

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19522

研究課題名(和文) アミリンオリゴマー制御による糖尿病、糖尿病性心筋症・認知症の画期的予防治療薬開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapeutics targeting amylin oligomers for diabetes mellitus

研究代表者

松原 悦朗 (Matsubara, Etsuro)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：70219468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病は、インスリンと一体化した挙動をとる膵臓ホルモンであるIAPP(アミリン)オリゴマーにより細胞変性・細胞死が引き起こされることに起因するコンフォメーション病でアルツハイマー病と共通の発症基盤を有していると考えられる。本研究ではこの立体構造依存的A_βオリゴマー特異的抗体(72D9-6H4)による、2型糖尿病アミリンオリゴマー仮説を検証した。72D9-6H4抗体はA_βオリゴマーを認識し、両オリゴマーによる培養膵島細胞変性を抑制することから、コンフォメーション病に共通した治療法開発に光が見えた。今後、前臨床試験でのこうした新規治療法の整合性確立が求められる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、アルツハイマー病と糖尿病発症の鍵となるオリゴマー分子に共通して存在する立体構造異常を認識する申請者のみが所有する独創的ツールを用いて、これまで糖尿病研究領域では何故か浸透せず、その整合性が未検証であった“2型糖尿病がADと共通の発症基盤を有する「コンフォメーション病」であることを検証する中で、糖尿病の根本的治療薬の開発を目指した研究である。

研究成果の概要(英文)：Islet amyloid polypeptide (amylin) plays a central role in type 2 diabetes (T2D) pathogenesis, and is implicated in a degeneration or death of pancreatic β cells, which share a common molecular basis of a synaptic failure with Alzheimer's disease. We investigated the pathological relevance of the “amylin oligomer cascade hypothesis” in T2D by means of conformational anti-A_β oligomer antibody. Dot-immunoblot analysis employing 72D9-6H4 revealed its immunoreactivity with amylin oligomers alone. The Live/Dead assay using trypan-blue of pancreatic β cells after 24-h-exposure to amylin oligomers and A_β oligomers revealed significant neuronal death, whereas the 72D-6H4 antibody nearly completely blocked both toxicity, indicating that T2D and Alzheimer's disease represents conformational disorder, in which we can share the conformational antibody as a disease modifying candidate.

研究分野：神経内科学

キーワード：糖尿病 アミリン オリゴマー コンフォメーション病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は、インスリンと一体化した挙動をとる膵臓ホルモンである IAPP(アミリン)が、インスリン抵抗性の環境下では膵ランゲルハンス島細胞から分泌が亢進する過程で、生理的分子から病的な立体構造変化を経て形成されたアミリンオリゴマーにより細胞変性・細胞死が引き起こされることに起因するコンフォメーション病に属すると考えられるが、糖尿病研究領域ではこの疾患概念は浸透しておらず、その整合性は依然として未検証のままである。最近注目されている糖尿病性認知症や糖尿病性心筋症もこうした発症分子基盤を有すると考えられるが、その分子病態は明らかでない。

2. 研究の目的

コンフォメーション病の代表疾患であるアルツハイマー病(AD)の発症病態解明に基づいた根本的疾患修飾薬開発の実績(欧州/日本で第I相臨床試験実施中)をII型糖尿病へと応用して発展的に展開し、II型糖尿病が異常な立体構造をとり細胞内外に蓄積するオリゴマー化したIAPP(アミリン)蛋白が細胞変性の原因となる「コンフォメーション病」であるとの疾患概念の整合性を検証する。本研究では、これまで生理的なアミリンモノマー分子認識を回避したオリゴマー選択的な解析が不可能であったため、あくまで推測の域に留まっていたアミリンオリゴマーカスケード仮説(アミリンオリゴマーが起点となり、膵細胞変性・細胞死を誘導し、II型糖尿病やその合併症である認知症や心筋症の病態発症に至る)を培養実験とモデル動物実験を中心に検証し、「コンフォメーション病」の普遍的な創薬を実現する。

3. 研究の方法

申請者が開発したA 3-merと5-merに共通のコンフォメーションを特異的に認識する抗体であるAオリゴマー特異的抗体(72D9-6H4クローン)と細胞内移行作用を有するそのマイクロ抗体により、培養細胞でアミリンオリゴマー仮説を検証し、糖尿病モデルマウスでその発症予防効果を検証し、申請者等の抗体が「コンフォメーション病」の普遍的な創薬に貢献できるかを明らかとする。

4. 研究成果

(1) ドットプロット解析:

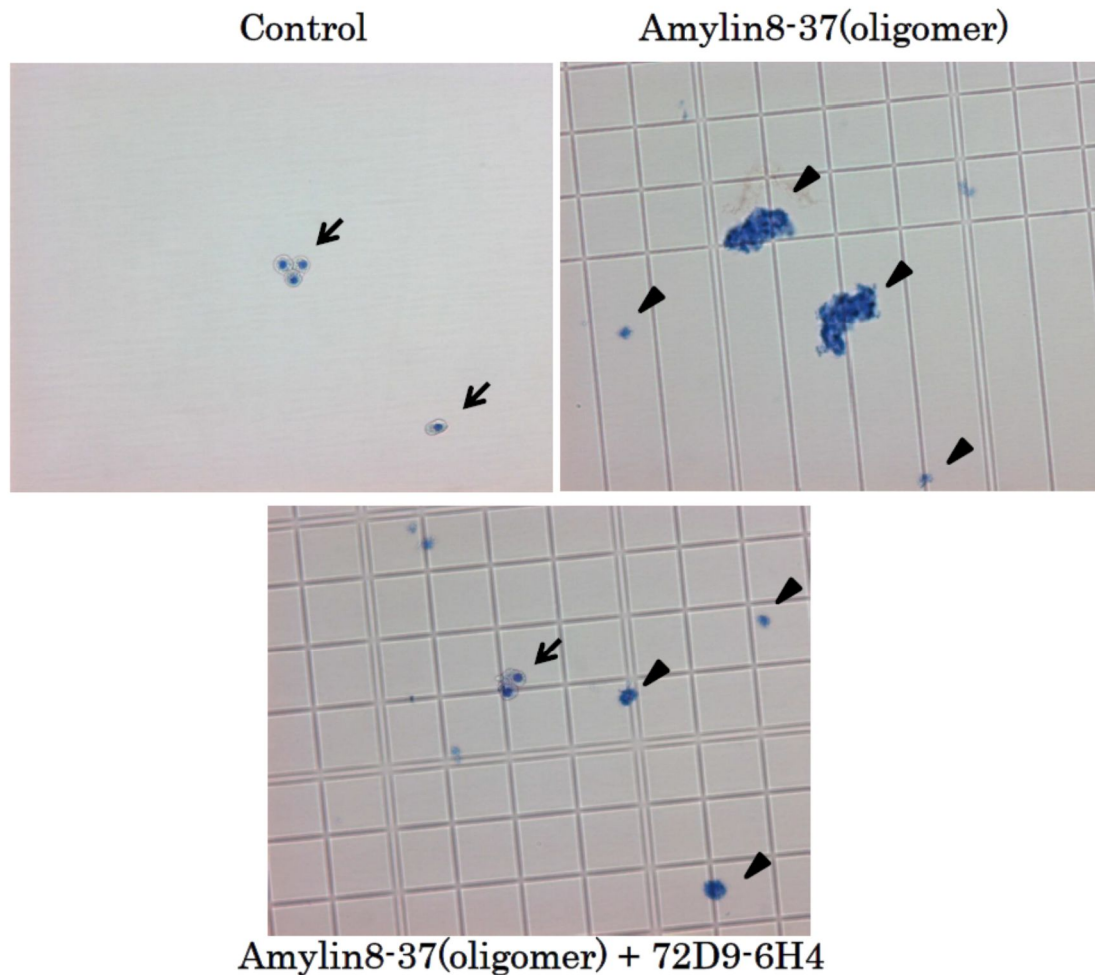
Amylin 1-18ペプチドとAmylin 8-37ペプチドからアミリンモノマーとアミリンオリゴマーを固相化し非特異結合部位をブロッキング後、Aオリゴマー特異的抗体(72D9-6H4クローン)はモノマーに反応せず、オリゴマーのみを検出することが明らかとなり、アミリンオリゴマーはAオリゴマーと共通する立体構造を有することが明らかとなった。

(2) アミリンオリゴマーによる培養膵島膵ベータ細胞変性・細胞死機構検証:

アミリンオリゴマーとAオリゴマーを培養膵島膵ベータ細胞に添加後、細胞毒性をLDHアッセイで検証したところ、両者とも神経毒性証明には至らなかった。この現象はAオリゴマー添加時の培養神経細胞でもしばしば経験される事象であったため、細胞膜ポア形成によるLDH逸脱には至っていないこと、それ以前の神経変性が惹起されているのではないかと想定し、同条件でトリパンブルー染色を試みた。

アミリンの1-18部分のペプチドとアミリンの8-37部分からなるペプチドが形成するオリゴマー

ーでは染色像が異なり、後方で細胞染色像と凝集像が目立ち、細胞変性作用が強いことが明らかとなった。さらに、この細胞毒性はAオリゴマー特異的抗体(72D9-6H4クローン)の同時添加で抑制されることが明らかとなった(下図)。興味深いことにAオリゴマー添加でもアミリンの8-37部分添加と同等の細胞変性が観察され、この細胞変性はAオリゴマー特異的抗体(72D9-6H4クローン)の同時添加で見事に抑制された。この結果は、アミリンオリゴマーではAオリゴマーと共通した細胞毒性発現機序が存在することを明らかとなった。



細胞内移行効果を有するマイクロ抗体ではアミリン毒性中和効果が確認できておらず、同じ毒性発現機構が想定されにもかかわらず、その作用発現に乖離がでる原因究明に至らなかった。今後の課題である。

(3) 前臨床試験：

本研究でアミリン毒性中和機構を有するマイクロ抗体が取得できなかったため、検証に至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Inoue M, Hada K, Shiraishi H, Yatsuka H, Fujinami H, Morisaki I, Nishida Y, Matsubara E, Ishitani T, Hanada R, Matsumoto M, Penninger JM, Ihara K, Hanada T.	4. 巻 525
2. 論文標題 Tyrosine pre-transfer RNA fragments are linked to p53-dependent neuronal cell death via PKM2.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 726-732
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.157.	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 松原悦朗	4. 巻 91
2. 論文標題 A オリゴマーをターゲットとした治療法の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 470-475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） ISSN:2434-3235	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松原悦朗
2. 発表標題 アルツハイマー病の新規診断・治療法開発と発症予防に向けた取り組み
3. 学会等名 日本内科学会北海道支部主催 第61回生涯教育講演会（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----