HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	糖尿病網膜症におけるN型糖鎖プロファイルの変化
Author(s)	稲福, 沙織
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第11954号
Issue Date	2015-09-25
DOI	10.14943/doctoral.k11954
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/59967
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号：2184
File Information	Saori_Inafuku.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

糖尿病網膜症における *N*型糖鎖プロファイルの変化

(Alteration of *N*-glycan Profiles

in Diabetic Retinopathy)

2015 年 9 月

北海道大学

稲福　沙織

目 次

発表論文目録および学会発表目録 ……1 頁

緒言 ……3 頁

略語表 ……5 頁

実験方法 ……6 頁

実験結果 ……9 頁

考察 ……17 頁

総括および結論 ……20 頁

謝辞 ……21 頁

引用文献 ……22 頁

なお、本文における図、表の一部はすでに Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology、Investigative Ophthalmology & Visual Science および Current Eye Research に掲載されており、本論文における使用にあたっては出版社より承諾を得ている。

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Inafuku S, Noda K, Amano M, Ohashi T, Yoshizawa C, Saito W, Kanda A, Nishimura S, Ishida S.
   A comparison of *N*-glycan profiles in human plasma and vitreous fluid.
   Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology;252:1235-43.2014
2. Inafuku S, Noda K, Amano M, Ohashi T, Yoshizawa C, Saito W, Murata M, Kanda A, Nishimura S, Ishida S.
   Alteration of *N*-glycan Profiles in Diabetic Retinopathy.
   Investigative Ophthalmology & Visual Science;56:5316-22.2015
3. 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.
   Current Eye Research;1-4.2015(Epub ahead of print)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Takashina S, Noda K, Amano M, Saito W, Kanda A, Nishimura S, Ishida S.
   Profile Analysis of Glycans in Human Vitreous.
   The 8th Congress of Asia Pacific Vitreo-retina Society, Nagoya (2013年12月)
2. Takashina S, Noda K, Amano M, Yoshida S, Saito W, Kanda A, Nishimura S, Ishida S.
   Profile Analysis of Glycans in Human Vitreous.
   World Ophthalmology Congress, Tokyo (2014年4月)
3. Takashina S, Noda K, Amano M, Yoshida S, Saito W, Kanda A, Nishimura S, Ishida S.
   Profile of *N*-Glycans in Human Vitreous.
   The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Orlando, Florida, USA (2014年5月)
4. 稲福沙織, 野田航介, 天野麻穂, 大橋哲, 齋藤航, 神田敦宏, 西村紳一郎, 石田晋
   「ヒト硝子体中の*N*型糖鎖プロファイル」
   『第79回インターフェロン・サイトカイン学会』 札幌 (2014年6月)
5. 稲福沙織, 野田航介, 天野麻穂, 大橋哲, 吉澤史子, 齋藤航, 村田美幸, 神田

敦宏, 西村紳一郎, 石田晋
「糖尿病網膜症の硝子体および血漿における *N*型糖鎖の網羅的解析」
『第 69 回日本臨床眼科学会』 神戸(2014 年 11 月)

6. 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.
The 9th Japan-Korea International Symposium in Ophthalmology, Sapporo (2014 年 12 月)
7. Inafuku S, Noda K, Amano M, Murata M, Saito W, Ohashi T, Kanda A, Nishimura S, Ishida S.
Profile of *N*-Glycans in Human Vitreous.
The Asia Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Tokyo (2015 年 2 月)
8. 稲福沙織, 野田航介, 天野麻穂, 大橋哲, 齋藤航, 村田美幸, 神田敦宏, 西村紳一郎, 石田晋
「糖尿病網膜症の硝子体および血漿における *N*型糖鎖プロファイル」
『第 20 回日本糖尿病眼学会総会』 東京 (2015 年 3 月)
9. 稲福沙織, 野田航介, 天野麻穂, 大橋哲, 齋藤航, 村田美幸, 神田敦宏, 西村紳一郎, 石田晋
「糖負荷刺激によるシアル酸転移酵素の誘導」
『第 119 回日本眼科学会総会』札幌 (2015 年 4 月)
10. 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.
The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Denver, Colorado, USA (2015 年 5 月)

緒言

糖尿病網膜症(図１)は糖尿病における三大合併症の１つであり、細小血管障害による網膜虚血により新生血管が形成され、網膜剥離や硝子体出血、血管新生緑内障を引き起こす疾患である。本疾患は日本人の壮年期における主要な中途失明原因であり、患者数は増加の一途をたどっているが、根本的な治療法はなく硝子体手術などの既存治療法による視力予後は良好とは言い難い。そのため、新たな治療法の開発や予防的介入につながる新規標的分子の探索は非常に重要である。

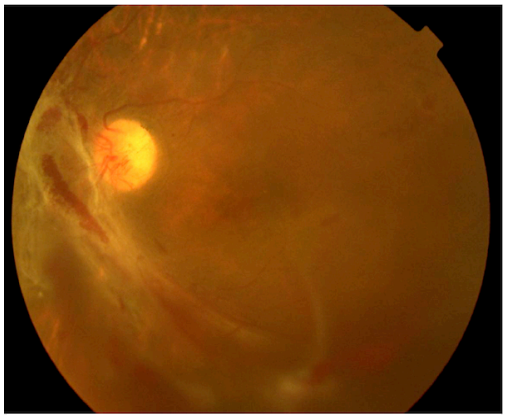

図１　糖尿病網膜症

近年、核酸と蛋白質に続く第三の鎖状生命高分子として、糖鎖が注目されている。糖鎖修飾は、蛋白質の機能調節に関わる「翻訳後修飾」の中でも重要な現象として広く認識されており、糖鎖構造の変化が蛋白機能に影響を与えることはよく知られている[1]。糖鎖は単糖が鎖状に連なったもので、ヒトにおいては８種類の単糖(図 2)が様々な組み合わせで結合して存在している。

糖類の単糖成分	
ヘキソース	ガラクトース(Gal)、マンノース(Man)、グルコース(Glc)
デオキシヘキソース	フコース(Fuc)
ヘキソサミン	N-アセチルグルコサミン(GlcNac)、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)
シアル酸	N-アセチルノイラミン酸(NeuAc)
ペントース	キシロース

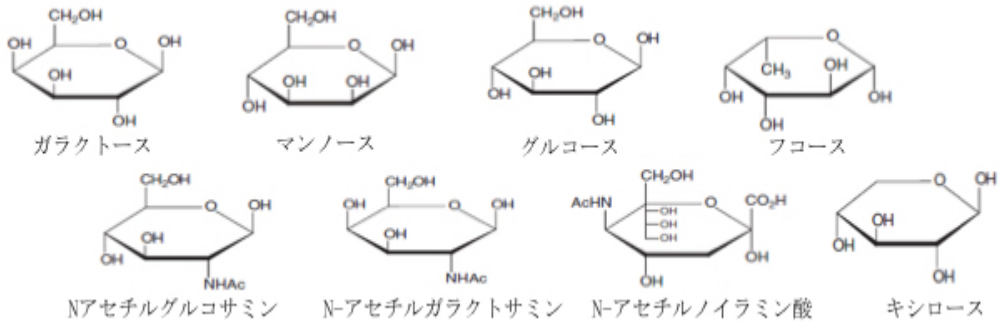

図 2 糖鎖を構成する単糖（ヒトでは８種類）

また、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(Asn)の窒素原子を介する *N* 型糖鎖の 2 種類があるが、その中で *N* 型糖鎖についての解析・研究が進んでいる(図3)。*N* 型糖鎖は、各種全身疾患においてそのプロファイルが変化することが知られており、肝臓癌[2]、膵臓癌[3]などの悪性腫瘍や潰瘍性大腸炎[4]などの炎症性疾患において、血液中の *N* 型糖鎖プロファイルの変化が相次いで報告されている。また、分子レベルにおいても糖尿病網膜症の病態で重要な役割を演じることが知られている erythropoietin[5] や intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)[6] などにおける糖鎖構造の異常はその機能変化を惹起することが明らかとされている。

図 3　*N* 型糖鎖

(Varki A, et al. Curr Protoc Protein Sci. 2009 より改変)

したがって、糖尿病網膜症の眼内においてどのような糖鎖変化が生じるかは大変興味深い点である。しかし、糖尿病網膜症のみならず、ヒト眼内(硝子体)における糖鎖プロファイルに関する報告は今までなされていない。その理由として、1) 糖鎖は DNA や蛋白質と異なり、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 1 検体あたり 3〜4 日を要していたこと、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が考えられる。しかしながら、共同研究者の西村紳一郎(北海道大学)らによって 96 検体の定量的糖鎖解析を 3〜4 時間で施行でき、かつ網羅的に幅広い種類の糖鎖を検出できる画期的な方法「グライコブロッティング法」が開発され、糖鎖研究は大きく前進することとなった[7,8]。

本研究の目的は、このグライコブロッティング法を応用して糖尿病網膜症患者の硝子体中の糖鎖を解析し、そのプロファイル変化を明らかにすること、さらに糖鎖変化の病態メカニズムへの関与を検討することにある。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

CHO	Chinese hamster ovary
dHex	deoxyhexose
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GlcNac	N-acetylglucosamine
Hex	Hexose
HexNAc	N-acetylsamine
HRMECs	human retinal microvascular endothelial cells
Man	Mannose
NeuAc	N-Acetylneuraminic acid
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
ST3GAL1	ST3 beta-Gal alpha-2,3-Sialyltransferase 1
ST3GAL4	ST3 beta-Gal alpha-2,3-Sialyltransferase 4
ST6GAL1	ST6 beta-Gal alpha-2,3-Sialyltransferase 1

実験方法

血液検体および硝子体検体の採取

本研究計画は、北海道大学病院高度先進医療支援センターによる自主臨床研究の承認を得て施行した（承認番号 011-0172)。北海道大学病院眼科で硝子体手術を施行された糖尿病網膜症患者および非糖尿病患者より血液検体および硝子体検体を採取した。非糖尿病群としては、基礎疾患として糖尿病を有していない特発性黄斑円孔や特発性黄斑上膜の症例を用いた。血液検体は入院時に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たため、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かった。

グライコブロッティング法による *N*型糖鎖解析

採取した血漿中(10ul)および硝子体中(200ul)における糖鎖をグライコブロッティング法により網羅的に解析をおこなった。グライコブロッティング法は、1) 試料溶液からの N-結合型糖鎖の切り出し、2) BlotGlyco® H ビーズ(Sumitomo Bakelite, Co., Tokyo, Japan)への全糖鎖の化学選択的捕捉、3) ビーズ上でのシアル酸の誘導体化、4) ラベル化糖鎖の遊離、5) Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS, Ultraflex 3, Bruker Daltonics, Billerica, MA)による糖鎖構造の解析と定量分析の５つのステップから成る。本法の最大の特徴は，糖鎖の精製を化学選択的に行う点にある。生体分子中で糖鎖のみがその還元末端にアルデヒド基を有していることを利用して、こ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に表面に持つビーズと反応させることで、大量の夾雑

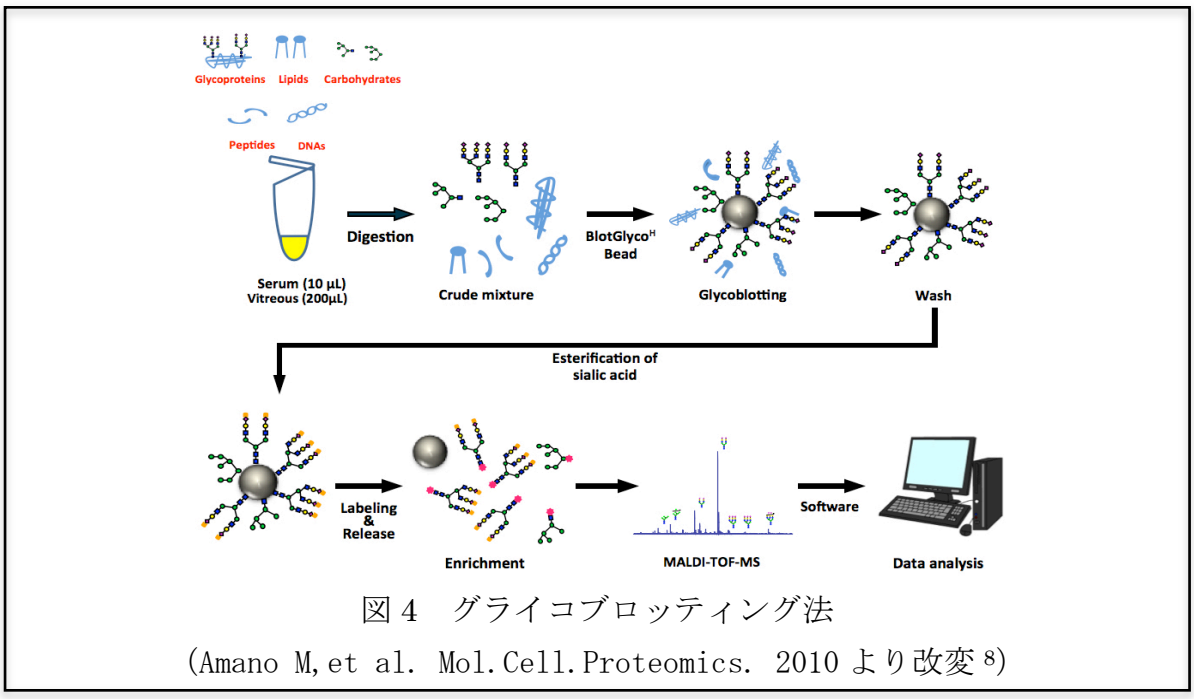

図４　グライコブロッティング法

(Amano M, et al. Mol.Cell.Proteomics. 2010 より改変[8])

物が存在する生体試料であっても，高効率で糖鎖のみをエンリッチすることが可能である(図 5)[8]。

ヒト網膜血管内皮細胞の培養

ヒト網膜血管内皮細胞(human retinal microvascular endothelial cells, HRMECs, Cell Systems Corporation, Kirkland, WA)を用いて real-time PCR 用は 6well プレートに、ELISA 用は 10cm dish にそれぞれ播種した。標準グルコース濃度(5.0mM)と高グルコース濃度(25mM)の CSC complete defined medium (DS Pharma Biomedical,Osaka,Japan)で 37℃、5%CO_2条件下で培養をおこなった。

RNA 抽出および real-time PCR

培養6時間後、24時間後、72時間後にTRIzol Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA)を用いてHRMECsの細胞破砕液を回収した。 DNAase(Promega, Madison, WI)で処理した後、GoScript Reverse Transcriptaseおよび oligo (dT)15primers(Promega)を用いて RNA から cDNA を作成した。内因性コントロールとしては glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(*GAPDH*)を用い、プライマーは下記に記載した配列を使用した。*ST3GAL1*および*ST3GAL4, ST6GAL1*の TaqMan probe は Life Technologies社より購入した。Real-time PCRは GoTaq qPCR Master Mix(Promega), THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO, Tokyo, Japan)を使用し、StepOnePlus Real-Time PCR System(Life Technologies)でおこなった。反応条件は95℃2分、続いて95℃15秒、60℃1分が40サイクルとした。Threshold cycle(C_T)値はStepOnePlus Real-Time PCR Systemに内蔵されたプログラムにより自動的に測定された。*Gapdh*を内因性コントロールとして各サンプルにおける各遺伝子の相対的な発現量を ΔΔCT法で算出した。

GAPDH プライマー

Forward 5'-CCTGGCCAAGGTCATCCATG-3'

Reverse 5'-GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-3'

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

培養 72 時間後に HRMECs の細胞破砕液を回収し、さらに超音波(5 秒間、4 回)で処理した後、遠心(17700g, 4℃, 10 分)した上で上清を採取した。ST3GAL1 および ST3GAL4 の蛋白濃度をそれぞれの ELISA kit(ST3GAL1, Cusabio Biotech, Wuhan, China; ST3GAL4, Blue Gene, Shanghai, China)を用いてマイクロプレートリーダー(Sunrise, TECAN, Männedorf, Switzerland)で測定した。さらに各サンプルの総蛋白濃度を BCA Protein Assay Kit(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)で測定し、各蛋白質濃度を補正した。

統計解析

実験結果はすべて平均±標準誤差で示している。統計解析は two-tailed unpaired Student *t*-test を用いた。*P* 値が 0.05 以下を有意とした。

実験結果

非糖尿病群の血漿中および硝子体中の糖鎖

硝子体中の糖鎖プロファイルを網羅的に検討した報告は、これまでにない。そのため、本研究では最初に非糖尿病群（黄斑円孔および黄斑上膜患者）から採取した血漿中および硝子体中の *N*型糖鎖について解析した。硝子体中の総糖鎖量(132±29 pmol/100μg protein, n=20)は、血漿中の総糖鎖量(714±29 pmol/100μg protein, n=20)と比較して有意に少なかった(P<0.0001,図5)。

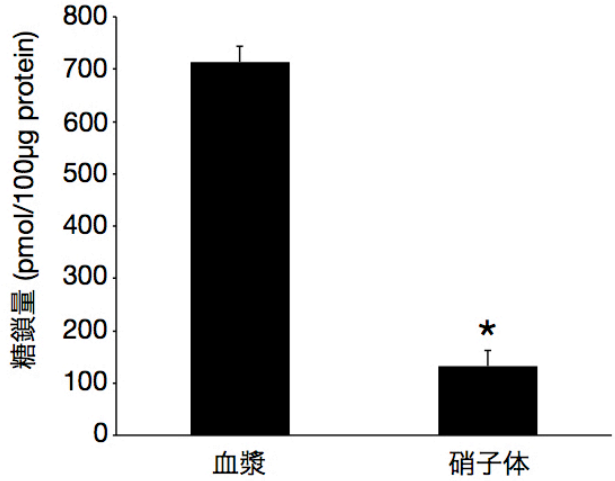

図5　血漿中と硝子体中の総糖鎖量。硝子体中では血漿中と比較して有意に少なかった。*, P<0.0001

また、血漿中の糖鎖プロファイルの 90%以上は硝子体中と共通であり、硝子体中の糖鎖は全て血漿中にも含まれる糖鎖であった。さらに、血漿中および硝子体中にもっとも多く含まれる糖鎖構造[(Hex)2(HexNac)2(NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2](m/z 2681)は両者で一致することが明らかとなった(表1)。

m/z		硝子体(%)	血漿(%)	*P* value
2681	(Hex)2(HexNAc)2(NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	37.2±3.1	39.7±1.1	0.237
2827	(Hex)2(HexNAc)2(dHex)1(NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	15.6±1.5	2.3±0.2	＜0.000001
1664	(Hex)2 + (Man)3(GlcNAc)2	10.6±1,5	1.4±0.1	＜0.000001
2054	(Hex)1(HexNAc)2(dHex)1 + (Man)3(GlcNAc)2	9.0±0.5	11.3±0.6	＜0.05
1892	(HexNAc)2(dHex)1 + (Man)3(GlcNAc)2	7.9±0.6	11.0±0.6	＜0.01
2095	(HexNAc)3(dHex)1 + (Man)3(GlcNAc)2	4.6±0.4	1.7±0.1	＜0.00001
2216	(Hex)2(HexNAc)2(dHex)1 + (Man)3(GlcNAc)2	3.3±0.2	3.9±0.3	0.194
2257	(Hex)1(HexNAc)3(dHex)1 + (Man)3(GlcNAc)2	3.2±0.2	1.7±0.1	＜0.00001
2522	(Hex)2(HexNAc)2(dHex)1(NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2.9±0.2	3.3±0.1	0.112
2375	(Hex)2(HexNAc)2(NeuAc)1+ (Man)3(GlcNAc)2	2.3±0.2	13.0±0.4	＜0.000001
1826	(Hex)3 + (Man)3(GlcNAc)2	2.0±0.3	1.3±0.1	＜0.05
2070	(Hex)2(HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	0.8±0.1	0.7±0.0	0.118
1988	(Hex)4 + (Man)3(GlcNAc)2	0.5±0.1	0.2±0.0	＜0.001
Others			8.4±0.3	N/A

表1　硝子体および血漿中の糖鎖プロファイル

非糖尿病群における硝子体中糖鎖の疾患別比較

次に、硝子体中の総糖鎖量を黄斑円孔群（120 ± 45 pmol/100μg protein, n=11）と黄斑上膜群（146±35 pmol/100μg protein, n=9）で比較したところ両群に有意な差は認めなかった（P=0.50, 図 6）。さらに、それぞれの糖鎖プロファイルを比較したところ、両群間に統計学的有意な差は認めなかった（表 2）。

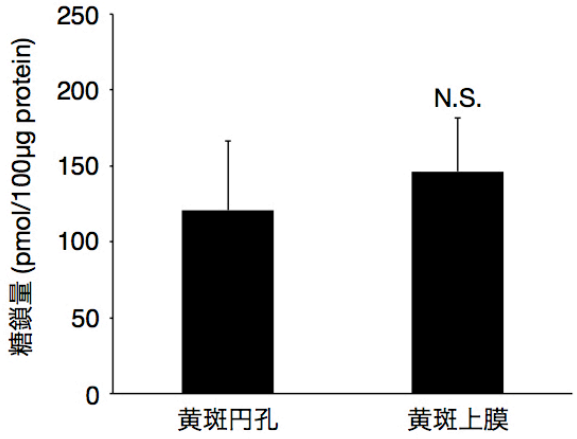

図 6 硝子体中の糖鎖量。黄斑円孔群と黄斑上膜群では有意な差は認めなかっ

m/z		黄斑円孔(%)	黄斑上膜(%)	*P* value
2681	(Hex)2(HexNAc)2(NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	35.0±3.6	39.8±5.6	0.424
2827	(Hex)2(HexNAc)2(dHex)1(NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	17.4±2.3	13.5±1.9	0.374
1664	(Hex)2 + (Man)3(GlcNAc)2	11.0±1.8	10.2±2.9	0.286
2054	(Hex)1(HexNAc)2(dHex)1 + (Man)3(GlcNAc)2	8.7±0.7	9.3±0.9	0.859
1892	(HexNAc)2(dHex)1 + (Man)3(GlcNAc)2	7.3±0.7	8.7±1.1	0.424
2095	(HexNAc)3(dHex)1 + (Man)3(GlcNAc)2	4.8±0.6	4.3±0.6	0.374
2216	(Hex)2(HexNAc)2(dHex)1 + (Man)3(GlcNAc)2	3.4±0.3	3.2±0.3	0.859
2257	(Hex)1(HexNAc)3(dHex)1 + (Man)3(GlcNAc)2	3.4±0.3	3.1±0.3	0.374
2522	(Hex)2(HexNAc)2(dHex)1(NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	3.1±0.3	2.6±0.4	0.248
2375	(Hex)2(HexNAc)2(NeuAc)1+ (Man)3(GlcNAc)2	2.3±0.4	1.6±0.3	0.286
1826	(Hex)3 + (Man)3(GlcNAc)2	2.1±0.2	2.6±0.2	0.131
2070	(Hex)2(HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	0.9±0.2	0.7±0.1	0.328
1988	(Hex)4 + (Man)3(GlcNAc)2	0.6±0.1	0.4±0.1	0.110

表 2 硝子体中の糖鎖プロファイル

非糖尿病群における硝子体中糖鎖の性別比較

硝子体中の糖鎖量を男性（121±33 pmol/100μg protein, n=10）と女性（143±49 pmol/100μg protein, n=10）で比較したところ両群に有意な差は認めなかった（P=0.80, 図 7）。糖鎖プロファイルも両群間に統計学的有意な差は認めなかった（表 3）。

これらの結果は、 1）非糖尿病患者硝子体中の糖鎖量は血漿中と比較して 20%以下であること、 2）血液眼関門によって隔離された硝子体中では血漿中とは異なる糖鎖

プロファイルが存在すること、 3）硝子体中の糖鎖量や糖鎖プロファイルは非糖尿病患者である黄斑円孔群と黄斑上膜群間、また男女間で有意差はないことを示しており、これらの疾患群はこれまでの硝子体検体を用いた蛋白成分に関する研究と同様に、糖鎖研究でもコントロール群として使用できると考えられた。

以上の検討結果を、我々は学術誌[Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology]に報告した[9]。

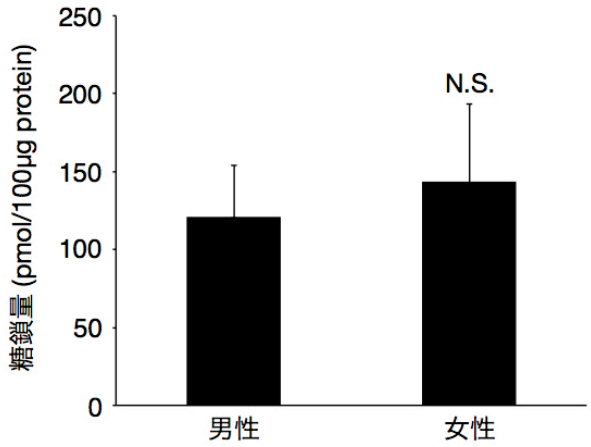

図 7 硝子体中の糖鎖量。男性と女性で有意な差は認めなかった。

m/z		男性(%)	女性(%)	*P* value
2681	(Hex)2(HexNAc)2(NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	40.8±4.2	33.6±4.6	0.200
2827	(Hex)2(HexNAc)2(dHex)1(NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	13.5±2.2	17.8±2.1	0.070
1664	(Hex)2 + (Man)3(GlcNAc)2	9.3±1.9	11.9±2.5	0.402
2054	(Hex)1(HexNAc)2(dHex)1 + (Man)3(GlcNAc)2	9.1±0.8	8.9±0.8	0.508
1892	(HexNAc)2(dHex)1 + (Man)3(GlcNAc)2	7.9±1.0	8.0±0.8	0.895
2095	(HexNAc)3(dHex)1 + (Man)3(GlcNAc)2	4.5±0.7	4.7±0.6	0.691
2216	(Hex)2(HexNAc)2(dHex)1 + (Man)3(GlcNAc)2	3.3±0.3	3.3±0.3	0.895
2257	(Hex)1(HexNAc)3(dHex)1 + (Man)3(GlcNAc)2	3.3±0.3	3.1±0.3	0.757
2522	(Hex)2(HexNAc)2(dHex)1(NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	2.6±0.2	3.2±0.3	0.402
2375	(Hex)2(HexNAc)2(NeuAc)1+ (Man)3(GlcNAc)2	2.5±0.3	2.2±0.3	0.310
1826	(Hex)3 + (Man)3(GlcNAc)2	2.0±0.4	2.0±0.3	0.566
2070	(Hex)2(HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	0.8±0.2	0.7±0.1	0.825
1988	(Hex)4 + (Man)3(GlcNAc)2	0.5±0.2	0.5±0.1	0.627

表 3 硝子体中の糖鎖プロファイル

糖尿病網膜症群の硝子体における総 *N*型糖鎖量の増加

次に、糖尿病網膜症群における血漿および硝子体中の *N*型糖鎖を前述の非糖尿病群を対照群として比較検討した。血漿中総 *N* 型糖鎖量は、非糖尿病群 (817.7±43.0 pmol/100μg protein, n=17)と糖尿病網膜症群 (878.2±36.4 pmol/100μg protein, n=17) の両群間に統計学的有意な差は認めなかった(P=0.29, 図 8)。

一方、硝子体中では糖尿病網膜症群で総 *N* 型糖鎖量が有意に増加していた (142.7±30.8 VS 495.5±37.4 pmol/100μg protein, n=17 each, P<0.001, 図 9)。しかしながら、糖尿病の一般的な治療目標値である HbA1c7.0%で糖尿病網膜症群を二群に分けて検討したが、7.0%未満 (526.5±62.6 pmol/100μg protein, n=8) と 7.0%以上 (468.0±45.1 pmol/100μg protein, n=9)で硝子体中の総 *N*型糖鎖量は、両群間で統計学的有意な差を認めなかった(P=0.46, 図 10)。

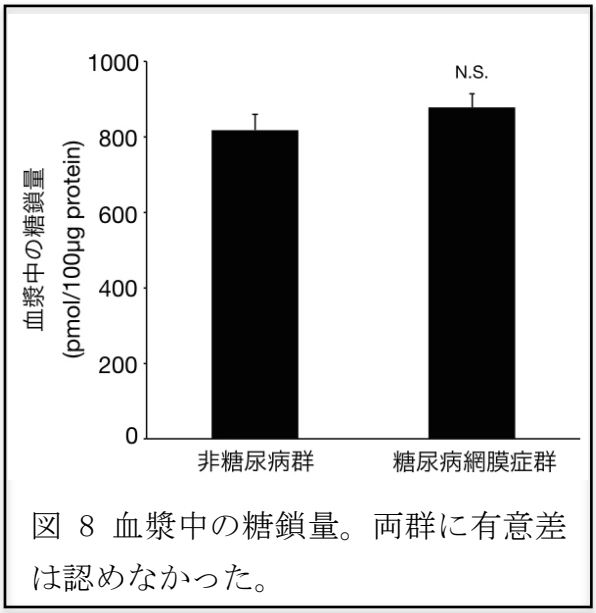

図 8 血漿中の糖鎖量。両群に有意差は認めなかった。

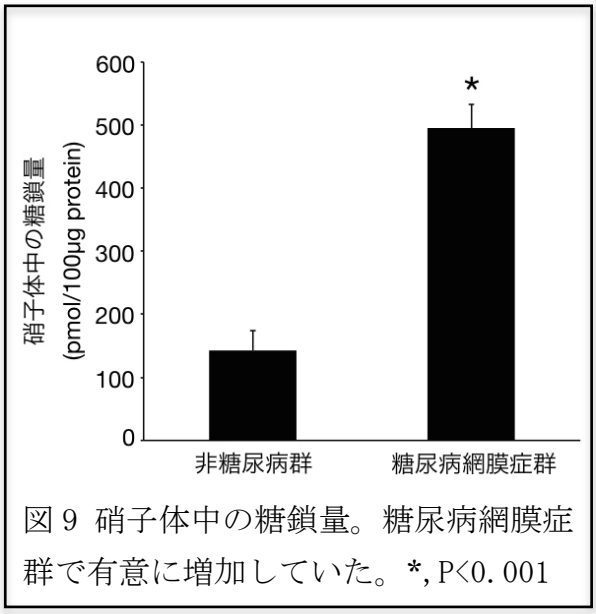

図 9 硝子体中の糖鎖量。糖尿病網膜症群で有意に増加していた。*, P<0.001

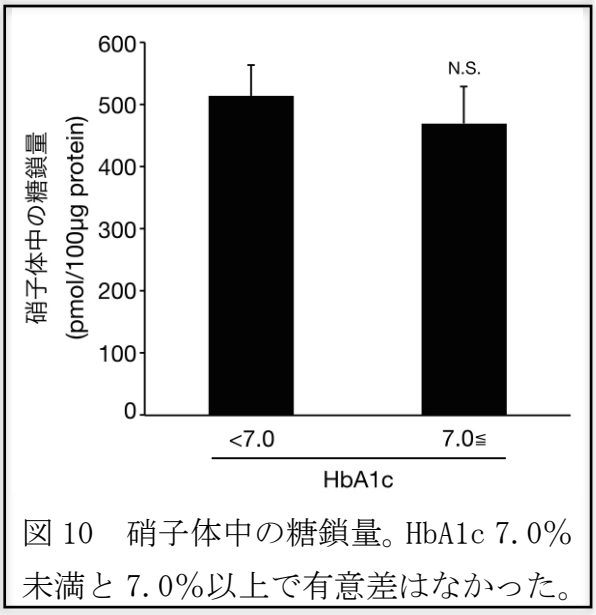

図 10 硝子体中の糖鎖量。HbA1c 7.0%未満と 7.0%以上で有意差はなかった。

糖尿病網膜症の硝子体における糖鎖プロファイルの変化

続いて、糖尿病網膜症における糖鎖プロファイルの変化を検討するために、非糖尿病群と糖尿病網膜症群の血漿と硝子体における糖鎖構造について解析をおこなった。

シアル酸含有糖鎖は、非糖尿病群と糖尿病網膜症群ともに血漿中で 19 種類が検出された(表 4)。一方、硝子体中でシアル酸含有糖鎖は 13 種類が検出されたが(表 5)、全て血漿中で検出された 19 種類のシアル酸含有糖鎖に含まれていた。また、硝子体中ではシアル酸含有糖鎖の多くが糖尿病群で増加していたが、血漿中ではシアル酸含有糖鎖の多くは非糖尿病群と糖尿病群で変化しなかった。また、ハイマンノース型糖鎖は硝子体中では非糖尿病群と糖尿病網膜症群ともに 5 種類検出され(表 5)、全て血漿中で検出された 6 種類のハイマンノース型糖鎖の中に含まれていた(表 4)。

m/z		非糖尿病群 (pmol/100μg)	糖尿病群 (pmol/100μg)	*P value*
<ハイマンノース型糖鎖>				
1502	(Hex)1 + (Man)3 (GlcNac)2	0.4±0.0	0.6±0.1	<0.05
1664	(Hex)2 + (Man)3 (GlcNac)2	9.2±0.7	12.6±1.1	<0.05
1826	(Hex)3 + (Man)3 (GlcNac)2	8.7±0.7	11.6±0.9	<0.05
1988	(Hex)4 + (Man)3 (GlcNac)2	1.1±0.1	1.4±0.2	0.12
2150	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2	0.9±0.1	1.5±0.2	<0.05
2312	(Hex)6 + (Man)3 (GlcNac)2	0.9±0.1	1.2±0.2	0.07
<シアル酸含有糖鎖>				
1848	(HexNAc)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNac)2	0.1±0.0	0.2±0.0	0.37
2010	(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNac)2	8.0±0.4	9.7±0.5	0.32
2156	(Hex)1(HexNAc)1(dHex)1(NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	0.4±0.0	0.5±0.1	0.06
2172	(Hex)2 (HexNAc)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNac)2	6.0±0.2	7.6±0.3	0.06
2334	(Hex)3(HexNac)1(NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	0.7±0.1	1.0±0.2	0.09
2359	(Hex)1(HexNAc)2(dHex)1(NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	6.2±0.5	5.1±0.7	0.19
2375	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNac)2	112.5±6.4	126.6±6.3	0.13
2521	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNac)2	28.2±1.6	29.9±2.2	0.52
2562	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNac)2	1.0±0.1	1.2±0.1	0.26
2578	(Hex)2 (HexNAc)3 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNac)2	1.9±0.3	3.3±0.6	0.07
2681	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNac)2	358.9±24.1	378.4±19.1	0.53
2725	(Hex)2(HexNAc)3(dHex)1(NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	11.6±1.3	14.2±1.4	0.17
2741	(Hex)3(HexNAc)3(NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	0.7±0.1	0.9±0.1	0.26
2827	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNac)2	22.5±1.9	23.7±2.3	0.7
2887	(Hex)3(HexNAc)3(dHex)1(NeuAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	0.1±0.0	0.1±0.0	<0.05
3030	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNac)2	4.3±0.6	5.9±1.0	0.2
3046	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNac)2	1.8±0.3	1.7±0.2	0.84
3351	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)3 + (Man)3 (GlcNac)2	13.6±2.5	13.5±1.6	0.97
3497	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3 (GlcNac)2	1.7±0.5	2.0±0.4	0.66
<その他>				
1746	(HexNAc)2 + (Man)3 (GlcNac)2	0.7±0.1	1.0±0.4	0.34
1892	(HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	71.8±6.7	72.7±10.7	0.94
1908	(Hex)1 (HexNAc)2 + (Man)3 (GlcNac)2	2.8±0.3	2.8±0.4	0.89
1949	(HexNAc)3 + (Man)3 (GlcNac)2	0.8±0.1	1.7±0.3	<0.05
2054	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	77.8±5.8	73.8±7.1	0.67
2070	(Hex)2 (HexNAc)2 + (Man)3 (GlcNac)2	4.6±0.2	5.0±0.3	0.38
2095	(HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	10.9±1.4	14.4±2.2	0.19
2111	(Hex)1 (HexNAc)3 + (Man)3 (GlcNac)2	0.8±0.1	1.4±0.2	<0.05
2216	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	26.5±2.2	26.8±2.5	0.94
2257	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	11.8±1.1	15.6±2.0	0.12
2419	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	3.5±0.4	4.3±0.6	0.26
2639	(Hex)3(HexNAc)4 + (Man)3(GlcNAc)2	4.3±0.4	4.2±0.3	0.82

表 4 血漿中の糖鎖プロファイル

m/z		非糖尿病群 (pmol/100μg)	糖尿病群 (pmol/100μg)	*P value*
<ハイマンノース型糖鎖>				
1502	(Hex)1 + (Man)3 (GlcNac)2	0.2±0.1	0.1±0.0	0.21
1664	(Hex)2 + (Man)3 (GlcNac)2	8.4±1.5	9.6±1.0	0.53
1826	(Hex)3 + (Man)3 (GlcNac)2	1.7±0.3	2.3±0.3	0.15
1988	(Hex)4 + (Man)3 (GlcNac)2	0.4±0.1	0.2±0.0	<0.05
2312	(Hex)6 + (Man)3 (GlcNac)2	0.2±0.1	0.2±0.0	0.73
<シアル酸含有糖鎖>				
1848	(HexNAc)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNac)2	0.2±0.1	0.4±0.0	<0.05
2010	(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNac)2	0.4±0.1	0.7±0.1	<0.05
2172	(Hex)2 (HexNAc)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNac)2	0.4±0.1	0.4±0.1	0.81
2375	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNac)2	3.8±1.0	17.2±1.9	<0.0001
2521	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNac)2	4.0±1.0	10.7±1.2	<0.001
2562	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNac)2	0.9±0.3	0.8±0.1	0.7
2578	(Hex)2 (HexNAc)3 (NeuAc)1 + (Man)3 (GlcNac)2	0.1±0.1	0.5±0.2	<0.05
2681	(Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNac)2	59.5±14.9	247.2±19.5	<0.0001
2827	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNac)2	18.6±4.8	26.6±3.1	0.17
3030	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNac)2	0.4±0.2	1.2±0.3	<0.05
3046	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)2 + (Man)3 (GlcNac)2	0.2±0.1	0.6±0.1	<0.05
3351	(Hex)3 (HexNAc)3 (NeuAc)3 + (Man)3 (GlcNac)2	2.8±1.0	16.4±2.1	<0.0001
3497	(Hex)3 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)3 + (Man)3 (GlcNac)2	0.8±0.2	5.9±1.3	<0.01
<その他>				
1746	(HexNAc)2 + (Man)3 (GlcNac)2	0.4±0.1	0.8±0.3	0.19
1892	(HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	11.7±2.9	59.9±9.2	<0.001
1908	(Hex)1 (HexNAc)2 + (Man)3 (GlcNac)2	0.5±0.2	1.4±0.2	<0.01
1949	(HexNAc)3 + (Man)3 (GlcNac)2	0.4±0.1	0.5±0.1	0.56
2054	(Hex)1 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	11.7±2.6	49.2±5.4	<0.001
2070	(Hex)2 (HexNAc)2 + (Man)3 (GlcNac)2	0.7±0.2	1.3±0.1	<0.01
2095	(HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	4.9±1.1	10.0±1.1	<0.01
2111	(Hex)1 (HexNAc)3 + (Man)3 (GlcNac)2	0.3±0.1	0.6±0.1	0.1
2216	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	3.9±0.9	16.7±1.8	<0.001
2257	(Hex)1 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	3.8±0.9	11.9±1.5	<0.001
2419	(Hex)2 (HexNAc)3 (Deoxyhexose)1 + (Man)3 (GlcNac)2	0.9±0.3	2.2±0.3	<0.01

表 5 硝子体中の糖鎖プロファイル

糖尿病網膜症群の硝子体におけるシアル酸含有糖鎖の増加

次に、構造別に *N*型糖鎖を分類して血漿と硝子体におけるその総量について比較したところ、硝子体中で検出されたシアル酸含有糖鎖の総量は糖尿病網膜症群で有意に増加していることが明らかとなった(92.1±21.2 VS 328.4±25.8pmol/100μg protein, n=17 each, P<0.0005, 図 11)。一方で、血漿中では非糖尿病群(580.3±36.2pmol/100μg protein, n=17)と糖尿病網膜症群(625.5±25.9pmol/100μg protein, n=17, P=0.32)で有意差は認めなかった。また、硝子体中で検出されたハイマンノース型糖鎖の総量は両群間で有意な差は認めなかった(10.9±2.0 VS 12.4±1.2pmol/100μg protein, n=17 each, P=0.54, 図 12)。

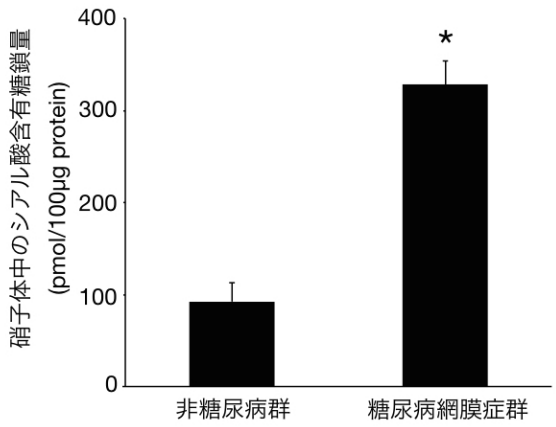

図 11 硝子体中のシアル酸含有糖鎖量。糖尿病網膜症群で有意に増加していた。*, P<0.0005

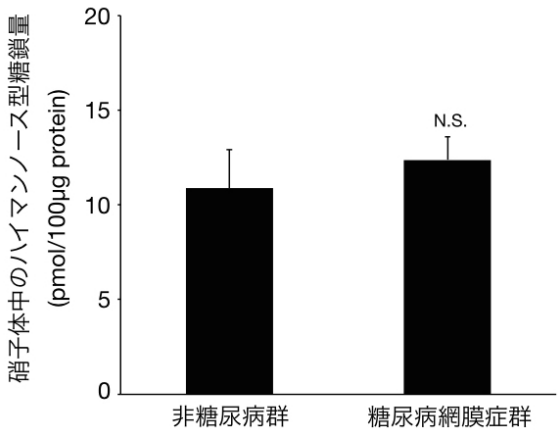

図 12 硝子体中のハイマンノース型糖鎖量。2群間に有意差は認めなかった。

糖負荷刺激によるヒト網膜血管内皮細胞におけるシアル酸転移酵素の変化

糖尿病網膜症群の硝子体中でシアル酸含有糖鎖量が増加していたことから、糖尿病網膜症の眼内ではシアリル化が亢進している可能性が示唆された。そのメカニズムを検討するため、糖鎖にシアル酸を付加するシアル酸転移酵素 *ST3GAL1, ST3GAL4*、*ST6GAL1* の発現を real-time PCR 法を用いて測定した。 *ST3GAL1* mRNA は糖負荷刺激 6 時間後(1.5-fold, P<0.05)、24 時間後(1.6-fold, P<0.05)、72 時間後(2.0-fold, P<0.05)で有意に増加していた(n=5 to 6, 図 13)。同様に、*ST3GAL4* mRNA も糖負荷刺激 6 時間後(1.7-fold, P<0.05)、24 時間後(1.7-fold, P<0.05)、72 時間後(1.9-fold, P<0.05)で有意に増加していた(n=5 to 6, 図 13)。一方で、*ST6GAL1* mRNA は糖負荷刺激では変化しなかった(図 13)。

さらに、糖負荷刺激 72 時間後に ST3GAL1 蛋白および ST3GAL4 蛋白が増加しているかを ELISA 法で検討した。前述の real-time PCR 法の結果と同様に、ST3GAL1 の蛋白は糖負荷刺激群で有意に増加していた(64.4±5.8 vs. 117.4±14.9pg/mg, n=4 to 5 P<0.01, 図 14). 同様に、ST3GAL4 の発現も糖負荷刺激群で有意に増加していた(3.8±0.3 vs 6.1±0.9pg/mg, n=4-5, P<0.05, 図 14)。

以上の検討結果を、我々は学術誌[Investigative Ophthalmology & Visual Science, in press]に報告した。

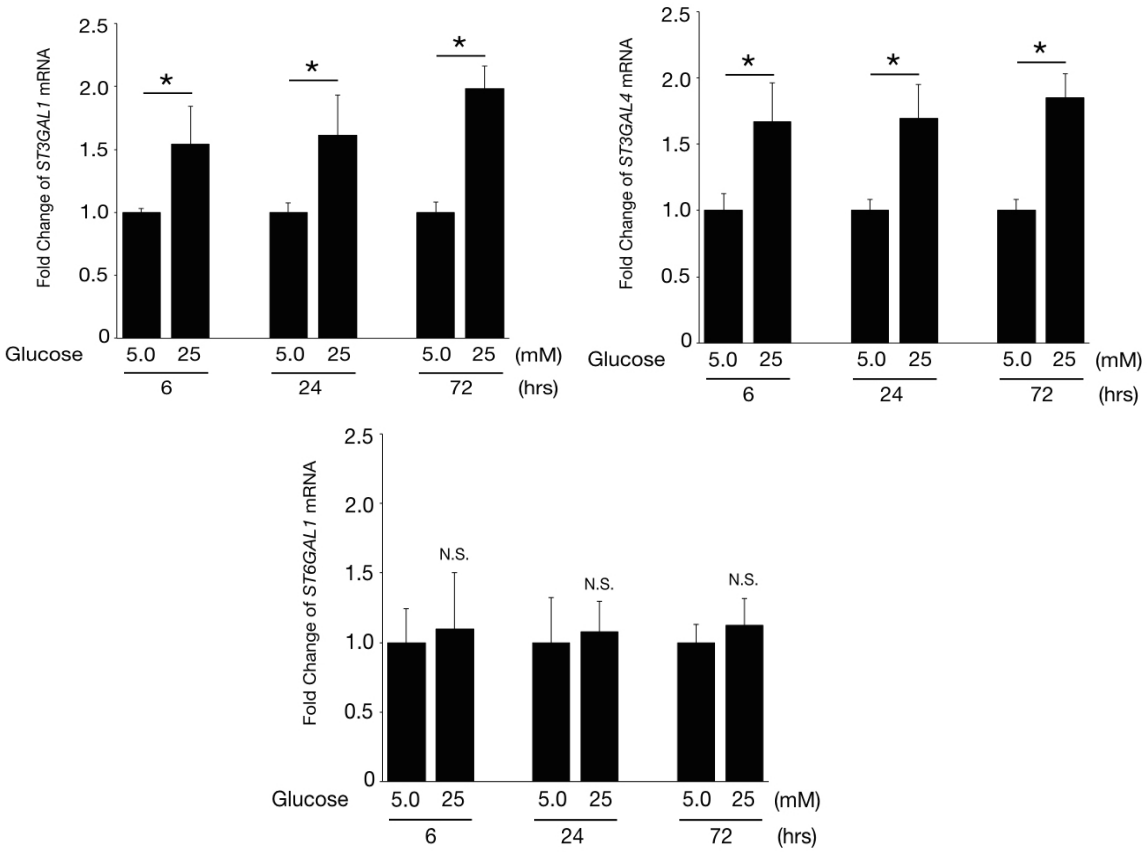

図 13 糖負荷刺激によるヒト網膜血管内皮細胞におけるシアル酸転移酵素の変化。*ST3GAL1* および *ST3GAL4* の mRNA は増加していたが、*ST6GAL1* の mRNA は変化しなかった。*, P<0.05

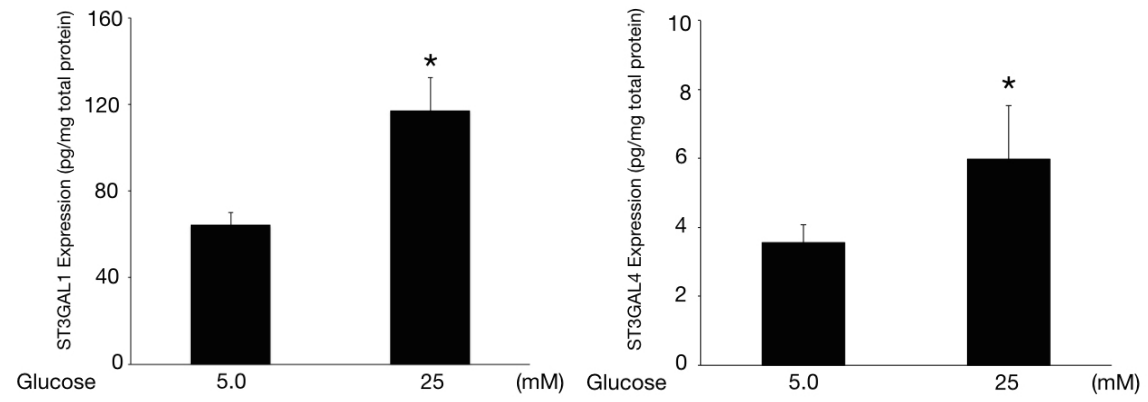

図 14 糖負荷刺激によるヒト網膜血管内皮細胞におけるシアル酸転移酵素の変化。ST3GAL1 および ST3GAL4 の発現が増加していた。*, P<0.05

考察

本研究では、1)硝子体中の糖鎖量は血漿中の糖鎖量の 20%以下であったが、グライコブロッティング法を応用することで測定が可能であること、2)これまで糖尿病網膜症患者の硝子体における蛋白解析においてコントロール群として用いられてきた黄斑円孔群と黄斑上膜群では硝子体中の糖鎖プロファイルに差がないこと、3)糖尿病網膜症患者の硝子体中では、総糖鎖量が有意に増加すること、4)糖尿病網膜症の硝子体中では、シアル酸含有糖鎖量が有意に増加すること、5)糖負荷刺激によってヒト網膜血管内皮細胞における ST3GAL1 および ST3GAL4 の発現が増加すること、が明らかとなった。我々の知る限り、本研究はヒト硝子体液中の糖鎖プロファイルを解析した初めての報告である。

我々が今回おこなったグライコブロッティング法の原法は、血液や細胞中の糖鎖を測定する手法として確立されたものであるため、原法によって硝子体のように少量しか糖鎖が含まれていない検体を解析することは困難であった。そこで我々は、各段階において乾燥脱水と融解を繰り返すことで硝子体を濃縮させ、グライコブロッティング法を用いて硝子体中の網羅的なかつ定量的な糖鎖解析をおこなうことに成功した。その結果、硝子体中で最大の含有量を示した糖鎖構造[(Hex)2(HexNac)2(NeuAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2](m/z 2681)は、血漿中にもっとも含有される糖鎖構造と一致していた。しかしながらその一方で、硝子体中で 2 番目に多かった糖鎖構造[(Hex)2(HexNAc)2(dHex)1(NeuAc)2+(Man)3(GlcNAc)] (m/z 2827)は血漿中では 7 番目に多い構造であり、硝子体中で 3 番目に多かった糖鎖構造[(Hex)2 + (Man)3(GlcNAc)2](m/z 1664)は、血漿中では 10 番目に多い構造であった。これらのことは、血液眼関門によって隔離された硝子体中では血漿中とは異なる糖鎖プロファイルが存在することを示唆していると考えられた。

さらに、黄斑円孔群と黄斑上膜群では、両群に総糖鎖量やプロファイルの差はなく、また男女間も差がなかったことから、これらの疾患群はこれまでの硝子体検体における蛋白解析と同様に糖鎖解析でもコントロール群として使用できると考えられた。そこで、その黄斑円孔群と黄斑上膜群をコントロール群として、糖尿病網膜症群との比較を行った。その結果、糖尿病網膜症群の硝子体中では *N*型糖鎖の総量が有意に増加しており、同疾患を有する眼内では蛋白上に付加される *N*型糖鎖が変化していることが示唆された。既報でも、炎症性疾患や糖尿病患者の血液中では *N*型糖鎖の構造が変化していることが報告されている [10]。また、涙液中でも糖尿病患者では *N*型糖鎖総量が増加することが報告されている [11]。その中でも特にシアル酸は注目されており、シアル酸の構造変化が腫瘍細胞の浸潤能や細胞外基質への接着能を変化させることや [12]、白血球遊走 [13] や炎症性疾患の活動性に関与すること [5] も報告されている。近年の研究が糖尿病網膜症の病態基盤に慢性炎症が関与することを示していることから、今後さ

らなる解析が必要ではあるが、糖尿病網膜症の眼内におけるシアル酸含有 *N* 型糖鎖の増加はその病態形成に関与している可能性があると考えられた。

さらに、我々は糖鎖合成の詳細な変化について解析した。本研究では、糖尿病網膜症の硝子体中ではシアル酸含有糖鎖が増加していたのに対し、ハイマンノース型糖鎖は変化していないことが明らかとなった。血漿中のシアル酸含有糖鎖およびハイマンノース型糖鎖は共に硝子体中よりも多く存在するため、単純に硝子体中への血液の流入が糖尿病網膜症の硝子体におけるシアル酸含有糖鎖量変化の原因ならば、両方の糖鎖構造が増加するはずである。しかしながら、本研究結果ではシアル酸含有糖鎖のみが増加していたため、糖尿病網膜症の硝子体中の変化は血液の混入や眼内の血管透過性の亢進による影響だけではないと推測された。

硝子体中のシアル酸含有糖鎖が増加したメカニズムとして、1)シアル酸含有糖鎖の合成促進、2)シアル酸含有糖鎖の分解抑制、などが考えられるが、本研究では合成亢進の可能性について検討した。糖尿病網膜症患者の硝子体中ではグルコース濃度が上昇していることが知られているため、本研究では糖タンパク上の糖鎖にシアル酸を付加する 3 種類のシアル酸転移酵素(ST3GAL1、ST3GAL4、ST6GAL1)が、ヒト網膜血管内皮細胞において糖負荷刺激によって増加するかを調べた。今回の検討では、シアル酸をα2-3 結合で付加させる ST3GAL1 と ST3GAL4 [14] は増加したが、α2-6 結合で付加させる ST6GAL1 [15] は変化しなかった。*N* 型糖鎖ではシアル酸はα2-3 結合またはα2-6 結合いずれかの形で存在し、これらの結合は競合する。すなわちα2-3 結合が増加するとα2-6 結合が減少することが明らかになっている [16]。既報では、細胞外基質や基底膜におけるα2-6 結合は細胞接着や細胞浸潤を変化させることが報告されている [4]。しかしながら、本研究ではシアル酸転移酵素 ST3GAL1 と ST3GAL4 が高グルコース下で誘導され、α2-3 結合が糖尿病網膜症の硝子体中のシアル酸含有糖鎖増加に関与することが示唆された。

糖尿病網膜症とシアリル化の関連性についての報告はまだ少ないが、マウスでは炎症により ST3GAL1 が増加することや神経細胞のアポトーシスではα2-3 結合が増加することが報告されている [17]。さらに興味深いことに、糖尿病網膜症の病態責任分子である血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)によって ST3GAL1 が増加することが近年報告された [18]。これらの既報と今回の検討結果より、ST3GAL1 および ST3GAL4 の増加によってシアル酸のα2-3 結合が促進され、シアル酸含有糖鎖が増加し、糖尿病網膜症の病態形成に関与することと推測された。

また近年、CHO 細胞から分泌されるモノクローナル抗体で低グルコースにより糖鎖合成が抑制されシアリル化も減少することが報告されている [19]。さらに今回の検討では 糖負荷刺激によりシアル酸転移酵素が増加したことから、血糖値は糖尿病患者の *N* 型糖鎖変化に関与している可能性があると考えられた。しかしながら、本検討で用い

た糖尿病網膜症患者の HbA1c は術前の血糖コントロールにより狭い範囲に集中しており、*N* 型糖鎖と HbA1c の相関を検討することはできなかった。この点については今後の検討課題である。

今回の検討では、糖尿病網膜症患者の硝子体中では *N* 型糖鎖の増加、特にシアル酸含有糖鎖が増加していたが、複雑かつ多様な要因が *N* 型糖鎖のプロファイルに影響している可能性がある。糖尿病網膜症患者では硝子体中のグルコース濃度上昇に伴い網膜実質細胞や網膜血管内皮細胞は過剰なグルコースに曝露されている [20]。したがって本検討で糖負荷刺激によってヒト網膜血管内皮細胞におけるシアル酸転移酵素が増加したことは、糖尿病網膜症患者の硝子体中でシアル酸含有糖鎖が増加していたことに関与している可能性がある。しかしながら、糖尿病網膜症では網膜血管の灌流低下による虚血の悪化に伴って、グルコースの供給が減少し網膜血管内皮細胞のシアル酸転移酵素の産生が抑制される可能性もある。このことから、糖尿病網膜症の眼内ではシアリル化の促進の他にも、シアル酸含有糖鎖の分解・代謝の低下、輸送機能の変化など、シアル酸含有糖鎖を増加させる多様なメカニズムが存在すると考えられる。さらに、糖尿病網膜症の眼内では血管透過性が増加していることから、血漿蛋白の眼内への流入も完全には否定出来ない。これらの点に関しては今後さらに検討する必要がある。

さらなる研究によって糖尿病網膜症病態関連分子の糖鎖構造変化を明らかにし、それら異常糖鎖を有する分子の機能異常が判明すれば、その異常糖鎖をターゲットとした新規分子標的治療につながる可能性があると考えている。今後も同テーマでの研究を進めていきたい。

総括および結論

本研究の結果により以下の結論が得られた。

1）硝子体中の糖鎖量は血漿中の糖鎖量の 20%以下であったが、グライコブロッティング法を応用することで定量的かつ網羅的な測定が可能であった。

2）黄斑円孔群と黄斑上膜群はこれまでの硝子体中の蛋白に関する研究と同様に、コントロール群として使用できると考えられた。

3）糖尿病網膜症の硝子体中では総糖鎖量が有意に増加していた。

4）糖尿病網膜症の硝子体中ではシアル酸含有糖鎖量が有意に増加していた。

5）糖負荷刺激によって、培養ヒト網膜血管内皮細胞におけるシアル酸転移酵素 ST3GAL1 および ST3GAL4 が増加した。

今回の研究結果より、糖尿病網膜症患者の眼内においてシアル酸付加が増加しており、シアル酸転移酵素 ST3GAL1 および ST3GAL4 が関与している可能性が示された。今後、シアル酸付加が増加している各種蛋白の同定、そしてシアル酸付加による蛋白機能の変化などを検討することなどが、本疾患の病態機序のさらなる理解につながると考えられた。

謝辞

本研究をおこなうにあたり、ご支援とご指導を下さいました北海道大学大学院医学研究科眼科学分野　石田晋教授、北海道大学大学院先端生命科学研究科　西村紳一郎教授に深く感謝致します。また、多くの助言、励ましを下さいました北海道大学大学院医学研究科眼科学分野　野田航介准教授、同神田敦宏特任講師をはじめとした研究委員会の先生方ならびに眼細胞生物学視覚科学研究室のスタッフの皆様(村田美幸先生、廣瀬育代さん、吉田志帆さん、石塚タンエルダルさん)にも深く感謝致します。さらにともに研究生活を送り、互いに切磋琢磨した大学院生の仲間たちにも心から感謝の意を表します。

引用文献

1. Varki, A. Essentials of glycobiology. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press [Bethesda National Center for Biotechnology Information]; (1999).
2. Kamiyama, T. *et al.* Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis. *Hepatology* 57, 2314-2325 (2013).
3. Nouso, K. *et al.* Clinical utility of high-throughput glycome analysis in patients with pancreatic cancer. *J. Gastroenterol.* 48, 1171-1179 (2013).
4. Miyahara, K. *et al.* Serum glycan markers for evaluation of disease activity and prediction of clinical course in patients with ulcerative colitis. *PLoS One* 8, e74861 (2013).
5. Higuchi, M. *et al.* Role of sugar chains in the expression of the biological activity of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 267, 7703-7709 (1992).
6. Scott, D.W. *et al.* Identification of a high-mannose ICAM-1 glycoform: effects of ICAM-1 hypoglycosylation on monocyte adhesion and outside in signaling. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 305, C228-237 (2013).
7. Nishimura, S. *et al.* High-throughput protein glycomics: combined use of chemoselective glycoblotting and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44, 91-96 (2004).
8. Amano, M. *et al.* Threshold in stage-specific embryonic glycotypes uncovered by a full portrait of dynamic N-glycan expression during cell differentiation. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 523-537 (2010).
9. Inafuku, S. *et al.* A comparison of N-glycan profiles in human plasma and vitreous fluid. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 252, 1235-1243 (2014).
10. Higai, K., Azuma, Y., Aoki, Y. & Matsumoto, K. Altered glycosylation of alpha1-acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta.* 329, 117-125 (2003).
11. Nguyen-Khuong, T. *et al.* Glycomic characterization of basal tears and changes with diabetes and diabetic retinopathy. *Glycobiology* 25, 269-83 (2014).
12. Schultz, M.J., Swindall, A.F. & Bellis, S.L. Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 501-518 (2013).
13. Arnold, J.N., Saldova, R., Hamid, U.M. & Rudd, P.M. Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation. *Proteomics* 8, 3284-3293 (2008).

14. Harduin-Lepers, A. *et al.* The human sialyltransferase family. *Biochimie.* 83, 727-737 (2001).
15. Taniguchi, N., Honke, K. & Fukuda, M. *Handbook of glycosyltransferases and related genes*. Tokyo ; New York: Springer; xviii, 670 p (2002).
16. Ranjan, A. & Kalraiya, R.D. alpha2,6 sialylation associated with increased beta 1,6-branched N-oligosaccharides influences cellular adhesion and invasion. *J. Biosci.* 38, 867-876 (2013).
17. Yasukawa, Z., Sato, C. & Kitajima, K. Inflammation-dependent changes in alpha2,3-, alpha2,6-, and alpha2,8-sialic acid glycotopes on serum glycoproteins in mice. *Glycobiology* 15, 827-837 (2015).
18. Willhauck-Fleckenstein, M. *et al.* Transcriptional regulation of the vascular endothelial glycome by angiogenic and inflammatory signalling. *Angiogenesis* 13, 25-42 (2010).
19. Villacres, C. *et al.* Low glucose depletes glycan precursors, reduces site occupancy and galactosylation of a monoclonal antibody in CHO cell culture. *Biotechnol. J.* (2015).
20. Lundquist, O. & Osterlin, S. Glucose concentration in the vitreous of nondiabetic and diabetic human eyes. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 232, 71-74 (1994).