

論文の内容の要約

氏名：河野 玄太

博士の専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：グルコース応答性インスリン分泌における TCA 回路酵素の役割の検討

【背景・緒言】糖尿病は、インスリン作用不足に基づく慢性の高血糖状態を主徴とする代謝疾患群と定義される。日本人の糖尿病患者の約 8 割を占める 2 型糖尿病は、肥満などの環境因子に伴うインスリン抵抗性と膵β細胞からのインスリン分泌不全によって発症する。インスリン分泌刺激に最も重要な物質としてグルコースが挙げられる。現在、提唱されているインスリン分泌機構の概要は以下の通りで、グルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) のシグナル伝達経路には、「triggering」経路と「amplifying」経路がある。「amplifying」経路はインスリン分泌の 2 相目に関連があるとされ、ミトコンドリア由来の citrate、glutamate などの代謝産物が関与していると考えられている。Adam らは、*Fh1* (*Fumarate hydratase 1*) ノックアウトマウスを用いて、TCA 回路酵素である *Fh1* を欠損させると重篤な糖尿病になると報告している (Cell Rep. 2017)。しかし、細胞レベルで GSIS が障害されているのか、膵島の生存が障害され個体のインスリン分泌が低下しているのかは不明であり、MIN6 細胞を用いて *Fh1* ノックダウン (KD) 細胞を作成し検討した。さらに、TCA 回路を構成する酵素の一つである、*Ogdh* (*Oxoglutarate dehydrogenase*)、*OgdhL* (*Ogdh-like*) を KD した細胞も作成し検討した。

【目的】GSIS 機構における TCA 回路の役割を解明するために、MIN6 細胞を用いて、TCA 回路関連酵素の *Fh1*、*Ogdh*、*OgdhL* 遺伝子の発現抑制を行った。

【方法】ドキシサイクリン (DOX 1.0 μg/ml) 誘導性に、*Fh1*、*Ogdh*、*OgdhL* 遺伝子に対する shRNA を発現する細胞を作成し、放射性同位体標識グルコースを用いた [5-3H]glucose 代謝及び

[U-14C]glucose 代謝の測定、GSIS の測定、細胞抽出液のメタボライト解析を行った。メタボライト解析は、3-NPH または MTBSTFA で誘導化し、LC-MS/MS を用いて解析を行った。

【結果】 *Fhl*KD では、細胞の全タンパク質量は、DOX を加えてから 7 日後では有意差を認めなかったが、14 日後ではコントロールと比較して 76.4% に減少した。DOX を加えてから 7 日後では、解糖系流量は有意に増加し (100 ± 8 (任意単位) (DOX -) vs. 120 ± 10 (DOX +), $p = 0.0370$, $n = 3$)、ATP/ADP 比は保たれていたが、citrate は減少 (100 ± 12 vs. 90 ± 12 , $p = 0.0330$, $n = 5$)、glutamate も減少して (100 ± 12 vs. 82 ± 9 , $p = 0.0041$, $n = 5$)、GSIS は低下した (100 ± 13 vs. 76 ± 12 , $p = 0.0405$, $n = 4$)。以上の結果は、Adam らの *Fhl* ノックアウトマウスの結果と同様に、全タンパク質量の減少が示すような細胞障害が生じている点は一致した。一方で、Adam らは、顕著なインスリンコンテンツの減少により、GSIS を評価できていないが、本研究では細胞レベルで GSIS の障害を評価することができた。他にも、インスリン分泌能に影響する TCA 回路酵素があると考え、 α -KG から succinyl-CoA への変換を触媒する酵素を検討した。*Ogdh*KD では、解糖系流量は減少 (100 ± 9 vs. 78 ± 8 , $p = 0.0240$, $n = 3$)、ミトコンドリア代謝は減少し (100 ± 11 vs. 82 ± 11 , $p = 0.0460$, $n = 3$)、ATP/ADP 比が小さくなる傾向で、citrate を含む多くの代謝産物が減少しているにもかかわらず、glutamate の増加を認め (100 ± 13 vs. 125 ± 19 , $p = 0.0297$, $n = 5$)、GSIS が維持された (100 ± 18 vs. 98 ± 26 , $p = 0.7964$, $n = 3$)。さらに、ミトコンドリア代謝は、GSIS の 2 相目である「amplifying」経路に関連していると考えられるので、グルコース還流実験を行った。*Ogdh*KD では、グルコース還流実験において、インスリン分泌の第 2 相が相対的に増加した。次に、*Ogdh* と同様に、 α -KG から succinyl-CoA への変換を触媒する酵素である *OgdhL* の KD を検証した。*OgdhL*KD の解析も、*Ogdh*KD と同様の傾向で、glutamate の増加に伴うインスリン分泌能の増加を認めた。

【考察】 glutamate dehydrogenase (GDH) ノックアウトマウスでは、インスリン分泌能が 40% 程度減少するという報告があり、glutamate の重要性が提唱されている。一方、citrate がインスリ

ン分泌に重要であるという報告もあるが、最近の報告で、ミトコンドリアのクエン酸-イソクエン酸輸送担体をノックアウトしたマウスでは、インスリン分泌能に影響がないという報告もあり、まだ議論が分かれ不明な点も多い。本研究では、**citrate** に比較して **glutamate** がより大きく GSIS に関連する結果となり、**glutamate** がインスリン分泌の「**amplifying**」経路に関与している可能性があり、ミトコンドリアでの分泌シグナル形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。MIN6 細胞の観察から、ミトコンドリア内の分泌シグナル形成の障害が、GSIS の障害の原因である可能性が示唆され、ヒトの 2 型糖尿病の発症過程を解明する一歩になりうると考えられた。