

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17501

研究課題名（和文）糖毒性・脂毒性による分泌顆粒内におけるプロインスリンプロセッシング障害の解明

研究課題名（英文）Glucolipotoxicity impairs proinsulin processing through disturbing V-ATPase function leading to impaired acidification within secretory granules

研究代表者

飯田 雅 (Iida, Hitoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60751146

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：耐糖能異常が進行すると血液中のプロインスリン濃度が上昇することが多数報告されており、これは膵細胞に負荷がかかり機能不全の状態であることを示唆する指標として考えられている。本研究はこの機序を解明するため、主要なプロセッシング酵素であるPC1/3がその酵素機能を酸性環境に依存することに着目した。飽和脂肪酸と高濃度グルコースにより分泌顆粒内酸性化が抑制された結果、PC1/3の酵素機能が低下しプロインスリンプロセッシングが障害されることを解明した。分泌顆粒内酸性化を調節するV-ATPaseの機能が過栄養により阻害されることを新たに見出し、2型糖尿病悪化機序の一部を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現状膵細胞機能を臨床的に評価する方法は乏しく、主にインスリン分泌能を測定するのみである。本研究は膵細胞に過剰な負荷がかかり、主要な機能の一つであるインスリン生合成が障害されることを、特にインスリン前駆体から正常にプロセッシングを受けずプロインスリンとして分泌量が増加するという観点から、分子生物学的に明らかにした。血液中のプロインスリン濃度は測定が可能であり、本研究により早期に膵細胞が機能不全の状態にあることを検知でき、早期治療介入と膵細胞機能保持につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：It has been reported in many clinical studies that serum proinsulin level increases, as glucose tolerance progress, which is considered as an indicator of dysfunction of pancreatic beta cells. In order to elucidate this mechanism, this study focused on the dependence of PC1/3, a major proinsulin processing enzyme, on the acidic environment for its enzymatic function. As a result of suppressing acidification in secretory granules by saturated fatty acids and high-concentration glucose, it was clarified that the enzyme function of PC1/3 was reduced and proinsulin processing was impaired. We found that the function of V-ATPase, which regulates acidification in secretory granules, is inhibited by overnutrition, and clarified a part of the mechanisms of exacerbation of type 2 diabetes.

研究分野：膵島生物学

キーワード：インスリン生合成 2型糖尿病 プロインスリンプロセッシング PC1/3 V-ATPase

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病はインスリンの相対的作用不足により生じる高血糖を主徴とする糖代謝異常である。インスリンを産生・分泌する膵細胞が機能不全に陥るとインスリンの量的、質的不足につながり、耐糖能異常を来す。血液中にインスリンの前駆物質であるプロインスリンが耐糖能異常の悪化に伴い上昇することが、日本人のデータをはじめ数多く報告されており、膵細胞機能不全の指標の一つとして考えられている。しかし血液中のプロインスリン濃度が上昇する詳細な機序は未だ解明されていない。

インスリンは前駆体プロインスリンとして発現し、分泌顆粒内においてプロセシングタンパクであるPC1/3により主に切断を受け、インスリンとCペプチドに分離される。PC1/3は活性の低い87 kDaから最も活性の高い66 kDaへと分泌顆粒内で成熟するが、この成熟と酵素活性に酸性環境を必要とし、分泌顆粒内の酸性環境はV-ATPaseと呼ばれるプロトンポンプにより調節されている。V-ATPaseは2つの主要なドメインがあり、細胞質にあるATP HydraseドメインであるV1と、オルガネラ膜上にあるプロトンポンプドメインであるV0の両者が結合してその機能を発揮する。そしてこの両者の結合は栄養状態をはじめ様々な因子により調節されている。一方2型糖尿病発症と悪化の要因に糖質、脂質の過剰があり、両者の長期的な過剰摂取は糖脂肪毒性として全身に様々な影響を与えることが知られている。これらの事実から糖脂肪毒性がV-ATPaseの機能を障害し、分泌顆粒内の酸性化を抑制することでプロインスリンプロセシングを障害すると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究は、糖脂肪毒性がプロインスリンプロセシングを障害することで、血中プロインスリン濃度の上昇に關与するという独自の視点で、糖脂肪毒性による膵細胞への影響を明らかにすることを目的としている。糖脂肪毒性がどのようにプロインスリンプロセシングを障害するか、その詳細な機序は明らかになっていない。本研究では糖脂肪毒性によるV-ATPaseの機能障害を介した細胞内pHの変化と、分泌顆粒内の酸性環境への影響、およびプロインスリンプロセシングの障害を検証し、2型糖尿病悪化の経過における血液中プロインスリンが増加する原因の一端を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

In vivoにおける糖脂肪毒性の影響を検証するため、食欲抑制が解除された肥満糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスを選択し、体重、耐糖能異常が有意に上昇し始める6週齢において検証した。またiv vitroにおいて糖脂肪毒性の影響を検証するため、野生型c57Bl/6マウスの単離膵島、及び膵細胞系腫瘍細胞株MIN6を選択し、これらに飽和脂肪酸であるパルミチン酸(Pal)、パルミチン酸と高濃度グルコース(HGPal)を負荷した。またV-ATPase阻害剤であるBafilomycin A1(BafA1)を投与し、これらによる分泌顆粒内の酸性度、プロインスリンプロセシング、V-ATPaseの機能を評価した。

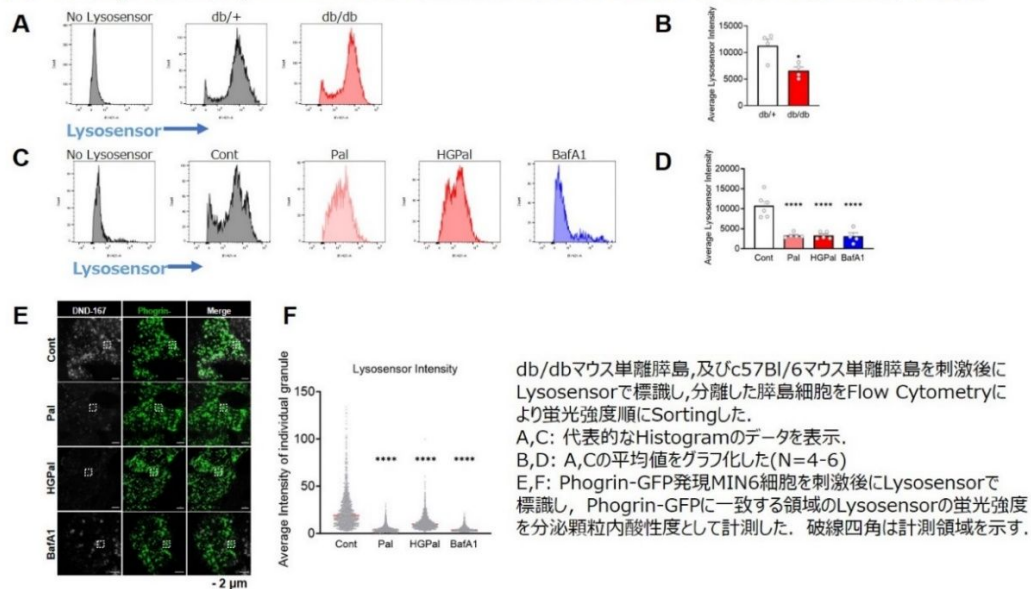
4. 研究成果

(1) 糖脂肪毒性によるオルガネラ内酸性環境への影響の解析

プロインスリンプロセシングの主要な酵素PC1/3はその酵素機能をオルガネラ内の酸性環境に依存するため、マウス単離膵島を蛍光pH指示薬Lysosensorで標識し、Flow Cytometryを用いて蛍光強度順に分離細胞をSortingした。その結果肥満糖尿病モデルdb/dbマウス単離膵島、及びc57Bl/6マウス単離膵島にPal、HGPal、BafA1を負荷したサンプルではLysosensorの蛍光強度が低下した。膵細胞の細胞質は多数の分泌顆粒で占められており、このデータは分泌顆粒の酸性度の低下を反映して

いるものと考えられた。しかし、より特異的に分泌顆粒の酸性度を検証するため、分泌顆粒膜タンパクの一つ Phogrin に GFP を融合させたタンパクを安定的に発現する MIN6 細胞を樹立し、同様に Lysosensor で標識した。GFP に一致する領域の Lysosensor の蛍光強度を分泌顆粒の酸性度とし計測したところ、上記刺激により酸性度が低下することを示した。(図 1)

図1：蛍光pH指示薬Lysosensorを用いた糖脂肪毒性によるオルガネラ内酸性環境への影響の解析



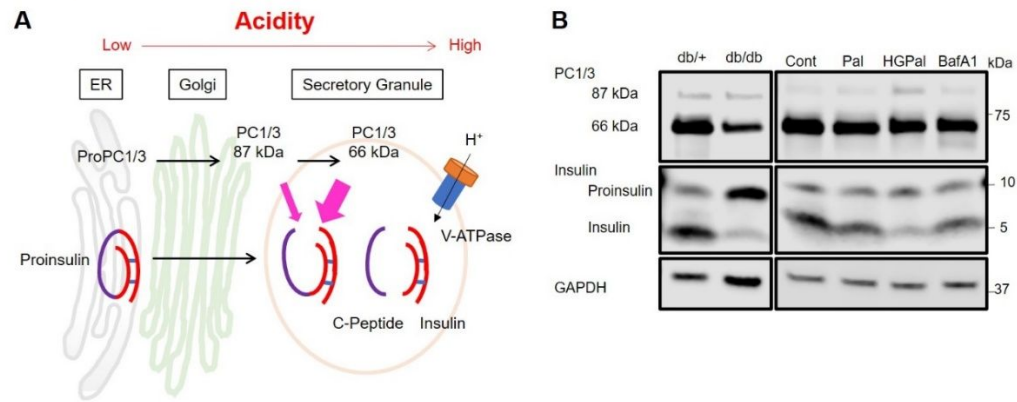
(2) 糖脂肪毒性によるプロインスリンプロセッシングへの影響の解析

肥満糖尿病モデル db/db マウスは 4 週齢で離乳後、6 週齢で体重、随時血糖が有意に上昇するため、この週齢で腹腔内グルコース負荷試験を行った。この負荷試験中、db/db マウスはコントロール db/+マウスに比較して常に高血糖を示し、プロインスリン分泌の増加に加え、プロインスリン/インスリン比の増加を示した。

同週齢のマウス単離膵島を用いてウェスタンブロット法で、PC1/3 とインスリンのタンパク形態を評価した。PC1/3 には様々な形態があり、活性の低い 87 kDa と活性の高い 66 kDa が検出可能である。分子量が自己切断により低下すると酵素活性が上昇し、またこの自己切断も酸性環境に依存する。そのため PC1/3 の形態と細胞内局在はオルガネラ内酸性度により規定され、87 kDa から 66 kDa への成熟は分泌顆粒内酸性化を反映する。db/db マウス膵島において 66 kDa の減少を認めた。またプロインスリンの蓄積とインスリンの減少を認め、プロインスリンプロセッシングが障害されていることを認めた。C57Bl/6 マウス単離膵島に HGPal を負荷した結果、活性の低い 87 kDa の蓄積と、インスリンの減少を認めた。

(図 2)

図2：糖脂毒性によるプロインスリンプロセシングへの影響の解析



A: プロインスリンプロセシングの概略図。PC1/3によりプロインスリンは分泌顆粒内酸性環境に依存的に切断される。PC1/3には形態が複数あり、活性の最も高い66 kDaへの成熟もオルガネラ内酸性度に依存する。
B: プロインスリンプロセシングをウエスタンブロット法で評価した。

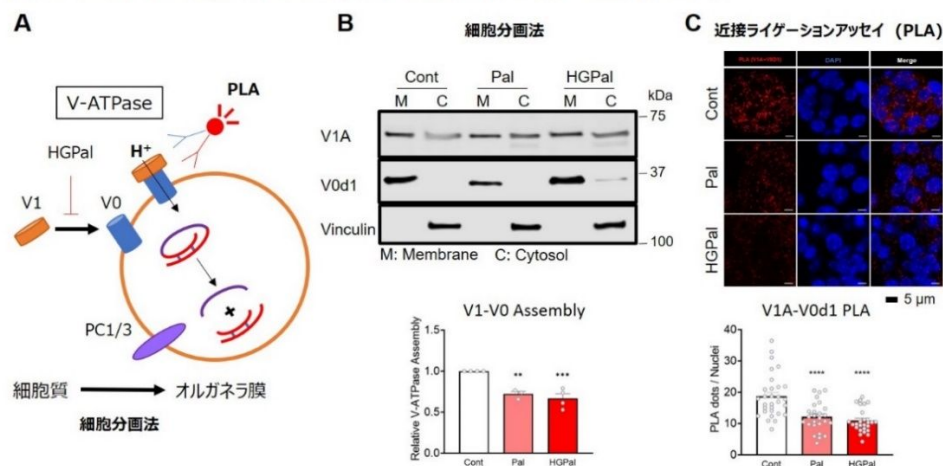
(3) V-ATPase 機能障害によるプロインスリンプロセシングへの影響の解析

分泌顆粒内酸性環境は V-ATPase により制御されている。このタンパクには 2 つの主要なドメインがあり、細胞質に存在する ATP Hydrase ドメインである V1 とオルガネラ膜上に存在する V0 ドメインに分かれ、両者が結合することで機能を発揮する。この V1-V0 結合を細胞分画法と近接ライゲーションアッセイを用いて評価した。

細胞分画法では細胞質 V1 ドメインの細胞質画分から膜画分への移行を検証した。V1 ドメインのそれぞれの画分における相対値を出し、細胞質画分に対する膜画分の比を移行度とした。飽和脂肪酸によりこの V1 の分画移行が低下した。

次に2つのタンパクが極至近距離に近接することを蛍光で評価できる近接ライゲーションアッセイをV1とV0のそれぞれのサブユニットに対する抗体を用いて行った。Pal、HGPalにより蛍光が減弱し、V1-V0結合の低下が可視化された。(図3)

図3：V-ATPase 機能障害によるプロインスリンプロセシングへの影響の解析



A: V-ATPaseの機能評価法の概念図。
B: 細胞分画法によるV1ドメインの細胞質画分から膜画分への移行の評価。(N=4)
C: 近接ライゲーションアッセイによるV1-V0結合の評価。(N=3)

本研究を通じて、2型糖尿病の発症、悪化に關与する飽和脂肪酸、グルコースの過剰摂取が膵細胞の主要な機能の一つインスリン合成に与える影響を、特にプロインスリンプロセシングの観点からその一端を解明した。今後は V1-V0 結合を阻害する詳細な機序を解明し、血液中プロインスリンの上昇が膵細胞機能障害を反映するバイオマーカーであり、臨床においてその測定が有用であることを示していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hitoshi Iida, Mami Takiguchi, Hirotsugu Uzawa, Akiko Kanai, Kyosei Ueki, Koki Ikeda, Yuya Nishida, Hirotaka Watada
2. 発表標題 Glucolipotoxicity inhibits proinsulin processing by blocking V-ATPase function and inhibiting acidification.
3. 学会等名 American Diabetes Association 84th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 飯田雅, 滝口真未, 鶴澤博嗣, 金井晶子, 植木響政, 池田恒基, 西田友哉, 綿田裕孝
2. 発表標題 糖・脂肪毒性はV-ATPaseの機能を阻害し, 分泌顆粒内 酸性化の障害を介してプロインスリンプロセッシングを抑制する.
3. 学会等名 第67回 日本糖尿病学会年時学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hitoshi Iida, Mami Takiguchi, Hirotaka Watada
2. 発表標題 Glucolipotoxicity inhibits proinsulin processing by blocking V-ATPase function and inhibiting acidification.
3. 学会等名 International Diabetes Federation Western Pacific Congress 2023 (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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