

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08920

研究課題名(和文) 糖尿病性多発神経障害におけるO-GlcNAc修飾の役割の解明

研究課題名(英文) Roles of O-GlcNAc modification in diabetic polyneuropathy.

研究代表者

中村 二郎 (Jiro, Nakamura)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：40283444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性多発神経障害(DPN)は高頻度な糖尿病性合併症であるが、有効な治療法は未確立であり、機序解明が必要である。

本研究では、O-結合型Nアセチルグルコサミン(O-GlcNAc)修飾に注目し、末梢神経系のO-GlcNAc修飾タンパクを探索し、そのDPNの病態におよぼす影響を解明した。

ペプチドシーケンスを実施し、候補タンパクのリストを得た。RNA sequencing解析ではGO解析では、コントロールと比較して、GlcNAc負荷群で、50種類のGO termが有意に上昇し、17種類のGO termが有意に低下した。DEG解析でも複数の遺伝子が有意な増減を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

O-GlcNAc修飾の糖尿病や中枢神経変性疾患における役割については報告されているが、DPNにおける報告はなく、本研究は非代替性の高い研究である。

学術的意義としては、国内外で主要な研究テーマとなっている酸化ストレス亢進などのDPNの病態仮説の限界を見極め、新たな仮説を検証する研究であること、また、糖尿病学と神経学の領域でともに重要な研究対象であるO-GlcNAc修飾をDPNという病態において統合し、新たな意義を付加する可能性があることが挙げられる。DPNの有望な治療標的分子は報告されておらず、本研究で同定できれば画期的な発見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Diabetic polyneuropathy (DPN) is a common complication of diabetes, but an effective treatment has not yet been established, and the underlying mechanism requires further elucidation.

In this study, we focused on O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification, and we aimed to identify O-GlcNAc modification proteins in the peripheral nervous system to understand their impact on the pathogenesis of DPN.

Peptide sequencing was performed to generate a list of candidate proteins. Additionally, RNA sequencing analysis revealed that in the GlcNAc-loaded group, 50 gene ontology (GO) terms showed a significant increase, while 17 GO terms exhibited a significant decrease compared to the control group. Furthermore, differential expression analysis (DEG) highlighted significant upregulation or downregulation of several genes.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病性神経障害

1. 研究開始当初の背景

DPN は、糖尿病患者の約半数に認められ (Dyck PJ, Neurology, 1993)、自発痛・しびれ感・知覚低下などの感覚障害に加え、一部の患者には足壊疽・切断といった生命予後悪化をもたらす病態を招く。DPN の発症・進展機序としては、高血糖に伴う代謝障害(ポリオール代謝亢進、PKC 活性の変化、AGE 蓄積、酸化ストレス亢進など)と血流障害が重要であると考えられている。代謝障害に対する治療として、アルドース還元酵素阻害薬が使用されているが有効性は十分でなく、発症機序のさらなる解明が必要な段階である。

本研究で注目する O-GlcNAc 修飾は、タンパクの翻訳後修飾の一つであり、グルコースの細胞内代謝回路である解糖系およびヘキソサミン生合成経路を経て GlcNAc が生成されることより、糖尿病における高グルコース状態により亢進することが知られている (Hart GW, Annu Rev Biochem. 2011)。また、O-GlcNAc をタンパクに付加する酵素 OGT が特に膵と神経系において高発現であることより、これまでに膵細胞および神経系における病態への影響を検討した報告が数多くなされている。この中で、O-GlcNAc 修飾が、糖代謝異常そのものに関与するという報告はいくつかされているものの (Akimoto Y, Glycobiology. 2006; Alejandro EU, Cell Reports. 2015; Yang Y, Nature. 2008)、糖尿病性合併症に関しては糖尿病網膜症の病態に関する一報があるのみである (Issad T, Diabetes Metab. 2010)。一方、神経系においては、アルツハイマー病における Tau および amyloid precursor protein, パーキンソン病における α -synuclein が O-GlcNAc 修飾の標的タンパクとして挙げられ、O-GlcNAc 修飾によるタンパク機能変化が、その病態を形成することが指摘されている (Lazarus BD, Int J Biochem Cell Biol. 2009; Wani WY, Brain Res Bull. 2017)。また、末梢神経系における探索も進みつつあり、近年、一次感覚ニューロン (Su C, J Neurosci. 2017) およびシュワン細胞 (Kim S, J Neurosci. 2016) の恒常性維持に、O-GlcNAc 修飾が重要な役割を持つことが報告された。このうち、シュワン細胞における報告では、ラット坐骨神経において 100 以上のタンパクが O-GlcNAc 修飾を受けることが示されており、その内の Periaxin が O-GlcNAc 修飾欠失マウスにおける末梢神経変性のキーファクターであることが示唆されている。

しかしながら、これらの末梢神経系における検討では、組織特異的 O-GlcNAc 修飾欠失マウスにおける神経変性を解析しており、糖尿病における O-GlcNAc 修飾の亢進とは相反する状態を評価している。中枢神経系疾患においても O-GlcNAc 修飾の亢進あるいは低下のいずれが病態の増悪あるいは進展抑制につながるかは結論が出ておらず、活発な議論が行われているところである。

2. 研究の目的

上記の状況を鑑み、本研究では、DPN の病態における O-GlcNAc 修飾の果たす役割を解明することを目的とし、その知見を通じて、今後の糖尿病性合併症あるいは神経変性疾患における O-GlcNAc 研究分野に一石を投じたい。すなわち、本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、「O-GlcNAc 修飾が DPN の病態にどのような影響をおよぼすか? そして、その病態に影響する O-GlcNAc 修飾の標的分子は何か?」である。

3. 研究の方法

DRG ニューロン細胞株 50B11 に、GlcNAc (5mM)、PugNAc (100uM) を付加した培地で 24 時間培養することで GlcNAc 負荷を行った細胞ライセートと RL2 抗体を用いた western blotting で O-GlcNAc 修飾の変化を確認した。

O-GlcNAc 修飾が強く認められた条件で培養した 50B11 細胞から得られた total RNA を用いて行った RNAseq から得られたデータについて各種解析を行った。

コントロール群 (D1-4)、GlcNAc 増強群 (G1-4) それぞれ n=4。RNAseq により得られたデータを階層別クラスタリング (Control と GlcNAc 群で発現が有意に 2 倍の差がある遺伝子、ヒートマップ (遺伝子発現が有意に 2 倍変化した遺伝子群を用いた)、GO 解析 (コントロールと比較して、GlcNAc 負荷群で、2 倍以上発現が変化した遺伝子群を対象とした)、DEG 解析 (コントロールと比較して、GlcNAc 負荷群で、2 倍以上発現が変化した遺伝子群を対象とした)、IPA 解析を行った。

4. 研究成果

DRG ニューロン細胞株 50B11 は、GlcNAc 負荷で、コントロールと比較して、より強い O-GlcNAc 修飾が認められた (Fig1)。

階層別クラスタリングにより、Control 群と GlcNAc 増強群の遺伝子発現が 2 層に分けられることを確認した (Fig2)。

ヒートマップを作成し、Control 群と GlcNAc 増強群の遺伝子発現の違いを確認した (Fig3)。

GO 解析では、コントロールと比較して、GlcNAc 負荷群で、2 倍以上発現が上昇した遺伝子群では、50 種類の GO term が有意に検出された (Table1)。2 倍以上発現が低下した遺伝子群では、17 種類の GO term が有意に検出された (Table2)。

DEG 解析では、遺伝子発現が有意に 2 倍以上上昇した遺伝子が 39 検出された (Table3)。遺伝子発現が有意に 2 倍以上低下した遺伝子が 48 検出された (Table4)。

IPA 解析では、Top canonical pathways、Top upstream Regulators、Causal Network、Diseases and Disorders、Molecular and Cellular Functions、Physiological System Development and Function の各項目で有意な pathway が検出された (Fig4、Fig5、Table5)。

Fig1

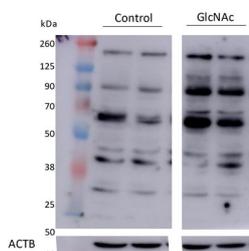


Fig1
50B11細胞を用いたWestern blotting
5%-10% gel, 50B11+GlcNAc 5mM+ PuGNAc100uM 24ht, 20ug/lane
1*Ab:ao-GlcNAc(RL2) sc596241:200

Fig2

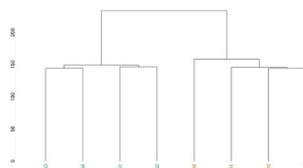


Fig2
ControlとGlcNAc群で発現が有意に2倍の差がある遺伝子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	成瀬 桂子 (Naruse Keiko) (30387576)	愛知学院大学・歯学部・教授 (33902)	
研究分担者	加藤 宏一 (Kato Koichi) (40319322)	愛知学院大学・薬学部・教授 (33902)	
研究分担者	速水 智英 (Hayami Tomohide) (60740933)	愛知医科大学・医学部・助教 (33920)	
研究分担者	姫野 龍仁 (Himeno Tatsuhiro) (60753762)	愛知医科大学・医学部・准教授 (33920)	
研究分担者	神谷 英紀 (Kamiya Hideki) (70542679)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------