

「2 型糖尿病における膵臓 β 細胞『疲弊』のメカニズムの解明」

兵庫県立大学大学院理学研究科

桜井 一

1 研究の背景と目的

2 型糖尿病は予備軍も含めると日本国民の 10 人に 1 人が患う疾患であり、症状が進行すると完治が困難かつ予後不良の国民病である。2 型糖尿病初期においては、膵臓から分泌されたインスリンに対する感度が鈍化し、血中グルコースの取り込みが遅延する。血中グルコース濃度が低下しにくくなり、膵臓はより多くのインスリンを分泌するようになる。2 型糖尿病後期になると症状進行に伴う需要の高まりに応え、盛んにインスリンを分泌していた膵臓 β 細胞が『疲弊』し、インスリン分泌量が顕著に減少してしまうことが知られている。その結果、血中グルコース濃度が非常に高くなり、糖毒性やインスリン合成過多に起因する小胞体ストレスによって膵臓 β 細胞が死滅してしまうことが知られている。一方で、2 型糖尿病症状において重大なターニングポイントであると言える膵臓 β 細胞の『疲弊』の仕組みはほとんど明らかにされていない。

本研究では、膵臓 β 細胞が『疲弊』することで、インスリン分泌が減少に転じるメカニズムの解明を目指す。他の内分泌タンパク質と同様に、インスリンの合成は小胞体が担い、分泌はゴルジ体が担っている。合成過多による小胞体ストレスと同様に、分泌過多時にゴルジ体機能が不足するとゴルジ体ストレスが生じることを所属研究室で発見している。所属研究室はこのゴルジ体ストレス研究においてイニシアティブを有しており、インスリン分泌過多の末に β 細胞がおちいる『疲弊』の正体がゴルジ体ストレスなのではないかという独創的な仮説の検証を本研究では目指した。

ゴルジ体ストレスに曝された細胞はストレス解消を主目的とする、ゴルジ体ストレス応答に機能する分子群を活性化する (Sasaki and Yoshida, 2019, FEBS Lett)。所属研究室ではこのゴルジ体ストレス応答メカニズムの解明に精力的に取り組んでおり、これまでに複数の分子の同定に成功している。一方で、ゴルジ体ストレスの誘導には、ゴルジ体機能を阻害するような薬剤を使用しており、ゴルジ体ストレス応答機構が本来備えている生理的な意義は未解明のままであった。本研究の仮説である、インスリン分泌の制御メカニズムの破綻による糖尿病進行に、ゴルジ体ストレス応答機構が機能するのであれば、ゴルジ体ストレス応答の生理機能を明らかにできるだけでなく、既存の知見とは異なった視点から糖尿病進行の克服を目指せる可能性が拓けると期待している。

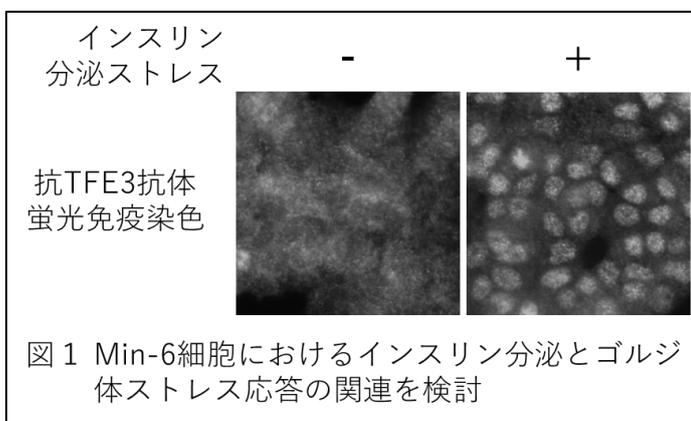
2 研究方法・研究内容

本研究では、まず、ゴルジ体ストレス応答機構がインスリン分泌量の変化、すなわちインスリン分泌に貢献しているゴルジ体への負荷の変化に応答するのかを検証する。インスリン分泌量の変化に応じたゴルジ体ストレス応答関連分子の変化を、① 膵臓由来培養細胞および ② マウス膵臓において検証する。さらに、③ インスリン分泌量が顕著に減少した疲弊 β 細胞において、ゴルジ体ストレス応答機構に変化がみられるのかを検証する。

3 研究成果

① 培養細胞を用いたインスリン分泌量変化とゴルジ体ストレス応答活性の関連性の検討

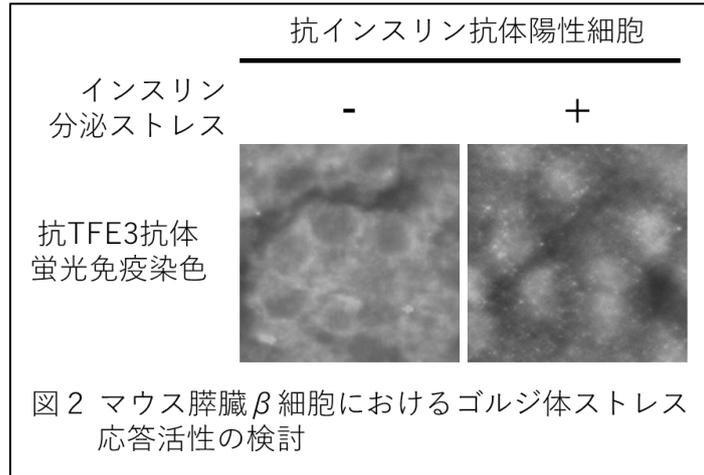
膵臓β細胞インスリノーマ由来の培養細胞である **Min-6** 細胞は培地中のグルコース濃度に依存してインスリン分泌量が増加することが知られる培養細胞である。**Min-6** 細胞を高グルコース培地および低グルコース培地で培養し、インスリン分泌が活性化および不活性化したβ細胞のモデルとした。また、ゴルジ体ストレス応答に機能する分子群のうち転写調節因子 **TFE3** に着目した。現在までにゴルジ体に負荷されるストレスの種類の違いに応じて複数のゴルジ体ストレス応答経路が存在することが明らかにされており、経路によって異なる分子が機能を発揮するケースも報告されている。一方で、転写調節因子 **TFE3** は複数の経路において活性化することが報告されている分子であり、本研究で期待しているインスリン分泌ストレスは既報のいずれのゴルジ体ストレスとも異なるストレスであることが予想されるため、**TFE3** に着目した (Taniguchi et al, 2015, Cell Struct Funct; Jamaludin et al, 2019, Cell Struct Funct; Sasaki et al, 2025, J Biol Chem)。ゴルジ体ストレスに曝された細胞において、**TFE3** タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち 108 番目のセリン残基のリン酸化修飾が脱リン酸化されると、**TFE3** の細胞内局在パターンが細胞質中から核内へと顕著に変化する。この **TFE3** の細胞内局在パターンの変化を指標として、**Min-6** 細胞のインスリン分泌活性の変化とゴルジ体ストレス応答機構のクロストークの有無を検証した。その結果、非常に興味深いことに、培地中のグルコース濃度依存的に **TFE3** の細胞内局在パターンが変化することを発見した (図 1)。本結果より、現在まで薬剤によって人工的に誘導されたゴルジ体ストレスに対する応答機構でしかなかったゴルジ体ストレス応答機構が、ゴルジ体を経由して分泌される内分泌タンパク質であるインスリンの分泌量調節に機能するという生理機能を持つ可能性が初めて示唆された。**Min-6** 細胞は培地中のグルコース濃度変化に応じてインスリン分泌活性が増加するが、他にもグルコース濃度に応答する細胞機能は複数存在するため、インスリン分泌をより直接的に誘導・阻害できる薬剤を使用して更なる検証が必要である。糖尿病治療に使用されるインスリン分泌促進剤である **SU** 薬や、インスリノーマ治療に使用されるインスリン分泌阻害剤である **KATP** チャネル活性化剤による、より直接的なインスリン分泌活性の変動時にもゴルジ体ストレス応答機構が作用するのかを今後検証する必要がある。既に本追加検証の予備実験を実施しており、培地中のグルコース濃度変化に依存したゴルジ体ストレス応答活性化と一致した結果を得ている。これまでに得られた知見が統計的にも裏付けられることを今後検証する必要がある。



② マウス膵臓におけるインスリン分泌量変化とゴルジ体ストレス応答活性の関連

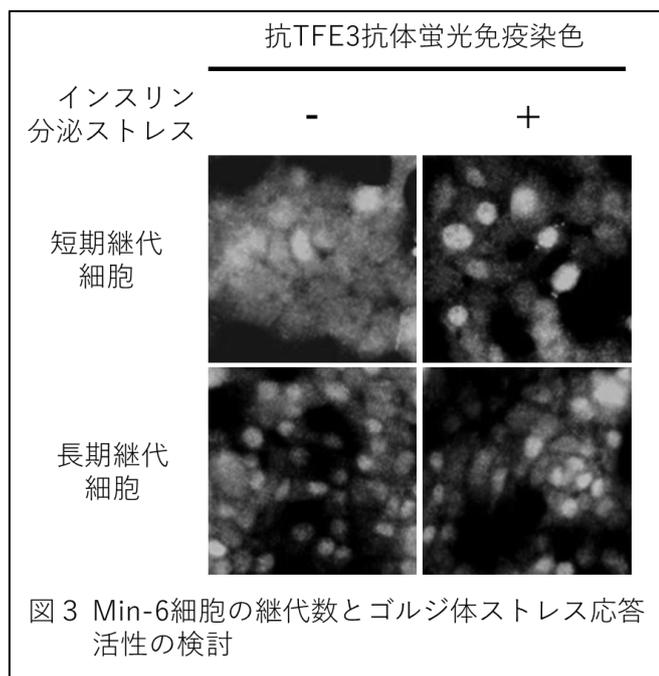
性の検討

マウス膵臓インスリノーマ由来培養細胞 Min-6 細胞で検出されたインスリン分泌活性依存的なゴルジ体ストレス応答機構の働きがマウス個体においても同様の応答を示すのか検証した。C57BL/6 系統マウスを 1 晩絶食することで低血糖状態を誘導し、血糖値測定後に 10% グルコースを腹腔投与すると 20 分後に顕著な血糖値上昇を検出することができる。本実験系を用い、低血糖状態と高血糖状態のそれぞれの条件下における膵臓β細胞を組織免疫蛍光染色により観察した。麻酔下で摘出した膵臓を PFA 固定後、凍結切片を作製し、抗インスリン抗体を用いて蛍光抗体染色し、膵臓ランゲルハンス島β細胞を可視化した。同時に、抗 TFE3 抗体で蛍光抗体染色し、TFE3 の細胞内局在を比較検討すると、Min-6 細胞の結果と一致して、マウスの血糖値変化に依存した TFE3 の細胞内局在パターンの変化を検出することに成功した (図 2)。本成果により、培養細胞を用いて得られた新規の知見が、生体内の現象を反映したものであることが裏付けられた。



③ インスリン分泌量が顕著に減少した疲弊β細胞において、ゴルジ体ストレス応答機構に変化がみられるのかを検証

培地中のグルコース濃度に応答してインスリン分泌量が変化する Min-6 細胞であるが、長期に渡って継代するとグルコース濃度変化に応答せず、インスリンを分泌しなくなることが知られている。Min-6 細胞は高グルコース培地で生育・維持するため、初期糖尿病時におけるインスリン分泌量増加と似たようなストレスに曝された結果、糖尿病進行時のβ細胞疲弊に似た現象によって Min-6 細胞も疲弊しているのではないかと考えた。本仮説のもと、Min-6 細胞を高グルコース培地で 25 継代以上継続したところ、培地中のグルコース濃度依存的な TFE3 の細胞内局在パターン変化が観察できなくなることを発



見した (図 3)。本研究期間では 25 継代継続した Min-6 細胞の用意に長時間を要したため、以降の解析は実施できていない。今後の課題として、本成果より得られた示唆を糖尿病モデルマウスを用いて実際に初期から後期にかけて病態進行することでゴルジ体ストレス応答機構が働きにくくなっているのかを検証したい。

4 生活や産業への貢献および波及効果

2 型糖尿病治療において『疲弊』前までの初期症状であれば経口薬による治療が有効であるが、『疲弊』に至ってしまうと不可逆である上に、インスリン注射が必要になるなど予後が悪い。本研究の成果により、『疲弊』のメカニズムの一端にこれまで生理的意義の不明であった細胞機能であるゴルジ体ストレス応答が関与する可能性が示唆された。これまで全く関連性を予期されていなかったゴルジ体ストレス応答の寄与を明らかにしたことで、2 型糖尿病治療における最終防衛ラインとも言える初期症状からの進行をモニターする指標の開発や、後期症状からの回復が期待できるような新規治療方針の発展に期待できる。ゴルジ体ストレス応答に関する知見は兵庫県立大学においてイニシアティブが確立されており、これまでの細胞生物学的成果を医学薬学領域へと兵庫県から拡大していけるのではないかと期待している。