

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16231

研究課題名（和文）糖尿病下膵 細胞機能回復のための標的因子の探求

研究課題名（英文）Identification and analysis of target factors for amelioration of pancreatic beta-cell function under diabetic conditions

研究代表者

下 直樹（Shimo, Naoki）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10814064

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）：2型糖尿病患者の血糖管理は経過とともに悪化することがよく経験され、その背景には慢性的な高血糖がインスリン分泌細胞である膵細胞の機能障害をもたらすという「高血糖毒性」が関与している。我々は、高血糖毒性の有無により発現が変動する「高血糖毒性感受性遺伝子」は膵細胞機能において重要な役割を果たすと考え、新規因子を探索し、Tmem163およびCox6a2を同定した。そしてそれぞれ、インスリン分泌顆粒の成熟および、酸化反応によりもたらされる生体への有害作用である酸化ストレスを介して、膵細胞機能に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病患者は増加の一途をたどるが、疾患の経過において認められる、膵細胞機能低下およびそれに伴う血糖管理増悪をもたらす「高血糖毒性」のメカニズムは、これまで明らかにされていない。本研究により新規同定されたTmem163およびCox6a2は、膵細胞が正常に機能する上で重要な役割を果たすことが示唆されており、特に2型糖尿病発症の初期段階に関与することが想定されている。膵細胞機能低下を防ぐためには糖尿病初期からの治療が重要であることから、上記因子に関する解析は、新たな糖尿病治療法の開発に資することが期待される。

研究成果の概要（英文）： We frequently experience the gradual deterioration of blood glucose control in patients with type 2 diabetes, and glucose toxicity, which represents the dysfunction of pancreatic β -cells caused by chronic hyperglycemia, is involved in the pathophysiology. We hypothesized that glucose toxicity-sensitive genes, whose expressions were readily influenced by chronic hyperglycemia, played important roles in β -cell functions, and identified two novel factors, Tmem163 and Cox6a2. Our data suggest these factors contribute to β -cell functions through the maturation of insulin secretory granules and oxidative stress, respectively.

研究分野：膵細胞

キーワード：膵細胞 高血糖毒性 2型糖尿病 インスリン分泌顆粒 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

日常臨床において、2 型糖尿病患者の血糖管理は経過とともに悪化することがよく経験され、その背景には膵 β 細胞機能 (インスリンの生合成および分泌) の進行性の低下が関与している。その機序の 1 つとして、慢性的な高グルコース状態が膵 β 細胞機能障害を引き起こすことが明らかにされており、膵 β 細胞に対する高血糖毒性として認識されている。しかしながら肥満を有する 2 型糖尿病患者において、生体内で高血糖そのものが、どのような形で膵 β 細胞機能に影響を及ぼしているのかは明らかではない。一方、高血糖毒性とは反対に、2 型糖尿病患者の治療経過において膵 β 細胞機能が改善することも多く経験されるが、その分子機序も未解明である。

高血糖毒性に対する感受性が高い、すなわち高血糖毒性の有無で発現変動を示す因子は、膵 β 細胞機能において重要な役割を有することが想定される。このような遺伝子を新規同定することは、糖尿病の病態解明のみならず、新たな糖尿病治療法の開発および糖尿病患者増加の抑制にも資することが期待される。

2. 研究の目的

高血糖毒性に対する感受性が高く、膵 β 細胞機能において重要な役割を果たす新規因子を同定し解析する。

3. 研究の方法

(1) 高血糖毒性感受性遺伝子の新規同定

我々はこれまでに、過食 2 型糖尿病モデルの *db/db* マウスに対し、SGLT2 阻害薬を 1 週間投与することで、高血糖毒性を選択的に短期間軽減し得ることを報告している (Shimo N, et al. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2015)。本系を用いて、治療群と非治療群の 2 群からそれぞれ膵ランゲルハンス島 (以下膵島) mRNA を抽出し、マイクロアレイ解析にて 2 群間の遺伝子発現を網羅的に比較した。

(2) *Tmem163* の膵 β 細胞における役割の解析

Tmem163 の膵における発現の局在を、免疫組織化学および免疫電子顕微鏡にて検討した。生体内における *Tmem163* の役割を検討するため、Mouse Insulin Promoter (MIP) 下に Tamoxifen 誘導性の Cre recombinase (CreERT) を発現する MIP-CreERT マウスと、*Tmem163* flox マウスを交配することで、膵 β 細胞特異的 *Tmem163* ノックアウトマウス (*MIP-CreERT; Tmem163^{flox/flox}*、以下 β *Tmem163KO*) を作出した。対照群 (*MIP-CreERT; Tmem163^{+/+}*、以下 control) および β *Tmem163KO* について、随時体重・随時血糖、経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) により耐糖能およびインスリン分泌能を評価した。 β *Tmem163KO* における膵 β 細胞の性質に関し、形態を電子顕微鏡により解析するとともに、成熟性を抗プロインスリン抗体を用いた免疫組織化学により評価した。

(3) *Cox6a2* の膵 β 細胞における役割の解析

Cox6a2 の膵 β 細胞における機能を *in vitro* で解析するため、膵 β 細胞株の MIN6 細胞に対しアデノウイルスベクターを用いた RNAi による *Cox6a2* ノックダウンを行い、酸化ストレスレベルを対照群と比較した。生体内における *Cox6a2* の役割を検討するため、全身性 *Cox6a2* ノックアウトマウス (以下 *Cox6a2KO*) を作出した。野生型マウス (以下 WT) および *Cox6a2KO* について、腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT) により耐糖能を評価した。

4. 研究成果

(1) 高血糖毒性感受性遺伝子の新規同定

microarray 解析の結果、33,779 の有効 probe のうち、非治療群に比べ治療群で 2 倍以上の有意な発現改善を示す 81 因子が同定され、それらの中には膵 β 細胞のグルコース応答性インスリン分泌 (Glucose-Stimulated Insulin Secretion) や細胞増殖に関わる因子が多数含まれており、血糖管理との関連が推測されるという点から、解析結果の信頼性は高いと考えられた。さらに、膵 β 細胞機能での役割は未知であるが、a) GWAS において 2 型糖尿病疾患感受性遺伝子として報告 (Tabassum R, et al. *Diabetes*, 2013) されている *Tmem163*、b) ミトコンドリア呼吸鎖複合体 (以下 COX) の subunit であり、骨格筋ではその発現抑制により活性酸素の増大が報告 (Quintens R, et al. *PLoS One*, 2013) されている *Cox6a2*、が含まれていた。これらの既報より膵 β 細胞機能における重要な役割が強く推察され、これら因子に注目し解析を進めることとした。

(2) *Tmem163* の膵 β 細胞における役割の解析

Tmem163 の膵島における発現の局在を免疫組織化学に検討したところ、インスリンとは強く共染する一方、グルカゴンとは明らかな共染は認めず (図 1) β 細胞に高い特異性を有すること

が明らかになった。さらに、膵β細胞内における Tmem163 の局在を検討するため、DAB による免疫染色を行った膵切片を電子顕微鏡で解析した結果、抗 Tmem163 抗体染色切片ではインスリン顆粒周囲の膜が黒く線状に描出されたことから (図 2)、本因子はインスリン顆粒膜に局在していることが明らかになった。

次に、生体内における Tmem163 の役割を検討するため、control および βTmem163KO の解析を行った。随時体重は 2 群間で明らかな差を認めない一方、随時血糖は control に比べ βTmem163KO で有意な低下を認めた (図 3)。さらに、OGTT により耐糖能およびインスリン分泌能を検討したところ、control に比べ βTmem163KO において、血糖値およびその AUC は有意な低値を示し、血漿インスリン値は有意な高値を示した (図 4)。以上より、Tmem163 の発現量減少は、インスリン分泌増大を介して血糖上昇抑制をもたらすことが示された。

続いて、βTmem163KO における膵β細胞の性質に関し、電子顕微鏡によりその形態を解析したところ、control に比べ βTmem163KO では、dense core の濃度低下および halo の消失を伴うインスリン分泌顆粒が多数認められ (図 5)、Tmem163 の発現量減少により、未熟なインスリン顆粒が増加することが明らかになった。そこで、インスリンの前駆体であるプロインスリンの発現について免疫組織化学にて検討したところ、control では核周囲に凝集して存在するのに対し、βTmem163KO では細胞質全体に強く染色されたことから (図 6)、Tmem163 の発現量減少はプロインスリンの分布変化をもたらすことが確認された。

以上より、高血糖毒性感受性因子の Tmem163 は成熟インスリン分泌顆粒の形成に必須の因子であり、膵β細胞機能に密接に関わることが示唆された。

図 1

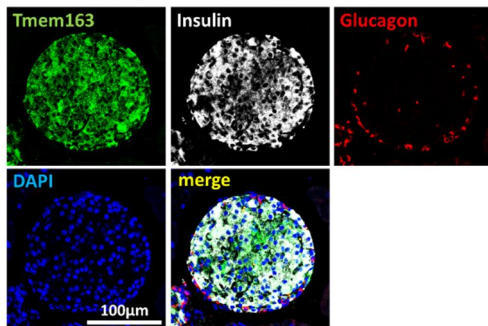


図 2

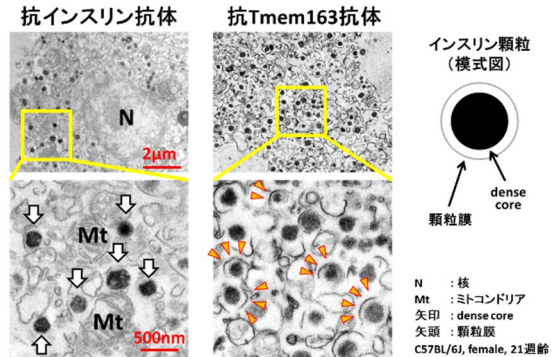


図 3

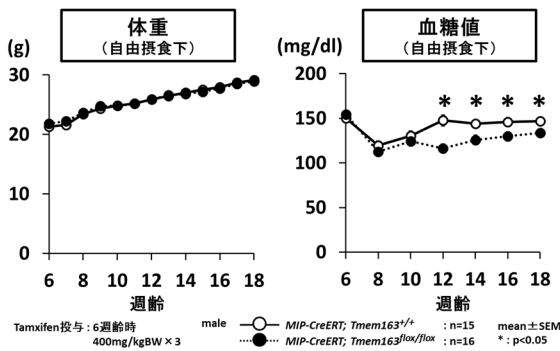


図 4

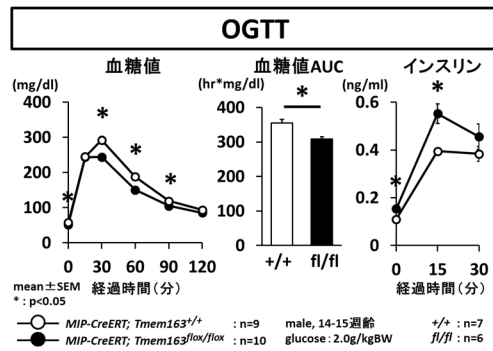


図 5

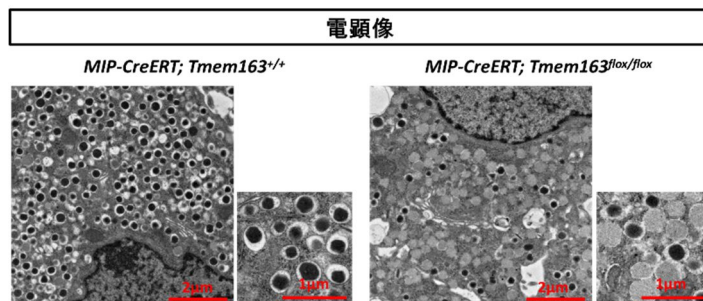
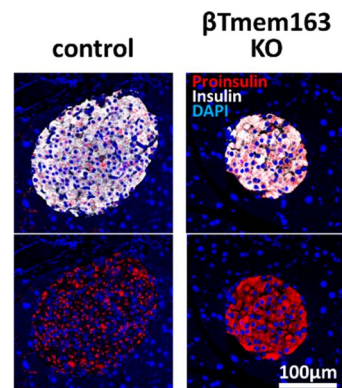


図 6



(3) Cox6a2 の膵β細胞における役割の解析

microarray 解析において、COX の subunit の中で、非治療群に比べ治療群で有意に高発現を示したのは Cox6a2 のみであり、膵β細胞内における高血糖への感受性の高さが推察された。

Cox6a2 の膵β細胞における機能を in vitro で解析するため、MIN6 細胞を用いたノックダウン実験を行ったところ、対照群に比べノックダウン群では、酸化ストレスの増大が認められた(図7)。

次に、生体内における Cox6a2 の役割を検討するため、IPGTT により耐糖能を評価したところ、通常餌下では WT と Cox6a2KO の間に差を認めなかったが(データ非提示)、高脂肪高シヨ糖餌負荷下では WT に比べ Cox6a2KO は有意な血糖上昇を示した(図8)。

以上の結果より、高血糖毒性感受性因子の Cox6a2 は、膵β細胞の酸化ストレス制御を介して膵β細胞機能維持に関与していることが示唆された。

これらの結果について、論文報告を行った(Nagai Y, Matsuoka T, Shimo N, et al. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2021)。

図7

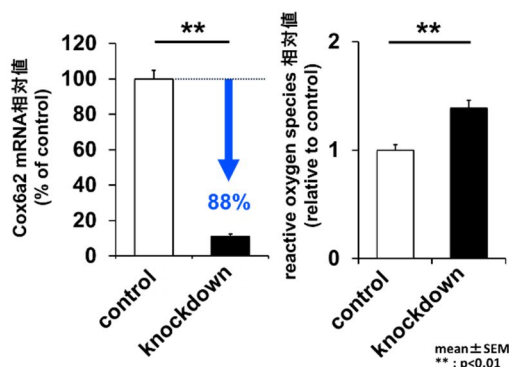
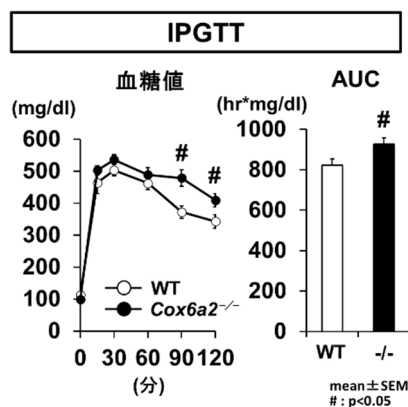


図8



本研究を通じて、糖尿病病態における膵β細胞機能障害に密接に関わることが示唆される新規2因子を同定し、それらの膵β細胞における役割の一端を解明するに至った。特に、SGLT2阻害薬を用いた短期的かつ選択的な高血糖毒性軽減という手法を用いた報告はこれまでになく、本手法を用いることで、高血糖毒性感受性遺伝子を網羅的かつ効率的に同定することが可能となった。さらにそれらの因子は、2型糖尿病の経過において初期の病態形成に強く関与することが推察されることから、糖尿病の早期治療における標的となり得るとも考えられた。

今後、Tmem163については、インスリン分泌顆粒成熟に関わるメカニズムを中心に解析を進めていく予定である。またCox6a2については、膵β細胞特異的ノックアウトマウスを作成しており、膵β細胞機能における役割と酸化ストレスとの関連性を、より詳細に解析していく方針としている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagai Yasuki, Matsuoka Taka-aki, Shimo Naoki, Miyatsuka Takeshi, Miyazaki Satsuki, Tashiro Fumi, Miyazaki Jun-ichi, Katakami Naoto, Shimomura Iichiro	4. 巻 556
2. 論文標題 Glucotoxicity-induced suppression of Cox6a2 expression provokes β -cell dysfunction via augmented ROS production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 134 ~ 141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.03.148	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 下 直樹、松岡 孝昭	4. 巻 63
2. 論文標題 1. 高血糖毒性による膵 細胞障害の分子メカニズム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 糖尿病	6. 最初と最後の頁 590 ~ 593
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11213/tonyoby.63.590	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 下 直樹
2. 発表標題 膵 細胞高血糖毒性感受性遺伝子Tmem163の解析
3. 学会等名 第63回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永井 泰紀
2. 発表標題 活性酸素増大に関する膵 細胞因子Cox6a2の解析
3. 学会等名 第63回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下 直樹
2. 発表標題 膵 細胞高血糖毒性感受性遺伝子の新規同定と解析
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 永井 泰紀
2. 発表標題 活性酸素増大に関する膵 細胞新規因子の解析
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 下 直樹
2. 発表標題 膵 細胞高血糖毒性感受性遺伝子の新規同定と解析
3. 学会等名 第91回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoki Shimo
2. 発表標題 Identification and Analysis of a Novel Glucose Toxicity-sensitive Gene in Pancreatic β -Cell
3. 学会等名 American Diabetes Association 78th Scientific Sessions (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	松岡 孝昭 (Matsuoka Takaaki)		
研究協力者	宮塚 健 (Miyatsuka Takeshi)		
研究協力者	小山 佳久 (Koyama Yoshihisa)		
研究協力者	島田 昌一 (Shimada Shoichi)		
研究協力者	下村 伊一郎 (Shimomura Iichiro)		

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