

令和 7 年 6 月 10 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K07403

研究課題名（和文）インスリン抵抗性の病態マーカーとなりえる細胞外分泌ミトコンドリア関連蛋白質の探索

研究課題名（英文）An exploratory study of extracellular mitochondrial proteins as novel markers of insulin resistance.

研究代表者

高橋 伸彦（Takahashi, Nobuhiko）

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：20372279

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：糖代謝とミトコンドリア機能とは深い関連がある。そこで、インスリン抵抗性の評価に有用な新たなミトコンドリア関連体液マーカーの確立を目的として研究に着手した。ミトコンドリア機能に影響を与えつつインスリン抵抗性改善作用を有する糖尿病治療薬イメグリミンの作用を手掛かりに検討を行い、骨格筋の糖代謝改善に伴って分泌されるミトコンドリア関連タンパク質を複数同定した。また、イメグリミンは脂肪細胞に作用し、マイトカインの分泌を促進することを突き止めた。これらミトコンドリア関連タンパク質やマイトカインは糖尿病の個別化医療に役立つ病態マーカーの候補となりえると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、骨格筋由来のミトコンドリア関連タンパク質や脂肪細胞由来のマイトカインが糖尿病の病態マーカーの候補となりえることを示すことができた。個々の分子の明確な意義付けには至らなかったが、糖尿病患者の病態に即した個別化医療の推進に寄与する体液マーカーの創出において、本研究はその基盤を構築するものとする。また、副次的に糖尿病治療薬イメグリミンの新たな作用メカニズムを解明でき、糖尿病治療において基礎的な視点からの病態理解に貢献することもできた。

研究成果の概要（英文）：There is a close relationship between glucose metabolism and mitochondrial function. Therefore, this study was initiated to establish a new, mitochondria-related humoral marker that is useful for evaluating insulin resistance. To investigate the effects of imeglimin, a diabetes drug that improves insulin resistance while affecting mitochondrial function, several mitochondria-associated proteins that are secreted in response to improved skeletal muscle glucose metabolism were identified. Additionally, imeglimin was found to act on adipocytes and promote the secretion of mitokines. These proteins and mitokines may be candidates for pathological markers useful in personalized diabetes medicine.

研究分野：代謝病学、臨床検査医学、細胞生物学、内科学

キーワード：インスリン抵抗性 病態マーカー ミトコンドリア タンパク質

1. 研究開始当初の背景

糖尿病はインスリン分泌不全とインスリン抵抗性とが相まって慢性の高血糖を呈する疾患であり、各々の関与の程度は患者ごとに異なっている。また、同一の患者であっても罹病期間が長くなるにつれ膵細胞におけるインスリン分泌能が低下したり、加齢に伴った骨格筋量の減少(サルコペニア)によってインスリン感受性が低下したり、病態も継時的に変化していくことが知られている。このように糖尿病は一人一人の病態が異なるため、特に治療介入に際して個別化医療が強く求められている。しかしながら、現在、臨床においてインスリン分泌能はある程度推定できるものの、インスリン抵抗性を評価できる有用な病態マーカーは存在していない。

インスリン抵抗性の分子病態メカニズムは、主に肝臓や骨格筋におけるグルコース代謝異常やインスリンシグナル障害、ミトコンドリアの質的・形態的異常などの様々な要因が複雑に絡みあっている。そのなかでもミトコンドリアは糖代謝異常に伴って酸化ストレスが蓄積したり、ミトコンドリア DNA の変異が蓄積したりするなど、病態に深く関与する。詳細を述べると、肝臓においては ATP 産生に伴う共役の低下や最大呼吸の低下、ATP 含量の低下、脂質の蓄積などが報告されている。一方、骨格筋においては活性酸素の産生増加や分裂の増加、小胞体との interaction の増加、ミトコンドリア自体の減少などが報告されている。このように、糖代謝異常ではインスリン抵抗性を担う肝臓や骨格筋において病態を反映したミトコンドリアの変化がおこり、それは臓器(細胞)ごとでも異なることがわかってきた。

ミトコンドリアは細胞内にて ATP 産生や Ca^{2+} 濃度の調節、脂肪酸の酸化、自然免疫、アポトーシスの制御など、細胞の機能維持に不可欠な役割を担っている。そしてごく最近、酸化ストレスなどの影響を受けたミトコンドリアからその構成因子、つまり、ミトコンドリア DNA そのものやミトコンドリア由来の小ペプチド、構成蛋白質、ミトコンドリア膜などの物質が脂質膜の小胞に包まれた形で細胞外に分泌されることが注目されている。このような分泌されたミトコンドリアの構成因子は、そのもととなる細胞内のミトコンドリア機能、ひいては細胞内代謝機能や細胞障害を反映すると考えられる。そのような構成因子のうち、「蛋白質」は種類も多い(約 1,000 種類存在する)ことから弁別性に優れ、かつ解析も容易であり、特に病態マーカーとして有望である。

2. 研究の目的

糖尿病患者の病態は個人個人で異なるため、個別化医療が必要となる。糖尿病の主病態はインスリン分泌低下とインスリン抵抗性であるが、特にインスリン抵抗性は HOMA-IR の概算や、肥満しているなどの大まかなイメージでしか捉えにくいのが現状である。

本研究は最近知られてきた細胞外に分泌されるミトコンドリア構成タンパク質に着目し、診療に有用なインスリン抵抗性を簡便でかつ正確に評価できる病態マーカーを確立することを目的とした。また、肝臓・骨格筋、各々のインスリン抵抗性を評価できる臓器特異的なマーカーの創出へとつながることに期待して計画を立てた。

本研究にて得られる成果は、非・低侵襲検査としての特徴をもつ体液診断や多種多様な糖尿病患者の病態にあわせた治療、そして最近では 10 種類にまで膨れ上がった糖尿病治療薬をそれぞれの患者さんの病態にあった使い方への応用が可能であり、これからの個別化医療に向けた病態解析ツールとして大変意義深いものと言える。

3. 研究の方法

研究の手掛かりとして、ミトコンドリアに作用することが知られている経口糖尿病治療薬イメグリミンに着目した。イメグリミンはインスリン抵抗性(感受性)を改善しつつ、ミトコンドリア内の変化が期待される。また、メトホルミンも同様に骨格筋の糖代謝改善作用が報告されている。そこで手掛かりとして、骨格筋細胞にイメグリミンあるいはメトホルミンを作用させた場合の分泌タンパク質を解析した。

(1) 骨格筋における検討

細胞の処置：骨格筋細胞のモデルとして、マウス C2C12 筋芽細胞(ATCC)を常法に従い筋管細胞に分化させ実験に供した。イメグリミン(1 mM)あるいはメトホルミン(1 mM)を C2C12 筋管細胞に作用させ、検討をおこなった。なお、対照群としてエンドトキシン free の滅菌水を用いた。

解析：

- ・培地のグルコース濃度を glucose oxidase assay kit を用いて評価した。
- ・細胞内へのグルコース取り込み量は、2-deoxy-glucose (2-DG) の取り込み量で評価した。
- ・細胞内タンパク質および細胞膜タンパク質を抽出し、Western blotting 法にて特定のタンパク質発現量を評価した。
- ・作用機序解析目的で、各種細胞内シグナル阻害剤を用いた。

・細胞外分泌タンパク質を検出する目的で、処置後に回収した培地の一部を検体に液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC-MS)を用いて網羅的に定量プロテオーム解析を行った(外注にて依頼)。

(2) 脂肪細胞における検討

脂肪細胞モデルとイメグリミン処置：マウス線維芽細胞 3T3-L1 細胞 (ATCC) を既報に準じて脂肪細胞に分化させ、イメグリミンを 0.25、0.5、1.0 mM の濃度で処置した。対照群としてエンドトキシン free の滅菌水を用い、各処置群の効果を比較した。

解析：骨格筋における検討で用いたもの以外を列記する。

・ミトコンドリア複合体 I 活性の測定：基質の酸化に伴う還元型 NADH の生成を測定し、複合体 I の活性をマイクロプレートアッセイキット (Abcam 製) にて定量した。

・NAD⁺、NADH、AMP 濃度の測定：専用のアッセイキット (Dojindo Laboratories 製) にて各濃度を測定した。

・ミトコンドリア DNA の定量：特定のプライマーを用いて、ミトコンドリア DNA と内因性コントロールとしての β -ミクログロブリン DNA を定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) にて定量し、比較した。

・RNA 抽出と遺伝子発現解析：total RNA を抽出し、逆転写反応を行った後、qPCR で遺伝子発現を測定した。

・mRNA 量の変化をひきおこすメカニズムの解析には actinomycin D を用いた。

・マイトカイン濃度、Monocyte chemoattractant protein (MCP) -1 濃度の定量：イメグリミン処置を行った脂肪細胞の培養上清からマイトカイン (Fibroblast Growth Factor-21, FGF21 および Growth Differentiation Factor 15, GDF15) の分泌量を ELISA 法にて測定した。

4. 研究成果

(1) 骨格筋における検討

イメグリミンあるいはメトホルミンは骨格筋細胞においてグルコースの取り込みを促進する

・イメグリミンはメトホルミンとほぼ同等に培地グルコース濃度を低下させた。また、イメグリミンはメトホルミン作用下において培地グルコース濃度をさらに低下させた。

・イメグリミンは骨格筋細胞の細胞膜 GLUT4 タンパク質を増加させた。

・イメグリミンの培地グルコース低下作用は PI3K 阻害剤の前処置によって減弱した。

以上の結果から、イメグリミンは骨格筋細胞に対して、メトホルミンと同等に糖取り込み作用を有することがわかった。

イメグリミンは多くのミトコンドリア関連タンパク質の分泌を促進する

・骨格筋細胞より培地に分泌されたタンパク質の網羅的定量解析の結果、定量できたタンパク質の種類は、Vehicle : 3371、イメグリミン : 3358、メトホルミン : 3355 種類であった。

Pathway 解析では Organelle inner membrane、Mitochondrial inner membrane、Mitochondrial protein-containing complex、Mitochondrial envelope、Mitochondrial matrix、

Mitochondrial membrane、Inner mitochondrial membrane protein complex がイメグリミンに優位なタンパク質群であり、ミトコンドリアに関連するものが特に目立っていた。個別のタンパク質では gene ontology で Coq9、Pgam5、Hibch、FAHD1、PdHA1、Dguok、Suc1g1、Pccb、Pitrm1 といったものが同定された。

・このような変化を認めるタンパク質について、実際に培地や細胞溶解液をサンプルとした場合、イメグリミンで変化するののかについて、既製の抗体を入手し、Western blot 法を用いて検討を行った。その結果、いくつかの分子については網羅的解析の結果と同様の結果を得ている。これらのなかにはインスリン抵抗性の病態マーカーとなりえる分泌蛋白の候補として期待される。

これらのなかにはインスリン抵抗性の病態マーカーとなりえる分泌蛋白の候補として期待される。

(2) 脂肪細胞における検討

イメグリミンは脂肪細胞においてグルコースの取り込みを促進する

・イメグリミンは脂肪細胞に 0.25mM から有意にグルコース (2-DG) の取り込みを促進した。

・イメグリミンは脂肪細胞の細胞膜 GLUT4 のタンパク質発現を増加させた。

・イメグリミンによる糖取り込みは AMPK の阻害剤ではキャンセルできず、PI3K や Akt、PKC の阻害剤で一部、減弱した。

以上の結果より、イメグリミンは脂肪細胞において糖代謝を改善することがわかった。

ミトコンドリアに対する作用

・イメグリミンは脂肪細胞におけるミトコンドリア複合体 I 活性を抑制する

イメグリミンは 0.5 mM 以上の濃度でミトコンドリア複合体 I の活性を有意に抑制した。また、Western blotting の結果から、複合体 I のタンパク質発現量は変わらなかった。このことから、イメグリミンはミトコンドリア複合体 I の活性自体を抑制するといえる。

・イメグリミンは細胞内 NAD⁺/NADH バランスに影響を与える

イメグリミンは NAD⁺レベルを有意に低下させた一方、NADH レベルを増加させ、結果として、NAD⁺/NADH 比が有意に低下し、細胞内の酸化還元状態が変化した。これらの結果は、イメグリミンがミトコンドリア複合体 I の抑制を介して NAD⁺と NADH のバランスに影響を与えることを示唆している。

・イメグリミンは細胞内 AMP レベルと AMPK のリン酸化を増加させる

イメグリミン処置により、細胞内 AMP レベルが有意に増加した。また、Western blotting の結果、AMPK のリン酸化が促進され、特に Thr172 のリン酸化が有意に増加した。

・イメグリミンはミトコンドリア DNA 量を増加させ、TFAM および PGC-1 の mRNA 発現を促進する

イメグリミン処置により、ミトコンドリア DNA 量は有意に増加した。TFAM および PGC-1 の mRNA 発現も有意に増加した。PGC-1 はミトコンドリアの生合成を調節する重要な転写共役因子であり、TFAM はミトコンドリア DNA の転写を促進するため、これらの遺伝子の発現増加は、イメグリミンがミトコンドリア DNA 量に対して正に調節していることを示している。

・イメグリミンはミトコンドリアの小胞体ストレス応答を惹起し、マイトカイン (FGF21 および GDF15) の分泌を促進する

・イメグリミン処置により、CHOP の発現が有意に増加した。これは、ミトコンドリア変性タンパク質ストレス (Mitochondrial unfolded protein response, UPR^{mt}) が活性化されたことを示している。UPR^{mt} はミトコンドリアのストレス応答に関与し、ミトコンドリアの機能を維持するための重要なメカニズムである。さらに、マイトカインである FGF21 および GDF15 について、ELISA による測定でそれぞれの濃度が有意に増加した。

考案) 以上の結果より、イメグリミンは脂肪細胞に作用し、ミトコンドリア呼吸鎖複合体への作用やミトコンドリア DNA 量を増加させ、ミトコンドリアストレス応答を惹起するなど、ミトコンドリア機能調節に関わることを明らかにした。また、ミトコンドリアストレス応答に対応して分泌が増加するサイトカイン、つまり FGF-21 や GDF-15 といったマイトカインの産生も増加することを見出した。これまでに FGF-21 は全身の糖代謝改善作用が報告されており、イメグリミンの代謝改善作用にこのようなマイトカインが関わる可能性が示唆された。また、FGF-21 は病態マーカーとしての可能性も考えられた。

単球走化性タンパク質 (MCP) -1 分泌に対する作用

・イメグリミンは 3T3-L1 脂肪細胞において培地中の MCP-1 分泌を低下させる

イメグリミンを脂肪細胞に作用させたと、培地中の MCP-1 分泌量はコントロールに比較し、減少していた。さらに、細胞内の MCP-1 蛋白質量や mRNA 量も低下していた。さらに、mRNA の低下は actinomycin D を用いた検討から、遺伝発現レベルで調節されていることがわかった。

・TNF- α による MCP-1 遺伝子の発現増加に対して、イメグリミンはそれを減弱させた。

考案) 以上の結果より、イメグリミンは脂肪細胞において定常状態および TNF- α により誘導された MCP-1 発現を低下させることがわかった。MCP-1 は脂肪組織に単球/マクロファージの遊走を促進し、さらにマクロファージから TNF- α が分泌され、さらに MCP-1 の分泌が促進される。このような悪循環とも言えるメカニズムで脂肪組織の炎症が進展するが、本研究結果から、イメグリミンがこのような悪循環を断ち切る可能性が示唆された。

まとめ：本研究から、糖代謝改善作用を持つ薬剤によって、インスリン抵抗性の多くを担う骨格筋から数多くのタンパク質が分泌されることがわかった。その中にはミトコンドリアに関連するものも多く、研究期間内においてすべては解明できなかったが、それらは病態マーカーの候補として期待される。一方、一連の検討を通じて、イメグリミンは骨格筋のみならず、脂肪細胞にも作用することを予期せず発見し、さらにはミトコンドリアに関連した小胞体ストレス応答を惹起し、それに呼応したサイトカインであるマイトカインの分泌が亢進することを確認した。このようなマイトカインも病態マーカーになりえる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi Nobuhiko, Kimura Atsushi P., Yoshizaki Takayuki, Ohmura Kazumasa	4. 巻 349
2. 論文標題 Imeglimin modulates mitochondria biology and facilitates mitokine secretion in 3T3-L1 adipocytes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 122735 ~ 122735
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2024.122735	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 Ieko Masahiro, Ohmura Kazumasa, Naito Sumiyoshi, Yoshida Mika, Sasaki Hisaomi, Sato Tsuyoshi, Sugawara Norifumi, Takahashi Nobuhiko, Ichinose Akitada	4. 巻 3
2. 論文標題 Considerations for simultaneous detection of autoantibodies to coagulation factor and lupus anticoagulant	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Exploration of Immunology	6. 最初と最後の頁 286 ~ 299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.37349/ei.2023.00103	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 1件）

1. 発表者名 高橋伸彦、木村敦、吉崎隆之、大村一将
2. 発表標題 イメグリミンは3T3-L1脂肪細胞において単球走化性タンパク質-1の産生・分泌を抑制する
3. 学会等名 第68回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2025年

1. 発表者名 高橋伸彦、木村敦、大村一将
2. 発表標題 骨格筋細胞におけるイメグリミンのグルコース取り込み作用の検討
3. 学会等名 第67回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高橋伸彦、木村敦、大村一将
2. 発表標題 イメグリミンは脂肪細胞に作用し、Fibroblast Growth Factor 21の産生・分泌を促進する
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nobuhiko Takahashi, Atsushi P. Kimura, Kazumasa Ohmura
2. 発表標題 Imeglimin affects mitochondrial function and DNA content in 3T3-L1 adipocytes
3. 学会等名 The 15th Scientific Meeting of The Asian Association for the Study of Diabetes (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋伸彦、木村敦、大村一将
2. 発表標題 新規経口糖尿病治療薬imegliminは3T3-L1脂肪細胞の糖取り込みを促進する
3. 学会等名 第26回アディポサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2023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
研究分担者	木村 敦 (Kimura Atsushi) (90422005)	北海道大学・理学研究院・教授 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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 分担者	大村 一将 (Ohmura Kazumasa) (10803637)	北海道医療大学・歯学部・准教授 (30110)	削除:2024年4月24日

	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	熊谷 京子 (Kumagai Kyoko)		

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