

「糖尿病合併症における Exosome を用いた新規診断・治療法の確立」

神戸大学大学院医学研究科糖尿病・内分泌内科

浅原俊一郎

1 研究の背景と目的

近年、様々な疾患領域において「臓器連関」が注目されるようになってきた。糖尿病領域においても、肝臓が中枢神経を介して膵β細胞保護に働いていることや、肝臓が同じく中枢神経を介して脂肪細胞の分解に影響していることなどが報告されている。このように、糖尿病領域では神経ネットワークによる臓器連関の報告が多いが、申請者は液性因子が臓器連関に及ぼす影響も重要であると考えている。申請者は特に、「エクソソーム」に注目している。これまでに、膵β細胞から分泌されるエクソソームの意義についてはほとんどわかっていない。そこで申請者は、膵β細胞から分泌されたエクソソームのみ蛍光分子 GFP を付加したマウスを独自に作製し、膵β細胞由来のエクソソームに含まれる分子 (miRNA やタンパク) の解析や、それらが他臓器に及ぼす影響を解明することとした。申請当初は、これを用いて合併症の病態解明・治療法の確立を目的としていたが、実験結果をもとに研究目的を変更した。本研究においては、膵β細胞から分泌される Exosome が糖尿病の病態においてどのような変化が及ぼされるのか、また糖尿病の病態にどのような影響を及ぼすのかについて検討を進めることとした。さらに、膵β細胞不全モデルマウスを用いて、高血糖になるより前の血清 Exosome を抽出し、この Exosome に含まれる microRNA の解析を行っている。これにより、「インスリン分泌臓器」とのみ考えられていた膵β細胞において、全く新しい役割を発見できる可能性があり、さらには糖尿病の新規治療法につながる分子機構を解明できるのではないかと期待している。

2 研究方法・研究内容

マウス：膵β細胞特異的 PDK1 ノックアウトマウス(βPDK1KO マウス)は、Pdk1 遺伝子のエクソン 3 および 4 の両端に loxP 配列を挿入したマウス(PDK1 floxed マウス)と、ラットインスリン 2 プロモーターの制御下において Cre リコンビナーゼを発現するマウス(RIP-Cre マウス)を交配させることによって作製した。またコントロールマウスには、Cre 遺伝子の配列を持たない PDK1 floxed マウスを使用した。それぞれのマウスについて、生後 3 週齢から 12 週齢の随時血糖値および体重を測定した。測定は午前 10-11 時に実施し、血糖値測定のための採血は尾部の血管から行った。

βExoG マウスの作製：全身で活性化される CAG プロモーターの下流に loxP-STOP-loxP を挿入し、その下流に CD63-GFP を挿入した遺伝子をもつトランスジェニックマウス (ExoG マウス) を作成した。このマウスと RIP-Cre マウスを交配することにより、βExoG マウスを作製した。

免疫染色：生後 7 週齢および 12 週齢のβPDK1KO マウスとコントロールマウスから膵臓を単離し、ボアン固定液によって固定後、パラフィンに包埋し、5μm に薄切した。この切片に対して、脱パラフィン処理後、1%牛血清アルブミン(BSA)によって室温で 60 分間静置しブロッキング処理を行った。その後、一次抗体とともに 4°C で終夜反応させ、一次抗体の洗浄後に二次抗体とともに室温で 60 分間反応させた。また、Pdx1 の染色については、ブロッキング処理の前にクエン酸緩衝液(pH6.0)を用いたオートクレーブ法による抗原賦活処

理を行った。一次抗体には抗インスリン抗体(1:4, DAKO)、抗グルカゴン抗体(1:2000, Sigma-Aldrich)、抗 Pdx1 抗体(1 : 1500, abcam)、二次抗体に Cy3 結合抗モルモット抗体、FITC 結合抗マウス抗体、Cy3 結合抗ウサギ抗体(いずれも 1:200, Jackson ImmunoResearch)を使用した。Pdx1 に対する染色では、抗 DAPI 抗体による核染色を実施した。

エクソソーム単離: 生後 7 週齢(48-50 日)の β PDK1KO マウスとコントロールマウスそれぞれ 5 匹の心臓から採血を実施し、血清を分離した。この血清を VivaSpin6(GE healthcare)を用いて、6000×g, 30 分間遠心分離し血清を濃縮した後に、EVsecond(GLsciences)を用いて 10 フラクシンのエクソソーム溶液を単離した。

ウエスタンブロッティングと RNA 抽出: 抽出されたエクソソーム溶液について、総蛋白量を 1 サンプルあたり 5 μ L に調整し、15 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施した。分画された蛋白をポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜へ 90 分間転写し、蛋白が転写された PVDF 膜に対して 3% BSA によるブロッキングを行った。その後、一次抗体とともに 4 °C で終夜反応させた。一次抗体は抗 CD9 抗体(1:1000, SBI)、抗 CD81 抗体(1:100, Santa Cruz)、二次抗体に HRP 結合抗ウサギ抗体(1:5000, PROMEGA)、HRP 結合抗マウス抗体(1:3000, Bio-Rad Laboratories)を用いた。ウエスタンブロッティングによってエクソソームの溶出が確認された画分のエクソソーム溶液に対して、miRNeasy Mini Kit(Qiagen)を用いてエクソソーム中 miRNA を抽出した。

マイクロアレイ解析と次世代シーケンス: マイクロアレイ解析は 3D-Gene(TORAY)、次世代シーケンス(NGS)解析は HiSeq2500(macrogen)によって解析を行った。

統計解析: マウスの血糖値と体重、 β 細胞量のデータについて、unpaired Student's t test による統計解析を実施し、P 値が 0.05 未満の場合を統計的に有意であると判断した。

3 研究成果

β PDK1KO マウスの表現型解析

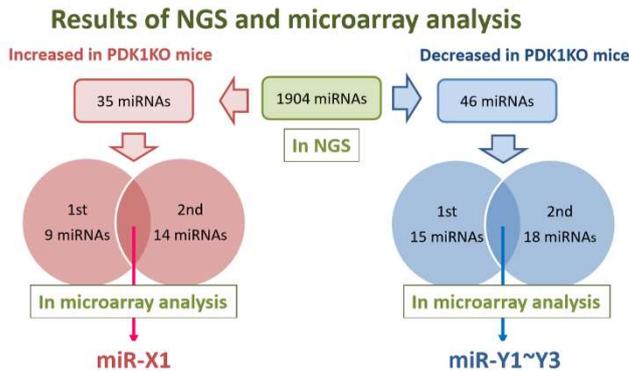
β PDK1KO マウスの詳細な表現型を調べるために、体重と血糖値の加齢に伴う変化を測定した。体重において、 β PDK1KO マウスとコントロールマウス間に有意な差は認めなかった。一方で、血糖値は β PDK1KO マウスにおいて、生後 8 週齢を超えた時点から著明な上昇を認めた。さらに生後 12 週齢ではほとんどの β PDK1KO マウスで 200 mg/dL 以上の高血糖を認めた。そこで、膵 β 細胞不全のみが起こっている時期を特定するために、 β PDK1KO マウスにおいて血糖値が著明な上昇を認める直前である生後 7 週齢における膵 β 細胞を観察した。すると生後 7 週齢において、血糖値には著しい上昇が見られない一方で、膵 β 細胞の形態は既に崩れており、膵 β 細胞量を定量すると、著明な高血糖を認める 12 週齢ほどではないものの、同じ週齢のコントロールマウスと比べて 30 %程度にまで膵 β 細胞量が減少していることが分かった。さらに、 β 細胞へ分化する際の転写因子である Pdx1 陽性細胞の割合も減少しており、インスリン分泌能力を持った成熟 β 細胞の割合が著明に減少していることが分かる。このことから我々は、 β PDK1KO マウスにおける 7 週齢を、糖尿病を発症する直前の β 細胞不全に陥っている状態であると定義した。

エクソソーム miRNA の網羅解析

膵 β 細胞不全状態の β PDK1KO マウスとコントロールマウスの血清からエクソソームが

精製出来ているか確認するために、カラムによって抽出した 10 フラクシオンの溶液について、エクソソームマーカーを確認した。すると、 β PDK1KO マウス、コントロールマウスどちらの血清から抽出した溶液についても、フラクション 4 から 6 において、代表的なエクソソームマーカーであるテトラスパニンファミリーの CD9 および CD81 を確認した。

単離されたエクソソーム溶液から抽出された miRNA について次世代シーケンス解析を実施すると、 β PDK1KO マウスで 182 個、コントロールマウスで 217 個の miRNA が検出された。この中で、マウスとヒトに共通して存在が確認されており、 β PDK1KO マウスにおいてコントロールマウスに比べて有意に発現が高かったものは 35 個存在した。反対に、 β PDK1KO マウスでコントロールマウスに比べて有意に発現が低かったものは 46 個

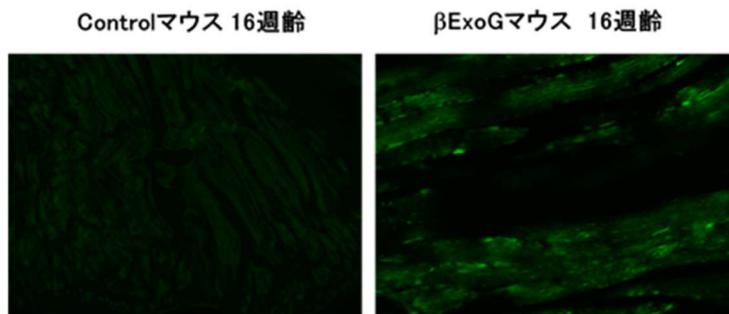


中から NGS 解析において検出されたリード数が多く、マイクロアレイを含めた 3 回の解析における発現量の変化に再現性が高いものを絞ると、 β PDK1KO マウスで発現が高くなるものは 1 個(miR-X1)、発現が低くなるものは 3 個(miR-Y1、miR-Y2、miR-Y3)特定された。

だった。さらに、マイクロアレイを実施した結果、1 回目、2 回目ともに 1500~1700 個の miRNA が検出され、これらの中で次世代シーケンス解析の結果と共通して β PDK1KO マウスにおける発現が高いものは 5 個存在し、反対に共通して β PDK1KO マウスで発現量が低くなるものは 10 個だった。さらに、これらの miRNA の

β ExoG マウスの解析

膵 β 細胞特異的に STOP カセットが欠損することにより、Exosome マーカーである CD63-GFP 結合タンパクを膵 β 細胞においてのみ発現させるマウスを作製した。すなわち、膵 β 細胞から分泌される Exosome のみ GFP で蛍光されることとなる。このマウスを 16 週齢まで飼育した後、解剖を行った。まず膵臓を観察したところ、膵島において GFP の蛍光が認められた。次に各組織における GFP 蛍光を確認したところ、骨格筋において著明に GFP の



の蛍光が確認された(左図)。他の組織(腎皮質など)にも一部 GFP 蛍光を認めたが、骨格筋において優位であった。この結果より、膵 β 細胞と骨格筋において何らかの臓器連関が起こ

っている可能性が示唆された。さらに、この蛍光が非特異的なものではないことを確認すべく、GFP 抗体を用いた蛍光染色も行った。その結果、GFP 蛍光と同一組織での染色が認められ、GFP 蛍光であることが証明された。

4 生活や産業への貢献および波及効果

近年エクソソーム研究が発展しつつあるが、そのほとんどは「がん研究」であり、糖尿病・代謝領域における研究はまだ多くはない。これは糖尿病・代謝疾患が全身に及ぶため、血液

中のエクソソームがどの組織から分泌され、どの組織を標的にしているのか見当がつかない為と思われる。本研究で、申請者は生体における膵β細胞由来のエクソソームを標識することに成功し、その標的組織として骨格筋を同定した。このことは、膵β細胞から骨格筋に対する臓器連関があることを示唆するものである。膵β細胞から骨格筋に対して、どのようなシグナルが送られているのかについては今後の研究課題であるが、膵β細胞が単なる「インスリン分泌臓器」ではなく、他の役割も担っているとすれば大変興味深いところである。膵β細胞が破壊される1型糖尿病患者では、インスリン注射による血糖コントロールが必須であるが、それだけでは不十分ということになる。実臨床においても意義深いものと考えられる。また、膵β細胞に限らず、他の組織においても分泌されるエクソソームを解析することによって、未知の役割が発見される可能性がある。このように、本研究は今後も十分に発展しうるものと期待している。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人ひょうご科学技術協会および当教室の多くのメンバーの協力を深く感謝いたします。