

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K11119

研究課題名(和文) 2型糖尿病個別化療法の確立を目指した糖尿病における分化転換の分子基盤の研究

研究課題名(英文) Molecular basis of transdifferentiation mechanism in type 2 diabetes mellitus ~ for establishment of personalized therapy for type 2 diabetes~

研究代表者

沖田 直之 (OKITA, Naoyuki)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・講師

研究者番号：60453841

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)：本申請課題では、2型糖尿病における細胞障害を研究対象とし、「分化転換の機能疲弊依存性」及び「分化転換の多様性」を明らかにすることで、糖尿病における細胞の分化転換の分子基盤を確立することを目的とし研究を進めた。マウス細胞株MIN6c4細胞の培養培地へ糖及び脂肪酸を添加し、急性ストレスおよび慢性ストレスの観点から各種解析を行なった結果、同一の過栄養ストレスであっても、急性ストレスと慢性ストレス下でのトランスクリプトームレベルでの遺伝子発現応答は異なるとの申請者の仮説を支持するデータを得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの当該分野での研究手法に一石を投じることが期待される。また、本研究の推進は、糖尿病研究における動物実験の代替方法の確立の側面も有することは時代の流れにも沿った研究であると言える。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we tried to establish the molecular basis of transdifferentiation of cells in type 2 diabetes mellitus by elucidating "dependency of functional exhaustion on transdifferentiation" and "versatility of transdifferentiation". MIN6c4 cells, a mouse pancreatic cell line, treated with high glucose and a certain type of fatty acid were subjected to various analysis from perspectives of acute or chronic stress. The most important result is data from transcriptome analysis which show differential expression pattern between acute and chronic stress.

研究分野：代謝ストレス応答

キーワード：2型糖尿病 膵島 分化転換 機能疲弊

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病発症における膵島機能低下の本質は、細胞の Insulin 分泌機能低下状態である「機能疲弊」と、それに続く細胞から非細胞への「分化転換」による機能的な細胞絶対数の低下による Insulin 分泌機能不全に集約される。例えば肥満時のような異常栄養環境は、細胞への高レベルの糖や脂肪酸等の過栄養ストレスの暴露を誘発し、直接的な細胞障害による機能疲弊のリスクファクターとなるのはこれまでの様々な先行研究より明らかとなっている。その一方、細胞の分化転換研究に関しては、少なくとも 2 型糖尿病患者の膵島において、分化転換現象は認められるが、現状現象論の報告の域を出ず、過栄養ストレスによる機能疲弊への依存性も含め、制御機構はほとんど分かっていない。

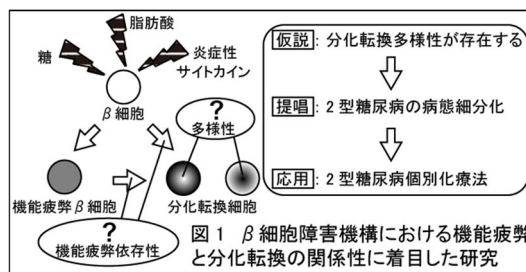


図 1 β 細胞障害機構における機能疲弊と分化転換の関係性に着目した研究

2. 研究の目的

本申請課題では、2 型糖尿病における細胞障害を研究対象とし、「分化転換の機能疲弊依存性」及び「分化転換の多様性」を明らかにすることで、糖尿病における細胞の分化転換の分子基盤を確立する。

3. 研究の方法

マウス細胞株 MIN6c4 細胞の培養培地へ糖及び脂肪酸を添加し、急性毒性および慢性毒性の観点から各種解析を行なった。

4. 研究成果

1) SAGE 解析

次世代シーケンサーを用いた SAGE 解析によって、糖及び脂肪酸の急性及び慢性毒性による遺伝子発現レベルの変動を解析し、主成分分析を行った結果、糖と脂肪酸による過栄養ストレスにおける急性毒性と慢性毒性下でのトランスクリプトームレベルでの遺伝子発現応答は異なるとの申請者の仮説を支持するデータを得ることができた。さらに、「急性あるいは慢性過栄養ストレス選択的に発現変動する遺伝子」の抽出が可能か検討した結果、網羅的遺伝子解析結果を対象とする主成分分析では、基本的には、急性と慢性応答で類似した変動をする遺伝子が抽出されてくることが多く、より精度よく「急性あるいは慢性過栄養ストレス選択的に発現変動する遺伝子」を抽出するには、何らかの「フィルター」を設定した上で、主成分分析を行う必要があることが示唆された。また、主成分分析にて慢性毒性処理における遺伝子発現変動として比較的大きな寄与が認められた 4 種類についてタンパク質発現量の解析を行い、おおよ同様の変動を示すことも確認することができた。

上記結果を受けて、急性毒性、慢性毒性の可逆性、可塑性をフィルターにできないかを検証すべく、急性毒性および慢性毒性群それぞれに対して、通常培地へのリリース群を準備し、トランスクリプトーム解析を行った。なお、培養系の不具合および、受託解析先の機器トラブルが重なり、トランスクリプトーム解析の結果が最終年度 3 月にまでずれ込んだため、現在詳細な結果は精査中である。

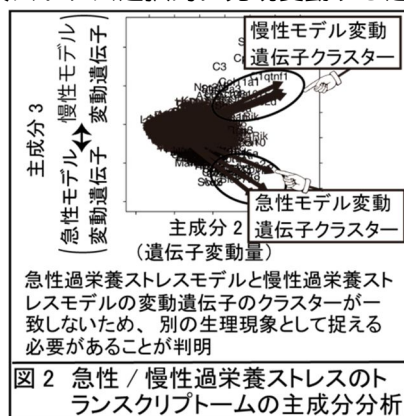


図 2 急性 / 慢性過栄養ストレスのトランスクリプトームの主成分分析

2) 細胞内 ATP/ADP レベルの検証

ATP/ADP レベルアッセイを行った結果、急性毒性群と慢性毒性群で、可逆性あるいは可塑性の観点から応答性が異なる可能性を示唆するデータを得た。

3) Insulin 分泌能

過栄養ストレス培養条件では、糖や脂肪酸自体が Insulin 分泌刺激作用を有するため、真の Insulin 分泌の潜在能力を評価するためには注意が必要である。そこで、Insulin flux を解析することで Insulin 分泌の潜在能力の評価を試みることにした。そこで、まずはどのタイプの Insulin 分泌阻害剤が使用に適しているかを検証するためにパイロット実験を行った。Insulin 分泌を阻害する薬剤として知られている KATP チャネル開放剤である diazoxide や Ca チャネル阻害剤である nifedipin 等を用いて Insulin 阻害効果の条件検討を始めた。その結果、

少なくとも通常培養培地での培養下では、上述の Insulin 分泌抑制効果を有する薬剤の効力が十分ではないことが明らかとなった。現在、その原因について検証している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Inouye Sachiye, Kubo Takanori, Miyamoto Takafumi, Iyoda Takuya, Okita Naoyuki, Akagi Reiko	4. 巻 27
2. 論文標題 Heat shock induced heme oxygenase 1 expression in a mouse hepatoma cell line is dependent on <sc>HSF1</sc> and modified by <sc>NRF2</sc> and <sc>BACH1</sc>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 719 ~ 730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12986	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 Tagawa Ryoma, Kobayashi Masaki, Sakurai Misako, Yoshida Maho, Kaneko Hiroki, Mizunoe Yuhei, Nozaki Yuka, Okita Naoyuki, Sudo Yuka, Higami Yoshikazu	4. 巻 23
2. 論文標題 Long-Term Dietary Taurine Lowers Plasma Levels of Cholesterol and Bile Acids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1793 ~ 1793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23031793	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 Mizunoe Yuhei, Kobayashi Masaki, Saito Hiroki, Goto Akifumi, Migitaka Ryota, Miura Kumi, Okita Naoyuki, Sudo Yuka, Tagawa Ryoma, Yoshida Miki, Umemori Ai, Nakagawa Yoshimi, Shimano Hitoshi, Higami Yoshikazu	4. 巻 154
2. 論文標題 Prolonged caloric restriction ameliorates age-related atrophy in slow and fast muscle fibers of rat soleus muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Gerontology	6. 最初と最後の頁 111519 ~ 111519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exger.2021.111519	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 Masaki, Yasukawa Hiromine, Arikawa Tomoya, Deguchi Yusuke, Mizushima Natsumi, Sakurai Misako, Onishi Shoichi, Tagawa Ryoma, Sudo Yuka, Okita Naoyuki, Higashi Kyohei, Higami Yoshikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Trehalose induces SQSTM1/p62 expression and enhances lysosomal activity and antioxidative capacity in adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 185 ~ 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13055	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 Kawahara Daisuke, Yamanouchi Kosho, Okita Naoyuki, Higami Yoshikazu, Inoue Yusuke, Ito Shinichiro, Hidaka Masaaki, Kanetaka Kengo, Fujita Fumihiko, Eguchi Susumu	4. 巻 25
2. 論文標題 Is PARP-1 Inhibitor (Nutlin3a) Effective on Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery, Gastroenterology and Oncology	6. 最初と最後の頁 189 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21614/sgo-25-4-189	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 Kobayashi Masaki, Ishizaki Yuka, Owaki Mika, Matsumoto Yoko, Kakiyama Yuri, Hoshino Shunsuke, Tagawa Ryoma, Sudo Yuka, Okita Naoyuki, Akimoto Kazunori, Higami Yoshikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Nutlin-3a suppresses poly (ADP-ribose) polymerase 1 by mechanisms different from conventional PARP1 suppressors in a human breast cancer cell line	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 1653 ~ 1665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27581	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 Hoshino Shunsuke, Kobayashi Masaki, Tagawa Ryoma, Konno Ryutaro, Abe Takuro, Furuya Kazuhiro, Miura Kumi, Wakasawa Hiroki, Okita Naoyuki, Sudo Yuka, Mizunoe Yuhei, Nakagawa Yoshimi, Nakamura Takeshi, Kawabe Hiroshi, Higami Yoshikazu	4. 巻 10
2. 論文標題 WWP1 knockout in mice exacerbates obesity related phenotypes in white adipose tissue but improves whole body glucose metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 306 ~ 315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12795	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 Mizunoe Yuhei, Kobayashi Masaki, Hoshino Shunsuke, Tagawa Ryoma, Itagawa Rei, Hoshino Ayana, Okita Naoyuki, Sudo Yuka, Nakagawa Yoshimi, Shimano Hitoshi, Higami Yoshikazu	4. 巻 10
2. 論文標題 Cathepsin B overexpression induces degradation of perilipin 1 to cause lipid metabolism dysfunction in adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57428-6	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 -

1. 著者名 Fujii Namiki, Uta Seira, Kobayashi Masaki, Sato Tsugumichi, Okita Naoyuki, Higami Yoshikazu	4. 巻 118
2. 論文標題 Impact of aging and caloric restriction on fibroblast growth factor 21 signaling in rat white adipose tissue	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Gerontology	6. 最初と最後の頁 55 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exger.2019.01.001	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 Masaki, Hoshino Shunsuke, Abe Takuro, Okita Naoyuki, Tagawa Ryoma, Nagai Wataru, Konno Ryutaro, Suzuki Yuki, Furuya Kazuhiro, Ishikawa Natsumi, Okado Hitoshi, Oku Misako, Iwamoto Machiko, Miura Yuri, Sudo Yuka, Higami Yoshikazu	4. 巻 508
2. 論文標題 Identification of WWP1 as an obesity-associated E3 ubiquitin ligase with a protective role against oxidative stress in adipocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 117 ~ 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.127	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 Sudo Yuka, Otsuka Hiroki, Miyakawa Ryota, Goto Akifumi, Kashiwase Yohei, Terawaki Kiyoshi, Miyano Kanako, Hirao Yuto, Taki Kanari, Tagawa Ryoma, Kobayashi Masaki, Okita Naoyuki, Uezono Yasuhito, Higami Yoshikazu	4. 巻 19
2. 論文標題 Differential Metabolic Responses to Adipose Atrophy Associated with Cancer Cachexia and Caloric Restriction in Rats and the Effect of Rikkunshito in Cancer Cachexia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3852 ~ 3852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19123852	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 Fujii Namiki, Uta Seira, Kobayashi Masaki, Sato Tsugumichi, Okita Naoyuki, Higami Yoshikazu	4. 巻 118
2. 論文標題 Impact of aging and caloric restriction on fibroblast growth factor 21 signaling in rat white adipose tissue	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Gerontology	6. 最初と最後の頁 55 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exger.2019.01.001	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 沖田直之	4. 巻 35
2. 論文標題 ウエスタンブロッティングの改変によるペプチドホルモンの分離検出	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 理大科学フォーラム	6. 最初と最後の頁 40-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 沖田直之、樋上賀一、深井文雄、小林正樹、御手洗光来、関谷剛男、佐々木敬
2. 発表標題 Western blottingのプロトコル改変による低分子量ペプチドの分離検出-糖尿病関連ペプチドホルモンを実施例として-
3. 学会等名 第60回日本生化学会中四国支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

教員紹介 <a href="http://www.socu.ac.jp/departments/faculty/naoyuki-okita.html">http://www.socu.ac.jp/departments/faculty/naoyuki-okita.html</a>
---

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	樋上 賀一  (HIGAMI Yoshikazu)  (90253640)	東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・教授    (32660)	

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	柴田 淳史  (SHIBATA Atsushi)  (30707633)	群馬大学・未来先端研究機構・准教授     (12301)	

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