

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08951

研究課題名(和文)敗血症誘発性高血糖病態におけるTxnipの役割解明と治療への展開

研究課題名(英文)Elucidation of the role of Txnip in the pathogenesis of sepsis-induced hyperglycemia and its therapeutic application

研究代表者

石井 祥代(Ishii, Sachiyo)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40457958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は敗血症誘発性高血糖症においてTxnipの発現上昇をトリガーとした炎症応答促進や細胞機能不全が病態悪化に関与しており、TxnipのGLUT1との結合を阻害することで病態が改善すると考え、TxnipとGLUT1受容体のタンパク間相互作用の静的ならびにMolecular dynamics(動的)解析を実施した。静的ならびに動的解析の両方で共通した複数の塩基をタンパク間相互作用に関連する塩基と仮定し、塩基を絞り込むためにアラニン置換変異体の組みあわせを複数作成した。現在はどのTxnip変異体によって、GLUT1受容体のエンドサイトーシスが消失するかということを実験中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は免疫機能低下と高血糖症を引き起こし、続発する高血糖症は敗血症の病態を悪化させるが、このメカニズムとして我々はTxnipの発現上昇をトリガーとした炎症応答促進や細胞機能不全が関与していると考えている。今回Txnipの発現上昇により酸化ストレスや小胞体ストレスが引き起こされていることや、TxnipがHSP70とタンパク質相互作用する可能性が判明し、シャペロンの直接阻害による小胞体ストレス誘導経路の可能性も示唆された。これらのTxnipの作用をさらに明らかにすることで高血糖症による敗血症の病態悪化を食い止める治療法につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We believe that promotion of inflammatory responses and cellular dysfunction triggered by increased expression of Txnip are involved in the worsening of the disease condition in sepsis-induced hyperglycemia, and that inhibiting the binding of Txnip to GLUT1 will improve the disease condition. So static and molecular dynamics analysis of protein-protein interaction between Txnip and GLUT1 receptor was performed.

We assumed that multiple bases common to both static and dynamic analyzes were bases related to protein-protein interactions, and created multiple combinations of alanine substitution mutants to narrow down the bases. We are currently conducting experiments to determine which Txnip mutant abolishes GLUT1 receptor endocytosis.

研究分野：麻酔

キーワード：敗血症 高血糖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### 敗血症と敗血症誘発性高血糖症

敗血症は全世界において年間発症数 4,890 万人/死亡者 1,100 万人とされ、依然として重要な健康問題の 1 つである。敗血症は免疫機能低下と高血糖症を引き起こし、続発する高血糖症は死亡率上昇のリスクファクターと考えられている。

### 敗血症誘発性高血糖症に関するこれまでの我々の研究

これまで、我々の研究グループは、重要な免疫細胞の 1 つとして、単球系細胞に着目し研究を遂行してきた。最新の研究結果として、ラットおよびヒトマクロファージの両方において、1) 高血糖状態が Lipopolysaccharide (LPS) による食作用の低下と CHOP 遺伝子の核内発現の増加および Akt リン酸化を阻害を増強すること、2) CHOP 遺伝子ノックダウンは、ヒトマクロファージの食作用および Akt リン酸化を回復させること、を報告し、小胞体ストレス (UPR) が敗血症誘発性高血糖症の免疫機能低下のメカニズムの一端であること解明した。しかし、高血糖状態が敗血症時の病態をさらに悪化させるメカニズムは依然として不明な点が多く残されている。

### Txnip と NLRP3 インフラマソーム

NLRP3 は免疫応答に関わるパターン認識受容体として知られ、インフラマソームと呼ばれるタンパク質複合体を形成する。インフラマソームは、敗血症に代表される炎症病態において病原体感染や菌体成分により刺激され、炎症応答を促進することが知られている。

チオレドキシン相互作用タンパク (Txnip) は、抗酸化物質であるチオレドキシン (TRX) の内因性阻害物質であり、チオレドキシンの働きを制御することで ROS を亢進させるという側面が知られていた。そして、近年、Txnip が NLRP3 インフラマソームの活性化に関与することが、様々な病態モデルから明らかとなりつつある。

### グルコース制御因子としての Txnip

Txnip は GLUT1 (glucose transporter 1) へ直接的に結合し、細胞へのグルコース取り込みを制御していることが知られている。そして、グルコース濃度 / 曝露時間依存性に Txnip の発現は上昇する。さらには、高血糖動物モデルや糖尿病患者においても Txnip の発現は上昇することが報告されている。

### チオレドキシン相互タンパクと細胞死

Txnip の発現上昇は、UPR を誘導し、種々の細胞死を引き起こすことが明らかにされている。これらのことから、我々は「敗血症誘発性高血糖症では Txnip の発現上昇をトリガーとした炎症応答促進や細胞機能不全が病態悪化に関与し、Txnip の発現抑制が病態を改善させる」という仮説を立てた。その中でも、特に細胞内のグルコース欠乏が小胞体ストレスを引き起こすことから、Txnip の Glucose metabolism に着目し、GLUT1 との結合を阻害することで病態が改善する可能性を考えた。これらの可能性を明らかにするために、以下の目的を設定した。

## 2. 研究の目的

- 1) Txnip の糖代謝機構を確認する。
- 2) Txnip と小胞体ストレスの関係性を探索する。
- 3) Txnip と GLUT1 のタンパク相互作用を解析する。

## 3. 研究の方法と研究成果

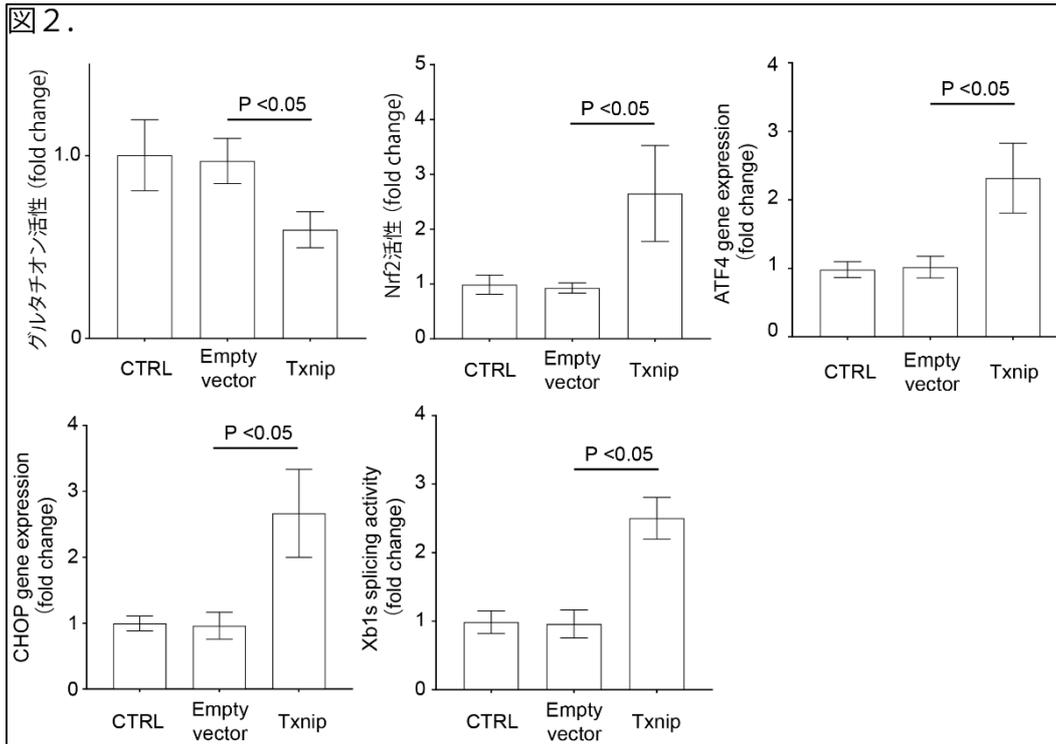
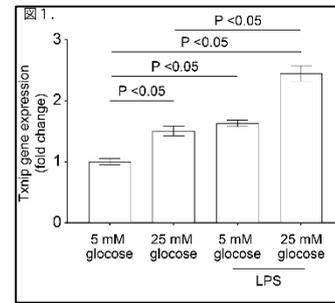
まず初めに、Txnip が Glucose response gene であり、GLUT1 と結合することを、細胞実験系で確認した。具体的には、Txnip は高血糖状態で刺激され、LPS の刺激によって、エンハ

ンスされることを、ヒト単球系細胞を用いてリアルタイム PCR で確認した ( 図 1 ) 。

次に、293T 細胞に Txnip ならびに GLUT1 を共発現させ、共免疫沈降法で、過去の文献通り、Txnip が GLUT1 と結合することを確認した。

次に、Txnip の上昇は酸化ストレスおよび ER ストレスを引き起こすことをヒト単球系細胞ならびに 293T 細胞に Txnip

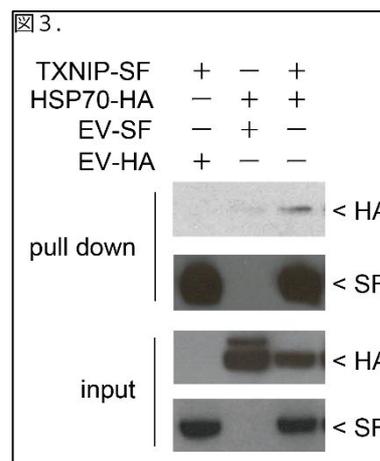
をアデノウイルスあるいはプラスミドを用いた遺伝子導入を行い、確認した。具体的には、酸化ストレスについては、グルタチオン活性および Nrf2 活性、ER ストレスについては、



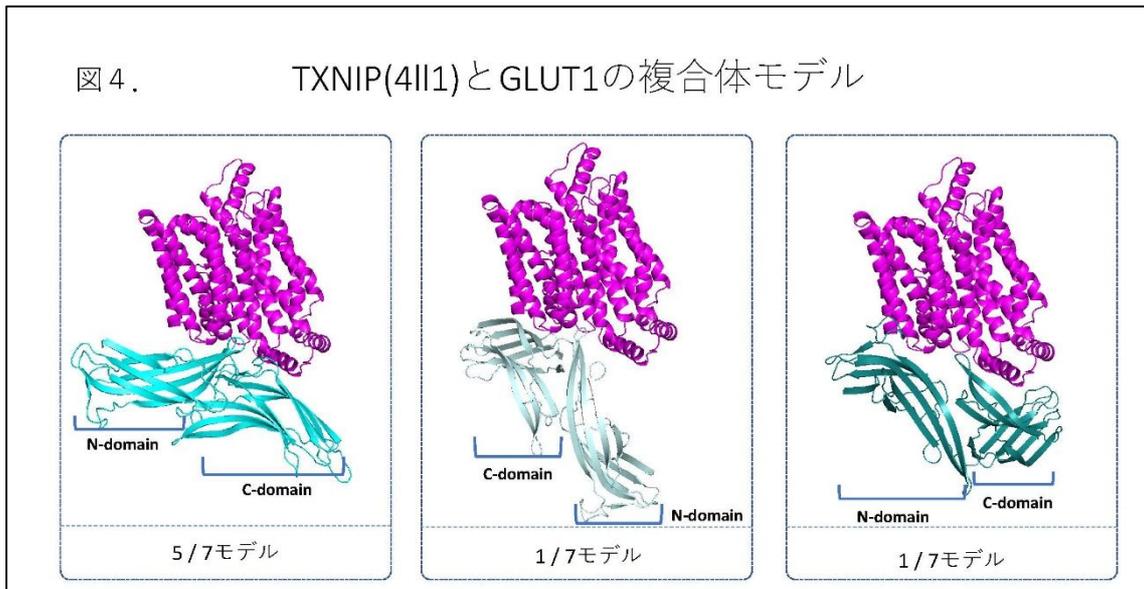
ATF4, CHOP などの ER ストレスマーカーの遺伝子発現ならびに xBP1 のスプライシング活性を計測した ( 図 2 ) 。

グルコース欠乏が小胞体ストレスを阻害するというメカニズム以外にも Txnip がシャペロン ( 関連 ) タンパクと直接結合する可能性を考え、複数のシャペロン ( 関連 ) タンパクについて 293T 細胞に Txnip と共発現させ、共免疫沈降法で、タンパク質相互作用を有する可能性があるか否かを探索した。興味深いことに、Txnip は HSP70 とタンパク相互作用する可能性が判明し、シャペロンの直接阻害による小胞体ストレスの誘導経路が考えられた ( 図 3 ) 。

その中でも、特に細胞内のグルコース欠乏が小胞体ストレスを引き起こすことから、Txnip の Glucose metabolism に着目し、GLUT1 との結合を阻害することで病態が改善する可能性を考えた。したがって、Txnip と GLUT1 の相互作用に関連する塩基の同定を行うこととした。Txnip 単独の結晶構造は完全には同定されていないため、その分子構造予測を精度が非常に高く注目を浴びているプログラムである AlphaFold を用いて行い、GLUT1 との相互作用を探



索した。静的・動的シミュレーションは、TXNIP(4II1)ならびに GLUT1(PDBID:4pyp)を用いて行った。図4に静的解析の一部を示す。



静的モデルでは全部で7つのモデルが提示された。動的解析の結果と統合し、複数の塩基が相互作用を有する可能性が考えられた。

現在、それらの塩基1つずつあるいはそれらの組み合わせに対して、アラニン置換を行った Txnip 変異体を作成し、Txnip-GLUT1 の相互作用が消失するか否かを、細胞実験で確認中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	飯田 淳  (Iida Jun)  (20515283)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教    (24303)	

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