

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06680

研究課題名(和文) リゾリン脂質の代謝制御による糖尿病の新規遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel gene therapy for diabetes mellitus by regulation of lysophospholipid metabolism

研究代表者

清水 かほり (Shimizu, Kahori)

大阪大谷大学・薬学部・講師

研究者番号：50737749

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)：本研究では、糖・脂質代謝の中心臓器「肝臓」においてリン脂質・リゾリン脂質代謝に関与する遺伝子「リゾリン脂質アシル転移酵素10：LPLAT10(別名LPCAT4、LPEAT2)」を高発現させることで、2型糖尿病の治療を試みた。安全で機能的な改良型アデノウイルスベクターを用いて、マウスの肝臓においてLPLAT10を高発現させることにより、肝臓内のリン脂質の脂肪酸組成の変化を介して、食後のインスリン分泌量を増加させることで、食後高血糖を抑制することが示された。したがって、LPLAT10を肝臓において高発現させる本遺伝子治療は、2型糖尿病に対する新しい治療法となる可能性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、糖尿病などの生活習慣病と脂質に関する研究においては、身体に蓄積している中性脂肪の「量」に着目しているものが主に報告されてきた。近年、脂肪酸組成の変化が脂肪性肝疾患に関与するなど、脂質の「量」のみならず、脂質の「種類」に関する研究が国内外において報告され始めた。本研究は、リン脂質・リゾリン脂質の代謝を制御することで糖尿病の治療に挑戦する新しい試みであった。そして、本研究において、リゾリン脂質アシル転移酵素10を用いてマウスに2型糖尿病に対する遺伝子治療を行ったところ、治療効果が示された。以上より、本研究は、2型糖尿病の新しい治療・予防法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated whether overexpression of lysophospholipid acyltransferase 10 (LPLAT10, also called LPCAT4 and LPEAT2) in the liver, the central organ of glucose and lipid metabolism, could treat type 2 diabetes mellitus. For overexpression, I generated an LPLAT10-expressing adenovirus (Ad) vector using an improved Ad vector. Changes in hepatic phosphatidylcholine species due to liver-specific LPLAT10 overexpression suppressed postprandial hyperglycemia by increasing postprandial insulin secretion. These findings highlight LPLAT10 as a potential novel therapeutic target for type 2 diabetes mellitus.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：糖尿病 遺伝子治療 リン脂質 リゾリン脂質アシル転移酵素 アデノウイルスベクター 脂質

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は糖尿病の9割以上を占め、その治療薬はこれまでに数多く開発されてきた。しかし、現在もなお2型糖尿病罹患者のQOLは罹患していない人に比べて低い傾向にあるため、2型糖尿病は克服されたとはいえ、革新的な糖尿病治療薬の開発が求められている。

一方で近年、糖尿病の病態解明において、脂質の多様性が大きな注目を集めている。生体膜の主要成分であるリン脂質は、極性基と脂肪酸の組み合わせにより多くの種類が存在し、脂肪酸は、さらに鎖長、二重結合の有無や位置の違いにより、多くの分子種が存在する。リン脂質は、2本の脂肪酸を有し、ホスホリパーゼAによって脂肪酸が1本取り除かれることでリゾリン脂質となる。そしてリゾリン脂質は、リゾリン脂質アシル転移酵素によって再びリン脂質に変換される。主要なリン脂質であるホスファチジルコリン (phosphatidylcholine; PC) は、中性脂肪値を下げ、一方、リゾホスファチジルコリン (lysophosphatidylcholine; LPC) は、組織障害を示すことが報告されている。さらに、近年、脂肪酸の組成の変化が、肥満や脂肪性肝疾患などの発症・進展に関与することが報告されている。しかし、2型糖尿病とリン脂質・リゾリン脂質代謝との関連はほとんど明らかとなっておらず、リン脂質・リゾリン脂質を標的とした2型糖尿病の治療法は開発されていない。

そこで本研究では、糖・脂質代謝の中心臓器である「肝臓」においてリン脂質・リゾリン脂質代謝に関する遺伝子を高発現させることで、2型糖尿病への治療を試みた。2型糖尿病のような慢性疾患に対する遺伝子治療では、導入遺伝子を安全かつ高効率に長期間に渡り発現させる必要がある。研究代表者らは以前に、肝障害性が低く、搭載遺伝子を高効率に長期間、発現可能な改良型アデノウイルス (Adenovirus; Ad) ベクターの開発に成功している (Shimizu *et al.*, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2014; Shimizu *et al.*, *J. Immunol.*, 2021)。2型糖尿病に対する遺伝子治療が実現すれば、治療薬の投与が数週間～数か月に一度になり、患者のQOLが大幅に向上することが期待される。

本研究では、リン脂質・リゾリン脂質代謝に関する遺伝子を、研究代表者らが開発した改良型 Ad ベクターに搭載することで、2型糖尿病に対する遺伝子治療を試みた。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らが開発した安全で機能的な改良型 Ad ベクターを用いて、リン脂質・リゾリン脂質の代謝制御に関する遺伝子を肝臓中に高発現させることで、マウスの2型糖尿病に対する遺伝子治療の効果を検証することを目的とした。搭載する遺伝子として、研究代表者は、リゾリン脂質をリン脂質に変換するリゾリン脂質アシル転移酵素に注目し、中でも機能が十分に解明されていなかったリゾリン脂質アシル転移酵素 10 (lysophospholipid acyltransferase 10; LPLAT10、別名 LPCAT4、LPEAT2) を選択した。本研究では、研究代表者らが開発した改良型 Ad ベクターに LPLAT10 遺伝子を搭載した Ad ベクターを作製した。そして、作製した Ad ベクターをマウスに投与し、2型糖尿病に対する治療効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) LPLAT10 を搭載した Ad ベクターの作製および発現確認

LPLAT10 を C57BL/6 マウスの cDNA を用いてクローニングし、LPLAT10 を搭載した Ad ベクタープラスミドを作製した (pAdHM4-E4-122aT-LPLAT10)。LPLAT10 を改良型 Ad ベクターに搭載した Ad-LPLAT10 は、pAdHM4-122aT-LPLAT10 を 293 細胞にトランスフェクション後、293 細胞に 3-4 次感染させることで大量に調製した。その後、精製および透析を行ったものを本研究に使用した。

作製した Ad-LPLAT10 が肝臓において LPLAT10 をどの程度発現可能か調べるため、糖尿病モデルマウスである db/db マウスに Ad-LPLAT10 を尾静脈内投与し、2週間後に肝臓を回収した。肝臓の RNA およびタンパク質を抽出し、LPLAT10 の発現量を定量的 RT-PCR およびウェスタンブロッティング法を用いて測定した。コントロール Ad ベクターとして、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を搭載した Ad-Luc を用いた。

(2) Ad-LPLAT10 投与後の糖代謝の解析

マウスに Ad ベクター (Ad-LPLAT10 または Ad-Luc) を尾静脈内投与した。2週間後に空腹時血糖値およびインスリン値を測定した。また、耐糖能を評価するため、糖負荷試験を行った。具体的には、グルコース投与前、グルコース投与 15、30、60、120 分後に血糖値およびインスリン分泌量を測定した。

(3) Ad-LPLAT10 投与後のリン脂質・リゾリン脂質の分子種の解析

マウスに Ad ベクター (Ad-LPLAT10 または Ad-Luc) を尾静脈内投与し、2週間後に肝臓およ

び血清を回収した。肝臓および血清から脂質を抽出し、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS/MS) を用いて、リン脂質およびリゾリン脂質を解析した。

(4) インスリン分泌量の解析 (*in vitro*)

Ad-LPLAT10 投与後のマウス血清を用いた解析 (MIN6 細胞)

マウスインスリノーマ細胞株である MIN6 細胞を、Ad ベクター (Ad-LPLAT10 または Ad-Luc) 投与後の血清を含んだ培地を用いて一晩培養した。その後、グルコース応答性インスリン分泌量を、ELISA 法を用いて定量した。

リン脂質を用いた解析 (MIN6 細胞・膵島)

肝臓における LPLAT10 の高発現により肝臓および血清中で増加したリン脂質を含んだ培地を用いて、MIN6 細胞またはマウスから単離した膵島を一晩培養した。その後、グルコース応答性インスリン分泌量を、ELISA 法を用いて定量した。

4. 研究成果

(1) LPLAT10 を搭載した Ad ベクターの作製および発現確認

作製した Ad-LPLAT10 を db/db マウスに投与し、2 週間後にマウスの肝臓を回収した。LPLAT10 の発現量を調べるため、定量的 RT-PCR を行ったところ、Ad-LPLAT10 群は、コントロール群 (Ad-Luc 群) よりも 370 倍高い LPLAT10 の発現を示した。タンパク質レベルにおいても、Ad-LPLAT10 群は LPLAT10 の顕著な増大が見られた。したがって、作製した Ad-LPLAT10 は、マウス肝臓において LPLAT10 を高発現可能であることが示された。

(2) Ad-LPLAT10 投与後の糖代謝の解析

LPLAT10 をマウス肝臓中で高発現させることで糖代謝が変化するかを調べるため、db/db マウスに Ad-LPLAT10 を投与し、2 週間後に空腹時血糖値およびインスリン値を測定した。その結果、空腹時血糖値およびインスリン値ともに、Ad-LPLAT10 群とコントロール群との間に有意な差は見られなかった。

耐糖能について調べるため、糖負荷試験を行った。その結果、Ad-LPLAT10 群はコントロール群と比較して、血糖値が低値を示すとともに、インスリン分泌量の増加が示された。したがって、LPLAT10 の肝臓における高発現は、食後高血糖を抑制することが示された。

(3) Ad-LPLAT10 投与後のリン脂質・リゾリン脂質の分子種の解析

肝臓内の LPLAT10 の高発現によって、肝臓内のリン脂質・リゾリン脂質が変化し、それらが血中に分泌されて膵臓に作用することで、グルコース依存性インスリン分泌が起きると考えた。そこで、Ad-LPLAT10 投与後の肝臓内のリン脂質・リゾリン脂質を LC-MS/MS を用いて解析したところ、40:7 を含む PC が増加していること、20:3、20:4 を含む LPC が有意に減少したことが示された。さらに、血清中の PC および LPC の分子種の変化は、肝臓内の変化と同傾向を示した。

(4) インスリン分泌量の解析 (*in vitro*)

血中に分泌されたリン脂質がインスリン分泌に影響を与えるかを調べるため、Ad ベクター投与後のマウス血清を用いて、MIN6 細胞を一晩培養した。そして、グルコース刺激下におけるインスリン分泌量を測定したところ、Ad-LPLAT10 投与後のマウス血清を用いて培養した群においては、グルコース依存性インスリン分泌が増加した。

次に、肝臓から分泌されたリン脂質・リゾリン脂質がインスリン分泌を増加させるかを検討するため、LPLAT10 の高発現によって増加した PC 40:7 に注目した。PC の 40:7 は、18:1 (オレイン酸)、22:6 (ドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid; DHA)) であることを確認した。オレイン酸を MIN6 細胞に一晩作用させたところ、インスリン分泌の増加は観察されなかった。一方で、DHA を作用させることによって、グルコース応答性インスリン分泌量が増加した。さらに、マウス膵島を用いて同様に検討したところ、MIN6 細胞を用いた検討結果と同様に、高濃度グルコース刺激下において、膵島に DHA を作用させることでインスリン分泌量が増加したことが示された。

本研究では、リン脂質・リゾリン脂質の代謝制御による 2 型糖尿病の遺伝子治療を開発するため、リゾリン脂質をリン脂質に変換する酵素である「LPLAT10」に注目した。そして、改良型アデノウイルスベクターを用いて、マウスの肝臓において LPLAT10 を高発現させることにより、肝臓内のリン脂質の脂肪酸組成の変化を介して、食後のインスリン分泌を増加させ、食後高血糖を抑制することが示された。以上より、LPLAT10 は 2 型糖尿病に対する新しい治療法および予防法となる可能性が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shimizu Kahori	4. 巻 47
2. 論文標題 Development of an Improved Adenovirus Vector and Its Application to the Treatment of Lifestyle-Related Diseases	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 886 ~ 894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b23-00837	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 Shimizu Kahori, Ono Moe, Mikamoto Takenari, Urayama Yuya, Yoshida Sena, Hase Tomomi, Michinaga Shotaro, Nakanishi Hiroki, Iwasaki Miho, Terada Tomoyuki, Sakurai Fuminori, Mizuguchi Hiroyuki, Shindou Hideo, Tomita Koji, Nishinaka Toru	4. 巻 38
2. 論文標題 Overexpression of lysophospholipid acyltransferase, LPLAT10/LPCAT4/LPEAT2, in the mouse liver increases glucose stimulated insulin secretion	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e23425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202301594RR	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 Shimizu Kahori, Nishimuta Syogo, Fukumura Yuri, Michinaga Shotaro, Egusa Yuka, Hase Tomomi, Terada Tomoyuki, Sakurai Fuminori, Mizuguchi Hiroyuki, Tomita Koji, Nishinaka Toru	4. 巻 17
2. 論文標題 Liver-specific overexpression of lipoprotein lipase improves glucose metabolism in high-fat diet-fed mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0274297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0274297	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 Sakurai Fuminori, Tsukamoto Tomohito, Ono Ryosuke, Nishimae Fumitaka, Shiota Aoi, Iizuka Shunsuke, Shimizu Kahori, Sakai Eiko, Ishida Yuji, Tateno Chise, Chayama Kazuaki, Mizuguchi Hiroyuki	4. 巻 44
2. 論文標題 Transduction Properties of an Adenovirus Vector Containing Sequences Complementary to a Liver-Specific microRNA, miR-122a, in the 3'-Untranslated Region of the E4 Gene in Human Hepatocytes from Chimeric Mice with Humanized Liver	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1506 ~ 1513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00394	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 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水かほり、進藤英雄、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 肝臓におけるリン脂質の生合成制御による生活習慣病治療へのアプローチ
3. 学会等名 日本薬学会第144年会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 清水かほり、小野 萌、三家本武成、裏山悠哉、中西広樹、道永昌太郎、吉田瀬七、岩崎美穂、寺田知行、櫻井文教、水口裕之、進藤英雄、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 リゾリン脂質アシル転移酵素LPLAT10/LPCAT4/LPEAT2の肝臓特異的な高発現は、グルコース依存性インスリン分泌を促進する
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水かほり、小野 萌、三家本武成、裏山悠哉、中西広樹、道永昌太郎、吉田瀬七、岩崎美穂、寺田知行、櫻井文教、水口裕之、進藤英雄、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 リゾリン脂質アシル転移酵素LPLAT10/LPCAT4/LPEAT2の肝臓における高発現は、グルコース依存性インスリン分泌を促進する
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松尾弥優、清水かほり、浦 大志、岩崎美穂、櫻井文教、水口裕之、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 リゾリン脂質アシル転移酵素LPGAT1/LPLAT7が肝臓における脂質代謝に与える影響に関する検討
3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水かほり、小野 萌、三家本武成、裏山悠哉、中西広樹、道永昌太郎、吉田瀬七、岩崎美穂、寺田知行、櫻井文教、水口裕之、進藤英雄、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 リゾリン脂質アシル転移酵素LPLAT10の肝臓特異的な高発現は、グルコース依存性インスリン分泌を促進する
3. 学会等名 第29回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水かほり、小野 萌、三家本武成、裏山悠哉、中西広樹、吉田瀬七、岩崎美穂、寺田知行、櫻井文教、水口裕之、進藤英雄、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 リゾリン脂質アシル転移酵素LPLAT10の肝臓特異的な高発現がインスリン分泌に与える影響に関する検討
3. 学会等名 第65回日本脂質生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水かほり
2. 発表標題 肝臓における脂質の量と種類の制御による糖尿病の新規治療法に関する研究
3. 学会等名 第69回日本生化学会近畿支部例会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水かほり
2. 発表標題 改良型アデノウイルスベクターの開発と生活習慣病治療への応用
3. 学会等名 日本薬学会143年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水かほり、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 リン脂質代謝を標的とした生活習慣病に対する治療効果の検討
3. 学会等名 日本薬学会143年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西端真那、清水かほり、金原未幸、岩崎美穂、櫻井文教、水口裕之、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 肝臓におけるPLA2G6の発現抑制が肝臓内の脂肪蓄積に与える影響に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水かほり、小野 萌、三家本武成、裏山悠哉、中西広樹、寺田知行、櫻井文教、水口裕之、進藤英雄、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 リゾリン脂質アシル転移酵素LPCAT4/LPLAT10の肝臓特異的な高発現が糖代謝に与える影響に関する検討
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西端真那、清水かほり、金原未幸、岩崎美穂、櫻井文教、水口裕之、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 肝臓におけるPLA2G6の発現抑制が高脂肪食摂取マウスに与える影響に関する検討
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shimizu K, Ono M, Mikamoto T, Urayama Y, Nakanishi H, Terada T, Sakurai F, Mizuguchi H, Shindou H, Tomita K, Nishinaka T
2. 発表標題 Therapeutic effects of liver-specific overexpression of lysophosphatidylcholine acyltransferase 4 (LPCAT4)/lysophospholipid acyltransferase 10 (LPLAT10) on type 2 diabetes mellitus
3. 学会等名 第28回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水かほり、西牟田昇吾、福村友理、江草侑華、長谷知実、道永昌太郎、寺田知行、櫻井文教、水口裕之、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 リポタンパク質リパーゼの肝臓特異的な高発現による糖代謝異常の改善
3. 学会等名 第68回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮内美里、清水かほり、満川萌香、加藤彩香、櫻井文教、水口裕之、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 ペルオキシソーム形成因子Pex11 の肝臓特異的な高発現が脂質代謝に与える影響に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 満川萌香、清水かほり、宮内美里、常盤伊織、寺田百花、寺田知行、櫻井文教、水口裕之、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 改良型アデノウイルスベクターを用いた2型糖尿病感受性遺伝子ASB3の肝臓特異的な高発現が糖・脂質代謝に与える影響に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水かほり、扇谷祐哉、道永昌太郎、吉長 楓、木村 肇、寺田知行、櫻井文教、水口裕之、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 2型糖尿病感受性遺伝子ZFAND3の肝臓特異的な高発現は、インスリン抵抗性を改善する
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮内美里、清水かほり、加藤彩香、櫻井文教、水口裕之、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 ペルオキシシン11 の肝臓特異的な高発現が高脂肪食摂取マウスに与える影響に関する検討
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 満川萌香、清水かほり、常盤伊織、寺田百花、寺田知行、櫻井文教、水口裕之、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 2型糖尿病感受性遺伝子ASB3の肝臓特異的な高発現が糖・脂質代謝に与える影響に関する検討
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shimizu K, Nishimuta S, Fukumura Y, Michinaga S, Egusa Y, Hase T, Terada T, Sakurai F, Mizuguchi H, Tomita K, Nishinaka T
2. 発表標題 Liver-specific overexpression of lipoprotein lipase improves glucose metabolism in mice fed a high-fat diet
3. 学会等名 第27回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水かほり、西牟田昇吾、福村友理、江草侑華、長谷知実、道永昌太郎、寺田知行、櫻井文教、水口裕之、富田晃司、西中 徹
2. 発表標題 肝臓特異的なリポタンパク質リパーゼの高発現は、糖代謝異常を改善する
3. 学会等名 第67回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2021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