

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16195

研究課題名(和文) 膵島におけるO-GlcNAc修飾の生理学的役割の解明と新規糖尿病治療標的の探索

研究課題名(英文) Clarifying the physiological role of O-GlcNAcylation in pancreatic islets

研究代表者

井田 昌吾 (Ida, Shogo)

滋賀医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：90792028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白の翻訳後修飾は細胞機能を制御において重要な役割を果たしている。その一種であるO-GlcNAc修飾は糖尿病合併症と関係が深いことが知られているが、糖代謝の中心的役割を果たす膵島における役割は不明であった。我々は本修飾がインスリン分泌を行う膵細胞で欠損したマウスを用いて検討を行った。その結果、同修飾が欠損したマウスは最終的にERストレスや酸化ストレスといった種々のストレスにより障害を受けることが判明し、膵細胞の維持に重要な役割を果たしていることが示された。また、一過性のインスリン分泌の亢進が同マウスで認められたが、膵島のマイクロアレイ解析では種々の遺伝子が変化してい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

糖尿病は高血糖に起因した細胞内代謝障害に伴い生じる全身性疾患であり、近年、その患者数は世界中で急激に増加している。膵島はインスリンやグルカゴン分泌を介して糖代謝制御の中心的役割を担っており、その理解を深めることは糖尿病病態の理解および新規の糖尿病治療を探索するにあたり非常に重要である。本研究はO-GlcNAc修飾という蛋白の翻訳後修飾に着目し、膵島における同修飾の役割を明らかにすることで糖尿病の病態理解や治療に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Post-translational modifications play a critical role in regulating physiological cellular functions. One of the post-translational modifications, called O-GlcNAcylation, has been known that it is closely related to the pathogenesis of diabetic complication, however, the its role in pancreatic islets which has the central role in glucose metabolism is still unknown. Thus, we attempted to identify the role of O-GlcNAcylation in pancreatic beta cells using pancreatic beta cells-specific Ogt knock out mice (Ogt-bKO). In Ogt-bKO finally showed the beta cell destruction and insulin depletion due to various stresses such as ER stress and oxidative stress, suggesting O-GlcNAcylation is essential to maintain the homeostasis in pancreatic beta cells. Additionally, we found Ogt-bKO mice transiently increase insulin secretion, and cDNA microarray analysis revealed various gene alteration during that period.

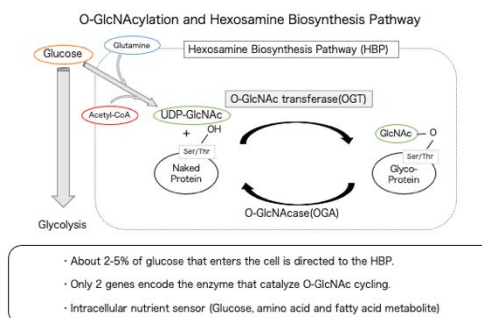
研究分野：糖尿病

キーワード：膵細胞 膵細胞 O-GlcNAc修飾 翻訳後修飾

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は高血糖に起因した細胞内代謝障害に伴い生じる全身性疾患であり、近年、その患者数は世界中で急激に増加している。糖尿病の病態はインスリン抵抗性の増大及びインスリン分泌の低下に起因する。さらにインスリン分泌の低下に関しては膵細胞量の低下、膵細胞機能不全の両者が関与し、糖尿病の診断以前の早期の段階から認められることが知られている。これらの点からもインスリン分泌を担う膵細胞を始めとした膵ラ氏島は全身の糖代謝制御の中心的役割を担っており、その理解を深めることは新規の糖尿病治療を探索するにあたり非常に重要であると言える。

一方、蛋白の翻訳後修飾は転写・翻訳と同様、細胞内外に存在する酵素や転写因子の制御に不可欠な過程であり、また細胞機能の多様性に寄与している。翻訳後修飾の異常は種々の疾患発症・進展の原因となる。糖尿病においてもリン酸化やユビキチン化などの翻訳後修飾を介した蛋白の機能異常はその病態形成に深く関与している。我々は細胞内糖鎖修飾の一つである O-GlcNAc 修飾という翻訳後修飾に着目した。O-GlcNAc 修飾は解糖系側副路の一つ



であるヘキソサミン生合成経路を介して最終的に産生される基質 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。ヘキソサミン生合成経路にはグルコース以外にもアミノ酸の一種であるグルタミンや脂肪酸代謝産物である Acetyl-CoA が関与していることから“細胞内栄養センサー”の役割を果たしていると考えられている。現在、O-GlcNAc 修飾の異常が、種々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、様々な組織で、O-GlcNAc 修飾が担う細胞機能の詳細な解明が待たれている。糖尿病領域においてはこの O-GlcNAc 修飾は糖尿病合併症の成因メカニズムとして着目されていたが、加えて近年、インスリン分泌や抵抗性にも関与していることが徐々に明らかになってきた。

我々は以前膵島における O-GlcNAc 修飾における生理学的役割を検討するため、タモキシフェン誘導性膵細胞特異的 OGT 欠損マウスを作成しその表現型を解析した。その結果、OGT 欠損誘導後早期においてはインスリン分泌の亢進とそれに伴う体重増加が認められた。しかしながら、徐々にインスリン分泌は枯渇し血糖の上昇とともに体重の減少を認め、全体として二相性の変化を認めた。詳細な検討を加えたところ、インスリン分泌亢進を認めた早期相では膵細胞の増殖能の亢進を伴う膵細胞量の増加が、インスリン分泌の枯渇を認めた後期相では膵細胞死の増加が認められた。また、糖尿病モデルラットを用いた検討で、インスリン分泌が枯渇する末期糖尿病状態において膵島の O-GlcNAc 修飾が減弱していることを明らかにした。これらの結果は膵島において O-GlcNAc 修飾が細胞の機能および恒常性維持に重要な役割を果たしていること、糖尿病の進展になんらかの関わりがある可能性を示唆するものであった。

## 2. 研究の目的

上記の研究結果を踏まえ、さらにそのメカニズムの詳細を検討すること目的とした。特に遺伝子・蛋白レベルでの変化を検討すること、さらに膵細胞特異的 OGT 欠損マウスの特徴として挙げられる二相性の表現型の変化に関して、独立した要因によって両表現型が起こっているのか、あるいは早期相の変化が後期相に影響を及ぼしているのかという点についても検討した。本研究の最終的な目標は、膵島における O-GlcNAc 修飾の生理学的、病態学的役割を解明することを介して糖尿病の病態解明ならびに新規治療標的の探索を行うことである。

さらに以前の我々の研究は膵島の中でも主に膵細胞に着目して研究を行っていたが、膵島にはグルカゴン分泌を介して血糖調整に重要な役割を果たす膵細胞も存在しており、我々の検討で膵細胞でも膵細胞同様 O-GlcNAc 修飾が認められていることを確認したため、膵細胞における O-GlcNAc 修飾の生理学的役割に関して本研究期間に合わせて検討することとした。

## 3. 研究の方法

- 膵細胞特異的 Ogt 欠損マウスを用いた膵細胞 O-GlcNAc 修飾の役割の解明  
膵細胞特異的 Cre 発現マウスと Ogt-flox マウスを交配させ、膵細胞特異的 Ogt 欠損マウスを作製し、膵細胞における O-GlcNAc 修飾の生理学的役割を解析した。主に膵細胞の主たる機能であるグルカゴン分泌および糖代謝に対する影響を評価する予定であった。
- 膵細胞特異的 Ogt 欠損マウスを用いた膵細胞 O-GlcNAc 修飾の役割の解明  
膵細胞特異的 Cre 発現マウスと Ogt-flox マウスを交配させることで作製した膵細胞特異的

Ogt 欠損マウスを用いて、上記で認められた表現型の解析をさらに進めた。特に単離膵島を用いて cDNA microarray を行い網羅的に変化している遺伝子を検索した、今回は特にインスリン分泌亢進している早期相の膵島を用いて行うこと検討を行った。一方、後期相に関しては、最終的に膵細胞がほぼ消失してしまうため、その直前、早期相と後期相の移行期の膵島を用いて遺伝子変化を評価した。さらに早期相と後期相の表現型の因果関係の有無を検討するため、ジアゾキサイドを用いて早期相のインスリン分泌を抑制し後期相の表現型に与える影響を評価した。また、高脂肪食摂取によるインスリン分泌亢進、インスリン抵抗性惹起が同マウスの表現型に与える影響についても評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### a) 膵細胞特異的 Ogt 欠損マウスを用いた膵細胞 O-GlcNAc 修飾の役割の解明

上記で記載した方法を用いて膵細胞特異的 Ogt 欠損マウスを作成した。まず初めに作製したマウスで O-GlcNAc 修飾が欠損しているかを評価し、一部 O-GlcNAc 修飾が欠損している膵細胞を認めたものの、多くの膵細胞では O-GlcNAc 修飾が残存しており十分にモデルとして機能しているとは言えない結果であった。そこでさらに Glucagon-Cre マウスと Td-tomato Cre reporter マウスを交配し膵細胞で Cre が十分に発現しているかを検討したところ、前述の結果と一致して多くの膵細胞で Cre が発現していないことが判明した。そこで現在は一旦、表現型の評価は行わず、別の膵細胞特異的 Cre 発現マウスを入手することを検討している。

##### b) 膵細胞特異的 Ogt 欠損マウスを用いた膵細胞 O-GlcNAc 修飾の役割の解明

まず初めに早期相において Control 群である Ogt-flox マウスと膵細胞特異的 Ogt 欠損マウスの膵島を単離し cDNA microarray を行った。その結果、Ogt 欠損マウスでは以前の検討ですでに判明していた Ins2 や Pdx1 遺伝子の上昇に加えて膵島に関連するものとして Ghrelin の遺伝子の発現が大きく上昇していた。一方で、Glucagon などの他の膵島構成細胞のマーカーに関しては変化を認めなかった。さらにインスリン分泌に必要な ATP 産生に重要であるミトコンドリア関連遺伝子なども変化を認めなかった。現在さらなる詳細に関して検討を進めているところである。

次に後期相の表現型の詳細を検討するために、早期相から後期相への移行期の膵島を単離し、遺伝子変化を上記の群間で RT-qPCR 法で比較したところ ER stress マーカー並びに酸化ストレスマーカーが膵細胞特異的 Ogt 欠損マウスで有意に上昇していた。この結果は、後期相において膵細胞量が減少しインスリン分泌が枯渇するという表現型を説明しうる結果であった。次に検討すべき課題としてはこれら種々のストレスによる膵細胞傷害がなぜ起こるかということ、さらには早期相のインスリン過分泌が後期相の表現型に影響を与えているのかということであった。そこで後者に関しては膵細胞の K-ATP チャネルを開口することでインスリン分泌を抑制する薬剤であるジアゾキサイドを用いてインスリン過分泌を抑制することで後期相の表現型を抑えることができるかを検討することとした。初期の検討では十分なインスリン分泌抑制を認めず評価が困難であったため、現在投与量などを含めて条件を検討しているところである。

さらに高脂肪食を投与することで、通常食摂取下で認められた早期相並びに後期相の表現型にどのような影響を与えるかについて検討を行った。その結果、通常食摂取下ではタモキシフェンによる Ogt 欠損誘導後 5 週ごろからインスリン分泌の亢進、血糖の低下が認められていたのに対し、高脂肪食摂取下では 4-5 週頃に同様の表現型が認められた。一方、後期相の表現型に関しても高脂肪食摂取下で通常食摂取下同様、インスリン分泌の枯渇、細胞死の亢進並びに血糖値の上昇が認められ、その時期は通常食摂取下と比較してわずかながら早期から起こっていた。しかしながら、これらの差異が有意であるかどうかの検討までは本実験では十分行うことができなかつたため、再度マウスの数を増やして追加の検討を行う予定である。

以上の結果から、本期間の研究で膵細胞特異的 Ogt 欠損マウスの表現型、さらにはその表現型を引き起こしたメカニズムについてより深く解析することができた。一方で、早期相の表現型のさらなる詳細、早期相と後期相の関連性に関してはまだまだ明らかにすべきことが残っている。今後それらの点を重点的に検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shogo Ida, Katsutaro Morino, Osamu Sekine, Natsuko Ohashi, Shinji Kume, Kanako Iwasaki, Norio Harada, Nobuya Inagaki, Satoshi Ugi and Hiroshi Maegawa |
| 2. 発表標題<br>Global and pancreatic beta cell-specific Ogt deletion revealed multiple effects of O-GlcNAcylation in glucose metabolism.                             |
| 3. 学会等名<br>Asia islet and incretin symposium (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|