

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04850

研究課題名(和文) 糖尿病性神経障害発症機構の解明と治療法開発に向けた基礎研究

研究課題名(英文) The role of Cdkal1-mediated tRNA modification in peripheral neuropathy

研究代表者

富澤 一仁 (Kazuhito, Tomizawa)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：40274287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖尿病性神経障害の分子機構の解明を目的として実施した。特に2型糖尿病と最も相関が高い危険因子の一つとして同定されたCDKAL1に着目し、Cdkal1欠損マウスを用いて研究を行った。全身性および膵細胞特異的Cdkal1欠損マウスに対して、各種末梢感覚試験を実施した。膵細胞特異的Cdkal1マウスでは、感覚異常は認められなかったが、全身性Cdkal1欠損マウスでは、すべての感覚試験において感覚鈍麻が認められた。また、全身性Cdkal1欠損マウスでは、末梢真剣線維および脊髄後根神経節の脱落が認められた。さらに、同マウスでは脊髄後根神経節におけるBDNF量が低下していた。

研究成果の概要(英文)：Genetic variations in CDKAL1 have been associated with the development of type 2 diabetes. CDKAL1 is a methylthiotransferase that catalyzes 2-methylthio modification of tRNA<sup>Lys</sup>(UUU). The ms2 modification is important for accurate decoding of Lys codon in Proinsulin. In addition to Proinsulin, Lys is also critical for the processing of various neurotrophic factors. We hypothesized that the dysregulation of CDKAL1 might cause aberrant translation of neurotrophic factors, and lead to the development of neuropathy. To test this hypothesis, we investigated the sensory functions of peripheral nerves in Cdkal1-knockout mice. Cdkal1-deficiency induced peripheral neuropathy independent of glucose intolerance. Cdkal1-deficient mice exhibited loss of CGRP- and IB4-positive neurons in DRG. Cdkal1-deficient mice exhibited loss of nerve fibers in footpad. BDNF were reduced in DRG of Cdkal1KO mice. These results suggest that dysfunction of Cdkal1 may be critical for development of diabetic neuropathy.

研究分野：生理学

キーワード：糖尿病 神経障害 tRNA 翻訳 末梢神経

### 1. 研究開始当初の背景

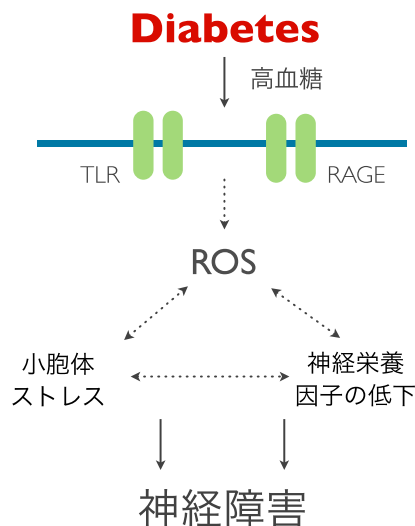
糖尿病性神経障害(DN)は、糖尿病患者における最も重要な合併症であり、我が国の糖尿病患者の内47.1%がDNを合併している(平成20年日本糖尿病対策推進会議調査より)。DNは、患者のQOLを著しく低下させる疾患であり、その予防ならびに治療は重要であるが、未だ有効な予防法、治療法が無いのが現状である。

DNの基本的治療は、厳格な血糖コントロールとされているが(日本糖尿病学会 科学的根拠に基づく糖尿病診療ガイドライン2013)、従来のコホート調査より、1型糖尿病のDNについては、血糖コントロールは有用であるが、2型糖尿病に随伴するDNについては無効とであるとの報告が多い。特に近年の厳密にコントロールされたコホート調査では、否定的な見解が多い[Lancet Neurol 11, 521 (2012)]。すなわち、血糖コントロールだけでなく、その発症機構を明らかにし、科学的根拠に沿った新たな予防法ならびに治療法の開発が望まれている。

CDKAL1は、2型糖尿病と最も相関が高い危険因子の一つとして同定された。従来、その分子機能は不明であったが、我々はリジンに対応する tRNA (tRNA<sup>Lys</sup>) のチオメチル化修飾酵素であることを突きとめた。プロインスリンはリジン残基でプロセッシングを受けるため、tRNA<sup>Lys</sup> のチオメチル化修飾が欠損すると、リジン残基で誤翻訳が起き、プロセッシングを受けない異常なプロインスリンが細胞内に蓄積する。その結果、小胞体ストレスが惹起され、インスリン分泌能が低下する。さらに高脂膳食負荷などの環境要因が加わると、糖尿病を発症することをCDKAL1欠損マウスで明らかにした [J Clin Invest 121, 3598 (2011)]。また、CDKAL1のSNPsはイントロンに存在するが、イントロンSNPが、なぜCDKAL1によるチオメチル化修飾低下を引き起こすか、そのユニークな分子機構を突き止めた [Hum Mol Genet 23, 4639 (2014)]。我々は、Cdkal1欠損マウスに高脂膳食を20週間以上与えると、下肢の感覚運動神経障害が頻発(38.6%)することを見出した。一方、野生型マウスは同様の症状を全く示さなかった。

DNの分子機構として現在有力な説は、右図に示すような機構である。持続的高血糖により、酸化ストレス(ROS)の上昇、小胞体ストレスの上昇、ならびに神経栄養因子の低下が起こり、その結果、神経障害を引き起こすという説である。しかし、ROS、小胞体ストレス、神経栄養因子の低下のそれぞれがどのように関連しているのか、この3つの要因の相互関係が不明であり、あくまでも有力な仮説の域を出ていない。近年、DNに対するNGFの第3相臨床試験が実施されたが、無効であるとの結果であった [JAMA 284, 2215 (2000); Int Rev Neurobiol 50, 393 (2002)]。本臨床試験の

結果、NGFでは末梢神経への到達が困難であるため、詳細な発症機構を解明し新たな創薬開発すべきであると結論されている。

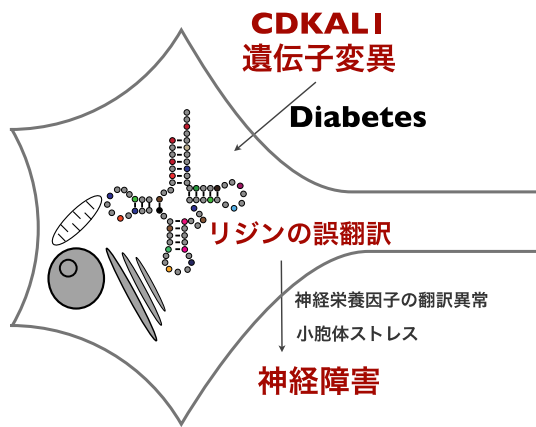


我々は、CDKAL1欠損マウスの表現系から、CDKAL1は、この3つの因子を繋ぐ重要な分子であるとの着想に至った。CDKAL1の活性中心は、システイン側鎖から伸びた[Fe<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>]が正六面体を形成している。この構造が崩れると活性を失う。システイン、鉄、硫黄は容易に酸化されるため、CDKAL1は生体内で、酸化ストレスに最も弱い分子の一つである。また、神経栄養因子群は、プロインスリン同様リジンで切断され、神経終末より放出される。すなわち、ROSによりCDKAL1の活性が低下し、tRNA<sup>Lys</sup>のチオメチル化修飾が低下する。そのため、神経栄養因子のリジン翻訳時に誤翻訳が生じやすくなる。その結果、プロセッシングを受けない異常な神経栄養因子が末梢神経に蓄積し、それが神経変性を引き起こすのではないかと仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究では、上述の仮説(右図のスキーム)を立証するために以下の研究を実施した。  
(1) Cdkal1欠損マウスの表現型解析…全身性Cdkal1欠損マウスと腭細胞特異的Cdkal1欠損マウスのいずれのマウスも高脂膳食を負荷すると高血糖を呈する。そこで高血糖のみがDNの原因か、それともCdkal1の欠損がDNを誘発する重要な要因であるか明らかにすることを目的とし、両マウスの末梢神経機能について比較検討した。

(2) 糖尿病性神経障害の分子機構の解明…Cdkal1欠損マウスを用いて、DNの分子機構を明らかにする。とくに、DNがCdkal1機能欠損神経栄養因子のプロセッシング異常、小胞体ストレスの惹起、末梢神経の変性という発症機構で起こるのか検証した(次頁図)。



### 3. 研究の方法

#### (1) Cdkal1 欠損マウスの感覚神経機能の評価

全身性 Cdkal1 欠損マウス、腓 細胞特異的 Cdkal1 欠損マウスおよび野生型マウスの感覚神経機能を比較するため、8 週齢と 22 週齢のマウスを用いて以下の試験を実施した。

) Von Frey 試験: マウスの触圧覚を検討するために、各マウスの後肢足底を 0.4g~4.0g の荷重がかかるように細いチップで刺激し、後肢の逃避行動を観察した。

) アセトンテスト: マウスの温度覚を検討するために、前肢の皮膚にアセトンを滴下し、逃避行動を解析した。

) ホットプレート試験: マウスの熱感覚を検討するために、48°C~58°C に設定したプレートにマウスを置き、疼痛関連行動までの潜伏時間を測定し、感受性を検討した。

) Pin Prick 試験: マウスの痛覚を検討するために、32 ゲージ針でマウス後肢足底を穿刺し、後肢逃避行動について検討した。

#### (2) 糖尿病性神経障害の分子機構の解明

) 足底部皮下末梢神経線維免疫染色: 全身性 Cdkal1 欠損マウス、腓 細胞特異的 Cdkal1 欠損マウスおよび野生型マウスの末梢感覚神経の脱落について比較検討するため、末梢小径線維のマーカである PGD9.5 と感覚神経 A 線維ならびに C 線維マーカである CGRP の抗体で足底部皮下組織の免疫染色を行った。

) 脊髄後根神経節の免疫染色: 全身性 Cdkal1 欠損マウス、腓 細胞特異的 Cdkal1 欠損マウスおよび野生型マウスの脊髄後根神経節の脱落について比較検討するため、感覚神経細胞のマーカである CGRP と有髄線維マーカである NF200 の抗体でマウス脊髄の免疫染色を行った。

) 脊髄後根神経節の BDNF 量の検討:

Cdkal1 欠損マウス、腓 細胞特異的 Cdkal1 欠損マウスおよび野生型マウスの脊髄後根神経節における BDNF 量を比較するため、抗 BDNF 抗体でマウス脊髄後根神経節の免疫染色を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) Cdkal1 欠損マウスの感覚神経機能の評価

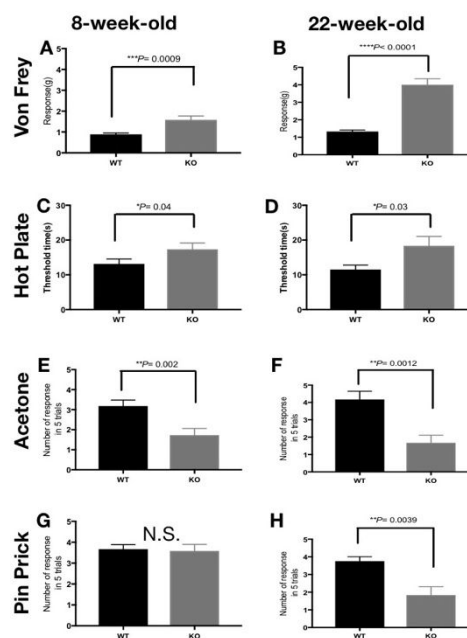
) Von Frey 試験: 全身性 Cdkal1 欠損マウスでは、8 週齢および 22 週齢の両週齢において、野生型マウスと比較して、有意に逃避反応が鈍麻していた。一方、腓 細胞特異的 Cdkal1 欠損マウスの触覚感覚は、コントロールマウスと差はなかった(下図)。

) アセトンテスト: 全身性 Cdkal1 欠損マウスでは、8 週齢および 22 週齢の両週齢において、野生型マウスと比較して、有意に温度感覚が鈍麻していた。一方、腓 細胞特異的 Cdkal1 欠損マウスの温度感覚は、コントロールマウスと差はなかった(下図)。

) ホットプレート試験: 全身性 Cdkal1 欠損マウスでは、8 週齢および 22 週齢の両週齢において、野生型マウスと比較して、有意に熱感覚が鈍麻していた。一方、腓 細胞特異的 Cdkal1 欠損マウスの熱感覚は、コントロールマウスと差はなかった(下図)。

) Pin Prick 試験: 全身性 Cdkal1 欠損マウスでは、22 週齢のマウスにおいて、野生型マウスと比較して痛覚が鈍麻していた。一方、腓 細胞特異的 Cdkal1 欠損マウスの痛覚は、コントロールマウスと差はなかった(下図)。

#### 野生型マウス(WT)と全身性Cdkal1(KO)欠損マウス



腓 細胞特異的 Cdkal1 マウスでは、感覚異常は認められなかったが、全身性 Cdkal1

欠損マウスでは、すべての感覚試験において感覚鈍麻が認められた。このことから、高血糖状態が持続するだけではDNは生じず、末梢神経におけるCdkal1欠損があるとDNが誘発されることが明らかになった。

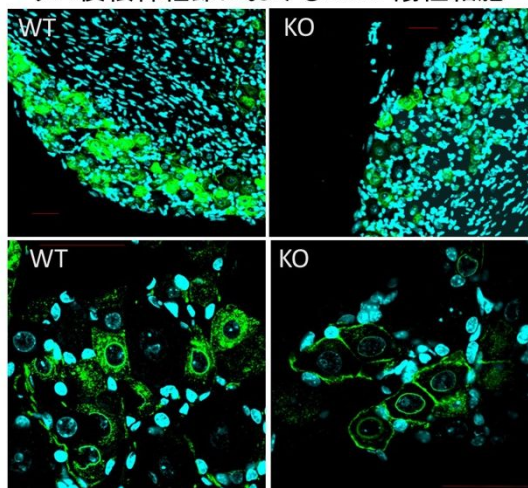
#### (2) 糖尿病性神経障害の分子機構の解明

) 足底部皮下末梢神経線維免疫染色: 全身性Cdkal1欠損マウスの足底部皮下において、PGP9.5およびCGRP陽性細胞が、野生型マウスと比較して、有意に減少していた。一方、腓細胞特異的Cdkal1欠損マウスのPGP9.5およびCGRP陽性細胞数は、コントロールマウスと同じであった。

) 脊髄後根神経節の免疫染色: 全身性Cdkal1欠損マウスの脊髄後根神経節では、CGRP陽性細胞数が野生型マウスと比較して、有意に減少していた。一方、NF200陽性細胞数は、Cdkal1欠損マウスと野生型マウスでは、有意差は認められなかった。腓細胞特異的Cdkal1欠損マウスのNF200およびCGRP陽性細胞数は、コントロールマウスと同じであった。

) 脊髄後根神経節のBDNF量の検討: Cdkal1欠損マウスの脊髄後根神経節では、BDNF陽性細胞数が野生型マウスと比較して、有意に減少していた(下図)。一方、腓細胞特異的Cdkal1欠損マウスのBDNF陽性細胞数は、コントロールマウスと同じであった。

全身性Cdkal1KOマウスおよび野生型マウス後根神経節におけるBDNF陽性細胞



以上の結果より、後根神経節においてCdkal1が欠損すると、BDNF翻訳時に誤翻訳が生じ、その結果、BDNF量が減少す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)

Lamichhane, T., Arimbasseri, A., Rijal, K., Iben, J.R., Wei, F.-Y., Tomizawa, K. and

Maraia, R.J. Lack of tRNA-i6A37 modification causes mitochondrial-like metabolic deficiency in *S. pombe* by limiting activity of cytosolic tRNA<sup>Tyr</sup>, not mito-tRNA. *RNA* 22, 583-596, (2016). 査読有

DOI: 10.1261/rna.054064.115.

Arimbasseri, A.G., Iben, J.R., Wei, F.-Y., Rijal, K., Tomizawa, K., Hafner, M., and Maraia, R.J. Evolving specificity of tRNA 3-methyl-cytidine -32 (m3C32) modification: a subset of tRNAs<sup>Ser</sup> require isopentenylolation of A37. *RNA* 22, 1400-1410, (2016). 査読有

DOI: 10.1261/rna.056259.116.

Takahashi, N., Wei, F.-Y., Watanabe, S., Hirayama, M., Ohuchi, Y., Fujimura, A., Kaitsuka, T., Sawa, T., Nakayama, H., Akaike, T. and Tomizawa, K. Reactive sulfur species regulate tRNA methylthiolation and contribute to insulin secretion. *Nucl. Acid Res.* 45, 435-445, (2017). 査読有

DOI: 10.1093/nar/gkw745.

Fakruddin M, Wei FY, Emura S, Matsuda S, Yasukawa T, Kang D, and Tomizawa K. Cdk5rap1-mediated 2-methylthio-N6-isopentenyladenosine modification is absent from nuclear-derived RNA species. *Nucleic Acids Res.* 45(20):11954-11961 (2017). 査読有

DOI: 10.1093/nar/gkx819.

Fakruddin M, Wei FY, Suzuki T, Asano K, Kaieda T, Omori A, Izumi R, Fujimura A, Kaitsuka T, Miyata K, Araki K, Oike Y, Scorrano L, Suzuki T, Tomizawa K. Defective mitochondrial tRNA taurine modification activates global proteostress and leads to mitochondrial disease. *Cell Rep.* 22(2):482-496 (2018). 査読有

DOI: 10.1016/j.celrep.2017.12.051.

[学会発表](計 2件)

榊田光琳、魏 范研、富澤一仁. tRNA修飾異常による神経障害の分子機構に関する研究. 第68回西日本生理学会大会(口演発表)(国内学会:福岡) 2017年10月6日

榊田光琳、魏 范研、富澤一仁. tRNA修飾異常による糖尿病性神経障害の分子機構に関する研究. 第95回日本生理学会大会(ポスター発表)(国内学会:高松) 2018年3月30日.

[図書](計 0件)

(産業財産権)

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

(その他)

ホームページ:

<http://kumamoto-physiology.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

富澤 一仁(TOMIZAWA, Kazuhito)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 40274287

### (2) 研究分担者

該当無し

### (3) 連携研究者

荒木 栄一(ARAKI, Eiichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 10253733

宇宿 功市郎(USUKU, Koichiro)

熊本大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 30281223

角間 辰之(KAKUMA, Tatsuyuki)

久留米大学・バイオ統計センター・教授

研究者番号: 50341540

魏 范研(WEI, Fan-Yan)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号: 90555773

### (4) 研究協力者

該当無し