

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03733

研究課題名(和文)糖脂肪毒性下の膵島ミトコンドリア機能障害・炎症の病態解明と治療法の創出

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenesis and treatment of islet mitochondrial dysfunction and inflammation under glucolipotoxicity

研究代表者

寺内 康夫 (TERAUCHI, Yasuo)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：40359609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性的なグルコキナーゼ活性化により発現が上昇する膵島の分子群を同定した。その中にバルミチン酸刺激でも発現が上昇するUncoupling protein 2 (UCP2)とS100 calcium-binding protein A8 (S100A8)があり、糖毒性と脂肪毒性の両者で共通して上昇する分子として注目し、UCP2およびAldolase Bによるインスリン分泌制御機構を解明した。マウス腹腔内に組み換えS100A8タンパクを投与したところ、LPSによる敗血症性ショックを抑制した。膵細胞や多臓器におけるS100A8とLPS、TLR4との相互作用を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

UCP2はミトコンドリアタンパクであり、ミトコンドリア機能障害に関与し、S100A8はマクロファージ等との細胞間相互作用を介して膵島炎症を引き起こす。現在市販されている経口血糖治療薬のうち、膵細胞のミトコンドリアや炎症を直接標的とする薬剤は少ない。本研究で得られた知見は、ミトコンドリアや膵島炎症を標的とした新たな糖尿病治療法の開発へ応用できる。実際、私たちはUCP2やAldBが膵細胞機能や量に及ぼす影響とその詳細な分子機構に基づき、生体内で健康的に機能的な膵細胞量を増大させる「膵細胞のhealthy expansion」を目指した研究を発展的に展開している。

研究成果の概要(英文)：Uncoupling protein 2 (UCP2), a mitochondrial protein, is known to be upregulated in pancreatic islets of patients with type 2 diabetes (T2DM). We here highlighted the molecular link between the increase in UCP2 expression in beta-cells and beta-cell failure by using genetically engineered mice and human islets. Beta-cell-specific UCP2-overexpressing transgenic mice (bUCP2Tg) exhibited glucose intolerance and a reduction in insulin secretion. Decreased mitochondrial function and increased aldolase B (AldB) expression through oxidative-stress mediated pathway were observed in bUCP2Tg islets. Our findings provide a new mechanism of beta-cell dysfunction by UCP2 and AldB.

Obesity and diabetes are independent risk factors for death during sepsis. S100A8, an alarmin, is related to inflammation, obesity, and diabetes. We now revealed the role of S100A8 in sepsis of obesity and diabetes models.

研究分野：内分泌・代謝学

キーワード：膵細胞 ミトコンドリア 膵島 インスリン UCP2 Aldolase B S100A8 TLR4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は肥満によるインスリン抵抗性と、膵細胞機能低下(インスリン分泌低下)により発症し、日本人は欧米人に比べインスリン分泌能が低く、膵細胞機能低下の病態形成における寄与が大きい。我々は、グルコキナーゼを介した膵細胞機能の制御機構を明らかにしてきた。膵細胞におけるグルコキナーゼの活性化は、短期的にはインスリン分泌促進、膵細胞増殖、小胞体ストレスからの保護に作用するが、慢性的な活性化による酸化ストレスを介したアポトーシスの誘導がこれまで詳細に解析され報告されている。すなわち、グルコキナーゼの慢性活性化は、高グルコースによる glucotoxicity のモデルとなる。我々は、膵島における慢性的なグルコキナーゼの活性化により発現上昇する分子群を同定し報告してきた (*Diabetes*, 2013 Oct;62(10):3448-58)。

糖尿病状態に伴う慢性の高血糖による glucotoxicity と遊離脂肪酸による lipotoxicity の組み合わせによる glucolipotoxicity が膵細胞機能障害の主な原因の1つである。我々は、glucotoxicity を模倣した慢性のグルコース刺激と lipotoxicity を模倣した遊離脂肪酸であるパルミチン酸刺激の両者において共通して膵細胞で発現上昇する分子として、ミトコンドリア脱共役蛋白の Uncoupling protein 2 (UCP2) と DAMPs (damage-associated molecular pattern molecules) である S100 calcium-binding protein A8 (S100A8) の2つの分子を同定した。UCP2 は膵細胞に発現しており、ヒト2型糖尿病患者の膵島で発現が上昇している (*Diabetologia*, 2005)。UCP2 はミトコンドリアの電子伝達系で生じたプロトンの勾配を短絡し、ATP 産生を行う前に熱として放散する役割を持つが、2型糖尿病患者における膵島 UCP2 発現上昇の意義は未だに不明な点が多い。また我々は、単離膵島とマクロファージの共培養系で、S100A8 がマクロファージと相互作用し、膵島炎症を介して膵細胞アポトーシスを誘導することを報告した (図1) (*J Biol Chem*, 293(16) 5934-5946, 2018)。しかし、膵細胞で誘導される S100A8 の生体での役割や治療への応用可能性は不明であった。

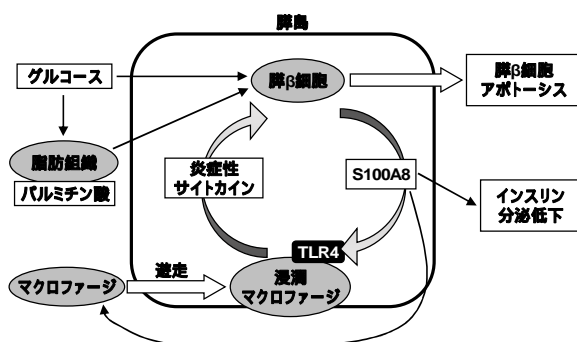


図1: 糖尿病では、高血糖によるグルコース刺激、内臓脂肪肥大による遊離脂肪酸刺激、膵島へのマクロファージ浸潤が生じ、これらの組み合わせにより TLR4 に非依存的に膵β細胞で S100A8 が誘導される。膵β細胞由来の S100A8 は、TLR4 を介してマクロファージを活性化することにより炎症性サイトカイン産生を誘導し、膵β細胞障害を引き起こすという悪循環を形成する。 *J Biol Chem*, 293(16) 5934-5946, 2018.より引用改変

2. 研究の目的

本研究では、膵細胞の glucolipotoxicity における UCP2 過剰発現および S100A8 発現誘導の生体内における影響をより詳細に解析し、2型糖尿病における UCP2 および S100A8 の病態生理学的な役割を明らかにし、UCP2 および S100A8 を標的とした glucolipotoxicity から膵細胞量を保護する糖尿病治療への応用が可能かどうかを明らかにすることを目的とした。

本研究において、我々は UCP2 で発現上昇する標的分子を同定したが、興味深いことにアルドラーゼ B (AldB) などの膵細胞での disallowed genes が含まれており、その機能は不明である。したがって、UCP2 発現上昇による膵細胞障害の機序を明らかにすることは、2型糖尿病の glucolipotoxicity による病態形成におけ

る分子基盤の解明につながり、広く治療に応用できる可能性がある。さらに、UCP2には膵外作用として、血管内皮細胞において酸化ストレスを軽減するという報告があり、糖尿病合併症である動脈硬化性病変の発症や進展を抑制する可能性も期待できる。

病理学的に認められる糖尿病状態での膵島へのマクロファージ浸潤及び膵島の内在性マクロファージ(レジデントマクロファージ)の意義は不明な点が多いが、S100A8は膵島へのマクロファージ浸潤および活性化に関与しており、glucolipotoxicityと膵島マクロファージを結びつける研究に位置づけられる。また、S100A8を中心としたDAMPsは、糖尿病だけでなく肥満、動脈硬化、乾癬等の皮膚疾患、自己免疫疾患、悪性腫瘍とも深く関与しており、S100A8の機能解明は、糖尿病に伴う合併症、とくに悪性腫瘍や皮膚病変の病態機序解明や治療法開発への応用にも寄与することが期待される。

UCP2はミトコンドリアタンパクであり、ミトコンドリア機能障害に関与し、S100A8はマクロファージ等との細胞間相互作用を介して膵島炎症を引き起こすことを明らかにしている。現在市販されている経口血糖治療薬のうち、膵細胞のミトコンドリアや炎症を直接標的とする薬剤は少ない。本研究で得られる知見は、ミトコンドリアや膵島炎症を標的とした新たな糖尿病治療法の開発へ応用できる。

3. 研究の方法

(1) 膵細胞におけるUCP2とS100A8の発現制御機構の解明

UCP2およびS100A8ともに慢性のグルコース刺激やパルミチン酸刺激で膵細胞での発現が誘導されることを明らかにしてきたが、マウス単離膵島および膵細胞株を用いて、glucolipotoxicityにおけるUCP2とS100A8発現の制御機構を解析する。UCP2の発現制御につき、プロモーター領域の転写因子結合領域から候補因子を解析し、ChIPアッセイで検証する。

高脂肪食等による肥満状態における腸内細菌叢のうち、膵細胞でS100A8を誘導する分子について、腸内細菌叢のメタボロミクスを、GC-MSおよびLC-MSを用いて解析する。

(2) UCP2によるA1dBを介した膵細胞障害機構の解明

独自に膵細胞特異的UCP2過剰発現マウス(UCP2Tg)を樹立し、その表現型を解析する。

A1dBの膵細胞での過剰発現によってもインスリン分泌低下が起こるか検証する。アルドラーゼBは解糖系酵素であり、UCP2と同様にATP産生に関与している可能性を考え、細胞外フラックスアナライザーを用いてUCP2Tgと野生型マウスの膵島における酸素消費速度や細胞外pHの測定を実施する。またミトコンドリアの形態異常から、UCP2やA1dBがミトコンドリアの選択的オートファジー(マイトファジー)に影響を与えている可能性を考慮し、膵島におけるマイトファジー関連タンパク質の発現や局在を評価する。

カルシウムイメージングや薬理学的手法により、UCP2やA1dBの過剰発現が小胞体からのカルシウム流入によるインスリン分泌に関与しているか検証する。UCP2やA1dBによるSOCE(store-operated Ca^{2+} entry)を介したインスリン分泌制御機構に関しても検証する。

(3) S100A8を標的とした膵島炎症制御による膵細胞保護の解析

膵細胞特異的S100A8欠損マウス(S100A8K0)を樹立し、その表現型を解析する。また、S100A8K0:db/dbマウスも作製し、膵島炎症の解析を進める。さらに、単球・マクロファージ系でS100A8を欠損するLyz2-cre:S100A8K0マウスも樹立し、その表現型を解析する。

膵島以外の臓器でのS100A8とマクロファージとの相互作用を解析することで、膵島炎症の本質に迫る。

(4) ヒト膵島におけるUCP2とS100A8の機能解析および治療法開発

これまで UCP2 と AldB は、2 型糖尿病のヒト膵島で発現が上昇し膵 細胞機能障害に関与していることが報告されている (*J Clin Endocrinol Metab.* 2018)。また我々は、ヒト膵島でも glucolipotoxicity でも S100A8 が誘導され、S100A8 中和抗体により、ヒト膵 細胞のアポトーシスを抑制されることを示してきた (*J Biol Chem.* 2018)。我々は、健康人ドナーおよび 2 型糖尿病ドナー由来のヒト膵島の解析系を確立しており、アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターを用いて、ヒト膵島由来の膵 細胞での UCP2 および S100A8 の過剰発現およびノックダウンを行い、インスリン分泌および膵 細胞増殖・アポトーシス、遺伝子発現を評価する。さらに、健康者および 2 型糖尿病ドナー由来の膵島での比較も行い、病態だけでなく糖尿病患者膵 細胞における治療の可能性を探る。

我々は、膵 細胞特異的にルシフェラーゼを発現する、光イメージングで膵 細胞量が解析可能なマウス (*Ins1-cre:Rosa26-Luc*) を作製した。このマウスの単離膵島を 96well プレート上で培養し、グルコースや遊離脂肪酸で刺激し発光の増加を検出することにより、天然化合物ライブラリーのスクリーニングを行う。

今後、本研究で同定した UCP2 や S100A8 の制御に関わる分子のプロモーター下でルシフェラーゼを発現する光イメージングが可能なマウスも作成を検討する。これらのマウスの膵島を、天然物ライブラリーを吸着した 96well プレート (東大創薬機構との共同研究や企業から購入を予定) 上で培養し、蛍光プレートリーダーを用いたハイスループットスクリーニングにより、glucolipotoxicity に対する膵 細胞治療薬のリード化合物の同定を行い、in vivo イメージングでも検証する。

4. 研究成果

UCP2 や AldB による SOCE (store-operated Ca^{2+} entry) を介したインスリン分泌制御機構に関して検証し、論文化した。S100A8 は LPS 等のエンドトキシンと相互作用する可能性が示唆され、膵 細胞や多臓器における LPS や TLR4 との相互作用を解析し、論文化した。以下、具体的なデータを提示する。

(1) 膵 細胞におけるUCP2とS100A8の発現制御機構の解明

UCP2 および S100A8 とともに慢性のグルコース刺激やパルミチン酸刺激で膵 細胞での発現が誘導されることを明らかにしてきた。これまでの各種キナーゼ阻害剤や ShRNA を用いた検討より、glucotoxicity ではカルシニューリンを介したシグナルが、lipotoxicity では ERK を介したシグナルが両者の発現に関与し、S100A8 は炎症性サイトカインである IL-1 の刺激が重要であることを明らかにした。UCP2 は、IRS2 欠損マウス膵島や IRS2 過剰発現膵島の検討から、IRS2 を介したインスリンシグナルにより発現が負に制御されており、glucolipotoxicity によるインスリンシグナル抑制が UCP2 発現上昇につながることを見出した。

肥満糖尿病モデルマウスの腸内細菌叢が、膵島の ERK を抑制し高血糖による S100A8 の発現を促進することを見出し、in vivo での抗生物質投与や便移植により、サイトカインのマルチプレックスパネルアッセイを用いて検証していく。

(2) UCP2によるAldBを介した膵 細胞障害機構の解明

膵 細胞特異的 UCP2 過剰発現マウス (UCP2Tg) はグルコース応答性インスリン分泌の低下による耐糖能障害を呈した。UCP2Tg の膵島においてミトコンドリア電子伝達系 Complex I の蛋白発現が低下していること、電子顕微鏡下にて、UCP2Tg の 細胞ではミトコンドリアの肥大とクリステの菲薄化を認めること、

単離膵島の遺伝子発現マイクロアレイにおいて、disallowed genes のアルドラーゼ B が約 70 倍まで発現上昇していることを見出した。

AldB の膵細胞での過剰発現によってもインスリン分泌低下が起こり、2 型糖尿病での UCP2 発現上昇は、glucolipotoxicity により誘導され、AldB を介していることが示唆された。アルドラーゼ B は解糖系酵素であり、UCP2 と同様に ATP 産生に関与している可能性を考え、現在、細胞外フラックスアナライザーを用いて UCP2Tg と野生型マウスの膵島における酸素消費速度や細胞外 pH の測定を検討している。またミトコンドリアの形態異常から、UCP2 や AldB がミトコンドリアの選択的オートファジー（マイトファジー）に影響を与えている可能性を考慮し、膵島におけるマイトファジー関連タンパク質の発現や局在を評価していく。現在、UCP2Tg マウスの膵島で、マイトファジーに関与する Parkin の発現が有意に低下することを確認しており、今後タイムラプス顕微鏡での解析を行っていく。

カルシウムイメージングにより、UCP2 や AldB の過剰発現が小胞体からのカルシウム流入によりインスリン分泌に関与していることも突き止めた。UCP2 や AldB の過剰発現は、GPR40 アゴニストによるインスリン分泌増強が低下していた。

UCP2Tg 膵島では小胞体からの細胞内カルシウム濃度上昇が抑制されており、また、AldB 過剰発現膵島においても小胞体からの細胞内カルシウム濃度上昇が抑制されていたこと、UCP2 過剰発現膵細胞では GPR40 作動薬による小胞体カルシウム濃度変化が消失したことより、UCP2 や AldB が SOCE を介したインスリン分泌制御機構を障害することと結論した。

（ 3 ） S100A8 を標的とした膵島炎症制御による膵細胞保護の解析

現在我々は、独自に膵細胞特異的 S100A8 欠損マウス（ S100A8KO ）を樹立し、glucolipotoxicity が膵島で誘導されるモデルである長期高脂肪食負荷で耐糖能が改善することを見出した。

単球・マクロファージ系で S100A8 を欠損する Lyz2-cre:S100A8KO マウスも樹立したが、このマウスでは高脂肪食負荷で耐糖能は障害されず、マクロファージではなく、膵細胞の S100A8 が膵島炎症に重要であることが明らかにした。

S100A8KO : db/db マウスも作製し、膵島炎症の解析を進めている。また、膵島内マクロファージが外来性か内在性かについて、フローサイトメーターによる表面マーカーの解析も進めており、膵島の glucolipotoxicity に関与するマクロファージの由来を探る。

組み換え S100A8 タンパクを大腸菌に発現させ精製し、マクロファージを刺激すると、TLR4 欠損マウスのマクロファージにより完全に消失していた。これより、TLR4 のリガンドである LPS と TLR4 は同様の作用があると想定された。そこで、マウス腹腔内に組み換え S100A8 タンパクを投与したところ、想定外に LPS による敗血症性ショックを抑制した。すなわち、S100A8 は LPS 等のエンドトキシンと相互作用する可能性が示唆された。

（ 4 ） ヒト膵島における UCP2 と S100A8 の機能解析および治療法開発

我々は、健康人ドナーおよび 2 型糖尿病ドナー由来のヒト膵島の解析系を確立しており、アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターを用いて、ヒト膵島由来の膵細胞での UCP2 および S100A8 の過剰発現およびノックダウンを行い、インスリン分泌および膵細胞増殖・アポトーシス、遺伝子発現を評価した。さらに、健康者および 2 型糖尿病ドナー由来の膵島での比較も行ったところ、マウス膵島とヒト膵島で同様の所見を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Inoue R, Tsuno T, Togashi Y, Okuyama T, Sato A, Nishiyama K, Kyohara M, Li J, Fukushima S, Kin T, Miyashita D, Shiba Y, Atobe Y, Kiyonari H, Bando K, Shapiro AMJ, Funakoshi K, Kulkarni RN, Terauchi Y, Shirakawa J.	4. 巻 25(7)
2. 論文標題 Uncoupling protein 2 and aldolase B impact insulin release by modulating mitochondrial function and Ca ²⁺ release from the ER.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104603, 1-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104603	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 Miyashita D, Inoue R, Tsuno T, Okuyama T, Kyohara M, Nakahashi-Oda C, Nishiyama K, Fukushima S, Inada Y, Togashi Y, Shibuya A, Terauchi Y, Shirakawa J.	4. 巻 25(12)
2. 論文標題 Protective effects of S100A8 on sepsis mortality: Links to sepsis risk in obesity and diabetes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105662, 1-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105662	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 Shirakawa J, Togashi Y, Basile G, Okuyama T, Inoue R, Fernandez M, Kyohara M, De Jesus DF, Goto N, Zhang W, Tsuno T, Kin T, Pan H, Dreyfuss JM, Shapiro AMJ, Yi P, Terauchi Y, Kulkarni RN.	4. 巻 41(1)
2. 論文標題 E2F1 transcription factor mediates a link between fat and islets to promote cell proliferation in response to acute insulin resistance.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 111436, 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111436.	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

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 9件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 白川 純
2. 発表標題 ヒトの膵 細胞量増大による糖尿病治療を目指した基礎的研究
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会 リリー賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺内康夫
2. 発表標題 代謝を標的とした内科疾患の治療戦略（内分泌・代謝）
3. 学会等名 第118回日本内科学会総会・講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上亮太、寺内康夫、白川 純
2. 発表標題 ヒト膵島における UCP2 およびアルドラーゼ B がインスリン分泌に与える影響の検討
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 寺内康夫
2. 発表標題 糖尿病集学的治療について
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白川 純
2. 発表標題 グルコースシグナルを介した膵 細胞機能調節機構の解明
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺内康夫
2. 発表標題 2型糖尿病治療におけるGLP-1受容体作動薬の位置づけ
3. 学会等名 第54回糖尿病学の進歩（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺内康夫
2. 発表標題 糖尿病の薬剤選択
3. 学会等名 2020年度日本内科学会生涯教育講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺内康夫
2. 発表標題 糖尿病治療の最前線 ～ 発症予防と早期マネジメント～
3. 学会等名 第34回日本エイズ学会学術集会・総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miyashita Daisuke, Terauchi Yasuo, Shirakawa Jun
2. 発表標題 S100A8 Suppresses Beta-Cell Proliferation in Diet-Induced Obese Mice
3. 学会等名 80th ADA annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺内康夫
2. 発表標題 遺伝子改変動物を用いた糖尿病・代謝疾患の病態の解明と治療法の創出（米田賞受賞講演）
3. 学会等名 第35回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺内康夫
2. 発表標題 「合併症予防を見据えて糖尿病治療薬をどのように使い分けるか？」DPP-4阻害薬
3. 学会等名 第37回日本糖尿病合併症学会（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

横浜市立大学 内分泌・糖尿病内科 http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~nai3naib/wp/

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	富樫 優 (Togashi Yu) (10710444)	横浜市立大学・医学部・講師 (22701)	

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	白川 純 (Shirakawa Jun) (70625532)	横浜市立大学・医学研究科・客員教授 (22701)	

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			
カナダ	University of Alberta			
米国	Joslin Diabetes Center			