

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500967

研究課題名(和文) 糖尿病性血管障害の新規発症因子解明とその防御

研究課題名(英文) A novel pathogenic and defence mechanisms in diabetic angiopathy

## 研究代表者

深津 佳世子(佐々木佳世子)(Sasaki-Fukatsu, Kayoko)

茨城キリスト教大学・生活科学部・准教授

研究者番号：70338903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性血管障害の新規メカニズムを解明するために、血管内皮細胞のグルタチオンレドックスサイクルに焦点を絞り検討を行った。生きた状態の培養ヒト血管内皮細胞の糖尿病モデル細胞において、グルタチオン依存系による過酸化水素消去能が著しく低下していることを発見し、その原因物質の合成を行ってきた。合成化合物は当初不安定であったが、最終的に安定な化合物を高純度で得ることができた。本化合物が過酸化水素消去酵素を阻害することも見出した。また防御因子として、ミリセチンが糖尿病モデル細胞におけるアポトーシスを抑制することも発見した。これらの物質は高血糖から血管障害発症に至る新規メカニズムに直接関わる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To investigate the novel mechanism involved in oxidative stress-mediated diabetic angiopathy, we focused on function of the glutathione (GSH) redox cycle in endothelial cells. In diabetes model human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) of the living state, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging activity via the GSH cycle was significantly reduced. We have carried out the synthesis of the causative agent. Although the synthetic compound was initially unstable, it was possible to obtain a final stable compound at a high purity. We found that this compound inhibits the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging enzyme. As a protective factor of diabetic angiopathy, we found that myricetin, a food ingredient, inhibits apoptosis in diabetes model HUVEC. These substances may, at least in part, be directly involved in a novel mechanism leading from hyperglycemia to develop vascular injury.

研究分野：生化学、基礎栄養学、栄養機能学、病態生化学

キーワード：糖尿病性血管障害 酸化ストレス 血管内皮細胞 培養細胞 グルタチオン 糖尿病 血管障害

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 「人は血管とともに老いる」といわれる通り、長寿社会の到来にともない、血管障害にかかわる疾病の増加には注目すべきものがある。血管障害の基礎疾患の中でも特に糖尿病は、食生活様式の変化にともない増加の一途をたどっており、2,000 万人以上の日本人が患者もしくはその予備軍といわれている。糖尿病に合併しておこる血管障害は糖尿病性血管障害とよばれ、その増加を食い止めるための新たな発想に基づく対策は、社会的な要請であるといっても過言ではない。なぜ糖尿病の高血糖状態になると血管障害が起こるのであろうか。1つの有力な仮説は、高血糖状態における血管組織での酸化ストレスの亢進により、血管内皮細胞の障害が起こるといったものであった。

(2) 本研究の展開にあたり、研究代表者の2つの先行研究が重要な技術的ブレークスルーをもたらした。従来、一般的に培養ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) で高グルコース障害を再現できず、培養系を用いた糖尿病性血管障害の研究が困難な状況にあった。研究代表者は鉄補充などの改良を加えることにより、継代培養 HUVEC において高グルコースによる細胞障害を再現することに初めて成功している (Sasaki K, Biochemi Biophys Res Commun 2001)。この成果により、様々な条件をコントロールした *in vitro* の系で、糖尿病性血管障害の発症機構にアプローチすることが可能になった。さらに研究代表者らは、培養細胞を生きたまま用いて過酸化水素消去速度を測定・解析することにより、抗酸化酵素活性を同時に測定できる方法を開発した (Sasaki K, Biochim Biophys Acta 1998)。これによって初めて生細胞における抗酸化酵素の活性測定が可能となった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病性血管障害の発症に関わる未知のメカニズムを解明し、防御に役立てることである。高血糖状態において、血管組織での酸化ストレス亢進が指摘されていたことから、本研究においては、酸化ストレス消去系に焦点を絞り、抑制されているのか否かを明らかにし、抑制されていればその原因に直結する機構を解明することを目的として、研究を行った。具体的には、培養ヒト血管内皮細胞を用いて、高グルコース状態における過酸化水素消去系に焦点を絞り、高血糖から血管障害に至るまでの新規原因物質およびその防御因子を明らかにすることを目的として、研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を EBM-2 培地にて培養し、実験に用いた。以下、独自に開発した実験方法について示す。

(2) 生きた状態の HUVEC における過酸化水素消去速度測定法：3日間培養したディッシュ内の HUVEC を洗浄後、4.95 mL の PBS(+) + グルコースを加え、37 恒温槽内で振盪しながら適当な濃度の過酸化水素溶液を 50  $\mu$ L 加えた。1.5分間隔で溶液を 50  $\mu$ L ずつ抜き取り、化学発光法にて過酸化水素濃度を定量した。定量後は、ディッシュ内 HUVEC を可溶化してたんぱく質定量を行なった。過酸化水素濃度の対数を時間に対してプロットし、直線回帰によるプロットの傾きから一次速度定数を得た。それに反応の midpoint の過酸化水素濃度をかけることで、反応速度 (nmol/min/mg protein) を求めた。

(3) 糖尿病モデル培養 HUVEC の作製：研究代表者は継代培養 HUVEC において鉄含量が継代に伴い急激に減少していることが高グルコース毒性耐性の原因となっていることをつきとめ、生理的濃度以下の鉄補充により生体内でみられる高グルコース障害を継代培養 HUVEC で再現することに成功している。1 mM FeCl<sub>3</sub> と 2 mM 8-ヒドロキシキノリン (8HQ) を含む 50% エタノール溶液を水で希釈し、この Fe/8HQ を 0.1  $\mu$ M 含む HBSS で、ディッシュ中 HUVEC を 37  $\cdot$  30 分間インキュベートすることにより鉄補充を行なった。その後洗浄し、高濃度グルコースを含む培地で培養し、糖尿病モデル培養細胞とした。

## 4. 研究成果

(1) 生きた状態の糖尿病モデル培養 HUVEC では、正常 HUVEC に比べて著しく過酸化水素消去能力が低下していた。

(2) 生きた状態の糖尿病モデル培養 HUVEC と正常 HUVEC の過酸化水素消去反応におけるパラメータ分析結果より、一次反応には差がなかったにもかかわらず、ミカエリス・メンテン反応の最大速度が糖尿病モデル HUVEC では正常 HUVEC の 1/3 以下になっていた。グルタチオンを枯渇させる薬剤である DEM で処理した細胞では、ミカエリス・メンテン反応に基づく曲線が消失することより、ミカエリス・メンテン反応は、グルタチオンレドックスサイクルに基づく反応を示す。したがって、糖尿病モデル HUVEC では、グルタチオンレドックスサイクルに基づく過酸化水素消去系が著しく低下していることが分かった。

(3) すでに予備実験結果より、予めグルコースとグルタチオンを緩衝液中でインキュベートすることにより新しい生成物が生じることを確認し、グルコースとグルタチオンの N 位化合物は合成していたが、S 位化合物

はこれまで合成が非常に困難であり、合成した場合でも変性が激しく実験に用いることができなかった。今回、安定な合成経路を探索し、受託合成企業と共同で考案することで、初めて安定な S 位糖化グルタチオンを合成することに成功し、その後、高純度に精製を行なうことができた。

(4) 研究代表者が合成した N 位糖化グルタチオンである N-1-deoxy-fructos-1-yl-glutathione と S 位糖化グルタチオンである S-fructos-linked-glutathione を用いて、グルタチオンレドックスサイクルの抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼおよびその抗酸化作用の際に必要な還元型グルタチオンを供給するためのグルタチオン還元酵素に対する作用を検討したところ、どちらの化合物も、両方の酵素を阻害することが明らかとなった。

(5) 研究代表者が開発した方法により条件設定された糖尿病モデル HUVEC においては、正常 HUVEC に比較して 48 時間培養の生存率が 53.9%であった。また、増殖速度は変わらないにもかかわらず、アポトーシスによる細胞死が増加していた。

(6)

防御因子として、食品成分であるミリセチンを上記糖尿病モデル培養 HUVEC に様々な濃度 (0.005-2.0 mM) で添加して培養したところ、0.025 mM (25  $\mu$ M) 添加した時に最も生存率を回復させることが明らかとなった。

25  $\mu$ M のミリセチン添加 48 時間培養で、糖尿病モデル HUVEC の生存率を上記 53.9%から 90%以上まで (現在、別ロットの HUVEC においても再現性確認実験中) 回復させることができた。

ミリセチンは、ブルーベリー、クランベリー、カシス、ビルベリー等に最大 142 mg/kg 程度含まれたため、体内で 100%吸収されたと仮定した場合、それらの果実を 280 g 摂取することで一時的に有効な血中ミリセチン濃度を得ることができると計算された。

(7)

本研究において新規に合成した原因候補物質との比較実験を行なうため、すでに糖尿病患者の血管内で増加の認められているメチルグリオキサールを用いて、正常培養 HUVEC に様々な濃度 (0.2-1.0 mM) で添加培養を行なった。メチルグリオキサール添加では、糖尿病モデル HUVEC と同様な形態を示してアポトーシスに至った。

これまでの報告では 1.0 mM メチルグリオキサールの添加で細胞死が起こらないとされていたが、それよりも低濃度である 0.5 mM

のメチルグリオキサール添加で明らかな細胞死が起こることを見出した (生存率 13.5%)。

0.2 mM メチルグリオキサール添加培養では、添加後 24 時間では生存率が著しく低下していたが、添加後 48 時間後で著しく増加回復することが明らかとなり、メチルグリオキサールに対する HUVEC の耐性が、濃度 0.2 mM において生じることを初めて明らかにした。この耐性は、細胞内グルタチオン含量の増加による可能性が考えられた。

(8) 研究代表者が合成した、糖尿病性血管障害の新規原因候補物質、N-1-deoxy-fructos-1-yl-glutathione と S-fructos-linked-glutathione は、様々な濃度において培養 HUVEC に添加したところ、細胞に取り込まれず、培養 HUVEC を変化させることはなかった。このため、ペプチドのトランスフェクション試薬を用いて作用させ、(さらなる再現実験が必要であるが) 培養 HUVEC の生存率を低下させることを見出した。今後、メカニズムの詳細について確認する予定である。

(9) 研究代表者が糖尿病性血管障害の新しい原因候補物質と考える N-1-deoxy-fructos-1-yl-glutathione および S-fructos-linked-glutathione、また新しい防御候補物質と考えるミリセチンは、高血糖状態から血管障害の発症にいたるまでの新規メカニズムに直接関わる可能性があると考えられる。(論文投稿準備中)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Kobayashi, S., et al. Sato, H. (15 人中 15 番目) Cystathionine is a novel substrate of cystine/glutamate transporter: implications for immune function. (査読有り) J. Biol. Chem. 290: 8778-8788. (2015) DOI: 10.1074/jbc.M114.625053.

Peng Ye, P., Mimura J., Okada, T., Sato, H., et al. (8 人中 4 番目) Nrf2- and ATF4-dependent up-regulation of xCT modulates the sensitivity of T24 bladder carcinoma cells to proteasome inhibition. (査読有り) Mol. Cell. Biol. 34: 3421-3434. (2014) DOI: 10.1128/MCB.00221-14

Mesci, P., et al. Sato, H., (9 人中 7 番目) System xc- is a mediator of microglial function and its deletion slows

symptoms in Amyotrophic Lateral Sclerosis.  
(査読有り) Brain 138: 53-68. (2015) DOI:  
10.1093/brain/awu312.

Kobayashi, S., et al. Sato, H. (9人中  
9番目) Enhanced expression of  
cystine/glutamate transporter in the lung  
caused by the oxidative stress-inducing  
agent paraquat. (査読有り) Free Radic.  
Biol. Med. 53: 2197-2203. (2012) DOI:  
10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.040

〔学会発表〕(計15件)

Sasaki-Fukatsu, K. A novel pathogenic  
mechanism in diabetic angiopathy:  
Involvement of nonenzymatic glycosylated  
glutathione, 第37回日本分子生物学会、  
2014年11月26日、パシフィコ横浜(神奈川  
県・横浜市)

深津(佐々木)佳世子、肥満と糖尿病の病  
態と対策、公益社団法人茨城県栄養士会研究  
教育公衆衛生専門研究会総会(招待講演)、  
2015年5月21日、茨城県立健康プラザ(茨  
城県・水戸市)

深津(佐々木)佳世子、糖尿病性血管障害  
における新規発症メカニズムの解明、第13  
回茨城県栄養健康改善学会、2015年2月19  
日、常磐大学(茨城県・水戸市)

Sasaki-Fukatsu, K., Sato, H., Bannai S.,  
and Makino, N., Involvement of  
glycosylated glutathione in  
glucose-induced suppression of  
antioxidant activity in endothelial cells.  
16<sup>th</sup> Society for Free Radical Research  
International Meeting, 2012年9月6日、  
London (England)

〔図書〕(計4件)

深津佳世子(佐々木)ほか、羊土社、栄養  
科学イラストレイテッド「基礎栄養学」改訂  
第2版、2014年、27-37ページ

深津佳世子(佐々木)ほか、羊土社、栄養  
科学イラストレイテッド演習版「基礎栄養学  
ノート」改訂第2版、2014年、24-33ページ

深津佳世子(佐々木)ほか、羊土社、栄養  
科学イラストレイテッド「基礎栄養学」2012  
年、27-37ページ

深津佳世子(佐々木)ほか、羊土社、栄養  
科学イラストレイテッド演習版「基礎栄養学  
ノート」2012年、24-33ページ

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

深津(佐々木) 佳世子 (SASAKI-FUKATSU,

Kayoko)

茨城キリスト教大学・生活科学部・食物健康  
科学科・准教授

研究者番号: 70338903

(2)研究分担者

佐藤 英世 (SATO, Hideyo)

新潟大学・医学部・保健学科・教授

研究者番号: 60235380