

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16127

研究課題名（和文）外因性ピルビン酸欠乏により誘導される細胞死のグルコース代謝異常の分子機序の解明

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanism of pyruvate-starved induced cell death under high-glucose conditions

研究代表者

八子 英司 (YAKO, Hideji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・研究員

研究者番号：00768880

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：高グルコース・外因性ピルビン酸欠乏環境下で誘導されるマウスシュワン細胞株IMS32の細胞死の機序を解析した。同環境下において、(1) GAPDH、ATF4のポリADPリボシル化の増加は確認されなかった、(2) 統合的ストレス応答の阻害剤ISRIBを投与しても細胞死は抑制されなかった、(3) AIFの核内移行やCaspase 3/7の活性化は見られなかった、(4) PDH活性は有意に減少していた。これらのことから、本細胞死はATF4の経路は介さず、ネクローシス様の経路により生じ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

糖尿病性神経障害は糖尿病慢性合併症のうち最も早期に出現し、その頻度も高いと推定されている。しかしながら、成因に基づいた効果的な治療法は乏しく、血糖コントロールに勝る治療はない。糖尿病モデル動物にピルビン酸を投与すると網膜症、腎症を改善することが報告されている。本研究結果から、高グルコース環境において、ピルビン酸は末梢神経を構成するシュワン細胞の機能維持に重要であることが示唆され、糖尿病性神経障害の新規治療薬としての有用性が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed to elucidate the mechanism of pyruvate-starved induced IMS32 Schwann cell death under high-glucose (15 mM) conditions. Pyruvate starvation failed to increase poly ADP ribosylation of GAPDH and ATF4, enhance caspase 3/7 activity, translocate AIF into nuclei under hyperglycemia; whereas the starvation decreased pyruvate dehydrogenase activity and levels of ATP, NAD and NADH. These results imply that the cell death results from energy depletion, indicating that pyruvate starvation induced necrosis-like Schwann cell death under high-glucose conditions.

研究分野：神経細胞生物学、病態生理学

キーワード：外因性ピルビン酸 TCAサイクル 解糖系 高グルコース 細胞死

1. 研究開始当初の背景

ピルビン酸は解糖系の最終産物であり、嫌氣的・好氣的環境下におけるエネルギー産生に重要である。その機能は内因性と外因性に分けられ、内因性ピルビン酸は代謝やエネルギー産生などに寄与している。一方で、外因性ピルビン酸は抗酸化作用を有している。高グルコース (>10 mM)・外因性ピルビン酸欠乏環境下に成熟ラット初代培養後根神経節ニューロンやマウスシュワン細胞株 IMS32 などを暴露すると 24 時間以内に細胞死が誘導されることを明らかにした (Yako *et al*, *Sci Rep*, 2021)。IMS32 細胞を用いたさらなる解析から、この細胞死は、(1) 活性酸素種 (ROS) 産生の増加、(2) タンパク質をポリ ADP リボシル化修飾する酵素 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) による解糖系酵素 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 活性の減少、(3) 解糖系速度の減少、(4) ポリオール代謝経路などの解糖系側副路の亢進、(5) クエン酸回路フラックスの低下によるミトコンドリア機能減弱により生じる ATP 産生量の減少などにより誘導されることを明らかにした。一方で、(6) 転写因子 activating transcription factor 4 (ATF4) は増加するが小胞体ストレスの阻害剤 4-PBA では細胞死が抑制されないことから、小胞体ストレスはこの細胞死の主要な経路ではないことも見出している。しかしながら、高グルコース・外因性ピルビン酸欠乏環境下に PARP 阻害剤 rucaparib を投与することで、細胞死、GAPDH 活性、解糖系速度は改善するがミトコンドリア呼吸の改善は見られず、また、ATF4 亢進の作用機序と細胞死への関与は分かっていない。そのため、細胞死機序の全貌を理解するためには代謝変動だけでなく遺伝子・タンパク質発現の変動と、代謝変化と分子変化の相互作用を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

外因性ピルビン酸は、抗酸化作用により細胞死を抑制する効果は報告されているが (Desagher *et al*, 1997; O'Donnell-Tormey *et al*, 1987; Wang *et al*, 2007)、高グルコース環境下での機能は分かっていない。高グルコース・外因性ピルビン酸欠乏環境下において短時間で広汎な細胞死が誘導され、この細胞死はシュワン細胞、ニューロン、血管内皮細胞、腎メサンギウム細胞などの多くの細胞種で生じることやグルコース以外の糖 (ガラクトース、マンニトール) では起こらないことも確認している。そのため、この細胞死はグルコース特異的で、多くの細胞種で生じる一般的な現象であると考えられる。その機序はグルコース代謝異常によるミトコンドリア機能不全や PARP の活性化によると推察された。一方で、ATF4 の亢進も見出しているが細胞死との関係性は分かっていない。ATF4 は細胞がストレスにさらされた際にタンパク質の翻訳を抑制し、ストレスに適応する遺伝子の発現を誘導する統合的ストレス応答に関与している。それだけでなく、ATF4 はミトコンドリアストレスにより亢進すること (Quirós *et al*, 2017) や PARP によりポリ ADP リボシル化を受けること (Hocsak *et al*, 2017) も報告されている。しかしながら、ATF4 が解糖系を制御するか、高グルコース・外因性ピルビン酸欠乏環境下でも同様な制御機構があるかは明らかとなっていない。そのため、本研究では、高グルコース・外因性ピルビン酸欠乏環境下における分子的・代謝的変動とこれらのクロストークを解明することを目的とした。

さらに、PARP を介した細胞死の機序は、caspase の活性化を介したアポトーシス、エネルギーの減少によるネクローシス、apoptosis-inducible factor (AIF) の核内移行により誘導されるパータナトスの 3 種類が推察されている。そのため、高グルコース・外因性ピルビン酸欠乏負荷で誘導される細胞死の機序を PARP 機能に着目し、明らかにする。

3. 研究の方法

マウスシュワン細胞株 IMS32 細胞を高グルコース (15 mM)・外因性ピルビン酸欠乏環境下に暴露し、(1) ポリ ADP リボース (PAR) 抗体を用い免疫沈降法により、ポリ ADP リボシル化タンパク質を濃縮し、Western blotting 法により GAPDH、ATF4 を検出し、これらのタンパク質のポリ ADP リボシル化を検出、(2) PAR、GAPDH、ATF4 の細胞免疫染色によるポリ ADP リボシル化と局在変化の解析、(3) ATF4 が中心的な役割を果たす統合的ストレス応答の阻害剤 ISRIB を用いた細胞死の抑制効果を MTS assay による計測、(4) ミトコンドリア機能異常メカニズムの解明のため、代謝酵素の活性を測定、(5) PARP を介した細胞死メカニズムの解明のため、アポトーシス (caspase 3/7 活性)、ネクローシス (細胞死)、パータナトス (AIF の細胞免疫染色) の検討を実施した。

4. 研究成果

(1) 高グルコース環境下において、外因性ピルビン酸の有無による GAPDH、ATF4 のポリ ADP リボシル化に有意な変化は認められなかった。(2) 高グルコース・外因性ピルビン酸欠乏負荷による PAR の核内の蓄積や GAPDH の核内移行は見られなかったが、ATF4 の核内移行が確認された。(3) 同環境下で誘導される細胞死に対して ISRIB 投与は抑制効果を示さなかった。(4) 同環境下において、ピルビン酸からアセチル CoA への代謝を触媒する酵素 pyruvate dehydrogenase (PDH)活性は有意に低下しており、PARP 阻害剤 rucaparib 投与でも改善が見られなかった。さらに、PDH の活性を抑制する PDH kinase (PDK)の阻害剤ジクロロ酢酸の単独投与や rucaparib との共投与でも細胞死は抑制されなかった。(5) この細胞死は、caspase3/7 の活性化や AIF の核内移行は見られなかった。一方で、高グルコース・外因性ピルビン酸欠乏環境下では、GAPDH 活性、ATP 量、NAD 量の減少を確認している (Yako et al, *Sci Rep*, 2021)。これらのことから、GAPDH 活性は、ポリ ADP リボシル化を介さずに PARP に制御されていること、この細胞死はネクローシス様のメカニズムを介すことが示唆された。一方で、ISRIB を投与してもこの細胞死が抑制されないことから、統合的ストレス応答や ATF4 の核内移行はこの細胞死の主要な経路ではないことが推察された (図 1)。

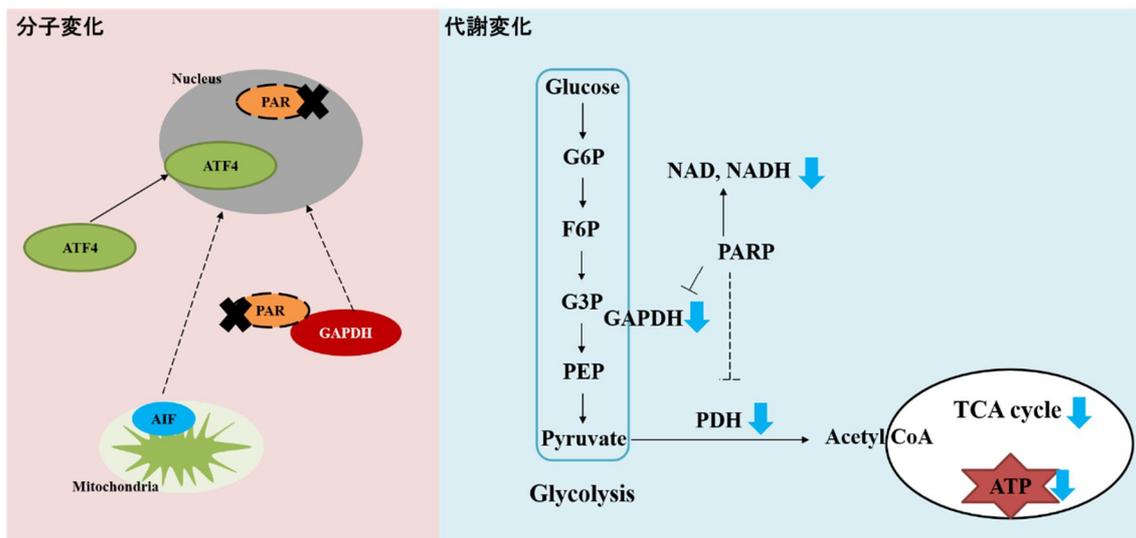


図 1 高グルコース・外因性ピルビン酸欠乏環境下における分子変化と代謝変化の模式図

高グルコース・外因性ピルビン酸欠乏下において、ATF4 の核内移行は確認されたが、GAPDH、AIF の局在に変化は見られなかった。また、GAPDH のポリ ADP リボシル化や PAR の核内蓄積も確認されなかった。一方で、同環境下において、PARP は NAD、NADH、ATP 量の減少と GAPDH 活性を間接的に抑制するが、PDH 活性に影響しなかった。高グルコース・外因性ピルビン酸欠乏負荷により、これらの分子・代謝変化が誘導され、細胞死に至ることが推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Niimi Naoko, Yako Hideji, Takaku Shizuka, Chung Sookja K., Sango Kazunori	4. 巻 22
2. 論文標題 Aldose Reductase and the Polyol Pathway in Schwann Cells: Old and New Problems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1031 ~ 1031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031031	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 該当する
1. 著者名 Takaku Shizuka, Tsukamoto Masami, Niimi Naoko, Yako Hideji, Sango Kazunori	4. 巻 22
2. 論文標題 Exendin-4 Promotes Schwann Cell Survival/Migration and Myelination In Vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2971 ~ 2971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22062971	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 Akamine Tomoyo, Takaku Shizuka, Suzuki Mari, Niimi Naoko, Yako Hideji, Matoba Keiichiro, Kawanami Daiji, Utsunomiya Kazunori, Nishimura Rimei, Sango Kazunori	4. 巻 153
2. 論文標題 Glycolaldehyde induces sensory neuron death through activation of the c-Jun N-terminal kinase and p-38 MAP kinase pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 111 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-019-01830-3	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 Yako Hideji, Niimi Naoko, Kato Ayako, Takaku Shizuka, Tatsumi Yasuaki, Nishito Yasumasa, Kato Koichi, Sango Kazunori	4. 巻 11
2. 論文標題 Role of pyruvate in maintaining cell viability and energy production under high-glucose conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98082-w	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八子 英司,加藤 文子,新見 直子,高久 静香,加藤 宏一,三五 一憲
2. 発表標題 高グルコース・外因性ピルビン酸欠乏環境下で誘導されるシュワン細胞死には、PARPを介したGAPDH活性低下が関与する
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八子 英司,加藤 文子,新見 直子,高久 静香,加藤 宏一,三五 一憲
2. 発表標題 高グルコース・外因性ピルビン酸欠乏環境下における、ベンフォチアミンのシュワン細胞死抑制メカニズムの検証
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八子 英司,加藤 文子,新見 直子,高久 静香,加藤 宏一,三五 一憲
2. 発表標題 高グルコース・外因性ピルビン酸欠乏環境下での解糖系変動に対するHIF1 と2-オキシグルタル酸の検証
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八子 英司,加藤 文子,新見 直子,高久 静香,加藤 宏一,三五 一憲
2. 発表標題 高グルコース・外因性ピルビン酸環境下で誘導されるシュワン細胞死と解糖系-TCA回路フラックス減少におけるPARPの関与
3. 学会等名 第36回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideji Yako, Kazunori Sango
2. 発表標題 Exogenous pyruvate maintains glycolysis-TCA cycle flux through PARP-dependent and independent cascades under high-glucose condition
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>高グルコース環境下における外因性ビルビン酸の機能 https://www.igakuken.or.jp/topics/2021/0923.html EurekAlert News Release https://www.eurekalert.org/news-releases/932911</p>
--

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