



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Exploratory research leading to the elucidation of glycome alternations in nonalcoholic steatohepatitis. [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	吉田, 康伸
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12727号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65604
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yasunobu_Yoshida_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 吉田 康伸

審査担当者	主 査	教 授	門出 健次
	副 査	教 授	小布施 力史
	副 査	教 授	出村 誠
	副 査	教 授	篠原 康郎（金城学院大学 薬学部薬学科）

学 位 論 文 題 名

Exploratory research leading to the elucidation of glycome alternations in nonalcoholic steatohepatitis.

（非アルコール性脂肪性肝炎におけるグライコーム変動の解明に向けた探索的研究）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

糖鎖は疾患マーカーとして極めて重要な役割を担う分子であり、例えばがんにおいては、アメリカ食品医薬品局で承認されたマーカーの多くが糖鎖や糖タンパク質である（Ludwig J. A. 2005）。近年では肝疾患における糖鎖の変化も数多く報告されている。一例として、2015 年 1 月に保険適用となった mac-2 binding protein (M2BP) の糖鎖修飾の変化を評価するキットである M2BPGi (シスメックス) は、肝臓の線維化を線維化ステージ別に明瞭に区別可能な新規血液マーカーとして注目を集めている（Kuno A. 2013）。

非アルコール性脂肪性肝炎（nonalcoholic steatohepatitis, NASH）は、アルコール摂取ではなく肥満や糖尿病を原因として、脂肪肝が炎症を起こし、肝細胞の機能低下などが進行している状態を指す。米国総人口の 3%が NASH であると見積もられていること（Browning J. D. 2004）、NASH が高い確率で肝硬変へと進行すること（Cohen J. C. 2011）、自覚症状が無い為に診断への動機付けが乏しいこと、確定診断に肝生検が必要であることを考慮すれば、NASH を低侵襲的に診断可能なマーカーの必要性は明らかである。NASH はその臨床像において他の合併症を併発しやすい為、臨床検体を用いたマーカー探索研究から NASH に特異的な診断マーカーを同定することは極めて困難な試みであると言える。以上の背景から、本研究では、NASH モデル動物研究を通じ、NASH 特異的な糖鎖マーカー探索を実施した。

マウスは、疾患メカニズム解明や疾患マーカー探索等の創薬研究において最も一般的に利用される動物種である。そこで本研究では、NASH モデル動物の動物種としてマウスを選択した。まず、本研究における基盤情報として、ヒト・マウス間における血清グライコームの動物種差を明らかにした。試料中に含まれる糖鎖の全体像を俯瞰する為のアプローチ

として、Fujitani らにより開発された総合グライコムクス解析を選択した。それにより、健常ヒト血清と健常マウス血清の試料中に含まれる、N-glycans, free oligosaccharides, glycosaminoglycans (GAGs), O-glycans, glycosphingolipid-glycans という 5 つのサブグライコムを包括的に解析した。その結果、シアル酸の違いを除けばタンパク質結合型糖鎖のサブグライコムはヒト・マウス間で一定の相関を示すこと、対照的に、脂質結合型糖鎖のサブグライコムにはヒト・マウス間で顕著な動物種差が存在することなどが明らかとなった。

続いて、NASH モデルマウスの肝臓及び血清をサンプルとして供し、NASH 病態の進展に伴うグライコムの変動の全体像を総合グライコムクス解析によって描出した。肝臓・血清共に、NASH 病態の進展に伴う劇的なグライコムの変動は見出されなかったが、その仔細に着目すると興味深い知見が数多く得られた。例えば高硫酸化型 heparan sulfates (HSs) は、病態の進展に伴って肝臓で減少、血清で増加した。近年、ヒト肝実質細胞の遺伝子のデータに基づき、HSs を含む GAGs が NASH 診断マーカーとなる可能性が推測されているが (Mardinoglu A. 2014)、糖鎖の定量解析により NASH 病態時の GAGs の有意な変動を捉えることに成功したのは本研究が初めてである。このように、遺伝的バックグラウンドおよび発症機構が均質なモデルマウスを用いることにより、臨床研究では見出すことが難しい、NASH に特徴的なグライコムの変動を見出すことが出来た。

総合グライコムクス解析による検証の結果、NASH 病態におけるグライコムの劇的な変動が確認されなかった理由として、「疾患特異的な糖鎖の変化は特定の疾患関連タンパク質上でのみ起きている為、組織全体の糖鎖解析からその変化を見出すことは難しい」という作業仮説を設定した。その仮説に基づき、タンパク質毎の修飾糖鎖変化を捉えることの出来る方法論・focused protein glycomics 解析を構築し、モデルマウスの血清を用いた NASH 診断糖鎖マーカー探索を試みた。その結果、haptoglobin (HPT) 由来の A3-glycan (A3) が脂肪肝から NASH に進展した際に顕著に増加することを見出した。その変動は血清全体の A3 の変動とは大きく異なっていたことから、上記の作業仮説が立証されたものと考えている。先述の通り、N-glycans のサブグライコムにはヒト・マウス間で一定の相関があることを鑑みると、HPT-A3 が臨床においても NASH 診断糖鎖マーカーとなる可能性は高いのではないかと推察している。今後、特定の糖鎖構造に対する抗体作製技術が実現すれば、本研究で構築した方法論と組み合わせることで、NASH だけでなく様々な疾患に対する新規糖鎖マーカー探索のプラットフォームとなる可能性がある。

これを要するに、著者はグライコム変動という新たな見地からのバイオマーカー探索に成功しており、今後、生命科学に対して、多くの貢献をもたらすところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格あるものと認める。