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［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	稲福, 沙織
Description	配架番号：2184
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11954号
Issue Date	2015-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59965
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Saori_Inafuku_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　稲福 沙織

学 位 論 文 題 名

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)

【背景と目的】糖尿病網膜症は糖尿病における三大合併症の 1 つであり、日本人の主要な中途失明原因であるが、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。

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。中でも 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相次いで報告されている。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が、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。

本研究の目的は、迅速かつ網羅的な糖鎖検出が可能な「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。

【対象と方法】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および硝子体を採取し、グライコブロッティング法により網羅的な糖鎖解析をおこなった。また、ヒト網膜血管内皮細胞(human retinal microvascular endothelial cells, HRMECs)を標準グルコース濃度と高グルコース濃度で培養し、シアル酸転移酵素 *ST3GAL1* および *ST3GAL4, ST6GAL1* の RNA 抽出、real-time PCR をおこなった。さらに ST3GAL1 および ST3GAL4 の蛋白濃度をそれぞれの ELISA kit で測定した。

【結果】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ため、本研究では最初に非糖尿病群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は、血漿中の総糖鎖量と比較して 20%以下であった。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は両者で一致するが、詳細なプロファイルは異なることが明らかとなった。次に、硝子体中の総糖鎖量および糖鎖プロファイルを黄斑円孔群と黄斑上膜群、および男性と女性で比較したところ両群に有意な差は認めなかった。

続いて、糖尿病網膜症群における血漿および硝子体中の N 型糖鎖について前述の非糖尿病群をコントロール群として比較検討した。血漿中総糖鎖量は、非糖尿病群と糖尿病網膜症群で差がなかったが、硝子体中では糖尿病網膜症群で総糖鎖量が有意に増加していた。

さらに、糖尿病網膜症における糖鎖プロファイルの変化を検討した。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硝子体中では 13 種類、血漿中では 19 種類が検出された。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変化しなかった。次に血漿と硝子体における構造別の総量について比較したところ、硝子体中の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たが、血漿中では非糖尿病群と糖尿病網膜症群で有意差は認めなかった。

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。HRMECs を用いた in vitro の実験では *ST3GAL1* mRNA および *ST3GAL4* mRNA は糖負荷刺激 6 時間後、24 時間後、72 時間後

で有意に増加していた。一方で、*ST6GAL1* mRNA は糖負荷刺激では変化しなかった。さらに、糖負荷刺激 72 時間後の ST3GAL1 蛋白および ST3GAL4 蛋白は刺激群で有意に増加していた。

【考察】本研究では、1)硝子体中の糖鎖は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。

グライコブロッティング法の原法では、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、硝子体を濃縮させることで、グライコブロッティング法を用いて硝子体中の糖鎖解析をおこなうことに成功した。その結果、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が示唆された。さらに、黄斑円孔群と黄斑上膜群では、糖鎖プロファイルに差がなく、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。

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 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。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。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、白血球遊走や炎症性疾患の活動性に関与することも報告されている。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、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。

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、本研究では合成亢進の可能性について検討した。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 は高グルコース下で誘導されたが、α2-6 結合で付加させる ST6GAL1 は変化しなかった。既報では、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。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。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。

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、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。

【結論】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。