

令和 6 年 9 月 5 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08503

研究課題名（和文）糖尿病性血管内皮機能障害におけるパルミチン酸のO-GlcNAcを介した機序の解明

研究課題名（英文）Mechanism of palmitic acid-induced diabetic endothelial dysfunction via O-GlcNAc

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・集中治療部・准教授

研究者番号：00364795

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：1. パルミチン酸投与方法：パルミチン酸投与後のO-GlcNAc修飾はダイナミックに変化し、5時間後にピークを迎え、24時間経つと消失した。
2. O-GlcNAc修飾蛋白の網羅的解析：ラベリングによる新しい方法によるO-GlcNAcで免疫沈降プロファイリングを行った。臍帯血管内皮細胞を、通常グルコース（5mM）、高グルコース（30mM）、高グルコース+パルミチン酸負荷（100mM、5時間）、ThiametG（1μM）の条件で48時間培養し蛋白抽出後に分析に提出している。
3. 患者の血管内皮細胞の採取：心臓バイパスグラフトの余剰断端から採取する方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性血管障害は高脂血症が加わるとさらに悪化する可能性があるが、明らかな機序はわかっていない。今回の研究ではパルミチン酸による細胞毒性が高血糖に加わることで、細胞のグルコサミン修飾（O-GlcNAc）が変化して悪化につながる可能性について研究を行った。パルミチン酸でどのような蛋白がO-GlcNAc修飾をうけるのか解析している段階である。

研究成果の概要（英文）：1. Palmitic acid administration method: O-GlcNAc modification after palmitic acid administration was dynamic, peaking at 5 hours and disappearing after 24 hours. Subsequent experiments were conducted at 5 hours after administration.
2. Comprehensive analysis of O-GlcNAc modified proteins: Immunoprecipitation profiling was performed with O-GlcNAc using a novel method of labeling. Umbilical cord vascular endothelial cells were cultured for 48 hours under normal glucose (5 mM), high glucose (30 mM), high glucose + palmitate load (100 mM, 5 hours), and ThiametG (1 μM) conditions and submitted to the contractor after protein extraction. In addition, collection of vascular endothelial cells from patients was performed to know O-GlcNAcylation of diabetics. A method was established to collect endothelial cells from the excess end of cardiac bypass grafts.

研究分野：Vascular Biology

キーワード：血管内皮細胞 O-GlcNAc Palmitic acid

令和6年9月5日

令和2年度科学研究費助成事業（令和2年度～令和4年度）

基盤研究(C)（一般）20K08503

課題名：糖尿病性血管内皮機能障害におけるパルミチン酸の O-GlcNAc を介した機序の解明

研究代表者：防衛医大集中治療部 眞崎 暢之

（趣旨）

糖尿病では脂肪肝や高トリグリセライド血症が高率に合併しており、血管内皮機能をさらに悪化させている可能性がある。最近、血清中の脂肪酸の一つであるパルミチン酸が、他の脂肪酸に比べて、糖代謝のヘキソサミン経路を活性化させて血管内皮細胞内グルコサミン修飾（O-linked Nacetylglucosamine：O-GlcNAc）を増加させることを発見した。O-GlcNAc は血管内皮の NO 産生を阻害するため、血管内皮機能障害の原因の一つと報告されている。心臓カテーテル検査器具から採取した実際の糖尿病患者の血管内皮細胞をもちいて、パルミチン酸の O-GlcNAc を介した新たな糖尿病性血管内皮機能障害の機序の可能性について研究を行った。

（研究方法）

1．培養細胞による研究：

市販のヒト臍帯血管内皮細胞（HUVEC）の3～5継代したものを用いた。培養液には EBM-2（Lonza）を用いた。パルミチン酸を投与に際しては、24時間前にアルブミンや細胞成長因子などを含まない Quiescent 培養液に変換し 50 μ M カルニチンを事前に投与して行った。

2．パルミチン酸溶液の作成：

0.1N NaOH 溶液 にパルミチン酸（Sigma Aldrich P5585）を 70 度で加熱溶解させ、55 度に加熱している 10%脂肪酸フリーアルブミン（Sigma Aldrich A6003）/PBS 溶液の中に加えてゆくことで、5mM パルミチン酸含有アルブミンを作成した。コントロールとしてパルミチン酸を加えていない 10%脂肪酸フリーアルブミン/PBS 溶液を作成し、共に使用まで 20 度で保存した。

3．ウェスタンブロット法：

PMSF 含有の Lysate Buffer にて抽出を行ったのちソニケーションを行い、LDS サンプルバッファー（Invitrogen NP0007）と 0.5M DDT を混和、80 度 10 分の加熱処理を行った。4 \times 12%ゲル（Invitrogen NP0321）にサンプルを注入し 150V にて電気泳動を行った。トランスファーは PVDF 膜を使用し 10V、16 時間で行った。ブロッキングは市販溶液（ナカイラスク 03953-95）で 60 分を行い、一次抗体に 4 度冷蔵 overnight で反応させた。一次抗体は、anti-O-GlcNAc（Abcam ab2739）1:1000、anti-MEGA/OGA（Abcam ab105217）1:2000、anti-OGT（Abcam ab96718）1:2000 を使用した。他、eNOS、AKT、GAPDH 抗体（Cell Signaling）を用いた。翌日に洗浄後に二次抗体へ室温にて 90～120 分反応させた。洗浄ののちに専用試薬（Thermo Fisher 34076）を用い RAS3000（Fujifilm）にて検出を行った。

(結果)

1. パルミチン酸の投与量と O-GlcNAc 修飾の関係 (24 時間)

方法：HUVEC にパルミチン酸をそれぞれの濃度で投与し (0、1、10、100 μ M) O-GlcNAc 修飾の程度を比較した。24 時間前に Quiescent 培養液に交換し、パルミチン酸、もしくはアルブミンを投与した。さらに 24 時間培養ののちに細胞回収した。

結果：パルミチン酸 1mM では殆ど変化を認めなかったが、10mM、100mM になるにつれて、24 時間後の O-GlcNAc 修飾が低下し (図 1) パルミチン酸の細胞毒性が示唆された。

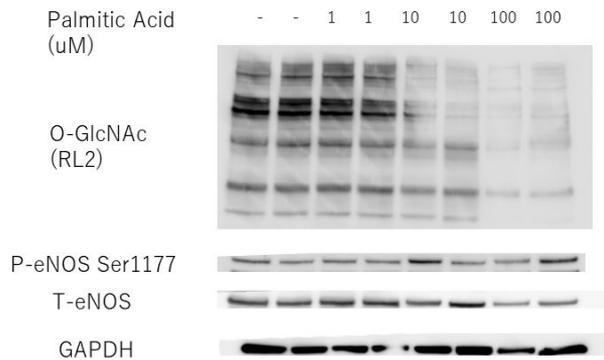


図 1 パルミチン酸の投与量による O-GlcNAc 修飾蛋白の変化

HUVEC を用いパルミチン酸投与後 24 時間培養した。パルミチン酸の量が多くなるにつれて O-GlcNAc 修飾が減少した。

2. パルミチン酸投与による O-GlcNAc 修飾の時間的变化 (0 - 24 時間)

方法：HUVEC に投与するパルミチン酸濃度を 100mM に固定し、時間によって O-GlcNAc 修飾が変化するかどうかを検討した。陽性コントロールとしてグルコース 30mM、さらに、他の細胞障害モデルとして TNF α 20nM を投与後 24 時間培養した群を設定した。

結果 1：事前に Quiescent 培養液に交換しなかった場合、パルミチン酸による O-GlcNAc 修飾の増加は認められなかった。

結果 2：事前に Quiescent 培養液に交換した場合は、パルミチン酸による O-GlcNAc 修飾は 5~10 時間に最大となり、24 時間後には非常に低下した。陽性コントロールであるグルコース 30mM、TNF α 20ng/mL を投与群は共に O-GlcNAc 修飾が増強した。(図 2)

解釈：パルミチン酸 100mM による O-GlcNAc 増加効果を見るには、事前に Quiescent 培養液に交換することが必須であり、投与後 5~10 時間が適していた。一方で、Quiescent 培養液で 24 時間以上培養すれば細胞死に陥る可能性がある。よって、以降の実験では、事前に Quiescent 培養液 + アルブミン 2%EBM2 培養液 (50%v/v) に交換しカルニチン 50 μ M 投与、パルミチン酸 100mM 投与、5 時間培養ののちに細胞回収と条件を決定した。また、TNF α に O-GlcNAc 修飾が反応することも示された。O-GlcNAc 修飾は外部環境でダイナミックに変動することがわかった。

令和6年9月5日

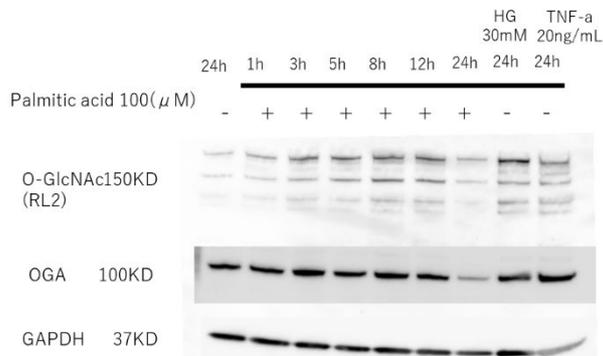


図2 パルミチン酸の投与時間による O-GlcNAc 修飾蛋白の変化

HUVEC を用いパルミチン酸投与後 0~24 時間培養した。O-GlcNAc 修飾蛋白は約 5-10 時間後が最大となる。分解酵素である OGA の量は 24 時間後に低下していた。

3. パルミチン酸投与による O-GlcNAc 修飾の網羅的解析

次に、パルミチン酸でどの蛋白が O-GlcNAc 修飾されるのか、免疫沈降によって明らかにすることにした。しかし、従来の抗 O-GlcNAc 抗体を用いて免疫沈降を行った研究では、抗体の質にばらつきによって一貫した結果が得られてないことが問題であった。^(1,2) 最近では Click It™ (Thermo Fisher 社) と呼ばれるラベリング技術が発達し、抗原抗体反応よりも正確と言われている。この技術によって修飾蛋白を網羅的に解析した文献は未だない。今回、Click It™ で O-GlcNAc 修飾蛋白のプロファイリングを行う方針とした。

方法：HUVEC を Quiescent 培養液 + アルブミン 2% EBM2 培養液 (50% v/v) に交換しカルニチン投与を行ったのち、投薬なし (コントロール)、グルコース負荷 30mM 48 時間、グルコース 30mM 48 時間 + パルミチン酸 100mM 5 時間、Thiamet G 1μM (DMSO < 0/01%) の 4 群を作成した。Thiamet G は OGA 阻害薬であり O-GlcNAc を増加させる。これらの細胞は通常の Lysate (PMSF なし) で回収したのち、Click It™ O-GlcNAc Enzymatic Labeling System (Thermo Fisher 33368) でラベリングし、Click-It™ Protein Enrichment Kit (Thermo Fisher 10416) で抽出した。質量分析を行うため、溶出前のスピнкаラムに入ったレジンの段階で委託業者へ冷凍で提出した。

結果：HUVEC を高血糖状態で培養することによって、ミトコンドリア蛋白 (Mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40)、IRS 関連蛋白 (Insulin-like growth factor-binding protein 7)、ER 蛋白 (Thioredoxin domain-containing protein 5) にセリン、スレオニン部位の O-linked GlcNAc 結合が認められていた。パルミチン酸負荷、OGA inhibitor (Thiamet G) 負荷の結果についても解析結果待ちの状態である。

4. 患者から得た血管内皮細胞との O-GlcNAc 修飾の比較

令和6年9月5日

狭心症で冠動脈バイパス手術を受ける患者約20人の大伏在静脈（グラフト血管）の断端からの細胞浮遊液を-80度で冷凍保存している（図3上）（倫理NO.4417、R4.1.30承認）。さらに、解凍後でも培養可能と確認している（図3下）。蛋白免疫沈降やトランスクリプトームでmRNA発現を調べるのに十分な量と質が得られ、かつ、RT-PCRで初代継代血管内皮細胞である証明を行った。患者から血管内皮細胞を得る条件が整った。次に、患者の血管内皮細胞のO-GlcNAc修飾蛋白が、3.の免疫沈降プロファイリングで示される結果と類似しているか、患者の血管内皮細胞のClick It™でのO-GlcNAc修飾蛋白抽出とプロファイリングを行う。患者から得た初代継代血管内皮細胞のみにO-GlcNAc修飾が認められる細胞内・核内蛋白質があれば、生活習慣など後天的要因によって生じたものと考えられる。修飾が認められる蛋白の機能についてリストアップし患者背景との関連を明らかにする。mRNAについても網羅的解析を予定する。

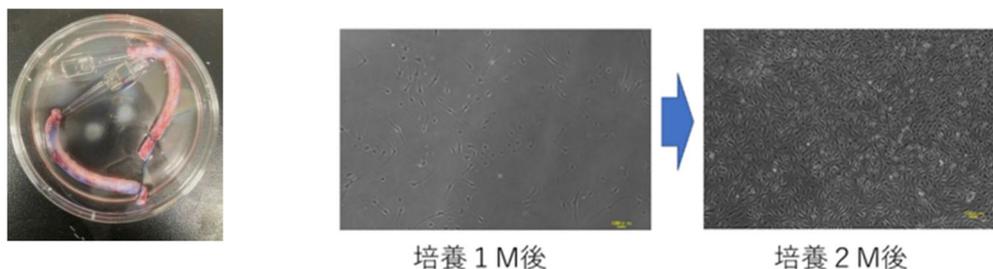


図3 大伏在静脈からの血管内皮細胞採取

上段 大伏在静脈

下段左 血管内皮細胞（培養1ヵ月後）

下段右 血管内皮細胞（培養2ヵ月後）

（まとめ）

パルミチン酸によるO-GlcNAc増加について、substrateの増加もしくは細胞にかかるストレスによるものと考えられるが、時間や他の条件に左右されることがわかった。今回の課題の中で実験が完了しておらず、詳細なメカニズムについてはまだ明らかになっていない。免疫沈降プロファイリングの分析結果が今後出てくるため報告する。また、患者血管内皮細胞のデータと照らし合わせることで、糖尿病性血管障害にパルミチンの影響がどの程度関与しているかさらに研究を推し進める予定である。

（索引）

1. Reeves RA, Lee A, Henry R, Zachara NE. Characterization of the specificity of O-GlcNAc reactive antibodies under conditions of starvation and stress. *Anal Biochem.* 2014 Jul 15;457:8-18. doi: 10.1016/j.ab.2014.04.008. Epub 2014 Apr 18.
2. Fahie K, Narayanan B, Zahra F, Reeves R, Fernandes SM, Hart GW, Zachara NE. Detection and Analysis of Proteins Modified by O-Linked N-Acetylglucosamine. *Curr Protoc.* 2021 May;1(5):e129. doi: 10.1002/cpz1.129.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishinoda Yuki, Masaki Nobuyuki, Hitomi Yasuhiro, Taruoka Akira, Kawai Akane, Iwashita Midori, Yumita Yusuke, Kagami Kazuki, Yasuda Risako, Ido Yasuo, Toya Takumi, Ikegami Yukinori, Namba Takayuki, Nagatomo Yuji, Miyazaki Koji, Takase Bonpei, Adachi Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 A Low Arginine/Ornithine Ratio is Associated with Long-Term Cardiovascular Mortality	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.63779	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 -
1. 著者名 Namba Takayuki, Masaki Nobuyuki, Hitomi Yasuhiro, Ishinoda Yuki, Iwashita Midori, Yumita Yusuke, Kagami Kazuki, Yasuda Risako, Ikegami Yukinori, Toya Takumi, Nagatomo Yuji, Takase Bonpei, Soejima Kyoko, Adachi Takeshi	4. 巻 80
2. 論文標題 Association of serum nitric oxide metabolite level with mortality in patients undergoing coronary angiography	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 578 ~ 584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2022.07.020	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
1. 著者名 Hitomi Yasuhiro, Masaki Nobuyuki, Ishinoda Yuki, Ido Yasuo, Iwashita Midori, Yumita Yusuke, Kagami Kazuki, Yasuda Risako, Ikegami Yukinori, Toya Takumi, Namba Takayuki, Nagatomo Yuji, Takase Bonpei, Adachi Takeshi	4. 巻 354
2. 論文標題 Effectiveness of the d-ROMs oxidative stress test to predict long-term cardiovascular mortality	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 43 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2022.03.001	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
1. 著者名 Mine Masataka, Masaki Nobuyuki, Toya Takumi, Namba Takayuki, Nagatomo Yuji, Takase Bonpei, Adachi Takeshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Association between Smoking and Urine Indole Levels Measured by a Commercialized Test	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 234 ~ 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo12030234	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 Mine Masataka, Masaki Nobuyuki, Toya Takumi, Namba Takayuki, Nagatomo Yuji, Takase Bonpei, Adachi Takeshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Association between Smoking and Urine Indole Levels Measured by a Commercialized Test	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 234 ~ 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo12030234	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 Hitomi Yasuhiro, Masaki Nobuyuki, Ishinoda Yuki, Ido Yasuo, Iwashita Midori, Yumita Yusuke, Kagami Kazuki, Yasuda Risako, Ikegami Yukinori, Toya Takumi, Namba Takayuki, Nagatomo Yuji, Takase Bonpei, Adachi Takeshi	4. 巻 354
2. 論文標題 Effectiveness of the d-ROMs oxidative stress test to predict long-term cardiovascular mortality	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 43 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2022.03.001	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 -

1. 著者名 Hitomi Yasuhiro, Masaki Nobuyuki, Ishinoda Yuki, Kagami Kazuki, Yasuda Risako, Toya Takumi, Namba Takayuki, Nagatomo Yuji, Takase Bonpei, Adachi Takeshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Effectiveness of pulsatility index of carotid Doppler ultrasonography to predict cardiovascular events	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Ultrasonics	6. 最初と最後の頁 95 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10396-021-01164-5	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masaki Nobuyuki, Takase Bonpei, Adachi Takeshi
2. 発表標題 Reduced blood flow velocity during flow-mediated dilation measurements in diabetic patients: the FMD-J B Study
3. 学会等名 第87 回日本循環器学会 学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaki Nobuyuki, Takase Bonpei, Adachi Takeshi
2. 発表標題 Effectiveness of Serum Nitric Oxide Metabolites for Prediction of 10-Year Mortality and Hospital Admission for Heart failure
3. 学会等名 第86 回日本循環器学会 学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaki Nobuyuki
2. 発表標題 脂質異常症と血管機能検査の関係を再構築する
3. 学会等名 第8 回日本血管不全学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaki Nobuyuki, Takase Bonpei, Adachi Takeshi
2. 発表標題 Evaluation of Phe- notype and Interaction of Endothelial Function at Different Arterial Levels by Simultaneous Measure- ment of Flow- Mediated Dilatation and Endo-PAT; FMD-J B Study
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 眞崎 暢之, 人見 泰弘*, 石野田 悠暉*, 高瀬 凡平, 足立 健
2. 発表標題 血清中一酸化窒素代謝物による死亡リスクの評価
3. 学会等名 第7 回日本血管不全学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaki Nobuyuki
2. 発表標題 Effectiveness of Serum Nitric Oxide Metabolites for Prediction of 10-Year Mortality and Hospital Admission for Heart failure
3. 学会等名 第86 回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 人見 泰弘, 眞崎 暢之, 雪野 碧, 弓田 悠介, 鏡 和樹, 安田 理紗子, 東谷 卓美, 難波 貴之, 長友 祐司, 高瀬 凡平, 足立 健
2. 発表標題 動脈硬化性疾患のスクリーニング検査としてのCAVI の有効性
3. 学会等名 第6 回日本血管不全学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 人見 泰弘, 眞崎 暢之, 雪野 碧, 弓田 悠介, 鏡 和樹, 安田 理紗子, 東谷 卓美, 難波 貴之, 長友 祐司, 高瀬 凡平, 足立 健
2. 発表標題 頸動脈ドップラー超音波検査で算出される拍動指数(Pulsatility Index) は心血管イベントを予測する
3. 学会等名 第6 回日本血管不全学会学術集会
4. 発表年 2021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 (Takeshi Adachi) (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)	

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
研究分担者	高瀬 凡平 (Bonpei Takase) (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	井戸 康夫 (Yasuo Ido) (50814133)	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)	

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