

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	第	号
------	---	---

氏 名 小 林 隆 史

論 文 題 目

慢性炎症における血清中タンパク質の糖鎖変動機序解明  
とバイオマーカー探索

### 論文審査担当者

主 査	名 古 屋 大 学 教 授	北 島 健
委 員	名 古 屋 大 学 教 授	佐 藤 ち ひ ろ
委 員	名 古 屋 大 学 教 授	柴 田 貴 広
委 員	名 古 屋 大 学 教 授	岡 島 徹 也
委 員	名 古 屋 大 学 助 教	呉 迪
委 員	名 古 屋 大 学 助 教	羽 根 正 弥

## 論文審査の結果の要旨

糖鎖は第 3 の生命鎖とも呼ばれ、細胞の接着、細胞間認識のみならず、個体の発生、分化など、種々の生理的機能に関わる重要な分子である。糖鎖には構造多様性があり、複雑な構造をもつためその分析技術の進歩は遅れてきたが、近年、質量分析 (MS) 解析技術が向上し、糖鎖構造をより直接的に評価することが可能となった。それに伴って、糖鎖は疾患の有無や重症度を判定するバイオマーカー分子として注目を集めている。本研究の目的は、糖鎖バイオマーカーの探索と有用性、またその産生機構の一端を解明することであり、具体的には、慢性炎症疾患である非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)、および関節リウマチに着目し、前者においては糖鎖バイオマーカーの探索とマーカー糖鎖変動機序の解明、後者においては既知の糖鎖マーカーであるシアル酸欠損免疫グロブリン (IgG) の産生機構の解明に向けた研究を行った。

(1) 非アルコール性脂肪性肝疾患と糖鎖に関する研究： 本疾患は、アルコール摂取量が基準値以下にもかかわらず、アルコール性肝疾患に類似の病態を示す疾患群である。非アルコール性脂肪性肝疾患は非アルコール性脂肪肝炎 (NAFL) および NASH とに分けられるが、NASH は肝硬変、および肝がんへと進展するリスクがあることから、NAFL および NASH を鑑別することは意義深い。現状では NAFL および NASH の鑑別は肝生検試料の病理評価に依存しているが、侵襲性が高いため、非侵襲的な NASH 診断マーカーが渴望されている。本研究では、NASH を非侵襲的に診断可能な血中の糖鎖バイオマーカーの探索を行った。まず、血清中糖タンパク質の N 型糖鎖を分析するため、SDS-PAGE 後のゲルから糖鎖を抽出し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法-飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF-MS) で分析する方法を構築した。この方法で NAFL 患者 5 例、および NASH 患者 6 例の血清中タンパク質の糖鎖を分析した結果、複数のタンパク質で糖鎖の有意な変動が認められた。このうち、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン (AAT) 上の糖鎖 A3F (AAT-A3F) が NASH 患者において最も大きく上昇していることがわかった。そこで AAT-A3F に着目して、AAT-A3F をより簡便かつ高いスループットで測定するため、血清から AAT を直接精製し糖鎖を解析する方法として、免疫沈降を用いた測定法 (IPG 法) を構築した。次に、この IPG 法によって NAFL 患者 57 例、および NASH 患者 74 例の AAT-A3F 濃度を測定した結果、AAT-A3F は NASH において有意に上昇することがわかった。ここで AAT タンパク質自体の濃度は群間で変化がなかったことから、AAT の糖鎖が NASH において変動していると考えられる。さらに、AAT-A3F が肝臓内のどのような変化を反映して上昇するのかに着目して、肝臓の病理学的スコアとの関連を調べたところ、AAT-A3F は肝臓内の炎症、および線維化を反映して上昇することが示唆された。AAT-A3F の変動メカニズムを調べるため、肝臓内の遺伝子発現量を調べた結果、A3F 糖鎖におけるアウター型フコースの転移を担う酵素である FUT6

## 論文審査の結果の要旨

遺伝子発現量が NASH で有意に上昇することがわかった。また、FUT6 遺伝子発現量を正に調節することが報告されており、NASH における炎症の進展に寄与するサイトカインである IL-6 の遺伝子発現量も NASH で有意に上昇していることもわかった。この肝臓中の IL-6 発現量と FUT6 発現量には相関があり、FUT6 発現量と血清中 AAT-A3F 濃度にも高い相関があることが判明したことから、IL-6 の増加を伴う肝臓内の炎症の進展によって FUT6 発現が亢進し、これによって血清中 AAT-A3F が増加する機構が働くことが示唆される。また、AAT-A3F の NASH 診断能を受信者動作特性 (ROC) 解析によって調べた結果、既知の NASH マーカー分子である cCK18 よりも優れた成績であった。したがって、AAT-A3F は NASH の診断に有用なマーカーであると考えられる。

(2) 関節リウマチと糖鎖に関する研究： タンパク質への糖鎖付加は通常、細胞内の小胞体、およびゴルジ装置で行われる。一方で、血清中など、細胞外において糖鎖への糖転移が起こるという可能性も提起されているが、証明されていない。本研究では、血清中の IgG のシアル酸が減少することが知られている疾患である関節リウマチに着目した。血清中でシアル酸の転移が起こると仮定した場合、血清中 IgG のシアル酸減少は、シアル酸転移のドナー基質である CMP-シアル酸の血清中濃度の減少に起因する可能性が考えられる。本研究では関節リウマチモデルである SKG マウスを用い、IgG のシアル酸修飾の度合いと、血清中 CMP-シアル酸濃度との関連を調べた。まず、血清中の CMP-シアル酸濃度を評価するため、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) カラムを用いた液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) 分析法の構築を行った。その結果、この分析法によって、CMP-シアル酸のみならず、シアル酸、および UDP-GlcNAc 等の各種糖ヌクレオチドの一斉分析が可能となった。血清を測定試料とする場合の定量性を添加回収試験によって評価し、5 ng/mL 程度まで定量が可能であることが確認された。次に、SKG マウス、および対象として同一系統の BALB/c マウスにおける血清中 IgG の N 型糖鎖を MALDI-TOF-MS によって解析した結果、SKG マウスではシアル酸修飾が減少しており、ヒト関節リウマチ患者と同様の変化が起こっていることが確認された。一方、血清中の CMP-シアル酸、およびシアル酸濃度を測定した結果、予測とは反対に、両者はいずれも SKG マウスで有意に増加していた。したがって、血清中 IgG のシアル酸減少は、血清中の CMP-シアル酸量の減少によるものではないと考えられた。血清中の CMP-シアル酸が SKG マウスで増加していたことから、CMP-シアル酸合成酵素 (CSS) の血清中存在量を評価した。CSS は通常では核内で機能する酵素であるが、昆虫 CSS および哺乳類 CSS が培養細胞から分泌されることが示されている。本研究においてマウス血清中の CSS 量を調べた結果、血清中においても CSS が存在し

## 論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

ていることが明らかになった。また、血清中 CSS 量は SKG マウスで増加しており、CMP-シアル酸の増加と対応する結果であった。さらに、血清中の CSS 活性についても SKG マウスで上昇していたことから、血清中の CSS は酵素活性を有していると考えられた。CSS 酵素活性と血清中 CMP-シアル酸濃度は相関しており、血清中 CMP-シアル酸の少なくとも一部は血清中 CSS によって供給されている可能性が示された。さらに、血清中 CSS は肝臓中 CSS とは異なる分子量を有していたことから、N 型糖鎖を切断する酵素であるペプチド:N-グリカナーゼ F (PNGase F) 処理による CSS の分子量変化を調べることで、CSS における N 型糖鎖修飾の有無を調べた。その結果、血清中 CSS は N 型糖鎖修飾を受けているのに対して、肝臓中 CSS には N 型糖鎖修飾は認められなかった。したがって、糖鎖を介した CSS の分泌機構、あるいは糖鎖を有する CSS が血中に滞留する機構が存在すると考えられる。そこで CSS が分泌される機構を解明するため、肝培養細胞である HepG2 および Hep1c1c7 に対するサイトカイン刺激を行った。その結果、関節リウマチで血清中濃度が上昇することが報告されている腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) で刺激した場合に、培養上清中への CSS 分泌が促進されることがわかった。一方で、これらの細胞の培養上清中 CSS は N 結合型糖鎖による修飾を受けていなかったことから、分泌型の CSS が糖鎖修飾を受けるといった単純な機構ではないこともわかった。

以上のように、本研究では非アルコール性脂肪性肝疾患および関節リウマチのような慢性炎症を伴う疾患における糖鎖バイオマーカーを同定し、糖鎖の疾患マーカーとしての有用性を明らかにした。また、これらの疾患において血中糖鎖が変動する機構として、炎症性サイトカインを介した制御が関与することも突きとめた。さらに、本研究では、その遂行過程において、血中タンパク質の糖鎖解析法および糖ヌクレオチド等の測定法を確立することができた。これらの手法は汎用性および実用性も高く、今後、糖鎖解析の基盤技術となることが期待できる。このように本論文は、独創性および新規性において高い学術的価値をもち、その成果はさらに社会貢献に繋がることが期待できる。したがって、審査委員会は本論文が博士 (農学) の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。