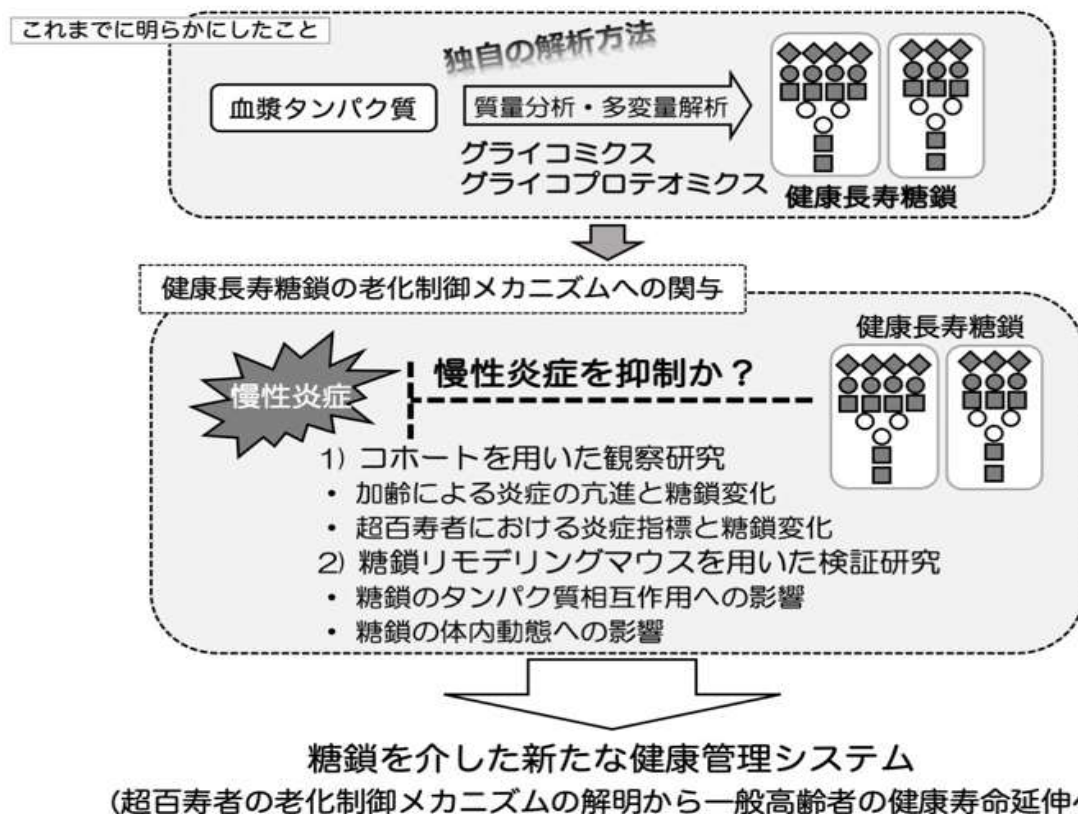


グライコミクス・グライコプロテオミクスによる健康長寿の機序の解明

代表研究者 東京都健康長寿医療センター研究所 研究部長 三浦 ゆり

【抄録】

超百寿者（105歳以上）の血漿タンパク質に特徴的な糖鎖である「健康長寿糖鎖」（高分岐シアル酸含有糖鎖）の生物学的な意義、すなわち老化制御にどのように関与しているのかを分子レベルで明らかにすることを目的とする。高齢者縦断コホートや超百寿者横断コホートを用いたグライコミクス・グライコプロテオミクスによる観察研究により、健康長寿糖鎖の出現と慢性炎症（Inflammaging）との関連について明らかにする。また、高分岐糖鎖の合成に関わる糖転移酵素を高発現させた「糖鎖リモデリング動物」を用いた検証研究により、健康長寿糖鎖によるタンパク質の機能制御について明らかにする。本研究により健康長寿糖鎖の老化制御メカニズムや健康長寿の機序が明らかになるだけでなく、糖鎖を利用した新たな健康管理システムの開発や新たな老化制御方法の発見に発展することが期待される。



1. 研究の目的

ヒトの長寿モデルである「超百寿者」は、一般高齢者に比べて認知機能低下などの「老化の進行が遅い」ことが報告されており [Arai Y, J

Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2014]、超百寿者には何らかの「老化を制御する機構」が存在すると考えられる。そこで超百寿者の老化制御メカニズムを明らかにするため、研究代表者はこれま

で血漿タンパク質の糖鎖修飾に着目し、血漿 *N*-グリコミクスを行って超百寿者に特徴的な糖鎖「健康長寿糖鎖」が高分岐高シアル酸糖鎖であることを明らかにした[Miura Y, *PLoS ONE*, 2015]。さらに、そのキャリアタンパク質の 1 つがハプトグロビンであることを明らかにした[Miura Y, *Biochim Biophys Acta*, 2018]。そこで本研究では、これらの糖鎖が健康な超百寿者に出現する生物学的な意義、すなわちどのような生理状態を反映しているのか、またこれらの糖鎖を増やすことが健康の維持につながるのかを明らかにし、糖鎖を介した老化制御メカニズムを解明することを目的とする。

2. 研究方法と経過

高分岐高シアル酸糖鎖は炎症により増加することが知られている。そこで申請者は、加齢に伴う慢性炎症の亢進 (Inflammaging) との関連に着目して研究を進める。

研究は 1) コホートを用いた観察研究と 2) 糖鎖リモデリングマウスを用いた検証研究の 2 つのアプローチから行う。

1) コホートを用いた観察研究

○高齢者縦断コホート(SONIC)を用いた慢性炎症亢進による糖鎖変化の解析

高齢者の大規模長期縦断コホート SONIC (Septuagenarians, Octogenarians, Nonagenarians Investigation with Centenarians) の参加者から、炎症指標である CRP が加齢により (6 年間連続的に) 増加したグループとそうでないグループを抽出し、慢性炎症の増加に伴う血漿タンパク質の糖鎖変化を調べる。また、IL-6 や TNF- α など SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) 関連因子の慢性炎症増加に伴う変化も測定し、高分岐高シアル酸糖鎖の出現と慢性炎症の亢進との関連を明らかにする。

初回調査、追跡調査 1 (3 年後)、追跡調査 2 (6 年後) のすべてに参加した 70 代の中から (645 人)、CRP が連続的に増加し、かつ炎症性疾患に罹患していない人 (CRP が増加した

原因が推定できない人) を慢性炎症亢進群とした (27 人)。さらに、慢性炎症亢進群 27 人に対する対照群を抽出するため、初回調査時の CRP 値および性別を適合変数として傾向スコアマッチング解析を行った。最終的に亢進群 22 人、対照群 22 人を解析対象者とし、それぞれの初回調査時と 6 年後追跡調査時の血漿検体について、個人ごとに 6 年間の変化を調べることにした。まず、SASP 関連因子である IL-6、TNF- α 、GDF15、CD163 について ELISA を用いて測定した。また、これまでに確立したグリコプロテオミクスの前処理法、測定法、解析法を用いて[Miura Y et al., *Biochim Biophys Acta* 2023]、血漿タンパク質の糖ペプチド解析を行った。

○超百寿者横断コホートを用いた炎症指標と健康長寿糖鎖出現との関連性解析

超百寿者の中でも炎症指標の高いグループと低いグループがあり、高いグループの方が余命の短いことが報告されている [Arai Y, *EBioMedicine*, 2015]。そこでこれらのグループの血漿糖鎖を解析し、超高齢者における炎症指標と「健康長寿糖鎖」出現との関連を調べる。

慶応大学医学部百寿総合研究センターの新井康通博士と協同し、センターに保管されている超百寿者血漿の中から炎症指標が高いグループ (CRP > 1.0 and IL-6 > 4.0) 30 検体と低いグループ (CRP < 0.4 and IL-6 < 4.0) 30 検体を解析対象とした。60 検体について IL-6、TNF- α 、CD163 を ELISA により測定した。また、グリコプロテオミクスにより血漿タンパク質の糖ペプチド解析を行った。

2) 糖鎖リモデリングマウスを用いた検証研究

高分岐高シアル酸糖鎖を多くもつ「糖鎖リモデリングマウス」を作製し、健康長寿糖鎖のキャリアタンパク質への機能制御について、体内動態や分子間相互作用 (特に炎症関連カスケードにおける糖鎖の制御機構) に着目して調べる。既に、健康長寿糖鎖のキャリアタンパク質の 1 つがハプトグロビンであることを明らか

にしているのので[Miura Y., *Biochim Biophys Acta*, 2018]、まずハプトグロビンの機能に及ぼす健康長寿糖鎖の影響について検討する。

○糖鎖リモデリングマウスの作製

高分岐糖鎖を合成する責任酵素であるMGAT5(α -1,6-mannosylglycoprotein 6- β -*N*-acetylglucosaminyltransferase)のプラスミドとトランスフェクション試薬(*in vivo* Jet-PEI)を5%グルコースに溶かしてマウスに尾静脈投与し、*in vivo* トランスフェクションを行った。コントロールマウスは同様に5%グルコースのみを投与した。トランスフェクションから2日、5日、14日後に採血と肝摘出を行い、肝臓におけるヒトMGAT5の発現と血漿タンパク質の糖鎖を調べた。

3. 研究の成果

1) コホートを用いた観察研究

○高齢者縦断コホート(SONIC)を用いた慢性炎症亢進による糖鎖変化の解析

IL-6、TNF- α 、GDF15、CD163についてELISAを用いて測定し、個人ごとに6年間の変化(CRPが増加する前と増加した後)を調べた。その結果、IL-6とCD163は慢性炎症亢進群においてのみ有意に増加した。また、GDF15は両群とも増加の傾向にあったが、対照群において有意に増加した。CD163はヘモグロビン-ハプトグロビン複合体に対するマクロファージ上のスカベンジャー受容体であるが、炎症の亢進に伴って分泌型CD163が増加することが知られている。CRPに加えて、炎症で増加するIL-6と分泌型CD163もCRP増加群において有意に増加したことから、本研究における慢性炎症亢進群の抽出は概ね妥当であったと判断された。グライコプロテオミクスについては、前処理と測定が終了し、現在解析中である。

○超百寿者横断コホートを用いた炎症指標と健康長寿糖鎖出現との関連性解析

IL-6とTNF- α の測定結果については、百寿総合研究センターの新井博士よりデータの供

与を受けた。SONICコホートの結果と同様、IL-6はCRPの高いグループが低いグループに比べて有意に高かったが、TNF- α についてはグループ間で有意な差は認められなかった。また、CD163についてはELISAを用いて測定したが、SONICコホートの結果とは異なり、CRPの高いグループでCD163が下がっていることが明らかになった。グライコプロテオミクスについては、前処理と測定は終了し、現在解析中である。

2) 糖鎖リモデリングマウスを用いた検証研究

○糖鎖リモデリングマウスの作製

in vivo トランスフェクション2日後のマウス肝よりtotal RNAを抽出してhMGAT5の遺伝子発現を調べたところ、トランスフェクションマウスのみhMGAT5の発現が認められた。また、血漿についてPHA-Lを用いてレクチンプロットを行ったところ、2日後の血漿が最も3,4-分岐糖鎖が増加しており、その後低下して14日後にはコントロールと同じレベルになることが明らかになった。さらに、血漿タンパク質をプロテオーム解析したところ、主成分分析から2日後の血漿タンパク質は、コントロール血漿やトランスフェクション14日後の血漿タンパク質とは大きく異なることが明らかになった。以上より、トランスフェクション2日目に糖鎖リモデリングマウスが作製されたと判断した。

4. 今後の課題

今後、観察研究のグライコプロテオミクス解析を進めるとともに、糖鎖リモデリングマウス血漿からハプトグロビンを精製し、ヘモグロビンへの結合能やCD163受容体との結合能に及ぼす糖鎖の影響について調べる。

5. 研究成果の公表方法

本研究で得られた成果は論文にまとめ、英文誌に投稿する予定である。

以上

Glycomics and glycoproteomics for mechanisms of healthy longevity

Primary Researcher: Yuri Miura
Theme Leader, Tokyo Metropolitan Institute for Geriatrics
and Gerontology

We previously reported that characteristic *N*-glycans of plasma proteins in semi-supercentenarians (≥ 105 years old), who are recognized as a model of human longevity, were highly branched and sialylated *N*-glycans, and that one of carrier-proteins of these characteristic *N*-glycans was haptoglobin. In turn, we address to clarify the biological roles of these characteristic *N*-glycans in healthy longevity. Highly branched and sialylated *N*-glycans are known to be involved in inflammation, and so we hypothesized that these characteristic *N*-glycans would prevent inflammaging resulting in healthy extreme longevity. In this study, we tried to examine the relationship between *N*-glycans of plasma proteins and inflammaging using longitudinal and cross-sectional study, and to validate the biological roles in anti-inflammation mechanisms of these characteristic *N*-glycans using *N*-glycans remodeling mice.

Subjects were extracted using CRP levels as an inflammation marker, from the 3-year SONIC (Septuagenarians, Octogenarians, Nonagenarians Investigation with Centenarians) longitudinal cohort study and cross-sectional Japanese centenarian study. In plasma samples of subjects, we examined some inflammatory cytokines using ELISA. Furthermore, to prepare *N*-glycans remodeling mice, we used *in vivo* transfection technique with plasmid of human MGAT5 (α -1,6-mannosylglycoprotein 6- β -*N*-acetylglucosaminyl-transferase), which is involved in synthesis of highly branched *N*-glycans.

In CRP-increasing group, IL-6 and CD63 were increased significantly for 6 years, while in CRP-stable group, these cytokines were not changed. In centenarians with high CRP levels, IL-6 was more abundant than those in centenarians with low CRP levels. Furthermore, we examined hMGAT5 expression in mice liver and *N*-glycans of plasma proteins, resulting that *N*-glycans remodeling mice, which have highly branched *N*-glycans on plasma proteins abundantly, could be prepared 2 days after *in vivo* transfection. In future, we will perform *N*-glycoproteomics and multivariate analyses in cohort studies, and will clarify anti-inflammation mechanisms through haptoglobin with highly branched *N*-glycans in mice study.