

受賞対象論文

Mise K, Imamura M, Yamaguchi S, Teshigawara S, Tone A, Uchida HA, Eguchi J, Nakatsuka A, Ogawa D, Yoshida M, Yamada M, Shikata K, Wada J : Identification of Novel Urinary Biomarkers for Predicting Renal Prognosis in Patients With Type 2 Diabetes by Glycan Profiling in a Multicenter Prospective Cohort Study : U-CARE Study 1. Diabetes Care (2018) 41, 1765-1775.

三 瀬 広 記

Koki Mise



岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学

Department of Nephrology, Rheumatology, Endocrinology and Metabolism, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

<プロフィール>

昭和57年生まれ

平成20年3月 岡山大学医学部医学科卒業

平成20年4月 岡山赤十字病院 臨床初期研修医

平成22年4月 虎の門病院 内科後期レジデント

平成23年4月 虎の門病院 腎センター・リウマチ膠原病内科 医員

平成27年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程入学

岡山大学病院 腎臓・糖尿病・内分泌内科 医員

平成30年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学
非常勤研究員

平成30年9月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程早期卒業

平成31年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学
客員研究員

国立療養所邑久光明園 内科医師

現在に至る

研究の背景と経緯

ヒトゲノムの配列が決定され、ポストゲノム研究が注目を集める中、糖尿病および糖尿病合併症の発症や進展に糖鎖異常が関与していることが報告されている。近年、糖尿病患者における血清中のN型糖鎖の違いと糖尿病血糖コントロールや糖尿病合併症との関連を検討した研究は少数ながら報告^{1,2)}があるが、尿中の糖鎖修飾の差異と糖尿病患者の腎予後との関連を検討した研究はなかった。我々は、共同研究者であるグライコテクニカ社の開発したレクチンアレイを用いることで、ハイスループットに45種類の異なる特異性を持ったレクチンに結合する糖鎖を定量化した³⁾。また、予備検討により尿中と血清中では糖鎖プロファイリングが大きく異なることが分かり、尿中の糖鎖排泄量の違いが腎疾患特異的な違いや組織学的な進展を反映している可能性があると考え、糖尿病患者における腎予後予測因子を同定するため尿中糖鎖プロファイリングを行った。

研究成果の内容

1. レクチンマイクロアレイによる尿中糖鎖プロファイリング

岡山県内8施設における2型糖尿病患者675名を対象とし、2012年度の研究開始時に採取後保管していた随時尿サンプルを用いて尿中糖鎖プロファイリングを行った。この糖鎖プロファイリングは、レクチンマイクロアレイを用いており、レクチンチップ上に固相化された45種類の異なる特異性を有するレクチンに結合する糖鎖シグナルを検出できるというのが特徴である(図)。そして、末期腎不全のサロゲートマーカーとして確立しているベースラインからのeGFR30%低下または末期腎不全による透析導入をエンドポイントとした解析を行うことで尿中糖鎖シグナルが腎予後予測マーカーとして有用であるかを検討した。

2. 4種類の尿中糖鎖排泄量は糖尿病腎症の新規腎予後バイオマーカーとなりうる

この675名の縦断解析により、中央値4.0年(四分位[*IQR*]: 3.9-4.0)の観察期間中に63人がアウトカムを発症したことが分かった。単変量と、ベースラインの

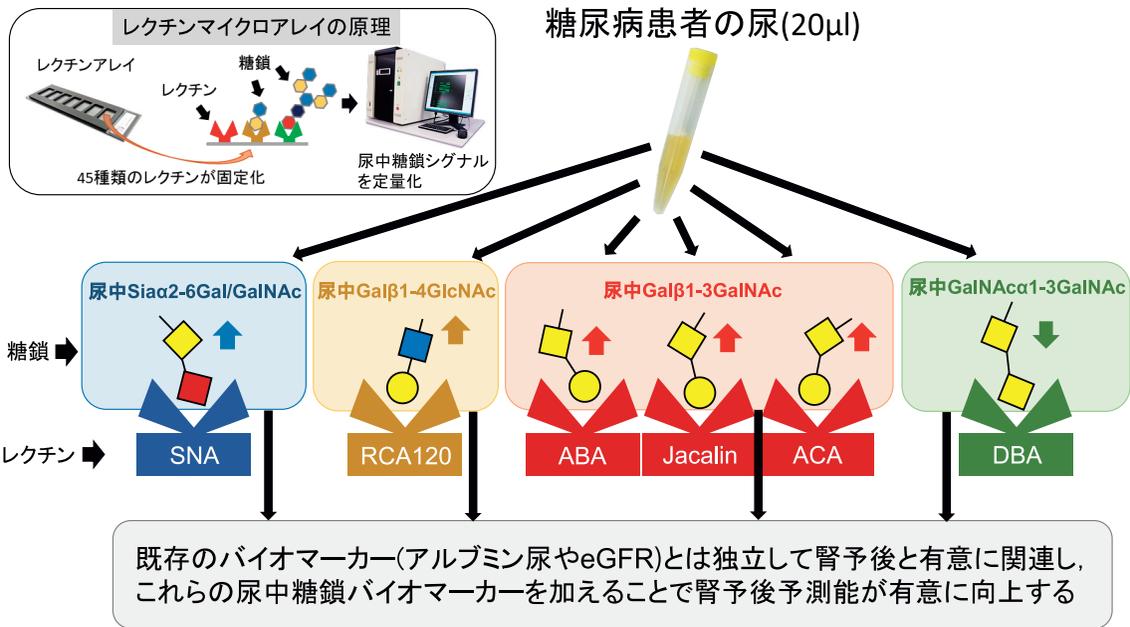


図 レクチンマイクロアレイの原理と新規腎予後予測マーカーとなる尿中糖鎖 (文献4より一部改変して引用)

アルブミン尿や eGFR など補正した多変量 Cox 回帰モデル双方においてアウトカムに有意に関連していた糖鎖結合レクチンは SNA (HR : 1.42 [95%CI : 1.14-1.76]), RCA120 (1.28 [1.01-1.64]), DBA (0.80 [0.64-0.997]), ABA (1.29 [1.02-1.64]), Jacalin (1.30 [1.02-1.67]), ACA (1.32 [1.04-1.67]) であった. SNA, RCA120, DBA に結合する特異的糖鎖はそれぞれ Siaα2-6Gal/GalNAc, Galβ1-4GlcNAc, GalNAcα1-3GalNAc であり, ABA, Jacalin, ACA に共通する特異的結合糖鎖は Galβ1-3GalNAc であった. 従って, 6 種類のレクチンが認識する 4 種類の糖鎖が腎予後に強く関連することが示された (図). また, 最近のバイオマーカーの解析で使用される, NRI (net reclassification improvement), IDI (integrated discriminated improvement), AIC (Akaike information criterion) を算出することで, 既存のバイオマーカーへの上乗せ効果も検討した. その結果, これら 6 種類のレクチンに結合する糖鎖シグナルをベースラインのアルブミン尿や eGFR など構成されたモデルに加えることでアウトカムの予測能は有意に向上することが示された (NRI : 0.51 [95% CI : 0.22-0.80], relative IDI : 0.18 [0.01-0.35], AIC 296→287).

研究成果の意義

1. 世界発の尿バイオマーカー — 尿中糖鎖と腎予後の関連 —

本研究では, 尿中 Siaα2-6Gal/GalNAc, Galβ1-4GlcNAc, Galβ1-3GalNAc 排泄量増加および尿中 GalNAcα1-3GalNAc 排泄量低下がアルブミン尿や eGFR などとは独立した腎予後因子であることが判明し, 予後予測能としても, 既存のバイオマーカーへの有意な上乗せ効果が示された (図). 本研究は, レクチンマイクロアレイという技術を用いて糖尿病患者における尿中糖鎖排泄量と腎予後との関連を世界で初めて示した報告となり国内外の多くのメディアでも取り上げてもらうことができた.

2. 糖鎖の性質・基礎研究に基づく本臨床研究結果の意義

一般に糖鎖は, 発生, 免疫, 感染, 細胞接着など多彩な生体機能に関わっており, セリン/スレオニンへの結合から始まる O 型糖鎖と, アスパラギン酸への結合から始まる N 型糖鎖の 2 つに大別される. また, 糖鎖の最大の特徴である構造上の “多様性・異質性” をもたらず糖鎖の付加反応は糖転移酵素によってなされ, この反応は glycosylation と呼ばれるが, 酵素によらない化学反応を指す glycation (糖化反応, メーラード反応) とは異なっている.

腎臓ポドサイトの主要な構成成分であるポドカリキシンも、glycosylationにより構造が維持される代表的な糖蛋白質である。ポドカリキシンはシアル酸を多く含むO型糖鎖によって構成されるが、マウスにおいてこのシアル酸を欠損させると、腎糸球体で足突起癒合が起こり、尿蛋白量が増加することが報告されている。また、O型糖鎖の伸長反応プロセスの根幹にある糖鎖であるGal β 1-3GalNAcの合成に必要な糖転移酵素(glycosyltransferase core 1 synthase and glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3- β -galactosyltransferase 1: *Clgalt1*)のノックアウトマウスにおける腎臓では、糸球体硬化、間質の線維化、足突起癒合、糸球体基底膜の肥厚、アルブミン尿を呈することや、ポドカリキシンにおける糖鎖Sia α 2-6Gal/GalNAcが低下していることが報告されている⁵⁾。

本研究結果の機序を、これら基礎研究結果を基に考察すると、尿中Sia α 2-6Gal/GalNAc、Gal β 1-4GlcNAc、Gal β 1-3GalNAc排泄量増加および尿中GalNAc α 1-3GalNAc排泄量低下は、糖尿病腎症における組織学的な糖鎖修飾の変化を反映しており、この組織学的糖鎖修飾の異常が糖尿病腎症における新たな進展機序である可能性が示唆された。予備実験における血清と尿中の糖鎖プロファイリングの違いがあったことも、この尿中への糖鎖排泄量が全身性というよりは腎局所における糖鎖修飾の違いを反映している可能性を裏付ける結果であると考えられた。

今後の展開や展望

本研究では、実際に全ての患者において、腎生検によって腎病理組織学的な変化と尿中糖鎖排泄量との関連を検討できているわけではなく、上述の推論を証明するには至っていない。現在、所属する腎・免疫・内分泌代謝内科学教室では、糖尿病患者における研究的

腎生検コホート研究(NE \times T-DN study: UMIN000024530)を進めており、将来的には、この研究を通じてヒト腎組織中における糖鎖修飾の変化が起こっているのか、実際の糖尿病腎症進展に関わっているのかといった検討を行う予定である。その他、AMED H29-31年度革新的医療シーズ実用化研究事業に採択された「尿中糖鎖プロファイリングによるIgA腎症の診断法の開発(Extant study: UMIN000029336)」により、IgA腎症新規診断法の作成にも着手している。このように、糖鎖プロファイリングを臨床応用し、様々な腎臓病の病態解明や新規診断法につなげていくことを目標に日々研究を行っている。

文 献

- 1) Bermingham ML, Colombo M, McGurnaghan SJ, Blackburn LAK, Vuckovic F, et al.: N-Glycan Profile and Kidney Disease in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* (2018) 41, 79-87.
- 2) Testa R, Vanhooren V, Bonfigli AR, Boemi M, Olivieri F, et al.: N-glycomic changes in serum proteins in type 2 diabetes mellitus correlate with complications and with metabolic syndrome parameters. *PLoS One* (2015) 10, e0119983.
- 3) Kuno A, Uchiyama N, Koseki-Kuno S, Ebe Y, Takashima S, et al.: Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. *Nat Methods* (2005) 2, 851-856.
- 4) 三瀬広記, 和田 淳: グライコム解析. *Diabetes Journal* (2019) 47, 34-35.
- 5) Song K, Fu J, Song J, Herzog BH, Bergstrom K, et al.: Loss of mucin-type O-glycans impairs the integrity of the glomerular filtration barrier in the mouse kidney. *J Biol Chem* (2017) 292, 16491-16497.

平成31年3月29日受稿
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1
電話: 086-235-7235 FAX: 086-222-5214
E-mail: kokims-frz@okayama-u.ac.jp