

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19544

研究課題名（和文）慢性炎症疾患におけるバイセクト糖鎖の役割

研究課題名（英文）Impact of bisect glycosylation

研究代表者

中神 啓徳（Nakagami, Hironori）

大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：20325369

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、IgGなどの生体内機能分子の糖鎖修飾が加齢にともなう慢性炎症病態にどのような影響があるかをマウスモデルおよびヒト臨床検体を用いて検証することを目的とする。マウスに3か月間高脂肪食を付加したモデルを作成し、若年マウスと高齢マウス、高脂肪食負荷マウスの血清を採血してIgG糖鎖分析を行った。

結果、若年マウスに比べて高齢マウスではバイセクト糖鎖が増える傾向にあったが、高脂肪食負荷ではそれほど大きな違いは見いだせなかった。また、バイセクト糖鎖以外にもgalactoseやFruuctoseなどの修飾も増える傾向が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳心血管病、慢性腎臓病など多くの慢性炎症が関与する疾患において、加齢は強力かつオールマイティーな危険因子である。加齢とともに緩やかに進行する慢性炎症のメカニズムの解明の一つとして糖鎖修飾が着目されている。

健康寿命延伸のためには、より臨床的な精度の良い老化バイオマーカーが求められており、今回の研究はIgG糖鎖解析により老化バイオマーカーを探索するものである。今後の臨床研究での解析結果が期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to examine the impact of IgG glycosylation in the chronic inflammatory diseases with aging through the analysis of disease model mice and human clinical sample. We obtained the serum sample from young mice (8 weeks old), old mice (20 weeks old), high fat diet fed mice, and analyzed the IgG glycosylation. As a result, a bisecting glycosylation tended to increase in old mice group compared with young mice group, but it was not affected by a high fat food load. Similarly, galactose and fructose glycosylation was increased in old mice group compared with young mice group.

研究分野：老年内科

キーワード：糖鎖 抗体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳心血管病、慢性腎臓病など多くの慢性炎症が関与する疾患において、加齢は強力かつオールマイティーな危険因子である。近年、これらの疾患発症・進展の機序として免疫細胞の役割が注目されており、自然免疫機構の活性化からリンパ球やマクロファージの臓器局所への集積、炎症性サイトカインの発現亢進などのメカニズムにより、炎症を起点としたメカニズムが理解されてきた。しかし、大半の研究は急性疾患モデルにおける変化を観察したものであり、加齢とともに緩やかに進行する慢性炎症のメカニズムには当てはまらない。

我々は過去の2つの実験結果から、動脈硬化や糖尿病などの病態において加齢とともに出現する自己抗体が増加しさらに糖鎖修飾を伴うことが慢性炎症の病態に関与している仮説を立てた。

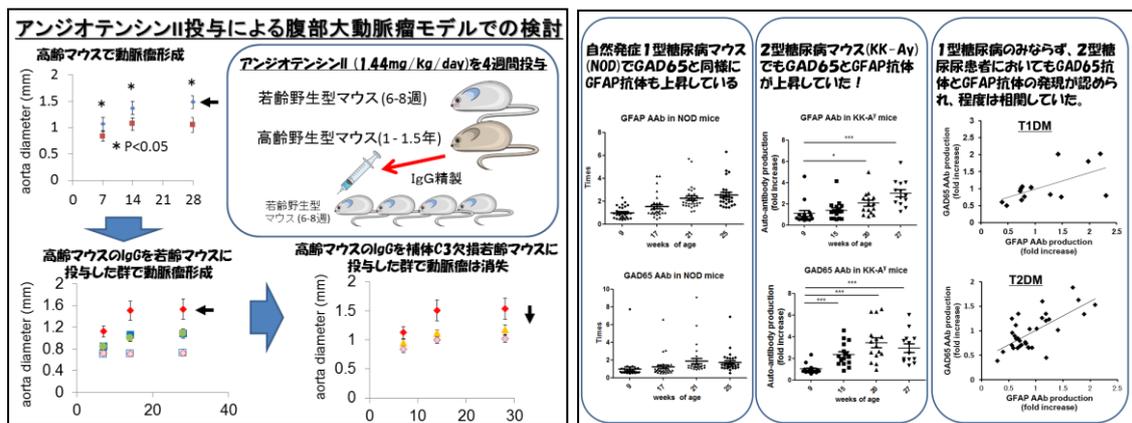
1) 加齢に伴う大動脈瘤形成の実験

野生型高齢マウスにアンジオテンシン II を4週間持続投与すると腹部大動脈瘤の形成が認められる。この高齢マウス由来のIgG分画を若年マウスに投与したところ、高齢マウスと同様に動脈瘤が発症したが、若年補体C3欠損マウスでは消失した。高齢マウスにおいてはアンジオテンシン II 投与によって自己抗体が誘導され、それが起点となり補体活性化を介した炎症を惹起し腹部大動脈瘤発症に至ることが示唆された。

2) 2型糖尿病モデルマウスおよび2型糖尿病患者における自己抗体の存在

1型糖尿病の鋭敏な自己抗体の探索研究として、脳ではグリア細胞特異的に発現しているGFAPが胼周囲のシュワン細胞に発現しており1型糖尿病マウスNODで膵臓が傷害されたときにその自己抗体が認められることが確認された。興味深いことに、この自己抗体は2型糖尿病モデルマウスKK-Ayでも週齢とともに血中で増加が確認された。ヒト糖尿病患者検体を用いた検討でも1型糖尿病のみならず2型糖尿病においてもこれらの自己抗体の発現が検出された。すなわち、2型糖尿病においても加齢とともに自己抗体が出現していることが示唆された (Pang Z, Nakagami H et al. *FASEB J* 2017)。

本研究課題では加齢に伴い徐々に変化する糖鎖修飾、中でもIgGのバイセクト糖鎖修飾によってもたらされる機能変化に着目した。抗体(IgG)は重鎖Fc部分のAsn



残基 (297 残基目) に N-結合型糖鎖を有

しており、この糖鎖は加齢とともに修飾され、抗体分子としての活性や動態、安全性等に寄与することが報告されている。Asn297のN-結合型糖鎖の還元末端のN-GlcNAc残基に付加しているFuc残基(コアフコース)を除去すると抗体依存性細胞障害(ADCC)活性が増強され、同N-結合型糖鎖のバイセクティングGlcNAc残基の付加量を増加させることによりADCC活性が増強される。また、ADCC活性と並ぶエフェクター活性である補体依存性障害(CDC)活性については、Fc部分に結合する糖鎖の非還元末端部分のガラクトース(Gal)残基数が多いほど補体第一成分(C1q)への結合が増しCDC活性が増強される。興味深いことに、このIgGのAsn297のN-結合型糖鎖修飾(バイセクト糖鎖修飾)はヒト高齢者、Werner症候群などの早老症患者で増えていること、高齢マウスで高く食事制限で低下することが報告されている。

2. 研究の目的

本研究は、IgGなどの生体内機能分子の糖鎖修飾が加齢にともなう慢性炎症病態にどのような影響があるかをマウスモデルおよびヒト臨床検体を用いて検証することを目的とする。

慢性炎症疾患モデルとして、高脂肪食負荷による肥満マウスあるいは糖尿病モデルマウスを用い、加齢に伴う血中IgGのバイセクト糖鎖修飾を定量評価する。その結果を元にして、ヒト検体を用いた解析計画書を作成して臨床試験の準備を行う。

3. 研究の方法

本研究では、マウスでの分析・解析を中神が担当し、ヒト臨床サンプルを用いた解析を研究分担者の楽木、杉本が担当する。

(1) 慢性炎症疾患モデルとして、脂質異常症をきたす高脂肪食負荷による肥満マウスあるいは糖尿病モデルマウスを用い、加齢に伴う血中IgGのバイセクト糖鎖修飾を定量評価する。

糖鎖修飾の解析方法として以下の手順を予定している。

- ① マウス血液からIgG精製あるいは γ GTP精製を行った後に、酵素またはヒドララジン分解による糖鎖の切り出しを行う。
- ② 2-アミノピリジンで蛍光標識を行い (PA化) 逆相HPLCとMALDI-TOF/MSあるいはLC/MS/MSで分析する。
- ③ 各PA化糖鎖の構造は逆相HPLC分析で取得した保持時間と質量の情報から推定する。IgGのN-結合型糖鎖の加齢に伴う変化に関しては多くの分析がされており過去の文献などを参考に構造推定を行い、その中で加齢変化が顕著な糖鎖を選定する。

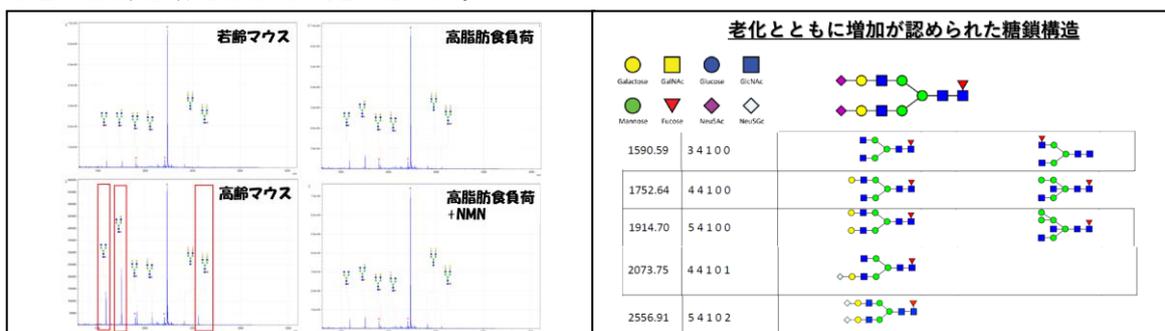
(2) ヒト臨床研究サンプルを用いてIgG抗体の糖鎖修飾の測定を行いその結果を定量化することにより、年齢、血糖値、血圧などとの相関関係を検証する。特に、フレイル (①1年間で体重が4-5kg減少、②疲れやすくなった、③筋力 (握力) の低下、④歩行スピードの低下、⑤身体の活動性低下) を主要評価項目とした臨床研究に着目し、その評価項目とIgG糖鎖修飾との関連解析を行う。また、臨床研究は抗老化作用が報告されているNMN (ニコチンアミドモノヌクレオチド) の投与群とプラセボ投与群の二重盲検試験であることから、NMN投与によるIgG糖鎖への影響も同時に観察を行う。

4. 研究成果

(1) マウスでの検討

マウスに3か月間高脂肪食を付加したモデルを作成し、若年マウス (8週齢 6匹) と高齢マウス (20週齢 3匹)、高脂肪食負荷マウス (20週齢 6匹) から血清100 μ Lを採血してIgG糖鎖分析を行った。さらに、様々な抗老化作用が報告されているNMN (ニコチンアミドモノヌクレオチド) を高脂肪食負荷マウスに3か月間連日投与を行った (20週齢 6匹)。

結果、既報通りに若年マウスに比べて高齢マウスではバイセクト糖鎖が増える傾向にあったが、高脂肪食負荷ではそれほど大きな違いは見いだせなかった。一方、NMN投与により若干バイセクト糖鎖が少なくなる傾向が見出された。また、バイセクト糖鎖以外にも galactose や Fructose などの修飾も増える傾向が見出された。



(2) ヒト臨床試験での解析 (解析方法の準備)

マウスの結果を元にヒト用検体を用いた解析の実施計画書を作成し、バイセクト糖鎖に加えて、ガラクトース、シリアル化修飾も含めた解析を行う。それぞれの糖鎖修飾別を分類分けを行い、分類内糖鎖群のパーセントの経時的推移、および変化量の計時的推移を分析する。

臨床研究は高齢者糖尿病男性患者（65歳以上）で筋力低下（握力低下あるいは歩行測定低下）を対象とした試験であり、NMN 250mgあるいはプラセボを1日1回6か月間（24週間）投与する介入試験である。IgG糖鎖解析は投与前、投与後3か月（12週）後、投与後6か月（24週）後の3回行う予定である。

2019年4月から実施し、2020年3月に終了する予定であったが、新型コロナウイルス感染拡大の影響を受けて、試験期間を延長している。16名の患者様への投与完了後に、血液サンプルをまとめてIgG抗体測定を行う予定である。



特定臨床研究（身体的フレイルを対象としたNMNの効果）

項目	内容
目的	高齢者糖尿病で筋力低下を伴う患者を対象として、二重盲検法により、NMNを250mg含有する錠剤を24週間投与したときの有効性及び安全性の検討を目的とする。
主要評価項目 副次評価項目	主要評価項目 1) 筋力（握力）・身体機能（歩行速度） 副次的評価項目 1. 筋力（膝伸屈筋力） 2. 身体機能（開眼片足立ち時間・5回立ち上がり時間） 3. 筋量（体組成計を用いた測定・骨格筋エコーによる下腿筋群の筋厚、筋輝度の評価） 4. フレイル評価（J-CHS基準） 5. 家庭血圧・脈拍、 6. 糖尿病性網膜症評価（矯正視力検査、眼圧測定、眼底カメラ、眼底3次元画像解析、光干渉断層画像撮影） 7. 糖代謝（随時血糖、HbA1c）、 8. 糖鎖修飾(IgG糖鎖) 、 9. 末梢血単核球でのNAD+濃度（HPLC）
選択基準	1. 65歳以上男性（同意取得時） 2. 筋力低下（握力：男性26kg未満）または身体機能低下（歩行速度1m/秒未満）を伴う者（アジアのサルコペニア基準（AWGS）に該当） 3. 糖尿病治療薬を使用中あるいは未治療でHbA1c 6.5%以上の者
研究方法	二重盲検、NMN(250mg)およびプラセボ投与、1日1回 6ヶ月連日投与
予定参加者数	NMN、プラセボの2群に対し、各群8例、合計16例とする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hironori Nakagami	4. 巻 20(2)
2. 論文標題 Cellular senescence and senescence-associated T cells as a potential therapeutic target.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Geriatr Gerontol Int.	6. 最初と最後の頁 97-100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ggi.13851	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

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	樂木 宏実 (Rakugi Hiromi) (20252679)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	杉本 研 (Ken Sugimoto) (20437403)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	