

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07871

研究課題名（和文）臓器特異的な糖代謝異常を反映する分泌小胞内蛋白質の探索と体液診断への応用

研究課題名（英文）An exploratory study of extracellular proteins as novel markers of organ-specific glucose dysmetabolism.

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）：本研究は糖尿病などの糖代謝異常において、臓器毎の病態マーカーとなりえる分泌タンパク質を探索・同定を目的としている。具体的には、末梢のインスリン作用を担う骨格筋細胞や脂肪細胞に着目し、基礎的な検討を重ね、糖代謝変化と関連するタンパク質をいくつか同定することができた。今後はそれらと病態との結びつきについて深めていきたい。また、研究の過程で偶然、新規糖尿病治療薬イメグリミンの新たな末梢作用を発見し、検討を加えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ひとえに糖尿病といってもひとりひとりその成り立ちは異なっている。この研究ではそのような糖尿病の病状評価に役立つ臨床検査指標を創出するための基礎的な研究を行った。その結果、糖代謝に関わる骨格筋細胞や脂肪細胞の代謝変化と関連した新たな分泌タンパク質をいくつか同定することができた。さらに研究の過程で、偶然、新規糖尿病治療薬の新たな作用を発見することもできた。これらは将来の糖尿病医学に貢献する可能性を秘めた知見といえる。

研究成果の概要（英文）：This research aimed to explore the extracellular proteins in each organ that reflect glucose dysmetabolism for the application of laboratory testing. As a result, we obtained the list of such potential extracellular proteins in the skeletal muscle cells and adipocytes. In addition, we unexpectedly discovered that imeglimin, a novel oral anti-diabetic drug, facilitates glucose transport in adipocytes. These findings contribute to the pathogenesis of diabetes.

研究分野：代謝病学、糖尿病学、内科学、臨床検査医学

キーワード：糖代謝異常 分泌タンパク質 体液診断

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病の個別化医療を行うためには、臓器毎の病態評価が必要である

我が国における糖尿病有病者数はその可能性が否定できない人も含め約2,000万人と推定されている(H28年国民健康・栄養調査、厚生労働省)。このような数の多さに加え、2型糖尿病に代表される糖代謝異常の病態は各個人で異なることが臨床上の対応を複雑化させている。さらに糖尿病治療薬は注射薬も含め計9種類も上市されているが、使い分けのためには個々の病態理解が欠かせない。

糖代謝は膵臓や骨格筋、脂肪組織、肝臓、腎臓など数多くの臓器が緊密に連携しあいながら調節されている。そのうち膵β細胞はインスリン分泌能に関連し、その他の臓器はインスリン抵抗性に関連する。临床上、インスリン分泌能は簡便に評価できるが、多くの臓器が関係するインスリン抵抗性について、臓器毎の病態評価が可能な臨床ツールは得られていない。

(2) 細胞外分泌小胞内のタンパク質は臓器・細胞特異的分子マーカーとして期待される

細胞は径20~100 nmのエクソソームや径100 nm~1 μmのマイクロベジクルなどの小胞を分泌している。その中には様々な蛋白質や核酸、脂質などが含まれているが、これらの物質の構成はその由来する細胞の種類によって異なり、また病態に応じて変化すること(Biochem Biophys Acta 1859: 16-22, 2006)が知られている。そのような小胞内物質の中でも蛋白質は、①種類が多いこと、②細胞特異的に発現しているものも多いことを反映して小胞内の蛋白質も特異的なものが多いと推定されることから、臓器特異的マーカーの候補として有力な物質といえる。

2. 研究の目的

以上の背景をもとに、本研究では「細胞外分泌小胞内の物質の中でも蛋白質は、糖代謝異常を反映する臓器特異的な病態マーカーになり得るのではないか?」という学術的な問いを設定した。特異的な目的として、臓器・細胞特異的な糖代謝異常を反映する細胞外分泌小胞内蛋白質の探索、それに引きつづき臓器特異的な細胞外分泌小胞内蛋白質の動物実験を用いた評価、もし可能であれば、臨床検体を用いた病態マーカーとしての有用性の検証まで行うことを視野に入れた。

3. 研究の方法

(1) 概略

末梢の糖代謝に関わる臓器のモデルとして骨格筋細胞と脂肪細胞を用いた。それらに対して薬物的にインスリン抵抗性を引き起こし、細胞外分泌小胞を得る。分泌小胞はサイズによりエクソソームとマイクロベジクルに分離し、それぞれにおいて内包する蛋白質を抽出する。得られた蛋白質は二次元電気泳動にて分離し、コントロールと比較した上でマーカーとなりうるスポットを得る。これを質量分析にて解析し、マーカーとなる蛋白質を同定する。

(2) 培養細胞に糖代謝変化を惹起する

まず個々の臓器のモデルとしてC2C12骨格筋細胞や3T3-L1脂肪細胞を用いた。当初はセラミドによるインスリン抵抗性の惹起を諮ったが、セラミド自身がexosomeの分泌を促進するため、コントロールとの比較が難しかった。そこで視点を換え、インスリン抵抗性を改善する処置による変化を検討してみることにした。具体的には、これらの細胞にインスリン抵抗性改善薬メトホルミン(Sigma)や新規糖尿病治療薬イメグリミン(Sigma)を作用させ、培地を採取した。同時に、細胞からもRNAやタンパク質を抽出し、分子動態の詳細を検討するためのサンプルとした。

(3) 培地からexosomeを採取し、二次元電気泳動法にてタンパク質の検索・同定を行う

まず、前項で得た培地から浮遊物除去目的で遠心を行い、上清はさらに夾雑物の排除目的でシリンジフィルター(0.45 μm)処理を行った。次にサンプルを遠心濃縮チューブ(Vivaspin, Cytiva)にて数百μL程度まで濃縮し、サイズ排除法(EVsecond L 70, ジーエルサイエンス)にて分画に分けていった。各分画のそれぞれ一部分を用いて、CD9の存在を指標にwestern blot法によるexosome分画の確認を行った。それらexosome分画をタンパク質検討のためのサンプルとした。サンプル中のタンパク質はアルキル化を施し電気泳動に供した(EzApply 2D Kit, Atto)。また、exosomeを分離せずに培地からタンパク質を抽出する場合は、濃縮後にReadyPrep 2-D クリーンアップキット(BioRad)にて精製した(尚、これらの手順は、予備実験を繰り返し、必要なタンパク質の量やアルキル化の必要性などの検討を通じて確立した)。

サンプル中のタンパク質は一次元目の電気泳動を行った後(pH3-10, アガーゲル, Atto), 二次元電気泳動(10%ゲル, Atto)にて分離し、coomassie brilliant blue (Simply Blue Safe stain, ThermoFisher Scientific)あるいは銀染色(EzStain Silver, Atto)を施し、コント

ロールと処置群のスポットを比較した（微妙な染まりかたの違いによって比較が難しくなるため、数枚同時に染めて比較するようにした）。切り出したスポットはタンパク質抽出とそれに引き続く質量分析[MALDI-TOF/MS（Genomine社）あるいはnanoLC-MS/MS（日本プロテオミクス）]を通じて候補タンパク質の同定に供した。

(4) 同定されたタンパク質の検証

質量分析にてスポットに含まれる確率の高いタンパク質について、既製の抗体を購入し、western blot法にて実際の変化の確認を試みた。

4. 研究成果

(1) 骨格筋細胞を用いた解析

C2C12骨格筋細胞にインスリン抵抗性改善薬メトホルミンを作用させ、①分泌された exosome 中のタンパク質を解析した。加えて、比較のために②細胞内タンパク質を解析した。

① exosome 中のタンパク質の解析結果

メトホルミンで発現の目立つスポット5つをMALDI-TOF/MSにて解析し、タンパク質を同定した。そのうち1つは筋肉の構成タンパク myosin であったため特異性は見いだせないが、他の1つは小胞体に関連したタンパク質 (calreticulin)、残り3つはミトコンドリアの構成タンパク質 (Electron transfer flavoprotein subunit alpha, glutamine amidotransferase-like class 1 domain-containing protein 3A, superoxide dismutase Mn) であった。このうち2つに着目し、実際に糖代謝異常の病態変化を捉えるのかについて western blot 法を用いて検証したが、現時点で有意な変化は認めていない。しかし、western blot 法は感度や測定レンジの点で十分な評価ができていないとはいえず、今後はELISAなどの新たな測定系を構築し、精度の高い検証を行うことが必要であると考えた。

② 細胞内タンパク質の解析結果

メトホルミンで目立つ4つのスポットを検討し、3種類が同定できた。しかし、2つは tubulin や GAPDH であるため病態との関連は考えにくい。残りの1つは ATP synthase β (ATPB) であり、これはミトコンドリアで働く酵素である。この ATPB について、実際の発現変化を western blot 法にて確認しているが、メトホルミンで増加傾向を示している結果を示すこともあるが、繰り返して確かな再現性があるとも言えず、結論は持ち越されている。

(2) インスリン感受性改善薬イメグリミンの作用：脂肪細胞への新たな作用の発見

イメグリミンは膵 β 細胞、肝臓、骨格筋に作用することが報告されている新規糖尿病治療薬である。しかし、脂肪細胞に対する作用は知られていないため、試しに3T3-L1脂肪細胞に作用させてみたところ、メトホルミンで同様の処置をしてもみられない培地の色の変化が認められた。そのため、イメグリミンは脂肪細胞に何らかの作用を及ぼしているのではないかと考え、まず培地のグルコース濃度を測定した (GAGO20, Sigma)。その結果、グルコース濃度は低下しており、さらにイメグリミンの濃度を変えて実験を行ったところ、濃度依存性にグルコース濃度を低下させることがわかった。さらにイメグリミンは2-NBDGの取込みも増加させ、細胞膜の GLUT-4 タンパク発現も増加させた。以上のことから、イメグリミンが脂肪細胞の糖取り込みを促進するという新たな発見があった。

(3) 脂肪細胞を用いた解析

例) 二次元電気泳動と銀染色による蛋白質の分離

上記(2)に記載した通り、イメグリミンが脂肪細胞に対して糖代謝に変化を及ぼすことがわかったため、同時に病態マーカーとなり得る何らかのタンパク質が分泌されるのではないかと仮説を立て、検討を行った。具体的にはイメグリミンを作用させた培地を検体として、タンパク質を二次元電気泳動にて分離し、イメグリミンにて低下している可能性のあるスポットを質量分析にて解析した。その結果、そのスポット中のタンパク質はインスリン感受性に関連のある既知のアディポサイトカイン (fatty acid binding protein 4) やミトコンドリア内で働くはずのタンパク質



(Enoyl-CoA delta isomerase I) である可能性

が示唆された。このうちミトコンドリアタンパクに着目し、実際に糖代謝異常の病態変化を捉えるのかについて western blot 法を用いて検証を行っているが、現時点で有意な変化は認めていない。しかし、骨格筋における検討と同様に western blot 法は感度や測定レンジの点で十分な評価ができていないとはいえず、今後はELISAなどの新たな測定系を構築し、精度の高い検証を行うことが必要であると考えた。

(4) まとめ

以上のように、本研究を通じて骨格筋細胞や脂肪細胞における糖代謝変化の病態に関係した様々な分泌タンパクを同定することができた。その中にはミトコンドリアに関連したタンパク質の割合が多く、糖代謝とミトコンドリアとのinteraction、およびミトコンドリア成分の細胞外への分泌について興味を持たれた。一方、それら細胞外タンパク質の量と病態学的意義との関係について、現時点で十分な検証ができているとはいえ、今後はこの知見について更に検討を行い、成果をまとめていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nobuhiko Takahashi, Atsushi P. Kimura, Kazumasa Ohmura, Sumiyoshi Naito, Mika Yoshida, Masahiro Ieko	4. 巻 735
2. 論文標題 Knockdown of long noncoding RNA dreh facilitates cell surface GLUT4 expression and glucose uptake through the involvement of vimentin in 3T3-L1 adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 144404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2020.144404	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 Takahashi Nobuhiko, Kimura Atsushi P., Otsuka Kai, Ohmura Kazumasa, Naito Sumiyoshi, Yoshida Mika, Ieko Masahiro	4. 巻 236
2. 論文標題 Dreh, a long noncoding RNA repressed by metformin, regulates glucose transport in C2C12 skeletal muscle cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 116906 ~ 116906
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2019.116906	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 伸彦、木村 敦、大村 一将、内藤 澄悦、吉田 美香、家子 正裕
2. 発表標題 3T3-L1細胞において長鎖非コードRNA-Drehのノックダウンはvimentinを介したGLUT4の細胞膜発現増加によって糖取り込みを促進する
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 伸彦、木村 敦、大村 一将、内藤 澄悦、吉田 美香、家子 正裕
2. 発表標題 C2C12骨格筋細胞においてlncRNA-AK050349はメトフォルミンによって発現が低下し、その発現低下は糖取り込みを増加させる
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 伸彦, 木村 敦, 大塚 海, 大村 一将, 内藤 澄悦, 吉田 美香, 家子 正裕
2. 発表標題 LncRNA Drehの発現低下は骨格筋細胞および脂肪細胞でのグルコース取り込みを促進する
3. 学会等名 第24回アディポサイエンス・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 伸彦, 吉崎 隆之, 内藤 澄悦, 吉田 美香, 大村 一将, 家子 正裕
2. 発表標題 中性脂肪合成酵素lipin1の脂肪細胞における役割:炎症とのクロストーク
3. 学会等名 中性脂肪学会第3回学術集会
4. 発表年 2019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)	
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)	

	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)	北海道医療大学・歯学部・実験助手 (30110)	

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