

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670749

研究課題名(和文) グライコブロットング法による糖尿病網膜症関連糖鎖の網羅的解析

研究課題名(英文) Glycoblotting analysis of N-glycans related to 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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病網膜症の有病率は糖尿病の罹病期間に関連するため、網膜症患者は増加の傾向にある。さまざまな基礎および臨床研究が行われてきたが、糖尿病網膜症のメカニズムにはいまだ不明な点が多い。しかし、近年N型糖鎖とよばれる蛋白上の構造変化が多くの疾患病態に関与することが明らかとなっており、糖尿病網膜症眼内でのN型糖鎖変化も興味深い点である。

本検討では、1)糖尿病網膜症患者硝子体中においてN型糖鎖が増加していること、2)シアル酸付加型N型糖鎖が特に増加しており、全体のプロファイルも変化していること、3)そのシアル酸付加型N型糖鎖には複数のシアル酸転移酵素が関与することなどを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Since the prevalence of diabetic retinopathy, severe ocular complication of diabetes, is closely related to the duration of diabetes, with the growing diabetes epidemic the world would experience an explosion in the number of patients with DR. However, despite extensive basic research and clinical studies, biochemical mechanisms responsible for the pathogenesis of DR remains elusive. Lines of evidence have indicated that structural alterations of N-glycans are related to the pathogenesis of diseases, and thus the profile changes of N-glycans in ocular diseases such as DR are of great interest.

In the present study, we demonstrated that i) the vitreous N-glycan concentration was significantly higher in patients with DR than those without diabetes, ii) sialylated N-glycans were increased in the vitreous fluid of patients with DR, and iii) high glucose stimulation augmented the sialyltransferases ST3GAL1 and ST3GAL4, but not ST6GAL1.

研究分野：血管細胞生物学

キーワード：糖尿病網膜症 糖鎖 グライコミクス

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は壮年期における主要な中途失明原因であり、本症の視力予後改善は眼科学分野の責務である。そのため、光凝固術や硝子体手術、そして抗血管新生療法などの既存治療法の改良に加えて、本症の予防的介入につながる新規分子標的の探索は重要である。

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。蛋白質に結合する糖鎖はセリン/スレオニンの酸素原子を介する O 型糖鎖とアスパラギン残基の窒素原子を介する N 型糖鎖の 2 種類があるが、特に N 型糖鎖は悪性腫瘍や炎症性疾患などの各種全身疾患においてそのプロファイルの変化が報告され、その病態への関与が注目されている。また、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。これらの分子は糖尿病網膜症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。

しかしながら、眼内組織あるいは眼内液などの生体試料における糖鎖解析には従来問題点があった。その問題点とは、1) 糖鎖は DNA や蛋白質と異なり、polymerase chain reaction (PCR)法などで増幅をおこなうことができないため、従来その構造解析には 1 検体あたり 3~4 日と長期の解析時間を要していたこと、2) 硝子体などの検体量が少ない生体試料では構造解析や定量化に必要な量を確保できないこと、などであり、同分野はその煩雑さからあまり検討の進んでいない領域であった。

この点に関して、研究分担者である西村紳一郎（北海道大学）らが開発した「定量的糖鎖解析を 96 検体同時に施行でき、かつ血漿サンプル 1 検体を 8 分程度で完了する画期的な方法、グライコプロッティング法」を応用することで硝子体サンプル内の糖鎖解析が可能であることを我々のグループは報告した [Inafuku S, Ishida S, Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2014]。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記グライコプロッティング法変法を用いて糖尿病網膜症(PDR)患者の硝子体中における糖鎖プロファイルを検討することである。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病網膜症患者の血漿および硝子体における糖鎖構造の定量的解析

対象は、北海道大学病院で硝子体手術を施行した PDR 群 17 例(男性 9 例、女性 8 例、平均年齢 63.9±4.4 歳)および non-DM(黄斑上膜および黄斑円孔)群 17 例(男性 7 例、女性 10 例、平均年齢 60.1±6.7 歳)。血液検体は入院中ルーチンで行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。

採取した血漿中 (10 μ l) における糖鎖をグライコプロッティング法により網羅的な糖鎖解析をおこなう。この方法は、アミノオキシ基やヒドラジド基などのアルデヒド基に速やかに求核付加する官能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糖鎖のみを精製する [Nishimura S et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004]。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。

硝子体液および血漿中の N 型糖鎖をグライコプロッティング法変法によって定量した。

(2) 糖尿病網膜症患者の血漿および硝子体における糖鎖構造の網羅的解析

次に、糖尿病網膜症患者の血漿および硝子体に含まれる N 型糖鎖の構造を網羅的に解析した。

(3) 培養網膜血管内皮細胞を用いた糖尿病網膜症病態におけるシアル酸転移酵素変化の解析

糖尿病網膜症患者の血漿および硝子体に含まれる N 型糖鎖の構造を網羅的に解析した結果、non-DM 群に比較して PDR 群ではシアル酸付加糖鎖が硝子体中で局所的に増加することが明らかとなったため、そのメカニズムを in vitro 系で検討することとした。ヒト生体内では糖鎖にシアル酸を付加する酵素として α 2, 3-シアル酸転移酵素 (ST3GAL1, ST3GAL4) および α 2, 6-シアル酸転移酵素 (ST6GAL1) などが知られているため、これらについて検討した。具体的には、ヒト網膜血管内皮細胞 (HRMEC) を低グルコース (5.0mM) あるいは高グルコース (25mM) 条件下で培養し、ST3GAL1、ST3GAL4 および ST6GAL1 の mRNA 発現および蛋白量の変化を、それぞれ qPCR 法と ELISA 法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 糖尿病網膜症患者の血漿および硝子体における糖鎖構造の定量的解析

硝子体中で検出された糖鎖はPDR群では30種類、non-PDR群では13種類であった。また、硝子体中の蛋白当たりの糖鎖量は PDR 群 ($496 \pm 37 \text{ pmol}/100 \mu\text{g}$) では non-DM 群 ($142 \pm 31 \text{ pmol}/100 \mu\text{g}$) と比較して有意に多かった(図1、 $P < 0.001$)。一方、血漿中では両群に差は認めなかった。また、PDR 群の硝子体中では蛋白当たりの糖鎖量が 10 種類の糖鎖で増加していたが、これらの糖鎖は血漿中では増加していなかった。本検討結果は、糖尿病網膜症の硝子体中では血漿中とは異なる糖鎖環境の変化が生じていることを示唆

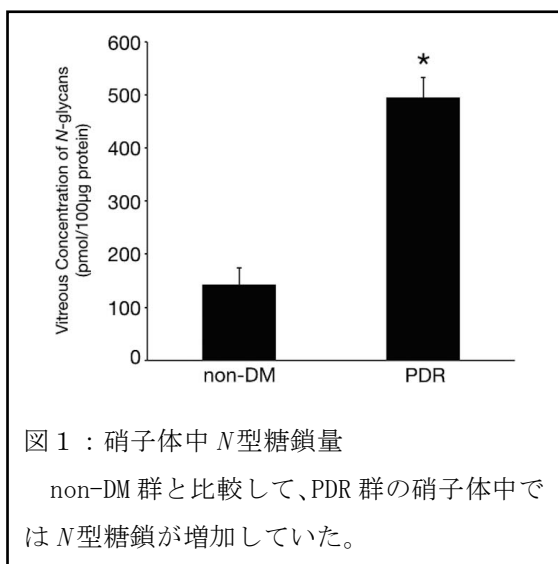


図1：硝子体中 N型糖鎖量

non-DM 群と比較して、PDR 群の硝子体中では N型糖鎖が増加していた。

していた。

(2) 糖尿病網膜症患者の血漿および硝子体における糖鎖構造の網羅的解析

次に、糖尿病網膜症患者の血漿および硝子体に含まれる N型糖鎖プロファイルを検討した。PDR 群の硝子体中におけるシアル酸付加糖鎖 ($328.4 \pm 25.8 \text{ pmol}/100 \mu\text{g}$) は、non-DM 群 ($92.1 \pm 21.2 \text{ pmol}/100 \mu\text{g}$) と比較して有意に増加していた(図2、 $P < 0.0001$)。一方、別の糖鎖構造、ハイマンノース型糖鎖では差がなかった($12.4 \pm 1.2 \text{ pmol}/100 \mu\text{g}$ vs. $10.9 \pm 2.0 \text{ pmol}/100 \mu\text{g}$, $P = 0.54$)

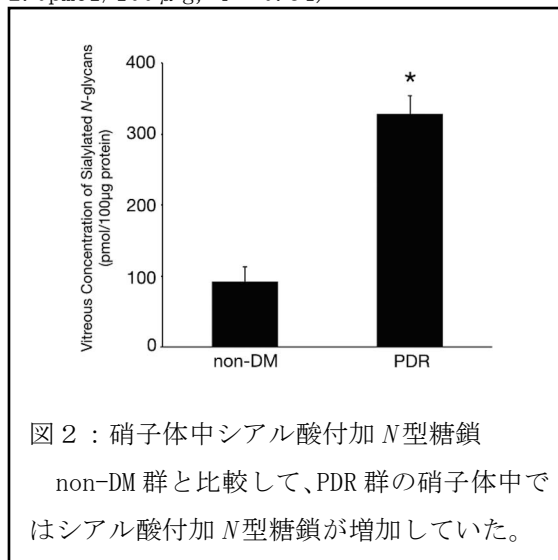


図2：硝子体中シアル酸付加 N型糖鎖

non-DM 群と比較して、PDR 群の硝子体中ではシアル酸付加 N型糖鎖が増加していた。

また、血漿中ではシアル酸付加糖鎖は両群で差がなかった ($625.5 \pm 25.9 \text{ pmol}/100 \mu\text{g}$ vs. $580.3 \pm 36.2 \text{ pmol}/100 \mu\text{g}$, $P = 0.32$)。

本検討結果から、PDR 眼ではシアル酸付加糖鎖が局所的に増加しており、その病態メカニズムへの関与が示唆された。

(3) 培養網膜血管内皮細胞を用いた糖尿病網膜症病態におけるシアル酸転移酵素変化の解析

上記(2)の検討において、PDR 眼ではシアル酸付加糖鎖が増加することが明らかとなったため、そのメカニズムを in vitro 実験系で検討した。結果として、糖負荷刺激群 (25mM) では対照群 (5mM) と比較して、刺激 6、24、72 時間後に ST3GAL1 と ST3GAL4 の mRNA 発現が HRMEC において有意に増加していた(図3、 $P < 0.05$)。一方、ST6GAL1 mRNA の発現は変化しなかった。

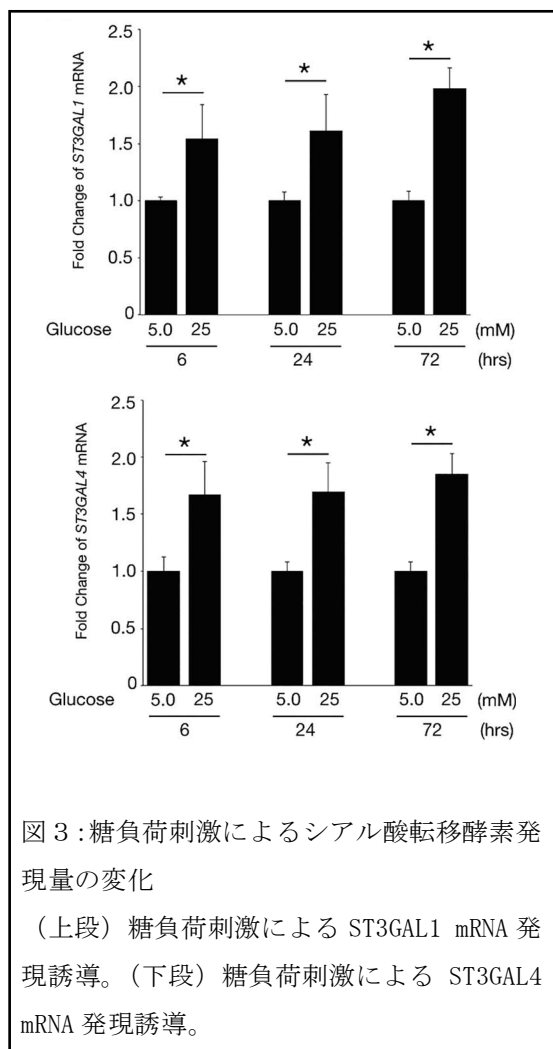
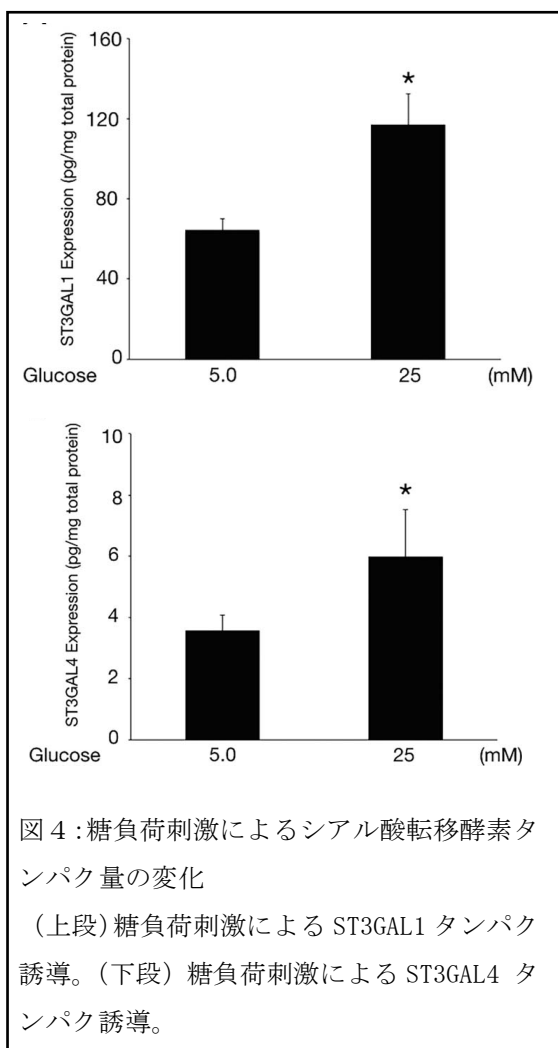


図3：糖負荷刺激によるシアル酸転移酵素発現量の変化

(上段) 糖負荷刺激による ST3GAL1 mRNA 発現誘導。(下段) 糖負荷刺激による ST3GAL4 mRNA 発現誘導。

さらに、刺激 72 時間後における対照群の ST3GAL1 ($64.4 \pm 5.8 \text{ pg}/\text{mg}$) および ST3GAL4 ($3.8 \pm 0.3 \text{ pg}/\text{mg}$) のタンパク量と比べて、糖負荷刺激群では ST3GAL1 ($117.4 \pm 14.9 \text{ pg}/\text{mg}$, $P < 0.01$)、ST3GAL4 ($6.1 \pm 0.9 \text{ pg}/\text{mg}$, $P < 0.05$) のそれらは有意に増加していた(図4)。



本検討結果から、PDR硝子体中でのシアル酸含有N型糖鎖の増加には、ST3GAL1およびST3GAL4が関与している可能性が示された。

本研究によって、PDR患者の眼内では糖尿病を有さないnon-DM患者の眼内に比べてN型糖鎖が量的に変化していること、そして質的にもシアル酸付加糖鎖の増加によるプロファイル変化が生じていること、などが明らかとなった。さらに、その糖鎖プロファイル変化には糖負荷条件によって誘導されたシアル酸転移酵素が関与している可能性が示された。これらの検討結果は、N型糖鎖の変化が血管新生疾患である糖尿病網膜症の病態に関与することを強く示唆しており、今後引き続き検討を続ける予定である。

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27件)

1. Kinoshita S, Noda K, Saito W, Kanda A, Ishida S. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor-B in proliferative diabetic retinopathy.

Acta Ophthalmol. Epub ahead of print
doi: 10.1111/aos.12969

2. Inafuku S, Noda K, Amano M, Nishimura S, Ishida S. Increase of sialylated N-glycans in eyes with neovascular glaucoma secondary to proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res.* 2015; 15: 1-4
doi:10.3109/02713683.2015.1068816
3. Inafuku S, Noda K, Amano M, Ohashi T, Yoshizawa C, Saito W, Kanda A, Nishimura S, Ishida S. Alteration of N-glycan profiles in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 56: 5316-5322
doi: 10.1167/iovs.15-16747
4. Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. Aflibercept traps galectin-1, an angiogenic factor associated with diabetic retinopathy. *Sci Rep.* 2015; 5: 17946
doi: 10.1038/srep17946
5. Inafuku S, Noda K, Amano M, Ohashi, Yoshizawa C, Saito W, Kanda A, Nishimura S, Ishida S. A comparison of N-glycan profiles in human plasma and vitreous fluid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014; 252: 1235-1243
doi: 10.1007/s00417-014-2671-x
6. Kanda A, Noda K, Ishida S. ATP6AP2/(pro)renin receptor contributes to glucose metabolism via stabilizing the pyruvate dehydrogenase E1 β subunit. *J Biol Chem.* 2015; 9690-9700
doi: 10.1074/jbc.M114.626713
7. Ando R, Noda K, Namba S, Saito W, Kanda A, Ishida S. Aqueous humor levels of placental growth factor in diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol.* 2014; 92: 245-246
doi: 10.1111/aos.12251
8. Kinoshita S, Noda K, Tagawa Y, Inafuku S, Dong Y, Fukuhara J, Dong Z, Ando R, Kanda A, Ishida S. Genistein attenuates choroidal neovascularization. *J Nutr Biochem.* 2014; 25: 1177-1182
doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.06.004.
9. Kinoshita S, Kase S, Ando R, Dong Z, Fukuhara J, Dong Y, Takashina S, Noda K, Noda M, Kanda A, Ishida S.

Expression of vascular endothelial growth factor in human ocular adnexal lymphoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014; 55: 3461-3467
doi: 10.1167/iovs.13-13510

[学会発表] (計 22 件)

1. Ishida S. Choroidal circulation in uveitis. Symposia & Courses: Inflammation studies. Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress (APAO) 2016: 2016/3/26. Taipei (Taiwan)
2. Ishida S. Afilibercept traps Galectin-1, an angiogenic factor associated with diabetic retinopathy. 39th Annual Macula Society Meeting. 2016/2/24-27. Florida (USA)
3. Noda K. Alteration of N-glycan profiles in diabetic retinopathy. 48th Annual retina society scientific meeting. 2015/10/7-11. Paris (France)
4. Inafuku S, Noda K, Amano M, Murata M, Saito W, Ohashi T, Kanda A, Nishimura S, Ishida S. Alteration of N-glycan profiles in diabetic retinopathy. ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting. 2015/5/3-7. Denver (USA)
5. Inafuku S, Noda K, Amano M, Murata M, Saito W, Ohashi T, Kanda A, Nishimura S, Ishida S. Alteration of N-glycan profiles in diabetic retinopathy. Asia-ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) 2015: Yokohama, Japan; 2015/2/16-19 パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)
6. Kanda A, Noda K, Ishida S. ATP6AP2/ (pro)renin receptor contributes to glucose metabolism via stabilizing the E1 β subunit of pyruvate dehydrogenase complex. Asia-ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) 2015: Yokohama, Japan; 2015/2/16-19 パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)
7. Ishida S. Role of VEG as a pro-inflammatory cytokine in diabetic macular edema. Symposium: Inflammatory mechanisms in diabetic retinopathy and other retinal degeneration. Asia-ARVO 2015: Yokohama, Japan; 2015/2/18. パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)
8. Ishida S. Receptor-associated prorenin system in the pathogenesis of diabetic retinopathy. Plenary Session: Recent advances in retinal basic research. Asia-ARVO 2015: Yokohama, Japan; 2015/2/17. パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)
9. Ishida S. Choroidal thickening with impaired circulation in acute idiopathic maculopathy. 2015 Meeting with Hokkaido University. 2015/1/31. Taipei (Taiwan)
10. Ishida S. Receptor-associated prorenin system (RAPS) as the inflammatory pathogenesis of diabetic retinopathy. Symposium: Inflammatory mechanisms/oxidative stress. 10th International Symposium of Ophthalmology - Hong Kong Symposium. 2014/9/26. Hong Kong (China)
11. Ishida S. Choroidal thickening with impaired circulation in acute idiopathic maculopathy. Symposium: Recent developments in posterior segment imaging. 10th International Symposium of Ophthalmology - Hong Kong Symposium. 2014/9/26. Hong Kong (China)
12. Ishida S. VEGF is pro-inflammatory in diabetic retinopathy. Retina Expert Conference 2014. 2014/5/4. Orlando (USA)
13. Takashina S, Noda K, Amano M, Ohashi T, Dong Y, Kinoshita S, Saito W, Kanda A, Nishimura S, Ishida S. Profile of N-glycans in human vitreous. ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting. 2014/5/4-8. Florida (USA)
14. Ishida S. Principle and Clinical Application of Laser Speckle Flowgraphy (LSFG-NAVI). Ocular Circulation and Morphology with LSFG and the latest OCT: Case Presentation. World Ophthalmology Congress 2014. 2014/4/3. 東京国際フォーラム (東京都千代田区)

15. Takashina S, Noda K, Amano M, Nishimura S, Ishida S. Profile analysis of glycans in human vitreous. World Ophthalmology Congress 2014 Tokyo. 2014/4/2-4 東京国際フォーラム (東京都千代田区)

〔図書〕 (計 1 件)

1. Kanda A, Ishida S. Roles of the retinal pigment epithelium in neuroprotection. Neuroprotection and Regeneration for Retinal Diseases. 2014; 227-238, Springer

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：1 0 2 4 5 5 5 8

(2) 研究分担者

西村 紳一郎 (NISHIMURA, Shin-Ichiro)
北海道大学・先端生命科学研究科・教授
研究者番号：0 0 1 8 3 8 9 8

野田 航介 (NODA, Kousuke)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：9 0 2 9 6 6 6 6