

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02862

研究課題名(和文) 糖代謝臓器における細胞内糖鎖修飾の網羅的機能解析 - 生理機能から糖尿病の病態まで

研究課題名(英文) Role of protein O-GlcNAcylation in physiology and diabetes

研究代表者

前川 聡 (Maegawa, Hiroshi)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：00209363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内タンパク質の機能制御に関わるタンパク翻訳後修飾の一つであるO-Glc-Nac修飾の糖尿病並びに糖尿病合併症関連臓器における生理的役割とその異常と糖尿病病態との関わりを検討した。結果、O-GlcNAc修飾は、白色脂肪細胞における脂肪合成や正常な機能的成熟、骨格筋での運動時の糖取り込み、腸管からの脂質の吸収制御、SGLT1発現を介した糖吸収の制御、腎近位尿細管における絶食時の脂肪酸酸化-ATP産生に寄与すること、これらの異常が糖代謝異常や合併症の進展に寄与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病ならびにその合併症は、患者さんのQOLを大きく損なう疾患であり、肥満患者数の増加や高齢化が急速に進む我が国において、その有病率の上昇が大きな社会問題の一つとなっている。今回の研究により、タンパク質の翻訳後修飾の一つであるO-GlcNAcylationの異常が糖代謝制御や糖尿病状態での合併症進展に寄与することが明らかとなり、その機能調節が糖尿病や糖尿病合併症に対する新たな治療標的となる可能性が示された。今後の研究の発展により、糖尿病患者さんの健康寿命延伸に対する新たな治療法の開発が期待される。

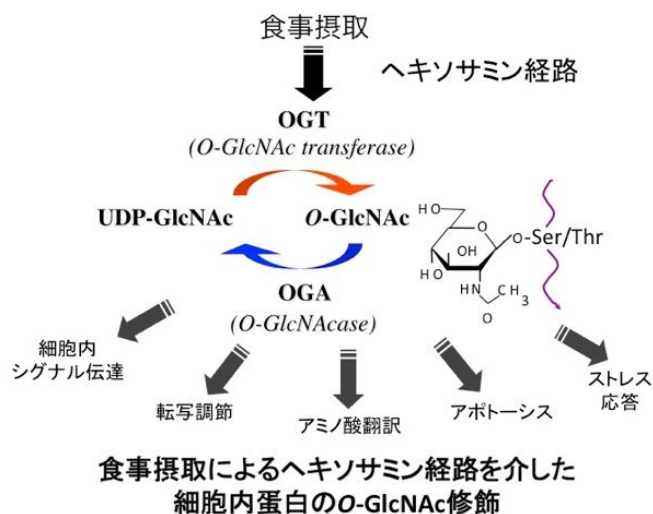
研究成果の概要(英文)：The physiological role of the O-GlcNAcylation, a post-translational modification of proteins, in diabetes and diabetic complication-related organs and the relationship between its abnormalities and diabetes development. The results show that O-GlcNAc modification contributes to lipogenesis in white adipose tissue, exercise-induced glucose uptake and utilization in skeletal muscle, regulation of lipid absorption from the intestine, regulation of glucose absorption via SGLT1 expression from the intestine, and fatty acid oxidation and ATP production during fasting in the renal proximal tubules, and that abnormalities in these functions contribute to the development of abnormal glucose metabolism and diabetic kidney disease.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 糖尿病合併症 タンパク翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

リン酸化、アセチル化やメチル化修飾などを介した蛋白の機能異常が病態形成に深く関与している。このような蛋白の翻訳後修飾は細胞内外に存在する酵素や転写因子の機能制御に不可欠な過程であり、その異常は種々の疾患の原因となる。そのため、その生理的機能の解明ならびにその異常と病態との関連を解明することが新たな治療標的の解明には不可欠となる。糖尿病では高血糖が持続する結果、細胞内外の蛋白に対する非酵素学的な糖化修飾反応 (Advanced glycation end products の生成) が生じるが、その過剰な産生は合併症の病態の中心的役割を担うとされている。また、細胞膜表面に存在する蛋白に対する酵素学的な糖鎖修飾は細胞の機能維持に重要である。このように翻訳後修飾の一つである広義の糖鎖修飾は、細胞外蛋白に対する修飾が主と考えられてきた。しかし近年、細胞質や核に存在する細胞内蛋白にも酵素学的な糖鎖修飾が生じることが明らかにされた。この細胞内糖鎖修飾は O-GlcNAc 修飾とよばれ、解糖系側副路を介してできた修飾基質 UDP-GlcNAc が蛋白の Ser、Thr 残基に付加される修飾であり、O-GlcNAc 転移酵素(OGT)により付加され、O-GlcNAc 分解酵素(OGA)により除去される(右図)。現在、O-GlcNAc の修飾の異常が癌、アルツハイマー病などの疾患と密接に関連していることが明らかにされつつあり、種々の臓器・組織において、O-GlcNAc 修飾が担う細胞機能の詳細な解明が待たれている。しかしながら、糖尿病や糖尿病合併症に関連する臓器における、その生理的役割や病態への関与は明らかとなっていない。



2. 研究の目的

本研究では、糖尿病およびその合併症に関連する臓器・組織において O-GlcNAc 修飾を減弱させ、O-GlcNAc 修飾の生理的機能および糖尿病・糖尿病血管合併症の病態形成における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

白色脂肪細胞における O-GlcNAc 修飾の役割

Adiponectin-Cre マウスを用いて、脂肪組織特異的 Ogt 欠損マウスを作製し、高脂肪食負荷肥満状態における表現型を解析した。また、マウス皮下脂肪組織由来の初代培養細胞に対し、Ogt 阻害剤投与と下で分化誘導を行い、脂肪滴蓄積や遺伝子発現を評価した。

骨格筋細胞における O-GlcNAc 修飾の役割

MLC1-Cre マウスを用いて、骨格筋特異的 Ogt 欠損マウスを作製し、通常飼育状況、運動時での糖代謝を解析した。

血管内皮細胞における O-GlcNAc 修飾の役割

VE-cadherin-Cre マウスを用いて、血管内皮細胞特異的 Ogt 欠損マウスを作製し、通常状態、高脂肪食負荷肥満状態、Streptozotocin による高血糖状態状態における表現系を検討した。

小腸上皮細胞における O-GlcNAc 修飾の役割

先天的並びに薬剤誘導性の Villin-Cre マウスを用いて、先天的並びに後天的な小腸特異的 OGT 欠損マウスを作製し、通常飼育状態での体重変化、糖・脂質代謝、エネルギー代謝の変化を観察した。また、腸管内分泌細胞である STC-1 細胞及び小腸特異的 OGT 欠損マウスからの単離腸管上皮細胞を用いて、O-GlcNAc 修飾変化による Sglt1 遺伝子発現の変化とその調整機構の確認を行った。

近位尿管細胞における O-GlcNAc 修飾の役割

NDRG1-Cre マウスを用いて、近位尿管特異的 OGT 欠損マウスを作製し、非絶食状況、絶食状況、高脂肪食負荷肥満モデルでの腎表現系を検討した。

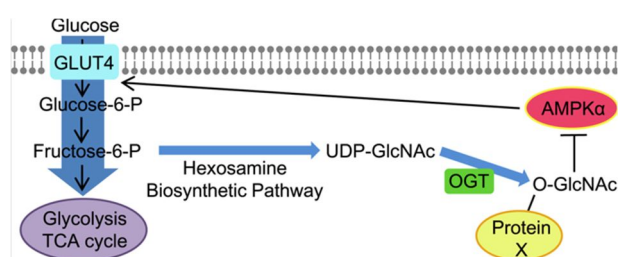
4. 研究成果

脂肪組織における O-GlcNAc 修飾の役割

脂肪組織特異的 Ogt 欠損マウスは、高脂肪食負荷 6 週後以降、摂餌量に差がないにもかかわらず、対照マウスに比して有意に体重増加が抑制されたが、耐糖能の悪化とインスリン感受性の悪化を認めた。組織像では、白色脂肪組織は萎縮し、脂肪滴の縮小と高度な線維化を認め、TNF- α 、IL-6、MCP-1、F4/80、CD11c、Col1a1 発現が上昇した。また、脂肪酸合成に関連する SREBP-1c、FAS、SCD1、SCD2 の遺伝子発現が有意に低下し、de novo 脂肪酸合成の障害が疑われた。さらに、脂肪組織特異的 Ogt 欠損マウスの血清レプチン濃度、血清アディポネクチン濃度の低下も確認された。皮下脂肪組織由来初代培養細胞を用いた検討では、Ogt 阻害剤投与下で分化誘導を行った群は、非投与群と比較して、用量依存性に細胞内脂肪滴蓄積が低下し、SREBP-1c、FAS、レプチン、アディポネクチン遺伝子発現も低下した。

以上より、白色脂肪組織において O-GlcNAc 修飾は脂肪合成や脂肪細胞の正常な機能的成熟過程において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

骨格筋特異的 Ogt 欠損マウスは、腹腔内糖負荷試験において、対照マウスと比べ血糖値には差が認めなかったが、血漿インスリン値の低下を認めた。腹腔内インスリン負荷試験中の血糖値および骨格筋の Akt リン酸化 (Ser 473 および Thr308) は、骨格筋特異的 Ogt 欠損マウスと対照マウスで差がなかったことから、O-GlcNAc 修飾の欠損は骨格筋の運動依存性グルコース利用を促進するのではないかと考え、20 分間の単発運動中の糖代謝を検討した。骨格筋特異的 Ogt 欠損マウスでは、運動中の血糖値が有意に低下し、AMPK の基質である ACC (Ser79) のリン酸化が促進された。C2C12 筋芽細胞において Ogt を siRNA でノックダウンすると、AMPK のリン酸化 (T172) が 1.3 倍に増加し、グルコース酸化能が高くなることが明らかとなった。以上より、骨格筋における O-GlcNAc 修飾は、骨格筋における運動時の AMPK を介したグルコース利用に関与することが明らかとなった (右図)。

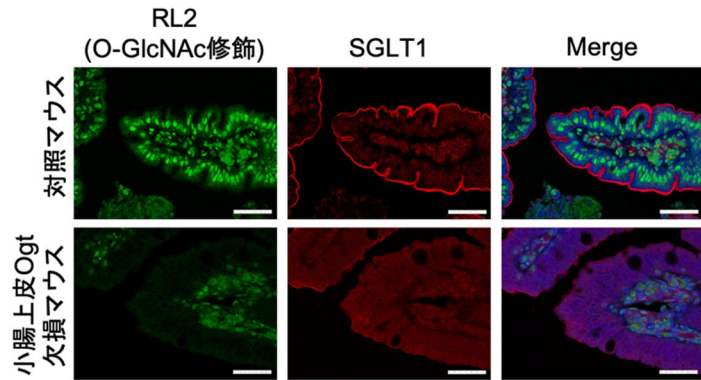


血管内皮細胞における O-GlcNAc 修飾の役割

血管内皮細胞特異的 Ogt 欠損マウスと対照マウスを比較したところ、高血糖状態において糖尿病合併症にみられる網膜新生血管の増生や尿蛋白の変化について 2 群間に差を認めなかった。一方、高脂肪食負荷実験では、血管内皮細胞特異的 Ogt 欠損マウスで体重増加が抑制され、その結果耐糖能やインスリン抵抗性の改善がみられた。基礎代謝は両群間に差を認めず、腸管からの糖吸収にも差を認めなかったが、腸管からの脂質の吸収が有意に抑制されていた。以上より、血管内皮細胞における O-GlcNAc 修飾は腸管からの脂質吸収制御に寄与する可能性が示唆された。

小腸上皮細胞における O-GlcNAc 修飾の役割

小腸特異的 OGT 欠損マウスを作成し対照マウスと比較したところ、小腸特異的 OGT 欠損マウスは、離乳時から低体重と随時血糖値の低値を認めた。栄養吸収を確認するために経口および腹腔内ブドウ糖負荷試験を行った結果、経口ブドウ糖負荷試験でのみ血糖の上昇は有意に抑制された。また、

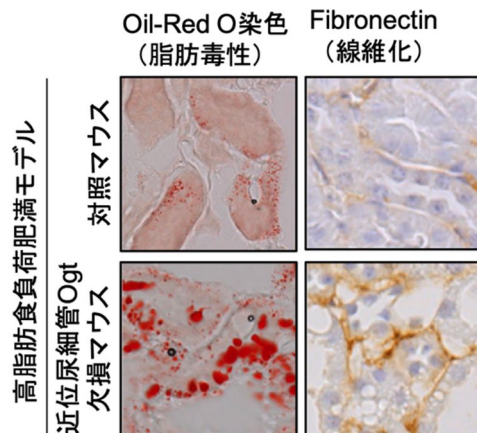


小腸特異的 OGT 欠損マウスの小腸で SGLT1 の遺伝子とタンパク発現が低下していることが確認された(右図)。さらに授乳期の影響を除外するために後天的な小腸特異的 OGT 欠損マウスでも、タモキシフェンによる遺伝子欠損誘導後に体重と随時血糖値が低下し、先天性同様に SGLT1 発現の減少を伴う糖の吸収抑制が確認された。

STC-1 細胞を用いて、O-GlcNAc 修飾の変化が Sgl t1 の遺伝子発現に及ぼす影響を検討したところ、O-GlcNAc 修飾の基質であるグルコサミン投与で O-GlcNAc 修飾、Sgl t1 の遺伝子発現は増加したが、OGT 阻害薬で減少した。以上より、小腸上皮において O-GlcNAc 修飾は、SGLT1 発現を介した糖吸収の制御に関わることが明らかとなった。

近位尿細管における O-GlcNAc 修飾の役割

近位尿細管特異的 OGT 欠損マウスは、摂食時には有意な表現型を呈さなかったが、48 時間絶食時には、アミノ酸、グルコース、各種イオンの尿中排泄が増加し、近位尿細管細胞のアポトーシス亢進が確認された。さらに、近位尿細管細胞内の顕著な脂肪滴の増加、ミトコンドリアの断片化、腎皮質における ATP 含量の有意な減少、脂肪酸代謝関連遺伝子発現の変化が確認された。また近位尿細管特異的 OGT 欠損マウスは、肥満糖尿病状態で腎脂肪蓄積の増大とともに腎障害の悪化が確認された(右図)。以上より、O-近位尿細管における GlcNAc 修飾は、絶食時の脂肪酸酸化-ATP 産生に関与するとともに、その異常が肥満や糖尿病に伴う腎障害に寄与することが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morino Katsutaro, Maegawa Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Role of O linked N acetylglucosamine in the homeostasis of metabolic organs, and its potential links with diabetes and its complications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 130 ~ 136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13359	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 -
1. 著者名 Nishimura K, Fujita Y, Ida S, Yanagimachi T, Ohashi N, Nishi K, Nishida A, Iwasaki Y, Morino K, Ugi S, Nishi E, Andoh A, Maegawa H.	4. 巻 59
2. 論文標題 Glycaemia and body weight are regulated by sodium-glucose cotransporter 1 (SGLT1) expression via O-GlcNAcylation in the intestine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2022.101458	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 -
1. 著者名 森野 勝太郎, 大橋 夏子, 井田 昌吾, 前川 聡	4. 巻 64
2. 論文標題 O-GlcNAc修飾と疾患	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 循環器内科	6. 最初と最後の頁 111-113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugahara S, Kume S, Chin-Kanasaki M, Tomita I, Yasuda-Yamahara M, Yamahara K, Takeda N, Osawa N, Yanagita M, Araki SI, Maegawa H.	4. 巻 30
2. 論文標題 Protein O-GlcNAcylation Is Essential for the Maintenance of Renal Energy Homeostasis and Function via Lipolysis during Fasting and Diabetes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Am Soc Nephrol.	6. 最初と最後の頁 962-978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2018090950.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murata K, Morino K, Ida S, Ohashi N, Lemecha M, Park SY, Ishikado A, Kume S, Choi CS, Sekine O, Ugi S, Maegawa H.	4. 巻 495
2. 論文標題 Lack of O-GlcNAcylation enhances exercise-dependent glucose utilization potentially through AMP-activated protein kinase activation in skeletal muscle.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 2098-2104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.12.081.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中本 明紀子, 大橋 夏子, 森野 勝太郎, 菅原 礼知安, 井田 昌吾, Perry Rachel, Shulman Gerald I., 岡本 拓也, 柳町 剛司, 佐藤 大介, 藤田 征弘, 卯木 智, 前川 聡
2. 発表標題 脂肪組織におけるO-GlcNAc修飾は、de novo脂肪合成を介した正常な機能維持に重要である
3. 学会等名 第36回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村 公宏, 藤田 征弘, 井田 昌吾, 柳町 剛, 西田 淳史, 安藤 朗, 森野 勝太郎, 卯木 智, 前川 聡
2. 発表標題 腸管でのO-GlcNAc修飾はブドウ糖吸収を制御し、糖代謝の恒常性に寄与している
3. 学会等名 第36回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大角 誠一郎, 森野 勝太郎, 大橋 夏子, 石角 篤, 井田 昌吾, 一山 悠介, Rachel Perry, 藤田 征弘, 卯木 智, Gerald Shulman, 大路 正人, 前川 聡
2. 発表標題 血管内皮細胞のO-GlcNAc修飾は肥満・高血糖で誘発される高血圧発症に関わる重要な因子である
3. 学会等名 第36回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中本 明紀子, 大橋 夏子, 森野 勝太郎, 井田 昌吾, Perry Rachel, Shulman Gerald, 岡本 拓也, 柳町 剛司, 佐藤 大介, 藤田 征弘, 卯木 智, 前川 聡
2. 発表標題 脂肪組織におけるO-GlcNAc修飾は肥満形成過程における脂肪組織増大に必須である
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大橋 夏子, 中本 明紀子, 森野 勝太郎, 井田 昌吾, 久米 真司, 関根 理, 藤田 征弘, 卯木 智, 前川 聡
2. 発表標題 肥満2型糖尿病における白色及び褐色脂肪細胞のO-GlcNAc修飾の役割と新規治療標的の探索
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中本 明紀子, 大橋 夏子, 森野 勝太郎, 井田 昌吾, Perry Rachel, Shulman Gerald, 岡本 拓也, 柳町 剛司, 佐藤 大介, 藤田 征弘, 卯木 智, 前川 聡
2. 発表標題 脂肪組織におけるO-GlcNAc修飾は肥満形成過程における脂肪組織増大に必須である
3. 学会等名 第63回日本糖尿病年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大橋 夏子, 森野 勝太郎, 前川 聡
2. 発表標題 The role of O-GlcNAcylation in brown and white adipose tissue
3. 学会等名 第63回日本糖尿病年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村 公宏, 藤田 征弘, 井田 昌吾, 柳町 剛司, 森野 勝太郎, 卯木 智, 前川 聡, 安藤 朗, 西田 淳史
2. 発表標題 腸管での O-GlcNAc修飾は吸収を介して糖代謝の恒常性に寄与している
3. 学会等名 第35回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中本 明紀子
2. 発表標題 脂肪組織におけるO-GlcNAc修飾は、肥満形成過程における脂肪組織増大と機能的成熟に必須である
3. 学会等名 第41回日本肥満学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大角誠一郎, 森野勝太郎, 大橋夏子, 石角 篤, 井田昌吾, 一山悠介, Perry Rachal, 藤田征弘, 卯木智, Shulman Gerald, 大路正人, 前川聡
2. 発表標題 血管内皮細胞特異的O-GlcNAc transferase欠損マウスは高脂肪食による肥満に対し抵抗性を示す
3. 学会等名 第63回日本糖尿病年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村公宏, 藤田征弘, 井田昌吾, 柳町剛司, 西田淳史, 安藤朗, 森野勝太郎, 卯木智, 前川聡
2. 発表標題 腸管上皮細胞のO-GlcNAc修飾は栄養吸収の調整に重要である
3. 学会等名 第63回日本糖尿病年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅原 翔, 久米 真司, 山原 真子, 山原 康佑, 武田 尚子, 大澤 紀之, 金崎 雅美, 柳田 素子, 荒木 信一, 前川 聡
2. 発表標題 腎臓近位尿管のO-GlcNAc修飾依存的脂肪酸代謝に着目した新規糖尿病性腎臓病治療標的の探索
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村 公宏, 井田 昌吾, 森野 勝太郎, 大橋 夏子, 藤田 征弘, 今井 隆行, 西田 淳史, 杉谷 義彦, 安藤 朗, 卯木 智, 前川 聡
2. 発表標題 腸管上皮細胞のO-GlcNAc修飾は栄養吸収に重要である
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻 明紀子, 大橋 夏子, 森野 勝太郎, 井田 昌吾, 佐藤 大介, 藤田 征弘, 卯木 智, 前川 聡
2. 発表標題 脂肪組織におけるO-GlcNAc修飾の欠損は白色脂肪組織の萎縮と高脂肪食摂取下での耐糖能増悪を惹起する
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田 幸一郎, 森野 勝太郎, 井田 昌吾, 大橋 夏子, Lemecha Mengistu, Park Shi-Young, 石角 篤, 久米 真司, Choi Cheol Soo, 関根 理, 卯木 智, 前川 聡
2. 発表標題 骨格筋におけるO-GlcNAc修飾の低下はAMPK蛋白発現の増加を伴う抗糖尿病および抗肥満作用を有する
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅原 翔, 久米 真司, 金崎 雅美, 武田 尚子, 大澤 紀之, 柳田 素子, 荒木 信一, 前川 聡
2. 発表標題 近位尿細管のエネルギー代謝恒常性維持における蛋白質O-GlcNAc修飾の役割
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅原 翔, 久米 真司, 金崎 雅美, 山原 康佑, 山原 真子, 武田 尚子, 大澤 紀之, 柳田 素子, 荒木 信一, 前川 聡
2. 発表標題 近位尿細管における蛋白質O-GlcNAc修飾は脂質代謝の安定化を介して絶食時および肥満糖尿病状態での細胞障害を軽減する
3. 学会等名 第33回 日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sugahara S, Maegawa H, Kume S, Yamahara K, Yamahara M, Takeda N, Osawa N, Kanasaki M, Yanagita M, Araki S.
2. 発表標題 Protein O-GlcNAcylation Regulates Renal Lipolysis During Fasting and Diabetes
3. 学会等名 Kidney Week 2018 (American Society of Nephrology) (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究協力者	久米 真司 (Kume Shinji)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	森野 勝太郎 (Morino Katsutaro)		
研究協力者	藤田 征弘 (Fujita Yukihiro)		
研究協力者	大橋 夏子 (Ohashi Natsuko)		
研究協力者	井田 昌吾 (Ida Shogo)		
研究協力者	村田 幸一郎 (Murata Koichiro)		
研究協力者	菅原 翔 (Sugahara Sho)		
研究協力者	西村 公宏 (Nishimura Kimihiro)		
研究協力者	中本 明紀子 (Nakamoto Akiko)		

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			
韓国	Lee Gil Ya Cancer and Diabetes Institute			
米国	Yale University School of Medicine			