

第5回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

YIA 受賞講演

糖鎖プロファイリングによる2型糖尿病患者における尿中腎予後予測バイオマーカーの同定：U-CARE 研究 1

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

三瀬 広 記

Koki MISE

はじめに

糖尿病性腎臓病(diabetic kidney disease : DKD)における腎予後を予測するさまざまなバイオマーカーが報告されているが、直接的に治療戦略にまで結びついてはおらず、新たな治療ターゲットの探索が望まれている。一方、近年、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。特に、腎臓におけるポドサイトなどの組織内の糖鎖異常は、それらの構造変化や機能異常を呈し腎機能の悪化やアルブミン尿増加に寄与していることが明らかにされており¹⁾、腎症進展における新たな進展メカニズムとして“糖鎖修飾”の異常という観点が注目されてきた。

ところが、糖鎖構造の複雑性のため、糖鎖を同定するためには膨大なコストと時間を要し、ヒトにおける大規模な糖鎖プロファイリングはなされてこなかった。DKDのバイオマーカーとしての糖鎖プロファイリングは、血清中のN型糖鎖を検討した少数の報告^{2,3)}にとどまっており、尿中の糖鎖プロファイルとDKDの予後との関連を検討した研究はなかった。

われわれは、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^{4,5)}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。また、ほぼ同じ尿蛋白量や腎機能を呈

し異なる腎疾患(DKD, 高血圧性腎硬化症, 膜性腎症)を有する3例の患者における血清および尿中の糖鎖プロファイルと比較したところ、血清の糖鎖プロファイリングでは3例の間で大きな差は認めなかったものの、尿中の糖鎖プロファイリングでは大きな違いが認められた。この結果から、尿中の糖鎖排泄量の違いが腎疾患特異的な違いを反映している可能性、各腎疾患における組織学的な進展を反映す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。

糖鎖とは

糖鎖は核酸、たんぱく質に続く第三の生命鎖ともいわれ、細胞表面や細胞内に存在し多彩な生体機能にかかわっている。糖鎖にはN型糖鎖とO型糖鎖が存在し、N型糖鎖はアスパラギン(Asn)の側鎖中のアミド窒素原子に結合する糖鎖の総称で、O型糖鎖はセリン(Ser)あるいはスレオニン(Thr)側鎖の酸素原子にOグリコシド結合で付加される糖鎖の総称である。また、糖鎖の最大の特徴である構造上の“多様性・異質性”をもたらす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とは異なっている⁶⁾。グルコースなど還元糖のカルボニル基がたんぱく質やアミノ酸のアミノ基と反応すると、シッフ塩基を形成し、アマドリ転位によって安定なアマドリ化合物となる。このような反応はglycationであり、HbA1cやグライコアル

ブミンが代表的なものである。glycation はアムドリ化合物生成までの反応が初期段階(early stage)と呼ばれ、以降の後期段階(advanced stage)反応と区別され、後期段階で最終糖化産物(advanced glycation endproducts : AGEs)が生成される。近年、DKD の病態における AGEs の重要性に関する報告が増えてきているため、glycation と glycosylation が混同されがちであるが、高血糖状態における血糖の化学反応の産物が glycation であり、どういった刺激が glycosylation を変化させるかということは、今後の更なる研究が必要である。

糖鎖に特異的に結合するレクチン

糖鎖に特異的に結合するたんぱく質あるいは糖たんぱく質としてレクチンファミリーが知られている。レクチンは、細胞または複合糖質を凝集することができ、植物・動物、微生物などに広く存在する物質の総称として用いられている。植物由来のレクチンは古くから研究に用いられており、例えばマメ科由来の植物レクチン PHA (phytohemagglutinin) や Con A (concanavlin A) はリンパ球幼弱化反応を惹起するため、免疫における古典的な研究手法とされている。また、糖鎖とレクチンの特異的な結合を利用して、糖鎖の解析や新規バイオマーカーの探索が行われており、特に癌の分野ではレクチンを腫瘍マーカーとして用いて臨床の現場での有用性が示されている。

レクチンアレイの原理と尿レクチンアレイへの応用

糖鎖の解析には質量解析が多く用いられてきたが、技術的な困難さやコストの高さから臨床応用は限定的であった。産総研からの技術で現在グライコテクニカが実用化しているレクチンアレイ⁴⁾は、簡単かつハイスループットに糖鎖構造を解析することができる。LecChip 上には45種類のレクチンが固相化されており、糖たんぱく質のたんぱく質部分をCy3で蛍光ラベルしてサンプル内の糖鎖を定量する。しかし糖鎖とレクチンの結合定数は $K_d = 10^{-3} \sim 10^{-7}$ M であり、抗原抗体 $K_d = 10^{-6} \sim 10^{-9}$ M、ビオチンアビジン相互作用 $K_d = 10^{-12}$ M と比較して相互作用が弱く、洗浄工程により容易に糖鎖とレクチンは乖離してしまう。そこで洗浄なしに特異的な蛍光シグナルを検出するために、スライドガラスの側面から励起光を投射するという手法を用いた。これにより、表面の100 nmの部分のみにエバネッセント波が形成され、結合しているCy3ラベル糖たんぱく質は

励起されるが、結合せず液相に浮遊しているCy3ラベル糖たんぱく質は励起されないため、洗浄過程なしに特異的シグナルを検出できる(図1)。また、アルブミンは糖鎖を有していないたんぱく質であるが、Cy3でラベルされるためエバネッセント波励起領域のシグナルに寄与してしまう。われわれはバックグラウンドシグナル強度と尿中アルブミンや尿中クレアチニンとの相関を確認した。さらに、24時間蓄尿と早朝随時尿との比較検討を行うことで、最終的にレクチンに結合した糖鎖シグナルからバックグラウンドのシグナルを差し引いた値を解析に用いることが臨床的に有用と判断した⁶⁾。

2型糖尿病患者におけ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688例のうち、観察期間中に緩徐進行型1型糖尿病の診断に至った8例と2012年度(観察開始時：ベースライン)のeGFRが15 mL/分/1.73 m²未満であった5例を除いた675例を対象とした。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。アウトカムはベースラインからのeGFR 30%低下、または末期腎不全による透析導入時点と定義した。

中央値4.0年(四分位[IQR]: 3.9~4.0)の観察期間中に63例がアウトカムに至った。全患者におけるベースラインのeGFRは 71.4 ± 17.1 mL/分/1.73 m²、UACRの中央値は17.3 (mg/gCr, IQR: 7.8~71.1)で、正常アルブミン尿、微量アルブミン尿を呈していた患者はそれぞれ429例(64%)、165例(24%)であった。

単変量と、ベースラインのアルブミン尿やeGFRなどで補正した多変量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Sia α 2-6Gal/GalNAc, Gal β 1-4GlcNAc, GalNAc α 1-3GalNAcであり、ABA, Jacalin, ACAに共通する特異的結合糖鎖はGal β 1-3GalNAcであった。したがって、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2)。また、近年のバイオマーカー解析で使用される、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

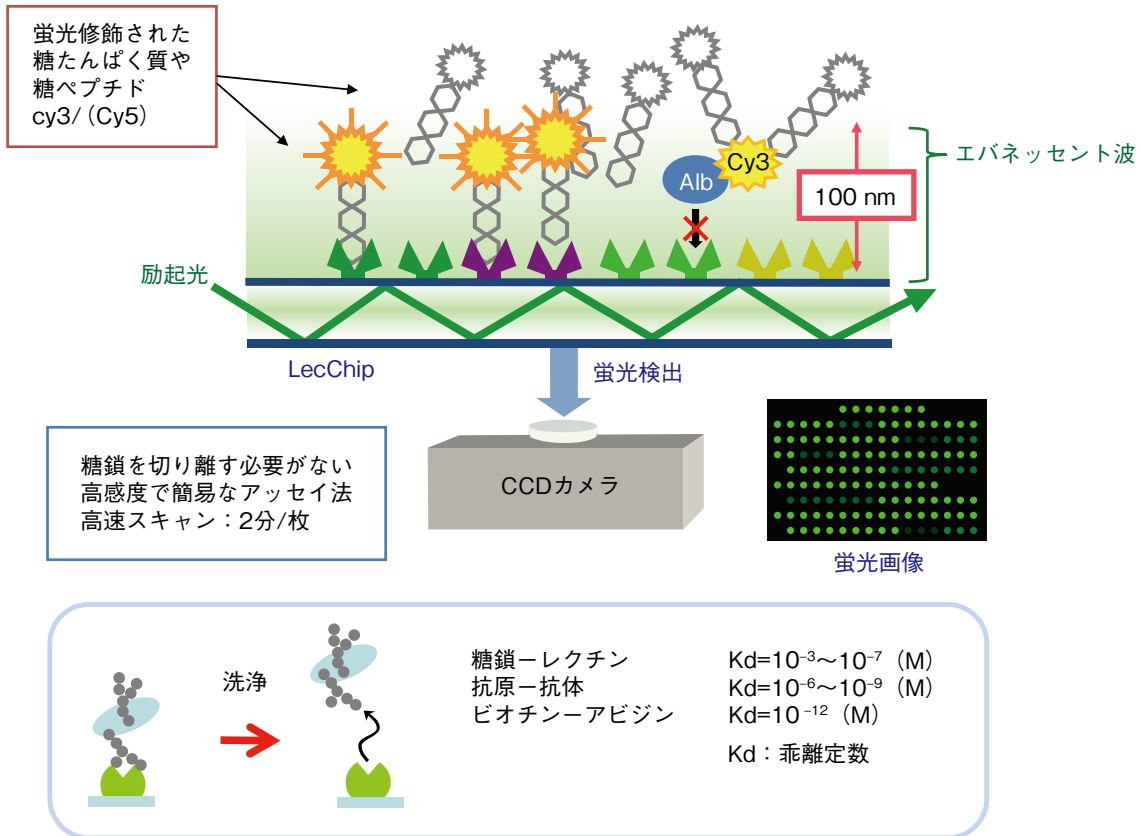


図1 レクチンアレイによる糖鎖シグナルの検出原理

糖鎖とレクチンとの結合は抗原抗体やビオチンアビジンに比して弱く、洗浄操作で容易に乖離してしまう。レクチンを固相化したチップ上に励起したエバネッセント波領域のシグナルを検出することで、洗浄操作なしで糖たんぱく質の糖鎖シグナルを検出できる。

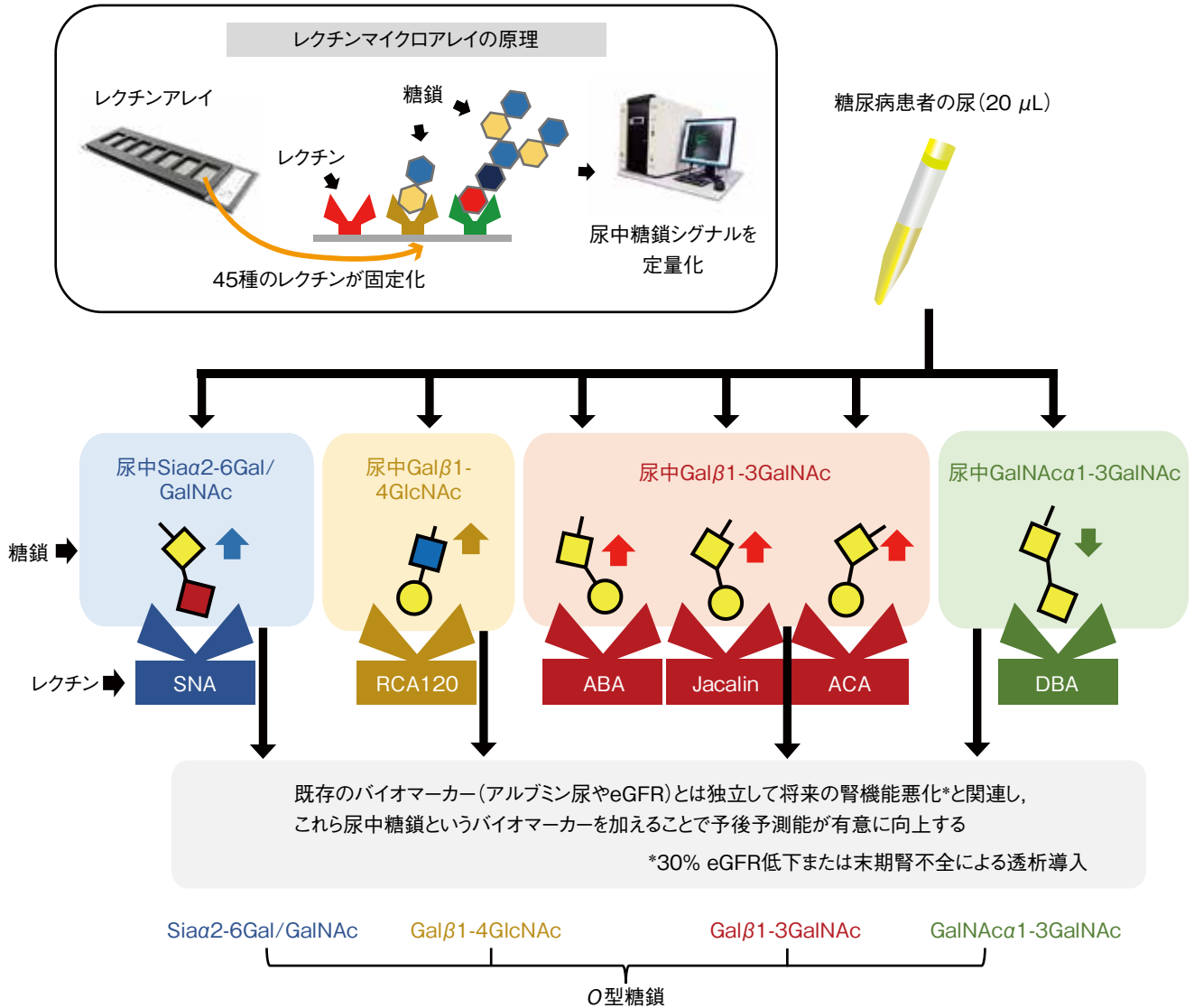
も検討した。その結果、これら6種類のレクチンに結合する糖鎖シグナルをベースラインのアルブミン尿やeGFRなどで構成されたモデルに加えることで、アウトカムの予測能は有意に向上することが示された (NRI: 0.51 [95% CI: 0.22~0.80], relative IDI: 0.18 [0.01~0.35], AIC 296→287)。

糖鎖の基礎的研究に基づく臨床成果の考察

本研究で同定された6種類のレクチンに結合する糖鎖の共通点は、いずれもO型糖鎖ということであった。O型糖鎖によって構成される腎臓に特異性の高い構造物としては、ポドサイトの構成成分であるポドカリキシンやポドプラニンが知られており、glycosylationにより構造が維持される代表的な糖たんぱく質である。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Galβ1-3GalNAcの合成に必要な糖転移酵素(glycosyltransferase core 1 synthase and glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-β-galactosyltransferase 1: *C1galt1*)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Siaα2-6Gal/GalNAcが低下していることが報告されている¹⁾。

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Siaα2-6Gal/GalNAc、Galβ1-4GlcNAc、Galβ1-3GalNAc排泄量増加および尿中GalNAcα1-3GalNAc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



O型糖鎖修飾の異常がDKDの新規進展メカニズムである可能性

図2 DKDの新規進展バイオマーカーとしての尿中O型糖鎖 (文献7より引用, 一部改変)

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。

ホート研究を通じて、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かかわっているのかといった検討を行うことが必要と考える。

今後の展望

本研究では、実際にすべての患者において、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たわけではなく、上述の推論を証明するには至っていない。今後、糖尿病患者における研究的腎生検コ

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文献

1. Song K, Fu J, Song J, 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.

2. Bermingham ML, Colombo M, McGurnaghan SJ, et al. N-glycan profile and kidney disease in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2018 ; 41 : 79–87.
3. Testa R, Vanhooren V, Bonfigli AR, 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.
4. Kuno A, Uchiyama N, Koseki-Kuno S, et al. Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. *Nat Methods* 2005 ; 2 : 851–856.
5. Hirabayashi J, Yamada M, Kuno A, et al. Lectin microarrays: concept, principle and applications. *Chem Soc Rev* 2013 ; 42 : 4443–4458.
6. Mise K, Imamura M, Yamaguchi S, et al. 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.
7. 三瀬広記, 和田 淳. グライコーム解析. *Diabetes Journal* 2019 ; 47(1) : 34–35.