs、および次のステップのCore 1合成酵素およびその特異的シャペロン

N-結合型糖鎖コアフコースの脱離酵素
(-L-フコシダーゼ; AFU)

O-N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)修飾の付加酵素および脱離酵素
-ガラクトシダーゼ

と関連して、LVにおけるCore 1合成酵素活性はHS群で顕著に上昇していた。一方、レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリング解析では、の糖鎖構造を認識する *Amaranthus caudatus* agglutinin (ACA) のシグナルの減少、および の糖鎖構造を特異的に認識する *Aspergillus oryzae* lectin (AOL) のシグナルの減少が認められた。これらのレクチンのシグナルの変動は、12週齢から16週齢へと進行的であり、LVと血漿とで同様の変動が認められた。以上の結果から、心肥大や心不全状態のLVでは、およびに関連した糖鎖修飾機構の変動およびそれによる糖鎖修飾の変動が生じており、それらの変動はACA、AOLで検出できることが明らかになった。

の糖鎖修飾変動に関連し、どのような糖鎖構造が増加しているかを明らかにするため、ムチン型O-結合型糖鎖生合成の各ステップを触媒する糖転移酵素の遺伝子発現をqPCRにて解析した。その結果、HS群のLVでは、disialyl-Tの生合成が亢進し、その他の糖鎖構造への変換が抑制されていた(図1)。

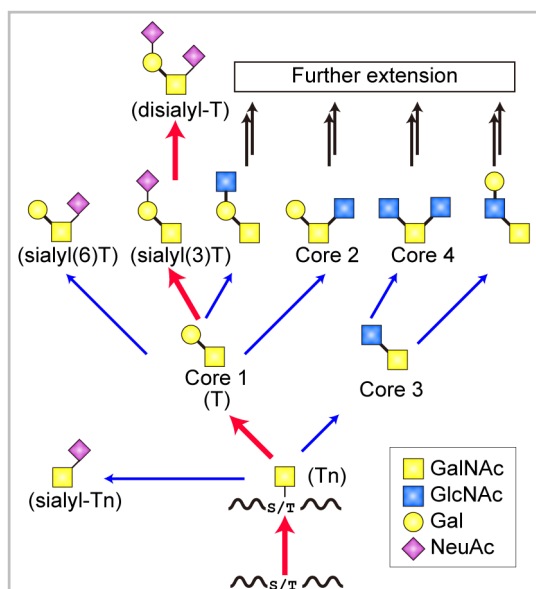


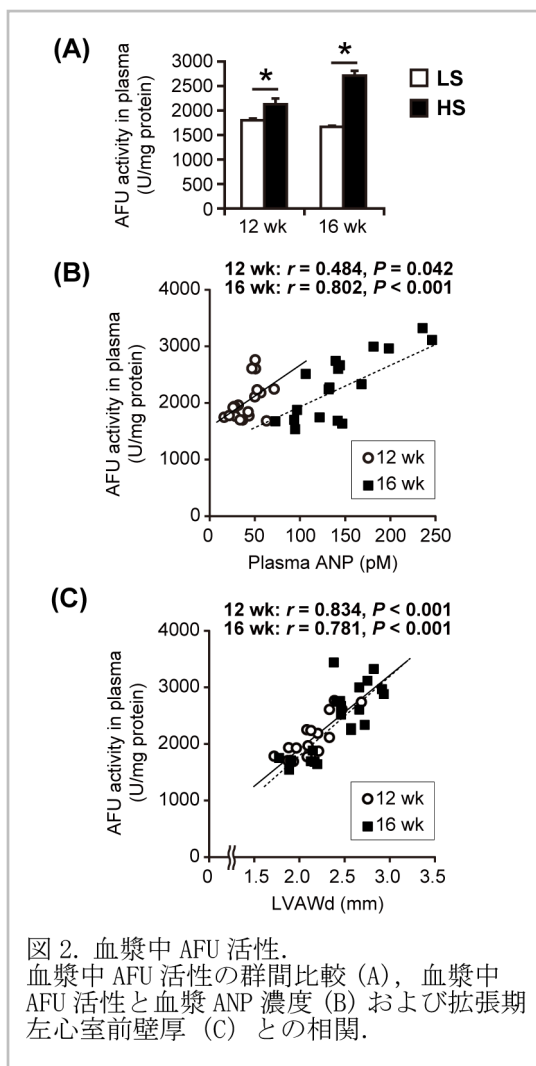
図1. ムチン型O-結合型糖鎖の生合成経路。心不全群でupregulateされていた経路を赤矢印、downregulateされていた経路を青矢印で示した。

ACAはDisialyl-Tを認識せず、Core 1(T)を認識する。そこで、sialidase処理したLVライセートを用いたACAレクチンプロット解析により、HS群とLS群とを比較したところ、HS群ではACAシグナルが顕著に高かった。これらの結果を総合すると、HS群ではLVのグリコームにおけるdisialyl-T量が増加していることが間接的に示された。

(3) 心肥大マーカーとしてのAFU

AFUは血漿中でも認められる。AFUタンパク質濃度と、血漿中AFU活性を測定したところ、これらは12週齢で既にHS群で顕著に増加していた(図2A)。AFUの主な発現部位は肝臓であるが、肝臓におけるAFUの遺伝子発現は群間で有意な差がなかったことから、血漿中AFU量の増加は主に心臓由来での発現増加によると示唆された。

心肥大マーカーである心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)の血漿中濃度と比較したところ、12週齢では中程度の正相関を示し、16週齢では高い正相関を示した(図2B)。また、心エコーにより得られた各パラメータと比較したところ、血漿中AFU活性は、特に拡張期左心室前壁厚(LVAWd)と高い正相関を示した(図2C)。



これらの結果から、血漿中AFU活性は、ANPとは異なる挙動を示す心肥大マーカーとなる可能性が示された。

(4) 心不全マーカーとしての2-マイクログロブリン(B2M)

糖鎖遺伝子の発現解析を進める中で、ハウスキーピング遺伝子とされているB2MのLVでの発現が、HS群で顕著に増加していることが見出された。LVでのB2M発現は心不全の進行に伴い顕著に増加し、血漿B2M濃度に反映された。LVでのB2M発現増加は心機能の低下に先んじて生じており、心不全病態の形成・進行に関与していることが示唆された。また、血中のB2Mは心不全マーカー候補となると考えられる。

(5) グライコプロテオーム解析による心不全関連糖タンパク質の同定

(2)の解析により同定された心不全に特徴的な糖鎖修飾構造に注目し、LVおよび血漿を対象としたグライコプロテオーム解析を行った。ACAやAOLレクチンカラムにより回収した糖タンパク質を用いた2D-DIGEでは、HS群とLS群とで有意な差のあるスポットは認められなかった。この原因として、アフィニティカラムでは非特異的吸着したタンパク質の混入と、洗浄による親和性の低い糖タンパク質の損失が考えられた。

そこで、二次元電気泳動後のゲルのレクチンプロットによる比較解析を中心に進めた。LVライセートに含まれるAOL認識糖鎖を有する糖タンパク質は、主に75 kDa以上で検出され、約100 kDaを解析上限とする二次元電気泳動法では比較解析が困難であると考えられた。一方で、ACAを用いたsialidase処理LVライセートのレクチンプロット解析では、20-100 kDaの広範囲に渡りACAのシグナルが検出され、比較的塩基性領域に偏ってシグナル陽性のスポットが認められた。HS群とLS群との比較解析を行った結果、10倍以上のACAシグナル強度差が認められるスポットを含む多数の変動スポットが同定された。これらのスポットのタンパク質を同定したところ、心筋の筋繊維に局在し、筋収縮の制御に関与すると考えられているタンパク質が多く含まれていた。また、多量タンパク質を除去した血漿からも探索を行った。結果として、40以上の心不全関連糖タンパク質が同定できた。

同定した心不全関連糖タンパク質について、特異的抗体を用いたウエスタンブロット解析により、血漿中での存在および群間での発現変動を解析した。LVから同定された一部のタンパク質は血漿でも検出できたことから、これらの中から心不全診断用血液マーカーが得られることが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Chiaki Nagai, Naoto Minamino.
Direct chemiluminescent enzyme immunoassay for atrial natriuretic peptide in mammalian plasma using a PEGylated antibody.
Analytical Biochemistry, in press.
査読有
DOI: 10.1016/j.ab.2014.05.022

Yuanjie Mao, Takeshi Tokudome, Ichiro Kishimoto, Kentaro Otani, Hiroshi Hosoda, Chiaki Nagai, Naoto Minamino, Kenji Kangawa.
Hexarelin treatment in male ghrelin knockout mice after myocardial infarction.
Endocrinology 154: 3847-3854 (2013).
査読有
DOI: 10.1210/en.2013-1291

〔学会発表〕(計 4 件)

永井千晶, 南野直人.
Dahl 食塩感受性高血圧ラットの左心室における 2-microglobulin の発現は心不全病態と相関する
第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 2013 年 11 月 22 日, 大阪.

永井千晶, 南野直人.
ポリエチレングリコール修飾抗体を用いた高感度心房性ナトリウム利尿ペプチド測定法の確立
第 36 回日本高血圧学会総会, 2013 年 10 月 24 日, 大阪.

Chiaki Nagai, Naoto Minamino.
Significance of glycosylation-focused proteome strategy for discovery of the biomarker of heart failure.
12th Human Proteome Organization Congress, 2013 年 9 月 17 日, 横浜.

Chiaki Nagai, Naoto Minamino.
Dynamic changes in beta-2-microglobulin and natriuretic peptide family peptides during the progression of heart failure in Dahl salt-sensitive rats.
17th International Congress of Comparative Endocrinology, 2013 年 7 月 17 日, パルセロナ(スペイン).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 千晶(NAGAI, Chiaki)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員
研究者番号: 30633648

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし