

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16230

研究課題名（和文）膵細胞のCh25h発現低下による劇症1型糖尿病発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Resolution of Ch25h mechanism at pancreatic beta cells in fulminant type 1 diabetes

研究代表者

細川 吉弥（Hosokawa, Yoshiya）

大阪大学・医学部附属病院・特任助教（常勤）

研究者番号：10814569

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：劇症1型糖尿病患者由来iPS細胞から分化誘導して得られたインスリン陽性細胞を含む細胞においてサイトカイン刺激にて上昇したCaspase3活性が25HCを投与することで有意に低下することを、また免疫染色において劇症1型糖尿病患者iPS細胞由来インスリン陽性細胞に占める活性型Caspase3陽性細胞の割合は25HCを投与した場合には有意に低下することを見出した。また血中25HC濃度をGC-MS/MSを用いて測定することに成功し、微量血液サンプルでの25HC濃度測定系の樹立の目途を立てることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により劇症1型糖尿病における膵細胞のアポトーシスにch25hが関与していることが示唆され、他の1型糖尿病をふくめ膵細胞傷害を抑制することでの糖尿病治療薬への応用が考えられる。また血中25HC測定系の樹立は劇症1型糖尿病の新規バイオマーカーとなりうる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：The caspase-3 activity was significantly lower in both 25HC and cytokine treatment pancreatic cells included INSULIN positive cells induced from fulminant type 1 diabetes iPSCs than in only cytokine treatment. The proportion of cleaved caspase-3-positive cells among the induced INSULIN-positive cells was significantly lower in both 25HC and cytokine treatment fulminant type 1 diabetes iPSCs than in only cytokine treatment. Plasma 25HC levels could be detected by GC-MS/MS and the measurement system of plasma 25HC levels from minutes amounts of blood sample could be in sight.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：MIN6 iPS細胞 25HC ch25h

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

劇症 1 型糖尿病は本邦で最初に報告された 1 型糖尿病のひとつの疾患単位であり (Imagawa A, et al. N Engl J Med 2000) 日本人の急性発症 1 型糖尿病の約 20% が分類される主要なサブタイプである。その病態は急速に進行する 細胞破壊にともなうインスリンの完全な枯渇を特徴とし、診断の遅れは患者の死亡に繋がることからその正確な病態解明が急務であるが、特異的なバイオマーカーは存在しない (Imagawa A, et al. Diabetes Care 2003)。この 細胞破壊は非常に急速で徹底的であるため、生検や剖検組織を用いて劇症 1 型糖尿病の際に 細胞に生じる病態メカニズムを検討することは困難である。そのため私どもは劇症 1 型糖尿病患者の繊維芽細胞から iPS 細胞 (劇症 1 型糖尿病 iPS 細胞) を作成、そこから 細胞を分化誘導し、細胞機能について解析する系を確立した (Hosokawa Y, et al. J Diabetes Investig 2018)。この系を用いて 細胞自身の脆弱性を検討したところ、劇症 1 型糖尿病 iPS 細胞から誘導した 細胞はサイトカイン刺激後のアポトーシスが亢進していた。メカニズム解明のためサイトカイン刺激後の遺伝子発現の網羅的解析を行い、遺伝子発現変化の著明な分子の上位リストアップにおいて、アポトーシスや免疫関連因子に加えて *CH25H (Cholesterol 25-Hydroxylase)* が見いだされた。CH25H は Cholesterol から 25HC (25Hydroxycholesterol) を産生する酵素であるが、免疫系細胞においてウイルス感染性や感染後の細胞内ウイルス増殖の変化が一部報告されている以外、膵 細胞における機能については全く不明である。

2. 研究の目的

今回の研究により、膵 細胞における CH25H の細胞脆弱性への関与、抗アポトーシス効果を明らかにするとともに、血中 25HC 濃度測定系の樹立による劇症 1 型糖尿病の新規バイオマーカー確立を目指す。

3. 研究の方法

劇症 1 型糖尿病患者由来 iPS 細胞からインスリン陽性細胞へ分化誘導し、サイトカインや poly(I;C) の単独投与およびそれらと 25HC 両者の投与による Caspase3 活性および免疫染色での活性型 Caspase3 陽性細胞率を評価する。さらに、GC-MS/MS を用いて微量な血液からの血中 25HC 測定系を樹立する。

4. 研究成果

2018 年度では劇症 1 型糖尿病患者由来 iPS 細胞 3 クローンから分化誘導して得られたインスリン陽性細胞を含む細胞においてサイトカイン刺激にて上昇した Caspase3 活性が 25HC を投与することで有意に低下することを、また免疫染色において劇症 1 型糖尿病患者 iPS 細胞由来インスリン陽性細胞に占める活性型 Caspase3 陽性細胞の割合は 25HC を投与した場合には投与しない場合に比し有意に低下することを見出した。このことから劇症 1 型糖尿病患者 iPS 細胞由来インスリン陽性細胞における 25HC の抗アポトーシス効果を見出した。2019 年度にはよりウイルス感染を模倣する系として劇症 1 型糖尿病患者 iPS 細胞由来インスリン陽性細胞に poly(I;C) をトランスフェクションし 25HC の抗アポトーシス効果を検討した。種々の濃度の poly(I;C) や 25HC で検討を行ったが、poly(I;C) による Caspase3 活性の有意な低下作用は認めなかった。

また大阪大学工学部と共同で、血中 25HC 濃度測定系の樹立をすすめた。2018 年度には市販健常人血漿中の 25HC 濃度を GC-MS/MS を用いて測定することに成功した。2019 年

度にはサンプル間の内部標準のばらつきを軽減することができ、また微量な血液量での測定系の検証をすすめた結果、微量血液サンプルでの 25HC 濃度測定に一定の目途を立てることができた。

今回の研究により劇症 1 型糖尿病における膵 細胞のアポトーシスに ch25h が関与していることが示唆され、他の 1 型糖尿病をふくめ膵 細胞傷害を抑制することでの糖尿病治療薬への応用が考えられる。また血中 25HC 測定系の樹立は劇症 1 型糖尿病の新規バイオマーカーとなりうる可能性が考えられる。

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