

## 主論文の要約

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

氏名： 小林 隆史

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、および分化など、種々の生理的機能に関わる重要な分子である。糖鎖はその構造的多様性から分析技術の進歩が遅れてきたが、近年、質量分析 (MS) 解析技術の向上により、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、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糖鎖は注目を集めている。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 G (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 を鑑別することが重要である。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、肝生検は侵襲性が高く、また採取試料が微小であることにより肝臓全体の状態を反映しない場合がある等の問題点を有するため、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) で分析する方法として、Focused Protein Glycomics (FPG) 法の構築を行った。FPG 法においては、血清中のタンパク質を市販の 2 種のアフィニティーカラムへの結合の有無により 3 画分に分画し、各画分を SDS-PAGE によって分離してタンパク質の染色を行った。可視化されたバンドを切り出し、タンパク質を同定することにより、単一のタンパク質がバンドを形成した 7 種のタンパク質 (IgG、トランスフェリン、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン、 $\alpha$ 2-マクログロブリン、補体 C3、ハプトグロビン、およびセルロプラスミン) を糖鎖解析の対象タンパク質として設定した。ゲルから抽出したペプチドに対して N 型糖鎖切断酵素で

あるペプチド:N-グリカナーゼ F (PNGase F) を作用させ、遊離した糖鎖をアミノオキシトリプトファンアルギニン (aoWR) で標識後、MALDI-TOF-MS 分析を行い、内部標準として添加した糖鎖とのピーク面積比から各糖鎖の定量を行った。

FPG 法により、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、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン上の糖鎖 A3F (AAT-A3F)、補体 C3 上の糖鎖 Man6、およびセルロプラスミン上の糖鎖 A1、A2、および A3 が群間で有意な変動を示した。IgG、トランスフェリン、 $\alpha$ 2-マクログロブリン、およびハプトグロビンについては糖鎖の有意な変動は認められなかった。変動がみられた糖鎖のうち、AAT-A3F が NASH 患者において最も大きく上昇していたことから、AAT-A3F に着目してその後の研究を進めた。AAT-A3F の臨床性能を調べる上では多症例での評価が必要であるが、FPG 法は操作ステップが多く、多症例の測定には適していないことが課題であった。そこで、AAT-A3F をより簡便に測定するため、血清から  $\alpha$ 1-アンチトリプシン (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 (Immunoprecipitation-Glycomics; IPG) 法を構築し、これによってスループットの向上を達成した。FPG 法、および IPG 法で測定した血清中 AAT-A3F 濃度は高い相関を示したことから、IPG 法によって FPG 法と同様の結果を簡便に得られることを確認した。

AAT-A3F の NASH マーカー性能を多症例で評価するため、NAFL 患者 57 例、および NASH 患者 74 例の AAT-A3F 濃度を IPG 法によって測定した結果、AAT-A3F は NASH において有意に上昇していた。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た。AAT-A3F が肝臓内のどのような変化を反映して上昇するかを調べるため、肝臓の病理学的スコアとの関連を調べた結果、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 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 circulating cytokeratin 18 (cCK18) よりも優れた成績であったことから、AAT-A3F は NASH の診断に有用であると考えられた。

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 遺伝子発現量が NASH で有意に上昇した。また、FUT6 遺伝子発現量を正に調節すると報告され、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た。肝臓中の IL-6 発現量と FUT6 発現量は相関を示し、FUT6 発現量と血清中 AAT-A3F 濃度は高い相関を示したことから、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 が増加することが示唆された。

(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、由来細胞内の小胞体、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 IgG のシアル酸修飾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。SKG マウスとは、T 細胞内のシグナル伝達物質である ZAP-70 に遺伝子変異を有し、マンナン等の多糖の添加によって関節リウマチを発症することが知られるモデルである。

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。移動相の pH の検討を通じ、pH 7.5 の移動相を用いることで、CMP-シアル酸、シアル酸、および UDP-GlcNAc 等の各種糖ヌクレオチドを一斉分析できることを確認した。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、CMP-シアル酸、およびシアル酸については 5 ng/mL まで定量が可能であることを確認した。次に、SKG マウスにおいて、ヒト関節リウマチ患者で認められる IgG のシアル酸減少が起こっているかを確認するため、血清中 IgG の N 型糖鎖を MALDI-TOF-MS によって解析した。SKG マウス、および対照として同一系統の BALB/c マウスを比較した結果、SKG マウスでは IgG の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を確認した。一方、血清中の CMP-シアル酸、およびシアル酸濃度を LC/MS によって測定した結果、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) の血清中存在量をキャピラリー電気泳動イムノアッセイによって評価した。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、血清中 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。

キャピラリー電気泳動イムノアッセイの結果において、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、PNGase F 処理時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評価した。その結果、血清中 CSS は N 型糖鎖修飾を受けていたのに対し、肝臓中 CSS においては 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。CSS が分泌される機構を詳細に調べるため、肝培養細胞である HepG2、および Hepal1c7 に対してサイトカイン刺激を行い、細胞内、および培養上清中の CSS 量

を評価した。その結果、これらの細胞を腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) で刺激した場合に、細胞内の CSS 量には変化がみられなかったが、培養上清中の CSS 量が増大した。TNF- $\alpha$  は関節リウマチにおいて血清中濃度が上昇することが知られるサイトカインであることから、SKG マウスにおける血清中 CSS の増加は血清中 TNF- $\alpha$  濃度の上昇に起因することが示唆された。一方で、これらの細胞の培養上清中 CSS の N 型糖鎖修飾の有無を調べた結果、N 型糖鎖修飾は認められなかった。したがって、分泌型の CSS が糖鎖修飾を受けるという単純な機構ではないと考えられた。CSS の分泌機構の解明についてはさらなる研究が必要である。

以上のように本研究では、血清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構築し、慢性炎症を伴う疾患におけるバイオマーカーの探索、および糖鎖変動機構の解明を目指した。それにより、炎症性サイトカインを介した糖鎖制御メカニズムを明らかにすることができた。本研究で見出した知見は、炎症を伴う疾患の病態をより詳細に理解し、有用な診断法を見出す上で、意義があると考えられる。