

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 7 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09565

研究課題名(和文) 糖尿病患者の血管内皮障害へ及ぼすグルコサミン修飾の影響と薬物介入への実験的検討

研究課題名(英文) Evaluation of the effects of glucosamine modification on endothelial cells of diabetic angiopathy

研究代表者

眞崎 暢之 (Masaki, Nobuyuki)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・内科学・講師)

研究者番号：00364795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心臓カテーテル検査の撓骨動脈シースを洗浄して血管内皮細胞を回収する方法を、国内外において初めて開発した。この方法で糖尿病性血管障害と細胞内グルコサミン修飾(O-GlcNAc)の関係を示した。実験1：上腕静脈から得た血管内皮細胞でO-GlcNAcが糖尿病患者で増加していた。実験2：インスリンによるeNOSリン酸化反応(peNOS Ser1177)を84人の患者で調査し、血管硬化指標(CAVI)高値、インスリン治療中、および冠動脈疾患を合併している糖尿病患者でインスリン抵抗性が認められた。これらの結果から、糖尿病性血管内皮機能障害が過剰なO-GlcNAc修飾で起こりうることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管は癌、血液、皮膚のように多くのヒト検体を採取して調べる事が難しい。そのため、血管内皮細胞の基礎研究(細胞、動物)に比べて、実際の患者の細胞・組織を用いた研究は限られていた。今回開発した方法は、心臓カテーテル器具に付着した細胞を回収するため、新たな侵襲を加えるものではない。この方法を用いて、我々は糖尿病患者の血管内皮機能障害の原因の一つとして細胞内グルコサミン化(O-GlcNAc)の関与を明らかにした。心臓カテーテル検査は広く普及していることから、多くの被検者から細胞を集めることができるため、不明であった患者の病態や血管生理と分子生物学的メカニズムとの関連の解明に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed a new method to collect freshly isolated endothelial cells from radial catheter sheath used for coronary angiography. We sought to elucidate the relationship between diabetic angiopathy and intracellular O-GlcNAc modification using the method. Study 1: O-GlcNAc modification in the endothelial cells harvested from upper arm veins with J-wire was increased in patients with type-2 diabetes mellitus (T2DM) by fluorescence microscopy. Study 2: In a cross-sectional study of 84 patients, Percent increase of insulin-induced phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) at serine 1177 were evaluated in endothelial cells collected from radial artery. Endothelial insulin resistance defined as reduced eNOS response to insulin was seen in the T2DM with self-insulin injection, coronary artery disease, and severe arterial stiffness evaluated by cardio-ankle vascular index. These results suggested that T2DM causes endothelial dysfunction by excessive O-GlcNAc modification.

研究分野：血管内皮機能障害

キーワード：血管内皮機能障害 グルコサミン 糖尿病

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性血管合併症は患者の生命予後に関わる重要な合併症である血管障害の進展には、様々な因子が関わっていることが推察され、未だ有効な治療法が開発されていない。その中で、血管内皮細胞のマイナーな糖代謝経路があたえる影響に着目した。

糖尿病では、糖代謝の副経路が活性化する。通常では、ヘキソサミン経路は糖代謝全体の 2-5%を占めている。最終産物である UDP-GlcNAc (Uridine diphosphate N-acetylglucosamine) はヒアルロン酸等のグリコサミノグリカンの生合成の基質として利用されている。しかし、一部の UDP-GlcNAc は細胞内タンパク質のセリン基、スレオニン基に O-link を介して付着し、O-GlcNAc (O-linked N-acetylglucosamine) 修飾をおこなう。この修飾は、O-GlcNAc transferase (OGT)、O-GlcNAcase (OGA) という酵素によって接着と分解がコントロールされている。単一グルコサミンによる修飾であり、架橋形成や連鎖は起こらないことが特徴である。翻訳後修飾の一つであり、リン酸化部位を競合阻害し、遺伝子発現や細胞活性に重要な役割を果たす。

血管においては、一酸化窒素 (NO) が血管拡張の維持など血管のホメオスタシスに重要な役割を果たしている。インスリン等の刺激によって eNOS のリン酸化が起こり、血管内皮から NO が産出される。eNOS の活性化にはセリン残基 (Ser1177) のリン酸化が必要である。過剰な eNOS の O-GlcNAc 修飾は同部位のリン酸化を競合阻害するため血管内皮障害を引き起こすのではないかとされている。(文献①, ②) しかし、実際の糖尿病患者から得た血管細胞での報告は少なく、本研究で検証することとした。

以上の研究を進めるにあたり、多くの患者から血管内皮細胞をとるために、新たな非侵襲的な方法を開発する必要がある。当初の研究方法は、J-ワイヤーを用いて血管内皮を擦搔する侵襲的なもので静脈にしか適応できないことが弱点であった。よって、心臓カテーテル検査で使用する動脈シースに付着した血管内皮細胞を回収する方法を試みた。この方法では、通常のカテーテル検査に新たに侵襲や余分な操作を加えることがないため、幅広く多くの患者から細胞を採取することが可能となった。

### 2. 研究の目的

- (1) 実験 1: 糖尿病患者の血管内皮細胞では、細胞内 O-GlcNAc 修飾が増加しているかどうかを検証する。さらには、O-GlcNAc 修飾の度合いを変化させることによって、血管内皮一酸化窒素産生酵素(eNOS)のリン酸化に変化を与えるかどうか明らかにする。
- (2) 実験 2: 動脈シースを洗浄して得た血管内皮細胞を用いて、インスリン刺激による eNOS 活性化(リン酸化)を測定する。この反応が乏しいことを血管内皮インスリン抵抗性と定義する。2型糖尿病と血管機能に関する横断試験を実施し、患者のバックグラウンド、糖尿病の程度や治療との関連を明らかにする。

### 3. 研究の方法

血管内皮細胞の採取、染色方法、標的分子の評価方法は以下のとおりである。

- (1) 上腕静脈にサーフロー針で外筒を留置後、J-ワイヤーを用いて血管内皮を擦搔し、洗浄液でワイヤーから血管内皮細胞を離す事によって血管内皮細胞を回収する。
- (2) 今回開発した動脈シースからの回収では、シース内筒の洗浄液から細胞を採取する。得られた細胞はコーティングしたチャンバースライド上で培養し、4%パラホルムアルデヒドで固定する。洗浄、乾燥ののちに-80°冷凍庫の中で保管する。
- (3) 後日、凍結スライドを溶解し、ブロッキング後にフォンウィルブラント因子(vWF)と標的分子に対する抗体をもちいて二重染色する。蛍光顕微鏡で血管内皮細胞を抗 vWF 抗体による染色で識別し、標的分子に対する蛍光染色の度合いを定量化する。定量化にはソフトウェアを用いて、細胞毎にバックグラウンドを引いた値を算出する。20 個以上の細胞の平均値を求める。
- (4) 日による染色濃度の違いを補正するため、あらかじめ市販血管内皮細胞のコントロールスライドを作成する。患者細胞と同時に染色を行い、コントロールから得られた値に対するパーセンテージを **arbitral unit(au)** と定義する。
- (5) 市販動脈血管内皮細胞 (HAEC) を、D-グルコース濃度 5mM,30mM および OGA インヒビターである Thiamet G、OGT インヒビターである Alloxan を用いて培養を行った。ウェスタンブロットの結果から患者細胞に使用する至適薬物濃度を設定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験 1:

###### ① 血管内皮細胞の O-GlcNAc 修飾の比較 :

2 型糖尿病患者 18 人、コントロール患者 10 人の比較試験を行った。上腕静脈から得られた血管内皮細胞で抗 O-GlcNAc 抗体の染色強度を比較したところ、糖尿病患者のほうが 1.8 倍高いことが明らかとなった。(図 1) O-GlcNAc 修飾の程度は、患者の朝空腹時の血糖値、HbA1C と正相関を認めた。

###### ② 血管内皮細胞内の O-GlcNAc 修飾の増減について :

2 型糖尿病患者から採取した血管内皮細胞を低グルコース(5mM)、高グルコース(30mM)の培養液で 24 時間培養し O-GlcNAc の増減をみたところ、低グルコースに比べて高グルコースのほうが抗 O-GlcNAc 抗体の

染色強度が高かった。また、同様に、低グルコース培養液中に Thiamet G 1 $\mu$ M 追加の有無で比較した場合、Thiamet G によって明らかに O-GlcNAc が増加することを認めた。逆に、高グルコース培養液中に OGT インヒビターである Alloxan 2.5 $\mu$ M を投与した場合には、O-GlcNAc の

蛍光強度は減弱した。同様の

変化は、市販の HAEC を用いたウェスタンブロットでも確認された。このことから、血管内皮細胞の細胞内タンパク質への O-GlcNAc 修飾の程度は、細胞外のグルコース濃度などの環境によって容易に変化することがわかった。

###### ③ O-GlcNAc 修飾の増減に伴う eNOS リン酸化の変化について :

2 型糖尿病患者の血管内皮細胞を低グルコース培地で培養したところ、高グルコース培地よりもインスリン刺激による eNOS リン酸化が回復することがわかった。しかし、Thiamet G 1 $\mu$ M を追加した場合、eNOS リン酸化反応は減弱した。このことから、O-GlcNAc 修飾の増加は、2 型糖尿病でみとめられる高血糖は血管内皮機能障害を引き起こすが、その一因として O-GlcNAc 修飾の過剰が考えられた。

##### (2) 実験 2:

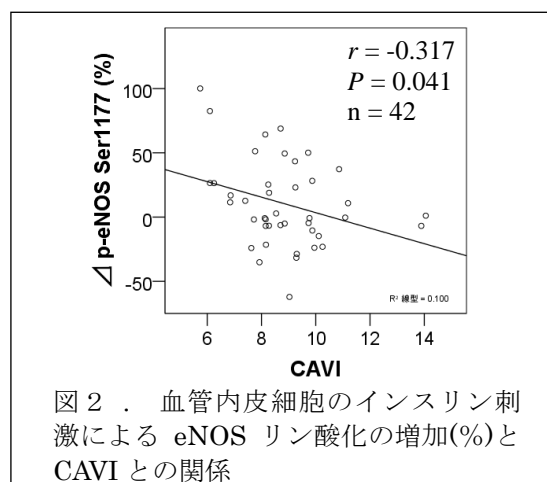
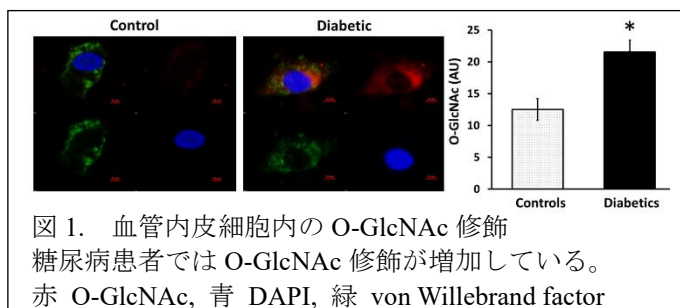
患者の血管内皮インスリン抵抗性を測定するため、動脈シースから血管内皮細胞を回収し、インスリン刺激(100 $\mu$ M, 30min)による eNOS リン酸化反応 ( $\Delta$ p-eNOS Ser1177) を 84 人の患者で調査した。結果、血管硬化指標 (CAVI: cardio-ankle vascular index) 高値、インスリン自己注射による治療中、および冠動脈疾患を合併している糖尿病患者で血管内皮インスリン抵抗性が認められた。(図 2)

#### 5. 今後の展望

今回、糖尿病性血管内皮機能障害に O-GlcNAc 修飾が関与している可能性について、多くの 2 型糖尿病患者の血管内皮細胞を用いて示した。以前より、糖尿病患者の白血球、赤血球などで O-GlcNAc が蓄積されている報告があった。(文献③~⑥) 血管内皮は血液に常に接触しているため、血球と同様に代謝の影響を鋭敏に受けやすいと考えられる。本研究では、糖尿病患者の血管内皮細胞であっても、低グルコース濃度下であればインスリンへの反応はある程度回復するが、高濃度グルコース下、もしくは OGA インヒビターによる O-GlcNAc が増加した状態では改善しないことを示した。

しかし、細胞全体の O-GlcNAc を軽減させた場合、もしくは eNOS の O-GlcNAc 修飾のみを減少させた場合にインスリン刺激による eNOS リン酸化反応が回復するかどうかについては、適切な薬剤などがなく本実験系では確認できていない。

過去の報告では、遺伝子導入により OGA を過剰発現させた I 型糖尿病マウスでは、アセチルコリン刺激による血管拡張機能が回復したとの報告がある。(文献⑦) 特定のタンパク質に特異的な抗 O-GlcNAc 抗体はまだ市販レベルでは開発されておらず、この点においては引き続き研究が



必要である。新しい非侵襲的な血管内皮細胞の回収については、他の血管機能に関わる標的分子の調査にも応用可能であり、解析方法の改良が今後の課題である。

## 6. 参考文献：

- ① Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R. Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation*. 2002;106:466–472.
- ② Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest*. 2001;108:1341–1348.
- ③ Holt GD, Haltiwanger RS, Torres CR, Hart GW. Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins. O-linked GlcNAc on Band 4.1. *J Biol Chem*. 1987;262:14847–14850.
- ④ Park K, Saudek CD, Hart GW. Increased expression of beta-N-acetylglucosaminidase in erythrocytes from individuals with pre-diabetes and diabetes. *Diabetes*. 2010;59:1845–1850.
- ⑤ Springhorn C, Matsha TE, Erasmus RT, Essop MF. Exploring leukocyte O-GlcNAcylation as a novel diagnostic tool for the earlier detection of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:4640–4649.
- ⑥ Myslicki JP, Shearer J, Hittel DS, Hughey CC, Belke DD. O-GlcNAc modification is associated with insulin sensitivity in the whole blood of healthy young adult males. *Diabetol Metab Syndr*. 2014;6:96.
- ⑦ Makino A, Dai A, Han Y, Youssef KD, Wang W, Donthamsetty R, Scott BT, Wang H, Dillmann WH. O-GlcNAcase overexpression reverses coronary endothelial cell dysfunction in type 1 diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015;309:C593–C599.

## 7. 主な発表論文等

### [雑誌論文] (3件)

- ① Masaki N, Feng B, Bretón - Romero R, Inagaki E, Weisbrod RM, Fetterman JL, Hamburg NM. O-GlcNAcylation Mediates Glucose induced Alterations in Endothelial Cell Phenotype in Human Diabetes Mellitus. 査読有, *J Am Heart Assoc*. 2020;9:e014046. DOI: 10.1161/JAHA.119.014046
- ② Masaki N, Ido Y, Yamada T, Yamashita Y, Toya T, Takase B, Hamburg NM, Adachi T. Endothelial Insulin Resistance of Freshly Isolated Arterial Endothelial Cells From Radial Sheaths in Patients With Suspected Coronary Artery Disease. 査読有, *J Am Heart Assoc*. 2019 Mar 19;8(6):e010816. doi: 10.1161/JAHA.118.010816.
- ③ Namba T, Masaki N, Takase B, Adachi T. Arterial Stiffness Assessed by Cardio-Ankle Vascular Index. 査読有, *Int J Mol Sci*. 2019 Jul 26;20(15). pii: E3664. doi: 10.3390/ijms20153664. Review.

### [学会発表] (5件)

- ① 眞崎 暢之、井戸 康夫、高瀬 凡平、足立 健. 心臓カテーテル検査器具から得られた血管内皮細胞のインスリン抵抗性と糖尿病性血管障害との関連、シンポジウム 【テーマ】糖尿病患者の心血管イベント予防、第 67 回日本心臓病学会学術集会名古屋 2019 年 9 月 13 日
- ② 眞崎 暢之、高瀬 凡平、足立 健 心臓カテーテル検査器具より回収した血管内皮細胞を用いた eNOS 活性と VCAM-1 発現の検討 口述、第 3 回日本血管不全学会学術集会、京都 2018 年 04 月 14 日
- ③ 眞崎 暢之、井戸 康夫、高瀬 凡平、足立 健 Association between arteriosclerosis obliterans and insulin-mediated eNOS activation in freshly isolated arterial endothelial cells from radial catheter sheath ポスターセッション、第 3 回日本循環器学会基礎研究フォーラム 東京 2019 年 9 月 4 日
- ④ Masaki N, Ido Y, Takase B, Adachi T Increased Basal eNOS Activity in Freshly Isolated Endothelial Cells from Patients with Cardiovascular Disease ポスターセッション、第 82 回日本循環器学会総会、大阪、2018 年 3 月 24 日
- ⑤ Masaki N, Ido Y, Takase B, Adachi T. Association Between VCAM-1 Expression in Freshly Isolated Arterial Endothelial Cells From Radial Catheter Sheath and Chronic Kidney Disease (Vascular Discovery 2019, Boston, USA)

## 8. 研究組織

### (1) 研究代表者

眞崎 暢之 (MASAKI, Nobuyuki)  
防衛医科大学校病院 集中治療部 講師  
研究者番号 00364795

### (2) 研究分担者

東谷 卓美 (TOYA, Takumi)  
防衛医科大学校 循環器内科 助教  
研究者番号 60781515

高瀬 凡平 (TAKASE, Bonpei)  
防衛医科大学校病院 集中治療部  
臨床教授  
研究者番号 50518214

足立 健 (ADACHI, Takeshi)  
防衛医科大学校 循環器内科 教授  
研究者番号 50231931

### (3) 研究協力者

井戸 康夫 (IDO, Yasuo)  
防衛医科大学校 循環器内科 助教  
研究者番号 50814133

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Masaki N, Feng B, Bret&oacute;n-Romero R, Inagaki E, Weisbrod RM, Fetterman JL, Hamburg NM.	4. 巻 9
2. 論文標題 O- GlcNAcylation Mediates Glucose- Induced Alterations in Endothelial Cell Phenotype in Human Diabetes Mellitus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc.	6. 最初と最後の頁 e014046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1161/JAHA.119.014046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Masaki N, Ido Y, Yamada T, Yamashita Y, Toya T, Takase B, Hamburg NM, Adachi T.	4. 巻 8(6)
2. 論文標題 Endothelial Insulin Resistance of Freshly Isolated Arterial Endothelial Cells From Radial Sheaths in Patients With Suspected Coronary Artery Disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc.	6. 最初と最後の頁 e010816.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1161/JAHA.118.010816	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Namba T, Masaki N, Takase B, Adachi T.	4. 巻 20(15)
2. 論文標題 Arterial Stiffness Assessed by Cardio-Ankle Vascular Index.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 pii: E3664.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3390/ijms20153664. Review.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamada T, Adachi T, Ido Y, Masaki N, Toya T, Uchimuro T, Nishigawa K, Suda H, Osako M, Yamazaki M, Takanashi S, Shimizu H	4. 巻 83
2. 論文標題 Preserved Vasoconstriction and Relaxation of Saphenous Vein Grafts Obtained by a No-Touch Technique for Coronary Artery Bypass Grafting.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 232-239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1253/circj.CJ-18-0714. Epub 2018 Nov 3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 眞崎 暢之, 井戸 康夫, 高瀬 凡平, 足立 健
2. 発表標題 心臓カテーテル検査器具から得られた血管内皮細胞のインスリン抵抗性と糖尿病性血管障害との関連
3. 学会等名 第67回日本心臓病学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 眞崎暢之、井戸康夫、高瀬凡平、足立健
2. 発表標題 Association between arteriosclerosis obliterans and insulin-mediated eNOS activation in freshly isolated arterial endothelial cells from radial catheter sheath
3. 学会等名 第3回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 眞崎暢之
2. 発表標題 心臓カテーテル検査器具より回収した血管内皮細胞を用いたeNOS活性とVCAM-1発現の検討
3. 学会等名 第3回日本血管不全学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 眞崎暢之
2. 発表標題 Increased Basal eNOS Activity in Freshly Isolated Endothelial Cells from Patients with Cardiovascular Disease
3. 学会等名 第82回日本循環器学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nobuyuki Masaki, Yasuo Ido, Bonpei Takase, and Takeshi Adachi
2. 発表標題 Association Between VCAM-1 Expression in Freshly Isolated Arterial Endothelial Cells From Radial Catheter Sheath and Chronic Kidney Disease
3. 学会等名 Vascular Discovery 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	足立 健  (Adachi Takeshi)  (50231931)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・内科学・教授   (82406)	
研究分担者	高瀬 凡平  (Takase Bonpei)  (50518214)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・集中治療部・准教授   (82406)	
研究分担者	東谷 卓美  (Toya Takumi)  (60781515)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・内科学・助教   (82406)	
研究協力者	井戸 康夫  (Ido Yasuo)		