

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：33920

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20900

研究課題名（和文）アミノ酸利用不均衡と異常スフィンゴ脂質蓄積が糖尿病性多発神経障害に及ぼす影響

研究課題名（英文）The Impact of Amino Acid Imbalance and Abnormal Sphingolipid Accumulation on Diabetic Polyneuropathy

研究代表者

下田 博美（Nakai-Shimoda, Hiromi）

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：40740931

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病性神経障害(DPN)の病態を解明する上で、アミノ酸利用不均衡に基づく、異常スフィンゴ脂質の蓄積に注目した。スフィンゴ脂質の構成分子であるL-serineが糖尿病患者では減少し血中異常スフィンゴ脂質が増加することより、アミノ酸濃度の変化が組織における異常スフィンゴ脂質蓄積を惹起している可能性を推察し、DPNにおいて異常スフィンゴ脂質が病態に関与しているかを検討した。結果、DPNマウス末梢神経系におけるアミノ酸トランスポーターの発現を確認した。加えて小胞体におけるスフィンゴ脂質合成に関わる重要な因子であるSpt1c1の発現低下を確認した。今後、更に解析を進め病態解明につなげる予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年は盛んに酸化ストレスがDPNの主要な病態であるとの仮説が検証されてきたものの臨床研究では仮説を裏切る結果が得られている。そのため、引き続き現在も国内外の研究者の間では、新規病態の解明が切望されている。

今回注目した異常スフィンゴ脂質とDPNの関係については、病理学的変化および分子生物学的メカニズムは十分に評価されていない。本研究の結果、新たな治療ターゲットの確立に繋がることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the pathology of diabetic polyneuropathy (DPN), we focused on the accumulation of abnormal sphingolipids based on amino acid imbalance. Given that L-serine, a component molecule of sphingolipids, decreases in diabetic patients while abnormal sphingolipids in the blood increase, we hypothesized that changes in amino acid concentrations trigger abnormal sphingolipid accumulation in tissues. We investigated whether abnormal sphingolipids are involved in the pathology of DPN. As a result, we confirmed the expression of amino acid transporters in the peripheral nervous system of DPN mice. Additionally, we confirmed a decrease in the expression of Spt1c1, a key factor involved in sphingolipid synthesis in the endoplasmic reticulum. We plan to further analyze these data and continue to elucidate the pathology of DPN.

研究分野：糖尿病学

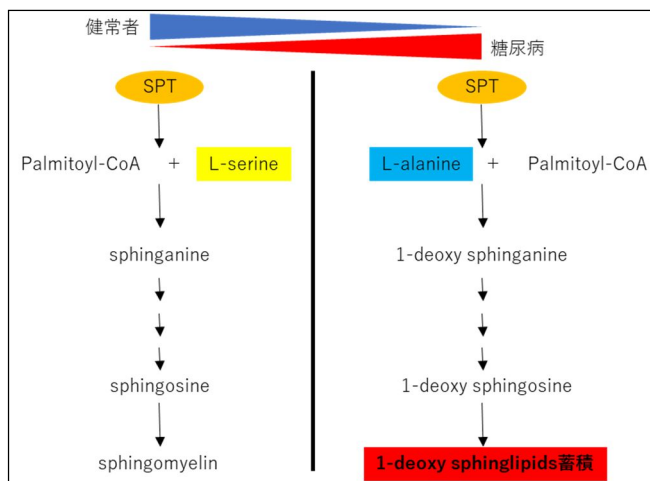
キーワード：糖尿病性神経障害

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は高血糖を特徴とする代謝疾患であるが、糖代謝障害を含む複合的代謝障害によって全身の組織・臓器が傷害されることが判明しつつある。DPN は、そのような組織傷害の一つであるが合併頻度が極めて高く、糖尿病発症時に 9 割以上の患者において何らかの神経伝導機能異常が存在することが知られている(馬場, 医学のあゆみ, 2013)。また、メタボリック症候群や耐糖能障害(IGT)患者においても DPN と同様の感覚神経優位の遠位対称性末梢神経障害が生じており、複合的代謝障害の中に DPN 発症機序が隠れていることが想定される。

本研究では、そのような複合的代謝障害を考察する中で、アミノ酸利用不均衡に基づく 1-deoxySLs の蓄積に注目した。スフィンゴ脂質は生体膜を形成する主要な脂質分子であり、多彩な機能性を有している。中でも血管内皮機能、糖代謝、神経機能等に対し恒常性維持のために重要な役割を持っていることが知られている。

スフィンゴ脂質の合成は、serine palmitoyltransferase (SPT) が触媒する L-serine と palmitoyl-CoA の縮合反応から開始され(図左側パネル)、いくつかのステップを経て sphingosine (SO)、sphinganine (SA)、sphingomyelin (SM)などのスフィンゴ脂質が生成される。中でも SM は生体のスフィンゴ脂質の 80%以上を占め、神経系における跳躍伝導を可能にするミエリン鞘を構成する主要な分子である。SPT は L-serine 以外に L-alanine および L-glycine も競合的に palmitoyl-CoA との縮合を触媒する。しかしながら、L-alanine と L-glycine



を基質として用いた場合、1-deoxySLs が生成される (図右側パネル)。SPT の gain of function mutations により 1-deoxySLs が蓄積することが遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチー1型 (HSAN1)で見いだされ、細胞実験で 1-deoxySLs の蓄積そのものがニューロン障害性を有することが示された (Penno A, J Biol Chem 2010)。さらに興味深いことに HSAN1 は DPN と非常に似た臨床像を呈する。すなわち、いずれも遅発性・緩徐進行性・length-dependent な末梢神経障害であり、すべての末梢神経系すなわち感覚・運動・自律神経系が障害されることも共通である。加えて、IGT あるいはメタボリック症候群を有するヒトおよび 2 型糖尿病患者の血中 1-deoxySLs が増加していることが示されている (Othman A, Diabetologia 2012)。また、糖尿病患者において血中 L-alanine 濃度は有意に上昇し、逆に L-serine は有意に低下していることが報告されている (Kamura M, Circ J 2010)。以上の事実から私は、1-deoxySLs の形成が DPN の病態に關与することを想定し、病態形成の促進因子として糖尿病におけるアミノ酸代謝の変化に注目し、“SPT による競合的な縮合反応において L-serine より相対的に L-alanine が優位となることで 1-deoxySLs の形成が促進され、DPN 発症に繋がるのでは?”との仮説を立てた。

2. 研究の目的

以上より本研究では、1-deoxySLs の蓄積そのものが DPN の発症・進展において重要な因子として寄与するか否かを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

当初計画の中で、以下の4つの実験を計画した。

実験 1. マウス血液-神経関門(BNB)におけるアミノ酸トランスポーターの分布評価

中枢神経系では L-serine は神経系内で安定供給できず血液からの供給に一部依存している。しかし、L-serine を中枢神経系側へ移行させるトランスポーター (SLC38A2, SLC1A4, SLC1A5) の利用は L-alanine と競合する。そこで末梢神経系においても血液脳関門と同様のアミノ酸の膜輸送システムが存在するかを評価し、中枢神経系での L-serine の重要性が末梢神経系でも成立するかを推察する。具体的には、野生型マウスの後根神経節 (DRG) および坐骨神経を用いて、アミノ酸トランスポーターの分布・発現を免疫組織化学染色と western blotting、RT-PCR 等により評価する。

実験 2. マウス DPN モデルの末梢神経系に 1-deoxySLs が蓄積しているかの検証

肥満糖尿病マウス (db/db マウス) を DPN モデルとして用い、末梢神経系に 1-deoxySLs が蓄積しているかを評価する。糖尿病誘発 8 週間後に、神経伝導検査、温覚閾値検査、触覚閾値検査を実施し、DPN の発症を確認し、DRG・坐骨神経を採取する。採取した神経組織は、メタノール/クロロフォルム溶液とアンモニア添加により脂質抽出後に酸/塩基加水分解し、大気圧化学イオン化法によりイオン化し質量分析を実施する。解析は、以下のスフィンゴ脂質を対象とする: SO, 1-deoxy-SO, SA, 1-deoxy-SA, 1-deoxymethyl-SA。また同じ組織を用いて、PHGDH および SPT の発現量の変化を mRNA レベルで解析し、質量分析の結果との相関解析を実施する。

実験 3. Ex vivo での神経系細胞培養における 1-deoxySLs の神経障害性の検証

野生型マウスより DRG を採取・培養し、1-deoxySLs が DRG ニューロンの神経突起伸長および細胞死に及ぼす影響を評価する。また、マウスの坐骨神経より Schwann 細胞を分離・培養し、DRG ニューロンとの共培養を実施する。共培養下での 1-deoxySLs のミエリン化への影響を評価する。この際、SPT 阻害剤 imidazopyridine 1、PHGDH 阻害薬 BI-4924 を添加することで分子機序の裏付けを強化する。一方、初代培養系での実験とは別に、DRG ニューロン株 50B11 および Schwann 細胞株 IMS32 において CRISPR-Cas8 を用いたゲノム編集技術により SPT および PHGDH を欠損させ、別途、分子機序の裏付けを得る。

実験 4. マウス糖尿病モデルへの L-serine 投与の DPN 予防効果の検証

マウス糖尿病モデルへの L-serine 投与により DPN の発症が予防できるかを検証する。12 週齢の db/db マウスに L-serine を 5% 含有する配合飼料を 8 週間投与し、DPN の発症・進展を評価する。生理学的には実験 2 と同じ神経伝導検査などを実施する。病理学的には、表皮内神経線維密度、坐骨神経/腓腹神経の超微形態学的変化を評価する。また、実験 2 と同様に、坐骨神経・DRG へのスフィンゴ脂質の蓄積量も評価する。

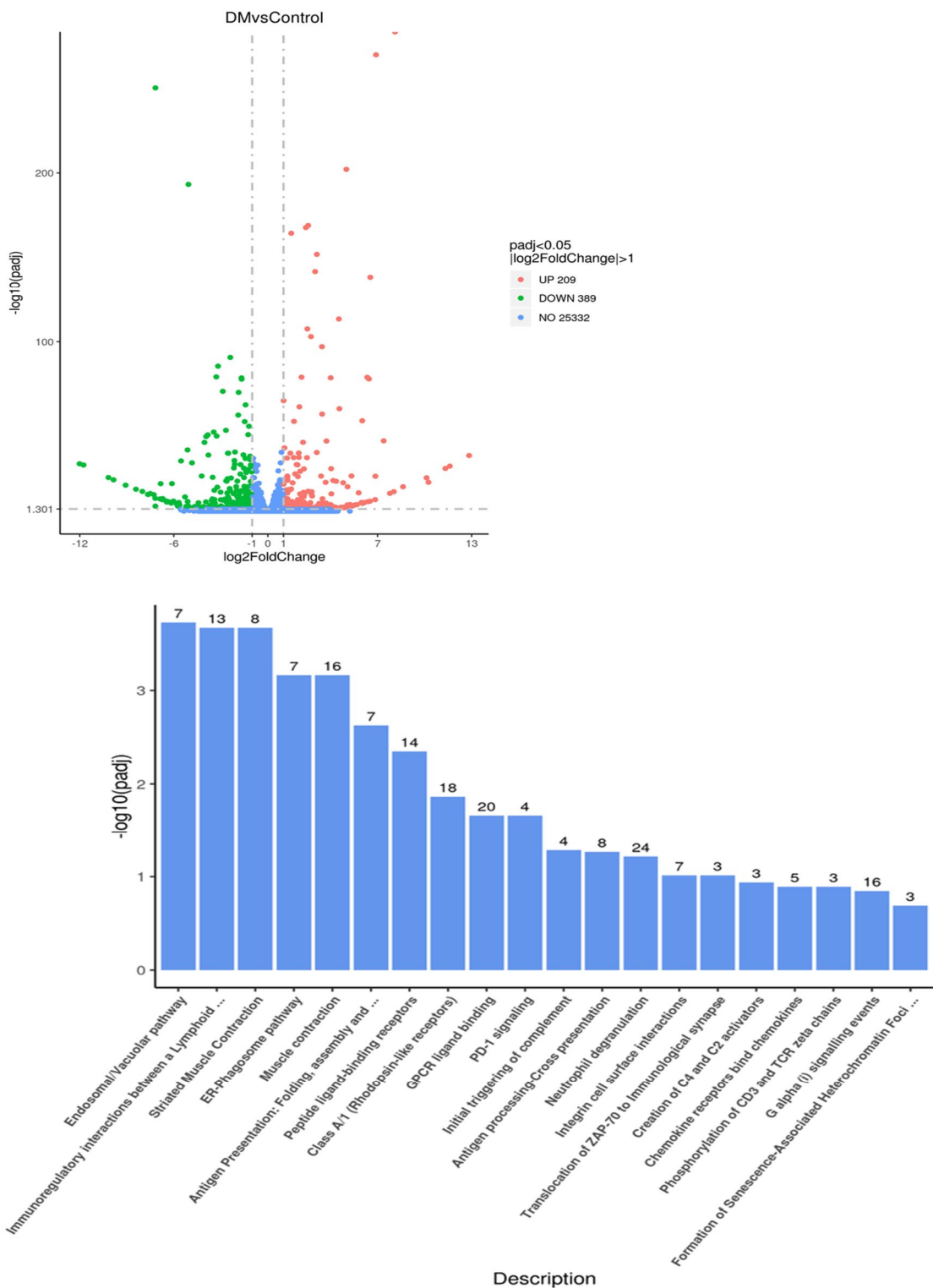
4. 研究成果

マウス DRG における免疫染色および western blotting 法による各種アミノ酸トランスポーター発現を確認することを試みたが、抗体の特異性について十分な確信の得られるデータが取得できなかった。そのため、マウス DRG の RNA sequencing による網羅的解析を実施した (Fig. 1)。その結果、マウス DRG においてアミノ酸トランスポーター SLC38A2, SLC1A4, SLC1A5 等の発現を確認できた (Fig. 2)。また、肥満 2 型糖尿病モデルマウス db/db マウスにおいては、これらトランスポーターのうちのヒトにおける HSN1 の原因遺伝子である Sptlc1 の発現量が有意に低下していることが確認できた (Fig. 2)。また、他のアミノ酸代謝関連因子の発現量についても検討したところ、これらのうち、ミトコンドリアにおける分枝鎖アミノ酸異化を司る Bcat2 が db/db マウスで有意に上昇していることが判明した (Fig. 2)。以上の結果より、末梢神経系のアミノ酸代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

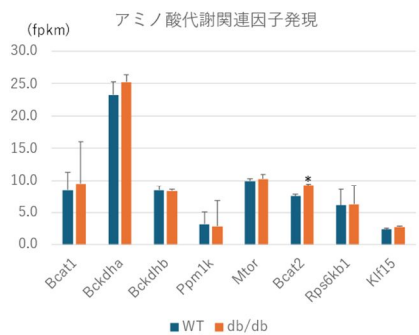
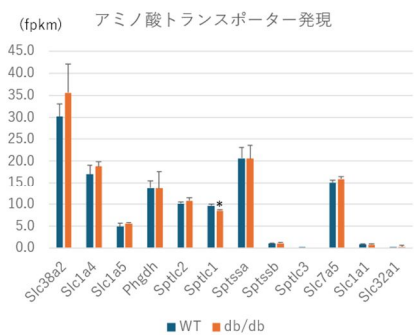
異常とスフィンゴ脂質合成経路は糖尿病モデル動物において何らかの変化を生じていることは確認でき、仮説の検証作業の第一歩をクリアできたと考えられる。今後、解析を進めつつ、L-serine 投与による治療介入効果を検証する予定としている。

Figure 1



様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

Figure 2



*: p < 0.05 vs WT

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

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