

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K13223

研究課題名(和文) マクロファージの糖鎖抗原の発現変動に基づく新規NASHバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Biomarker research for NASH diagnosis based on the disease-related glycoantigen expression in liver-resident macrophages

研究代表者

岡田 貴裕 (Okada, Takahiro)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：30584809

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、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の進行と肝常在性マクロファージ(クッパー細胞)における糖鎖抗原の発現との相関を調査した。マウスモデルを用いた検討の結果、NASHの発症に伴ってクッパー細胞の膜タンパク質に起こる糖鎖修飾が速やかに変動し、ガラクトース/N-アセチルガラクトサミン残基を有した糖鎖の発現が亢進することを明らかにした。また、病態が進行するにつれて糖鎖の分岐構造のバリエーションに変化が生じることを明らかにできた。さらに、遺伝子発現変動解析の結果から、このような糖鎖修飾の変化がB3gnt5遺伝子の発現亢進、およびSt6gal1遺伝子の発現低下に起因することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASHは早期診断の方法が確立されておらず、自覚症状を伴わないために肝がんや肝硬変への進展リスクが高い生活習慣病である。本研究で得られた結果をもとに、初期病態を反映するような糖鎖抗原の分布について詳細な検討を行っていくことで、クッパー細胞の性状変化に基づく診断バイオマーカーの開発が可能になると考えられる。これを実現化できれば、例えば血液生化学検査のように身体的・精神的負担の少ない病態鑑別が可能となり、子供から老人に至るまで幅広い年代に対して生活習慣病の早期予防を実施できるようになると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, the correlation between non-alcoholic steatohepatitis (NASH) progression and glycoantigen expression in liver-resident macrophages (Kupffer cells) was investigated. Using a mouse model, disease-related alteration of protein glycosylation was demonstrated by lectin microarray-based glycoprofiling. In association with the pathogenesis of NASH, the content of membrane protein-bound oligosaccharides harboring galactose/N-acetylgalactosamine residues increased in Kupffer cells. The results also suggested that disease progression altered the degree of oligosaccharide branching. Furthermore, the results of differential gene expression analysis suggested that the up-regulation of B3gnt5 and the down-regulation of St6gal1 were involved in such alteration.

研究分野：細胞生物学

キーワード：生活習慣病 マクロファージ 糖鎖

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

クッパー細胞は肝類洞に常在する組織マクロファージである。そのはたらきは多岐にわたり、死細胞や老廃物を排除する役割を担うとともに、炎症反応や組織修復に関与することで肝臓の健全性維持に寄与している。一方で、その機能変調は種々の肝疾患に関連し、過剰に活性化した本細胞が組織障害や肝線維化を悪性化させることが指摘されている。特に、非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) の進展過程においては、極めて早期より炎症促進的に振る舞うようになり、病態形成機序の中心的な役割を担うことが明らかとなりつつある。

研究代表者は、マウスモデルを用いた研究からクッパー細胞における内皮系マーカータンパク質群の発現レベルが肝障害の進展度に強く相関することを見いだしていた。さらに、マウス由来 RAW264.7 細胞株を用いた予備研究から、マーカータンパク質の発現レベルのみならず、これらに翻訳後修飾される糖鎖の構造バリエーションもまた肝障害の進展に連動するのではないかと仮説を立てた。このような背景をもとに、NASH の炎症病態とクッパー細胞におけるタンパク質糖鎖修飾との相関を見いだすことで特定の糖鎖抗原を新たな診断マーカーとして利用できるようなものではないかと考え、本研究計画を立案するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、NASH の進展下でクッパー細胞に起こる糖タンパク質糖鎖の発現変動パターンを明らかにしていく。また、炎症病態の進展がタンパク質糖鎖修飾経路にもたらす影響を検討し、糖鎖抗原の発現変動に関わる要因について知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 食餌誘発性 NASH マウスモデルの作成

C57BL/6J マウス (6 週齢、雄性) に超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料 (CDAHFD) を自由摂食させることで NASH 様病態を誘発させた。CDAHFD の投与は肝臓が繊維化に到るまで継続し、8 週齢、13 週齢、18 週齢の時点でクッパー細胞の単離を実施した。また、病態の進行度は血漿中トランスアミンアーゼ活性値をもとに評価した。

#### (2) クッパー細胞の単離

標準飼料 (SD) を投与した対照群、CDAHFD 投与群のマウスを麻酔下で開腹し、コラゲナーゼを含むハンクス液を灌流することにより肝臓の構成細胞を分散させた。さらに、分画遠心法で得た肝非実質細胞群をプラスチックディッシュに播種して 2 時間静置したのち、接着能の弱い細胞群を剥がすことでクッパー細胞の純化を行った。

#### (3) レクチンアレイを利用したタンパク質糖鎖修飾変動の検討

SD 投与群、および CDAHFD 投与群のマウスより単離したクッパー細胞から膜タンパク質画分を調製した。レクチンアレイを用い、本試料と 45 種類のレクチンとの相互作用を比較解析することで、NASH 様病態の進展下で膜タンパク質に起こる糖鎖修飾の変動パターンを推定した。また、検証実験としてレクチンプロットを実施した。

#### (4) RNA-Seq を利用した糖鎖修飾遺伝子群の発現変動の解析

SD 投与群、および CDAHFD 投与群のマウス (いずれも 8 週齢を使用) より単離したクッパー細胞から全 RNA 試料を調製した。本試料を用いて解析用ライブラリを調製し、イルミナ社 NovaSeq6000 でリードデータを回収した。さらに、HISAT2 プログラムを用いてリファレンスゲノムに対するマッピングを行い、これにより得られたカウントデータをもとにタンパク質糖鎖修飾経路に関わる遺伝子群の転写レベルの変動を比較解析した。

### 4. 研究成果

(1)NASH マウスモデルの作成・クッパー細胞の単離

肝障害マーカーであるトランスアミナーゼ(AST, ALT)の血中濃度を指標として、CDAHFD 自由摂食による NASH 様病態の進展度を評価した。SD 投与群ではいずれも基準範囲の数値を示し、正常な AST/ALT 比が認められた(AST>ALT)。これに対し、CDAHFD 投与群では ALT 値が顕著に上昇しており、NASH 様の炎症病態が進展していることを確認できた(図1)。これらのマウスより単離したクッパー細胞の純度は、いずれにおいても 96%以上であった(図2)。

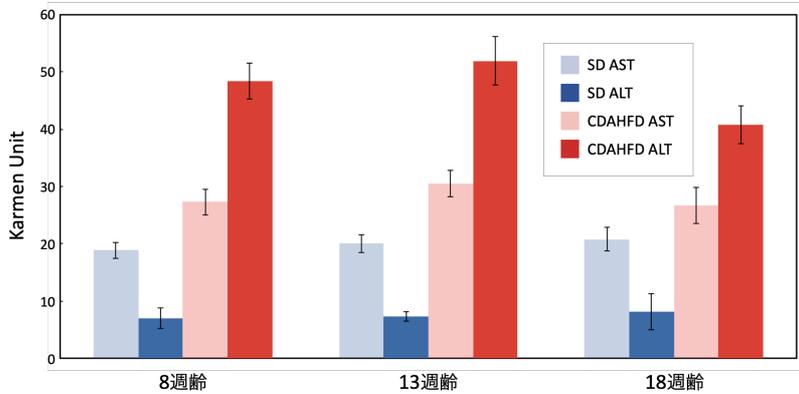


図1. CDAHFD自由摂食による血中トランスアミナーゼ値への影響

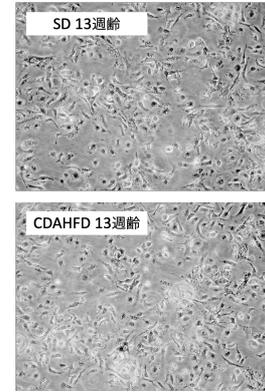


図2. 純化後の細胞

(2)NASH の進展に伴うクッパー細胞のタンパク質糖鎖修飾の変動

純化後のクッパー細胞より得た膜タンパク質試料と 45 種類のレクチンとの反応性をもとに、炎症病態の進展下で起こりうる糖鎖修飾の変動パターンを推定した。詳細は控えるが、主なレクチンとの相互作用を検討した結果の一部を図3に示す。

SD 投与群、CDAHFD 投与群のいずれにおいても、膜タンパク質に結合した糖鎖の量、およびそれらのフコシル化の頻度に明確な差は認められず(図3A)、加齢とともに糖鎖のシアル酸修飾が亢進する傾向が見られた(図3B)。一方で、CDAHFD 投与群の試料ではガラクトース/N-アセチルガラクトサミン残基を特異的に認識するようなレクチンとの反応性が高く、発症初期から線維化に到るまでこの傾向が維持されることが明らかとなった(図3C)。このほか、反応性が糖鎖の分岐構造に依存するようなレクチンにおいても顕著な差が認められた(図3D)。

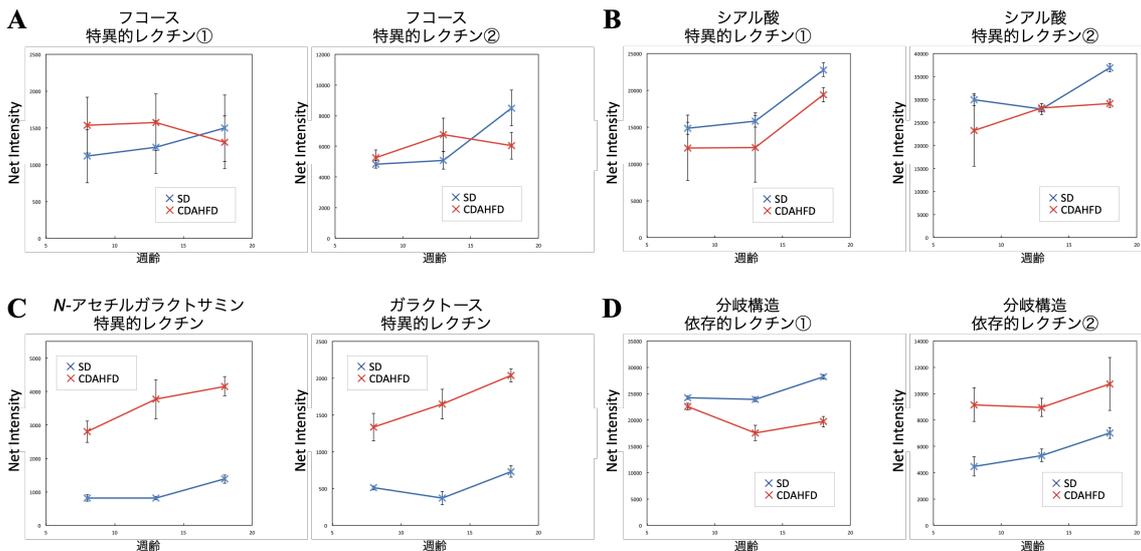


図3. クッパー細胞膜タンパク質試料のレクチンに対する反応性

以上により、”クッパー細胞が肝臓の炎症病態を反映するような糖タンパク質糖鎖を発現しうる”という当初の仮説を実証することができた。また、NASH の発症に連動してガラクトース/N-アセチルグルコサミン残基を末端に有するような糖タンパク質糖鎖の発現が速やかに亢進するとともに、糖鎖の分岐数に変化が生じることが示唆された。

### (3)糖鎖抗原の発現変動の検出

前項目で得られた結果をもとに、ガラクトース/*N*-アセチルガラクトサミン特異的レクチンを用いて糖タンパク質糖鎖の発現変動の検出を試みた。クッパー細胞の全タンパク質試料を用いたレクチンブロットにおいて、SD 投与群、CDAHFD 投与群の間で明確な差は認められなかった。この結果から、目的とする糖鎖抗原の発現が比較的マイナーであるという可能性、検出法としてレクチンブロットが適さないなどの可能性が考えられた。

### (4)NASH の発症が糖鎖修飾遺伝子群の発現にもたらす影響

糖鎖抗原の発現変動の関連要因を把握することを目的として、タンパク質糖鎖修飾プロセス(GO ID:0006486)に関わる遺伝子群の比較発現解析を行った。その結果、NASH 様病態の誘発に応じて発現が変動する遺伝子として、 $\beta$ 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase 5 (B3gnt5)、および $\beta$ -galactoside  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase 1 (St6gal1)を見いだした。

SD 投与群との比較において、CDAHFD 投与群では B3gnt5 遺伝子の発現が亢進していたことから(図4A)、NASH の進展下ではタンパク質上に修飾される *O*-結合型糖鎖の伸長プロセスが亢進することが示唆された。一方で、St6gal1 遺伝子は発現活性が低下していたことから(図4B)、*N*-結合型糖鎖における末端シアル酸残基の修飾プロセスが抑制されることが示唆された。

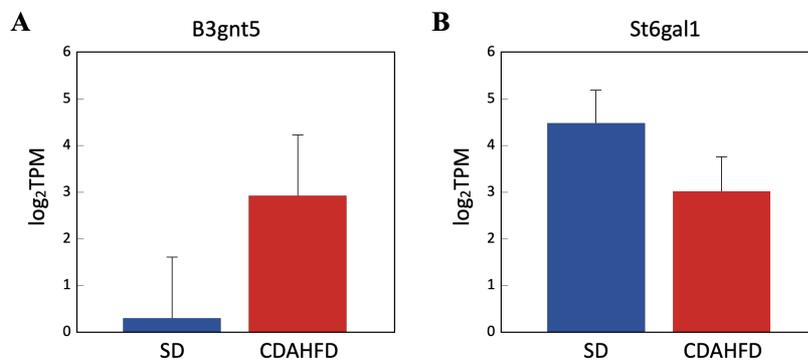


図4. クッパー細胞におけるB3gnt5, St6gal1遺伝子の転写レベル

これらの遺伝子発現変化は、レクチンアレイ解析で推定された糖鎖抗原の発現変動パターンを支持するものである。特に、ガラクトース/*N*-アセチルガラクトサミン残基を末端に有するような糖タンパク質糖鎖の増加傾向は、St6gal1 遺伝子の発現低下に起因するものと考えられる。

### (5)総括

以上の検討から、NASH の発症初期より病態進行を反映するような糖鎖抗原がクッパー細胞に発現することを実証できた。また、その関連要因として、二種類の糖転移酵素遺伝子の発現変動を見いだすことができた。

今後は、糖鎖抗原の分布や検出アプローチについて詳細な検討を行うとともに、目的とする糖タンパク質糖鎖の分子実体を明らかにすることが重要な課題となる。これらを実現できれば、クッパー細胞が特徴的に発現する糖鎖抗原/糖タンパク質を初期病態のバイオマーカーとして利用できるようになり、血液生化学検査によるNASHの早期診断が可能になるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田貴裕, 井原秀之, 伊東利津, 池田義孝
2. 発表標題 NASHの進展に連動した肝常在性マクロファージの糖鎖発現の変化
3. 学会等名 第92回 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田貴裕
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎の進展に連動した肝常在性マクロファージにおけるタンパク質糖鎖修飾の変化
3. 学会等名 第43回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----