

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：23102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K02110

研究課題名(和文) 糖尿病における高LDL血症発症の新しいメカニズム解明と食品成分による改善法の検討

研究課題名(英文) Elucidation of a novel mechanism for the development of hyperLDLemia in diabetes mellitus and its improvement by food-derived ingredients.

研究代表者

萩原 真 (Hagiwara, Makoto)

新潟県立大学・人間生活学部・助教

研究者番号：30546099

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)：糖尿病は厚生労働省が定める重大疾病の一つである。糖尿病は、LDLコレステロールの血中濃度が高い状態である高LDL血症のリスクを高める。高LDL血症は、動脈硬化形成を促進し、心疾患や脳梗塞の原因となることが報告されており、ヒトを対象とした調査では、糖尿病患者の7割が心疾患と脳梗塞で死亡している。本研究では、糖尿病における高LDL血症発症のメカニズム解明と食品由来成分による高LDL血症改善法を検討する。申請者の研究によって、高グルコースはLDLのエンドサイトーシスを低下させることや、食品由来成分によりエンドサイトーシス活性を上昇させ、高LDL血症を改善する可能性のある因子を見つけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病有病者は、循環器疾患で亡くなる割合が多い。本研究によって、糖尿病における高LDL血症発症のメカニズムが明らかになるとともに、エンドサイトーシス活性を上昇させることによって、高LDL血症を改善する可能性のある食品由来成分を見つげ出した。本研究によって明らかになったメカニズムはこれまでに報告がなく、新たな切り口でこのメカニズムをターゲットとすることによって、糖尿病における高LDL血症を予防・改善する方法が確立されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Diabetes mellitus is one of the major diseases defined by the Ministry of Health, Labor and Welfare. Diabetes increases the risk of hyperLDL hematosiis, a condition in which blood levels of LDL cholesterol are high. HyperLDLemia has been reported to promote atherosclerosis formation and cause cardiac disease and stroke. In a human study, 70% of diabetic patients died of cardiac disease and stroke. This study aims to elucidate the mechanism of hyperLDLemia development in diabetes mellitus and to examine methods of improving hyperLDLemia with food-derived ingredients. The applicant's research has found that high glucose decreases LDL endocytosis and that certain food-derived components improve hyperLDLemia by increasing endocytotic activity.

研究分野：栄養生化学

キーワード：糖尿病 高血糖 エンドサイトーシス LDLコレステロール Rab5 炎症 MAPK

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本において糖尿病は国が定める重要疾患の一つである。糖尿病による高血糖は、いわゆる悪玉コレステロールと呼ばれている LDL の血中濃度が高い状態である高 LDL 血症のリスクを高める。高 LDL 血症は、心疾患や脳梗塞の原因となり、ヒトを対象とした調査では、糖尿病患者の 7 割が心疾患と脳梗塞で死亡しているとの報告がある。

高 LDL 血症に対する薬としては、肝臓でのコレステロール合成を阻害するスタチン系の薬剤が使用されることが多い。しかし、最近の研究では、スタチン系の薬剤は血糖値を上昇させるため、糖尿病患者が使用するにはリスクがあることが報告されている (Zigmont et al., Diabetes Metab Res Rev, 2019)。従って、糖尿病における高 LDL 血症の改善には、新しい方法の確立が求められている。

マウスにおいてエンドサイトーシス調節因子である Rab5 をノックダウンすると LDL コレステロールの細胞への取り込みが低下し、血中 LDL 濃度が高くなることが報告されている。申請者は、上記のことや申請者の予備的実験を踏まえて、糖尿病における高血糖(高グルコース)は、エンドサイトーシス活性を低下させることによって、LDL のエンドサイトーシスを阻害し、高 LDL 血症をもたらすのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病における高グルコースによる高 LDL 血症発症のメカニズムを解明することと、食品成分による高 LDL 血症を改善法する方法について検討することである。

3. 研究の方法

- ・ A549 細胞は、DMEM 培地で培養した。
- ・ グルコース濃度の解析については、GLUP は同仁化学研究所から購入し、マニュアルを参考に測定した。グルコースの吸光度法による測定は、グルコース測定キットを同仁化学研究所から購入し測定した。培地におけるグルコース濃度の測定は、センサーチップによる方法で測定した。
- ・ ウェスタンブロット法は、特異的抗体を用いて一般的な方法に準じて行った。
- ・ 細胞数の計測は、セルカウンターを用いて計測した。
- ・ Rab5 の活性測定は GST-R5BD プルダウン法で行った。
- ・ Rab5 と EEA1 の細胞内局在性は、特異的抗体を用いて、免疫染色法を行い、蛍光顕微鏡で観察した。画像を ImageJ で解析し、ピアソン係数を算出した。
- ・ LDL コレステロールのエンドサイトーシスは、pHrode-Red-LDL をサーモフィッシャーサイエンティフィック社より購入し、マニュアルを参考にして、蛍光マイクロプレートリーダーで測定した。

4. 研究成果

・細胞内へのグルコースの取り込み測定

グルコースの細胞内への取り込み量を明らかにすることを目的として、グルコース蛍光測定試薬である GLUP を用いて、細胞内におけるグルコースを蛍光顕微鏡で観察した。その結果、当然ではあるが、正常グルコース濃度で培養した A549 細胞と比較して、高グルコース培養した A549 細胞では、細胞内におけるグルコース濃度が高いことが明らかとなった。また、細胞内におけるグルコース濃度を、吸光度法においても解析した。その結果、正常グルコース濃度で培養した A549 細胞と比較して、高グルコース培養した A549 細胞では、細胞内のグルコース濃度は高いことが、明らかとなり、GLUP を使用した蛍光顕微鏡観察の結果と傾向性が一致した。また、この吸光度法によるグルコース濃度測定を用いて、経時的に細胞内グルコース濃度を測定したところ、高グルコース培地で培養した A549 細胞では、細胞内グルコース濃度がしばらくの間は上昇し続け、その後、細胞内グルコース濃度が徐々に低下していた。一方、正常グルコース濃度で培養した A549 細胞は、若干の細胞内グルコース濃度の変化はあるものの、ほぼ一定であった。さらに、培養細胞培地中のグルコース濃度についても測定した。その結果、正常グルコース濃度と高グルコース濃度ともに、経時的に培地中のグルコース濃度が低下していた。興味深いことに、高グルコース培養に着目すると、培地中のグルコース濃度は徐々に低下し続けていたが、A549 細胞のグルコース濃度は徐々に上昇し、ピークを過ぎると徐々に低下している点で変化の仕方が異なっていた。

・グルコース濃度の違いによる MAPK シグナルや炎症、細胞増殖への影響

高グルコースによる炎症や細胞増殖などに関わる MAPK(JNK, p38, Erk)への影響を明らかに

する目的で、高グルコース濃度で A549 細胞を培養し、JNK, p38, Erk のリン酸化をウェスタンブロット法で解析した。その結果、p38 と Erk のリン酸化は顕著に上昇し、また、JNK のリン酸化は、若干ではあるものの上昇していた。次に、高グルコースによる炎症性サイトカインである IL-6 の発現と誘導型一酸化窒素 (iNOS) の発現量をウェスタンブロット法で解析した。その結果、正常グルコース濃度と比較して、高グルコース濃度で培養した A549 細胞では、IL-6 の発現と iNOS の発現が上昇していた。これらのことより、高グルコース培養した A549 細胞においては、炎症が惹起されているものと考えられた。炎症が惹起されると細胞増速が促進することが知られている。そこで、高グルコース培養における、A549 細胞の増殖について解析した。高グルコース培地で培養し、セルカウンターで A549 の細胞数を計測したところ、正常グルコース培養と比較して、高グルコース培養では、細胞数が多いことが明らかとなった。炎症は、高 LDL 血症のリスクを高めや動脈硬化を促進することより、高グルコースによる炎症惹起は、高 LDL 血症のリスクを上昇させ、動脈硬化症の原因となるものと考えられる。

・グルコース濃度の違いによるエンドサイトーシスへの影響

高グルコースによるエンドサイトーシスへの影響を明らかにするために、高グルコース培地で A549 細胞を培養し、GST-R5BD プルダウン法で Rab5 の活性を測定した。その結果、正常グルコース培養と比較して、高グルコース培養した A549 細胞では、Rab5 の活性が低下していた。次に、高グルコース培地で A549 細胞を培養し、Rab5 と初期エンドソームマーカーである EEA1 の細胞内局在性を蛍光顕微鏡で観察した。ImageJ によって、共局在の割合を表すピアソン係数を算出したところ、正常グルコース培養と比較して、高グルコース培養した A549 細胞では、Rab5 と EEA1 の共局在が有意に低下していた。さらに、高グルコースによる LDL コレステロールの細胞内への取り込み(エンドサイトーシス)を解析した。pHrode-Red-LDL を用いて、LDL コレステロールのエンドサイトーシスを測定したところ、正常グルコース培養と比較して、高グルコース培養した A549 細胞では、LDL コレステロールのエンドサイトーシスが低下していた。これらのことより、高グルコースは、エンドサイトーシス活性を低下させることによって、LDL が細胞外(血中)に蓄積し、高 LDL 血症を発症する可能性が示唆された。

・高 LDL 血症改善法の検討

上記の結果より、高グルコースは、エンドサイトーシス活性を低下させて、高 LDL 血症が発症する可能性が考えられた。そこで、Rab5 の活性を上昇させることができれば、高 LDL 血症を改善することができるものと考えた。さまざまな食品由来成分を培養細胞に添加し、GST-R5BD プルダウン法で、Rab5 の活性を測定した。その結果、特許などの取得の可能性があるので詳細は記載できないが、Rab5 の活性を上昇させる食品由来成分を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 萩原真	4. 巻 29
2. 論文標題 運動により血糖値を調節する新規の分子メカニズムの可能性	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 新潟の生活文化	6. 最初と最後の頁 23-25
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 萩原真	4. 巻 29
2. 論文標題 ADHD症状を引き起こす細胞内の分子メカニズム	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 新潟の生活文化	6. 最初と最後の頁 26-29
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Makoto Hagiwara	4. 巻 652
2. 論文標題 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting analyses via colored stacking gels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 114751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2022.114751	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 萩原真	4. 巻 162(3)
2. 論文標題 新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の感染とエンドサイトーシス/エキソサイトーシス	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学と生物学	6. 最初と最後の頁 i3_Rj01
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 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 秋原真	4. 巻 28
2. 論文標題 高糖質食が引き起こす高尿酸値血症と腎機能障害が水摂取によって改善される可能性: キイロショウジョウバエの研究より	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 新潟の生活文化	6. 最初と最後の頁 27-30
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 秋原真	4. 巻 28
2. 論文標題 過剰な食塩摂取がアルツハイマー型認知症のリスクを高める	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 新潟の生活文化	6. 最初と最後の頁 31-33
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 秋原真	4. 巻 28
2. 論文標題 認知症における「徘徊」の言い換えについて	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 新潟の生活文化	6. 最初と最後の頁 34-35
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 秋原真	4. 巻 13
2. 論文標題 コロナウイルスの感染機構と宿主細胞におけるレセプターの性質を利用した新型コロナウイルス治療薬	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 人間生活学研究	6. 最初と最後の頁 37-46
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 萩原真	4. 巻 28
2. 論文標題 食塩と認知症	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 食と医療	6. 最初と最後の頁 34-41
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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 萩原真、永野忠聖、松下健二
2. 発表標題 玄米に含まれるLPSによる免疫力活性化機構の解析
3. 学会等名 日本栄養食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 萩原真、永野忠聖、松下健二
2. 発表標題 玄米中に含まれるLPSによるファゴサイトーシス活性化機構の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 萩原真、永野忠聖、松下健二
2. 発表標題 グルコース濃度の違いが細胞に与える影響
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋原真
2. 発表標題 着色したスタッキングゲルによるSDS-PAGEとウェスタンブロットティング
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋原真
2. 発表標題 着色したスタッキングゲルによるSDS-PAGEとウェスタンブロットティング (サイエンスピッチ: ショートトーク)
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋原真、永野忠聖、松下健二
2. 発表標題 オルニチンによる免疫力活性化機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋原真、松下健二
2. 発表標題 高グルコースが細胞に及ぼす影響
3. 学会等名 日本栄養食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 萩原真、松下健二
2. 発表標題 グルコース濃度が細胞に及ぼす影響
3. 学会等名 トランスポーター研究会第1回関西西部会、第52回日本消化吸収学会総会合同学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 萩原真、永野 忠聖、松下健二
2. 発表標題 玄米中に含まれる成分の免疫力活性化機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Makoto Hagiwara, Hiroyuki Tada, Naoyuki Ishida, Kenji Matsushita
2. 発表標題 Nitric oxide activates phagocytosis by S-nitrosylation of Rab5.
3. 学会等名 ASCB-EMBO Meeting
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 萩原真、永野忠聖、松下健二
2. 発表標題 高グルコースによる細胞内シグナル伝達とエンドサイトーシスの変化
3. 学会等名 日本栄養食糧学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 萩原真、永野忠聖、松下健二
2. 発表標題 玄米に含まれる免疫力活性化成分LPSの作用機構の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 萩原真、永野忠聖、松下健二
2. 発表標題 オルニチンの免疫力活性化機構の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 萩原真、永野忠聖、松下健二
2. 発表標題 グルコースはエンドサイトーシスを変化させる
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 萩原真、永野忠聖、松下健二
2. 発表標題 玄米に含まれる免疫力活性化成分LPSの作用機構の解析
3. 学会等名 お米の未来を考えるシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋原真
2. 発表標題 低分子量Gタンパク質Rab5の解析－栄養素がエンドサイトーシスを調節する
3. 学会等名 Spring-GTP Workshop
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 秋原真他87名	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 530
3. 書名 タンパク質構造解析手法とIn silicoスクリーニングへの応用 担当 2章 高品質なタンパク質結晶の求め方 5節 ウェスタンブロット法によるタンパク質の検出 (印刷中)	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------