

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07345

研究課題名(和文) 肝臓由来のタンパク質を介した臓器間クロストークに基づく新しい血糖調節機構の解明

研究課題名(英文) Novel mechanism of blood glucose regulation based on inter-organ crosstalk mediated by liver-derived proteins.

研究代表者

合田 亘人 (GODA, NOBUHITO)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：00245549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：日本人は軽度の肥満であっても2型糖尿病を発症しやすく、これは慢性高血糖に対する代償機構が十分に働かないことに一因がある。本研究では、この代償機構にかかわる肝臓由来の分泌因子ニューレグリン1の受容体を新たに同定することに成功し、その受容体のErbB遺伝子欠損により2型糖尿病が増悪することを明らかにした。また、肝臓におけるニューレグリン1の切断・分泌機構の一端を解明した。以上の結果より、ニューレグリン1とその受容体が2型糖尿病に対する新しい治療標的になりうるということが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生体内のエネルギー代謝制御における肝臓の内分泌器官としての新しい役割を明らかにしただけでなく、さまざまな組織由来の多様な生理活性を示す分泌タンパク質を介した臓器間相互作用を基盤とする代謝制御機構の理解を深める点においても、この分野を大きく発展させるものと考えている。また、本研究は、既存の薬物療法では未だ十分にコントロールできないヒト2型糖尿病に対し、ニューレグリン1とその受容体を標的とした新しい治療法への開発に繋がるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：Type 2 diabetes is prone to develop in Japanese even if they are mildly obese, partly because the compensatory mechanism for chronic hyperglycemia does not work sufficiently. In this study, we have succeeded in identifying the receptor of the liver-derived secreted factor, neuregulin 1, responsible for this compensatory mechanism, and demonstrated that loss of the ErbB receptor in the target organ aggravates type 2 diabetes. We also have elucidated one aspect of the cleavage and secretion mechanism of neuregulin 1 in the liver. These results indicate that neuregulin 1 and its receptor may be a new therapeutic target for type 2 diabetes.

研究分野：分子病態医化学

キーワード：肝臓 分泌因子 糖尿病

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人は軽度の肥満であっても 2 型糖尿病を発症しやすく、これは膵ラ氏島の代償性過形成が起きづらいことに一因がある。2 型糖尿病に対する既存の薬剤は、末梢組織におけるインスリン抵抗性の改善あるいは残存する膵β細胞からのインスリン分泌増強に作用点を持つものが主流である。しかしながら、これらの治療薬だけでは良好な血糖値のコントロールは現状難しく、より厳密な血糖コントロールの実現のためには、正常なインスリン分泌能を持った膵β細胞数を増やすことができる新たな治療薬の開発が必要である。

セレノプロテイン P や FGF21 の発見以降、肝臓が微量で生理活性を示すさまざまなタンパク質(ヘパトカイン)を分泌することで、血糖値の調節に重要な役割を果たしていることが次々と明らかになってきた。このような背景の中、我々は 2 型糖尿病を発症したマウスで発現誘導される新規ヘパトカインとしてニューレグリン 1 を同定した。また、正常マウスの肝臓でニューレグリン 1 遺伝子を発現させると膵ラ氏島の肥大を伴ったインスリン分泌能の増強により血糖値を低下させることを見いだした。さらに、2 型糖尿病を発症した肝臓特異的ニューレグリン 1 遺伝子欠損マウスでは膵ラ氏島の代償性過形成が減弱し、その結果、インスリン分泌が抑制され血糖値がさらに上昇することを示す結果を得た。これらの結果は、2 型糖尿病において、肝臓由来のニューレグリン 1 が膵島に対してホルモン様に作用し、持続する高血糖に応答した膵ラ氏島の代償性過形成にかかわるヘパトカインであることを強く示唆している。しかしながら、なぜ 2 型糖尿病でニューレグリン 1 の作用が増強するのか、また膵ラ氏島においてニューレグリン 1 の機能がどうやって発揮されているのかはよく分かっていなかった。そこで、これらの課題を解決し、ニューレグリン 1 を介した臓器間クロストークに基づく新しい血糖値の調節機構の理解を深め、既存の治療薬とは異なる薬理作用点を持つ 2 型糖尿病の新規治療法の開発へと繋がる研究基盤を構築することが必要だと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、我々が新規ヘパトカインとして同定したニューレグリン 1 の膵β細胞における受容体とその下流の細胞増殖シグナル伝達機構を明らかにすることを目的とする。また、2 型糖尿病の肝臓におけるニューレグリン 1 遺伝子の発現調節機構とニューレグリン 1 タンパク質の細胞外ドメインの切断・分泌にかかわる分子機構を解明することを目指す。これらの解析によって、2 型糖尿病において、ニューレグリン 1 が、どのような転写因子により発現制御され、どのような分子機構によって細胞外ドメインが切断・分泌されるのか、さらにどのような受容体とシグナル伝達経路を介して膵β細胞の細胞増殖を制御するのかが明らかになる。その結果、2 型糖尿病におけるニューレグリン 1 を介した臓器間クロストークに基づく新しい糖代謝制御機構の理解を深化させることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 実験動物：本研究の実験動物および遺伝子組換え実験は早稲田大学における各委員会において承認受け実施した。本研究では、C57BL/6 マウスとタモキシフェン誘導型膵β細胞特異的 *ErbB3* ノックアウトマウスを用いた。このノックアウトマウスは、*ErbB3* flox マウスと *Pdx-Cre*ERT2 マウスと交配させることで作製した。2mg/日のタモキシフェン溶液を 3 日間連続腹腔内投与し、膵β細胞特異的に *ErbB3* 遺伝子を不活化させた。2 型糖尿病は高脂質高糖質食を 15 週間投与し作成した。経口糖負荷試験は、16 時間絶食を行ったマウスから採血し、Accu Check で血糖値を測定した値を 0 分値とした。その後、グルコース溶液を 2g/kg 体重で経口投与した後、120 分まで経時的に血糖値を測定した。また、糖負荷後 60 分までの血中インスリン濃度を ELISA で測定した。

(2) リコンビナントニューレグリン 1 タンパク質の精製：マウスニューレグリン 1 タンパク質の EGF 様ドメインから膜貫通ドメイン直前までをコードする遺伝子を pColdI ベクターに組み込んだ。このベクターで形質転換した大腸菌からリコンビナントニューレグリン 1 タンパク質を HisTALON カラムで精製した。

(3) タンパク質発現解析：リコンビナントニューレグリン 1 タンパク質で 30 分刺激したマウス膵β細胞株 MIN6 細胞と初代培養マウス膵ラ氏島細胞、リコンビナントニューレグリン 1 タンパク質の投与後 30 分の C57BL/6 マウスの膵臓を用いて、ウエスタンブロットでタンパク質の発現を解析した。ERBB1~4、AKT および ERK とそのリン酸化タンパク質をそれぞれの特異抗体を用いて解析した。また、内部標準は TUBULIN とした。阻害剤はリコンビナントニューレグリン 1 タンパク質による刺激の 30 分前に添加した。一方、ニューレグリン 1 切断・分泌機構の解析では FLAG タグに対する特異抗体を用いて解析した。

(4) 免疫細胞・組織学解析：Periodate Lysine Paraformaldehyde 固定液で固定した膵臓および 10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した分離膵島をパラフィンで包埋した。パラフィン切片は脱パラフィン処理後クエン酸バッファーを用いて抗原の賦活化を行った。マウス膵島サイズは、

ヘマトシキリン・エオジン染色した切片で Photoshop を用いて解析を行った。3%過酸化水素、Avidin/Biotin Blocking Kit および VECTOR M.O.M. Immunodetection Kit を用いてブロッキング処理後、抗インスリン抗体あるいは抗 Ki67 抗体を 1 次抗体として用いて免疫染色を行った。

(5) ニューレグリン 1 切断・分泌機構の解析：マウスニューレグリン 1 遺伝子の EGF 様ドメインの N 末側に FLAG タグを組み込んだアデノウイルスを、初代培養マウス肝細胞に感染し、その上清を解析した。阻害剤を含んだ新しい培地で 30 時間培養した培地を用いた。siRNA 処理はアデノウイルス感染前日に行った。

全ての統計解析は Student's T あるいは Mann-Whitney U 試験を行い、p 値が 0.05 未満で有意差があると評価した。

4. 研究成果

(1) 膵β細胞におけるニューレグリン 1 受容体の探索

ニューレグリン 1 はチロシンキナーゼ型受容体ファミリーの ERBB3 あるいは 4 と結合することが報告されている。そこで、マウス膵β細胞株 MIN6 細胞をリコンビナントニューレグリン 1 タンパク質で刺激したところ、ERBB3 のリン酸化の増強が認められた。一方、ERBB1、2 と 4 のリン酸化に明らかな変化は認められなかった。また、ERBB 受容体の下流のシグナル経路 PI3K-AKT 経路と MEK-ERK 経路の活性化を AKT と ERK のリン酸化を指標に確認したところ、AKT と ERK の両方のタンパク質のリン酸化の亢進が認められた。次に、C57BL/6 マウスにリコンビナントニューレグリン 1 タンパク質を投与後摘出した膵臓を用いて解析したところ、MIN6 細胞の結果同様に、ERBB3 のリン酸化の増強が認められたが、ERBB1 と 4 の明らかなリン酸化の亢進は確認できなかった。一方、ERBB2 のリン酸化はニューレグリン 1 刺激により増加傾向が認められた。また、マウス膵臓では AKT のリン酸化はほとんど誘導されなかったが、ERK の顕著なリン酸化の増強が認められた。以上の結果は、ニューレグリン 1 は ERBB3 に結合することで主に MEK-ERK 経路を介して細胞内にシグナルを伝達していることを示していると言える。

(2) 2 型糖尿病による膵ラ氏島の代償性過形成に対するニューレグリン 1-ERBB3 シグナル経路の機能解析

上述の結果は、ニューレグリン 1 が膵β細胞の ERBB3 を介して細胞増殖を促進する因子であることを示しており、生体内でも 2 型糖尿病で誘導される膵島の代償性過形成に重要な役割を果たしている可能性がある。そこで、膵β細胞特異的 *Erb3* 遺伝子欠損マウスを作出して検証を行った。

まず、通常食投与下のマウスの解析を行った。通常食投与 15 週間では、この欠損マウスの体重増加と随時血糖値は野生型と同程度であった。また、経口糖負荷試験の結果から、*Erb3* 遺伝子の欠損は耐糖能や糖負荷後のインスリン分泌能に影響を与えないことが分かった。次に、高脂質高糖質食を 15 週間投与して肥満を基盤とした 2 型糖尿病を生じさせ解析を行った。しかしながら、この病態食投与によっても、体重、空腹時および随時血糖値は欠損マウスと野生型マウスの間で明らかな差は認められなかった。一方、随時血中インスリン値は、欠損マウスで有意に低下していた。経口糖負荷試験の結果は、野生型と比較して、欠損マウスでは糖負荷後のインスリン分泌量の低下を伴った耐糖能の悪化を示した。また、組織学的解析結果より、膵島サイズと膵島内細胞増殖マーカーの Ki67 陽性細胞の割合が、欠損マウスで有意に減少していることを見いだした。一方、高脂質高糖質食 15 週間投与後のニューレグリン 1 の膵臓での遺伝子発現量と血中濃度には変化が認められなかった。さらに、膵島の代償性過形成におけるニューレグリン 1-ERBB3 経路の重要性を検証するために、2 型糖尿病を発症した膵β細胞特異的 *Erb3* 遺伝子欠損マウスに対して、ニューレグリン 1 タンパク質を投与した。その結果、欠損マウスの耐糖能、膵島サイズおよび細胞増殖マーカー-Ki67 陽性細胞数に顕著な変化は認められないことを確認した。以上の結果より、膵β細胞に発現する ERBB3 がニューレグリン 1 の受容体として機能し、2 型糖尿病に対する生体防御機構としての代償性膵ラ氏島過形成と耐糖能の増悪抑制に深く関わっていることが明らかになった。

(3) 膵β細胞の細胞増殖制御におけるニューレグリン 1-ERBB3 シグナル経路の機能解析

ERBB 受容体は 2 量体を形成し、リガンド結合により受容体がリン酸化されることで細胞内にシグナルを伝達する。しかしながら、ERBB3 受容体自体はキナーゼ活性をほとんど示さないことから、キナーゼ活性を示す他の ERBB 受容体とヘテロ 2 量体を形成することが作用発現には必要である。そこで、ニューレグリン 1 による膵β細胞の細胞増殖活性化にかかわる ERBB3 受容体のパートナーとその下流シグナル経路を明らかにするために、初代培養マウス膵ラ氏島細胞を用いて細胞増殖マーカー分子 Ki67 を指標に免疫染色による解析を行った。

まず、リコンビナントニューレグリン 1 タンパク質刺激により、膵ラ氏島および膵β細胞当たりそれぞれの Ki67 陽性細胞率が有意に増加していることを確認した。この増殖応答は ERBB3 特異的阻害剤の TX1-85-1 処理により、この細胞増殖応答が完全に抑制されることを見だし、ERBB3 がニューレグリン 1 による膵β細胞増殖に必須の受容体であることを確認した。ERBB1 と 2 に対する阻害剤の Lapatinib でも Ki67 陽性細胞数および陽性率がコントロール以下まで低下し

た。一方、ERBB1 特異的阻害剤の Gefitinib 処理では顕著な変化は認められなかった。これらの結果より、膵β細胞におけるニューレグリン 1 受容体は ERBB2/ERBB3 の 2 量体が機能していることが明らかになった。ニューレグリン 1 による膵β細胞増殖にかかわる ERBB2/ERBB3 受容体の下流のシグナル経路についても阻害剤を用いて解析したところ、PI3K 阻害剤の LY294002 では Ki67 陽性細胞数および陽性率は低下傾向があるものの有意な差は認められない一方で、ERK1/2 阻害剤の SCH772984 の前処理によりニューレグリン 1 による細胞増殖応答が完全抑制されることが分かった。以上の結果より、ニューレグリン 1 は膵β細胞の ERBB2/ERBB3 受容体に結合し、MEK-ERK 経路を介して細胞増殖を活性化していると結論づけた。

(4) ニューレグリン 1 の切断・分泌機構の解析

ニューレグリン 1 は膜貫通ドメインを持つタンパク質で、その細胞外ドメインが切断・分泌されることで、パラクラインやアートクライン作用を発揮する。一方、我々が同定した肝臓に発現されるニューレグリン 1 は膵β細胞に働きかけるホルモン様作用(エンドクライン)を発揮する。しかしながら、肝臓に発現するニューレグリン 1 がどのような切断酵素によって、アミノ酸のどこで切断させるのかは分かっていない。そこで、初代培養マウス肝細胞に FLAG タグ付きニューレグリン 1 遺伝子を発現させ、培地中に分泌されるニューレグリン 1 タンパク質断片を FLAG 認識抗体で免疫沈降し、その断片のアミノ酸配列を LC-TOFMS/MS により解析した。その結果、膜貫通ドメイン部より N 末側 15 アミノ酸上流までのフラグメントを複数検出した。アスパラギン酸あるいはグルタミン酸の C 末端を切断する酵素で切断後解析を行ったが、新しい情報は得られず、切断部位の同定はできなかった。

次に、阻害剤を用いて切断酵素の絞り込みを行った。その結果、これまで HEK293 細胞においてニューレグリン 1 の切断にかかわると報告がなされていた BACE1 および NRD1 に対する阻害剤では、ニューレグリン 1 の分泌抑制は認められなかった。一方、ADAMs および MMPs に対する広領域阻害剤 GM6001 の添加によってニューレグリン 1 分泌が濃度依存的に抑制されることを見いだした。GM6001 より標的範囲が狭いパチマスタットを用いたところ、同様に濃度依存的な切断・分泌抑制が観察された。パチマスタットの標的分子は ADAM17 と MMP1, 2, 3, 7, 9 と報告されている。そこで、それぞれの遺伝子の発現を siRNA により抑制し検討を行った。その結果、MMP2 と 9 に対する siRNA では分泌抑制は認められなかったが、ADAM17 の発現抑制によりニューレグリン 1 の切断は完全に抑制されることが明らかになった。MMP1, 3, 7 の関与については検討ができていないが、以上の結果より、肝臓で発現するニューレグリン 1 は EGF 様ドメインに続く α ドメイン内で ADAM17 によって切断・分泌されると結論づけた。

以上の結果より、肝臓から分泌されるヘパトカインのニューレグリン 1 が膵β細胞の ErbB2/3 受容体に結合し MEK-ERK シグナル経路を活性化させることで、2 型糖尿病に対する応答機構としての代償性膵島肥大を誘導すると結論づけた。また、肝臓におけるニューレグリン 1 の切断・分泌には少なくとも ADAM17 が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sorimachi Yuriko, Karigane Daiki, Ootomo Yukako, Kobayashi Hiroshi, Morikawa Takayuki, Otsu Kinya, Kubota Yoshiaki, Okamoto Shinichiro, Goda Nobuhito, Takubo Keiyo	4. 巻 296
2. 論文標題 p38 plays differential roles in hematopoietic stem cell activity dependent on aging contexts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100563 ~ 100563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100563	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 Kobayashi Toshihiko, Nguyen-Tien Dat, Sorimachi Yuriko, Sugiura Yuki, Suzuki Takehiro, Karyu Hitomi, Shimabukuro-Demoto Shiho, Uemura Tatsuki, Okamura Tadashi, Taguchi Tomohiko, Ueki Kohjiro, Kato Norihiro, Goda Nobuhito, Dohmae Naoshi, Takubo Keiyo, Suematsu Makoto, Toyama-Sorimachi Noriko	4. 巻 118
2. 論文標題 SLC15A4 mediates M1-prone metabolic shifts in macrophages and guards immune cells from metabolic stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2100295118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2100295118	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 Ayukawa Shiyu, Kamoshita Nagisa, Nakayama Jun, Teramoto Ryohei, Pishesha Novalia, Ohba Kenji, Sato Nanami, Kozawa Kei, Abe Hikari, Semba Kentaro, Goda Nobuhito, Fujita Yasuyuki, Maruyama Takeshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Epithelial cells remove precancerous cells by cell competition via MHC class I?LILRB3 interaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1391 ~ 1402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-021-01045-6	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 該当する
1. 著者名 Noguchi Koji, Yokozeki Kyosuke, Tanaka Yuko, Suzuki Yasuhiro, Nakajima Kazuki, Nishimura Takashi, Goda Nobuhito	4. 巻 27
2. 論文標題 Sima, a Drosophila homolog of HIF-1, in fat body tissue inhibits larval body growth by inducing Tribbles gene expression.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 145 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12913	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 Mizukami Kiichi, Katano Ayaka, Shiozaki Shuichi, Yoshihara Toshitada, Goda Nobuhito, Tobita Seiji	4. 巻 10
2. 論文標題 In vivo O2 imaging in hepatic tissues by phosphorescence lifetime imaging microscopy using Ir(III) complexes as intracellular probes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76878-6	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 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 合田 亘人
2. 発表標題 肝臓と膵臓を繋ぐ新規ヘパトカインの探索とその機能解析
3. 学会等名 第7回肝臓と糖尿病・代謝研究会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 絵莉子、新井 理智、合田 亘人
2. 発表標題 2型糖尿病で肝臓から分泌される Hepatokine X は膵島肥大を誘導することで 血糖調節にかかわっている
3. 学会等名 第27回肝細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 合田 亘人
2. 発表標題 低酸素応答の疾患生物学
3. 学会等名 第88回日本医科大学医学会総会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 合田 亘人
2. 発表標題 HIF-PHDを介した低酸素感知・応答システムの制御機構
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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