

＜高血糖が血管内皮細胞および肝細胞に及ぼす影響に関する基礎研究＞

研究年度 令和4年度

研究期間 令和3年度～令和4年度

研究代表者名 岡本 恭子

【はじめに】

厚生労働省による令和元年国民健康・栄養調査では20歳以上の成人のうち「糖尿病が強く疑われる人(すでに診断され治療を受けている人を含む)」は1196万人、「可能性を否定できない人(予備軍)」は1055万人いることが報告されている。「可能性を否定できない人」が「糖尿病が強く疑われる人」へと移行している状況にあり、長崎県でも例外ではなく、平成28年度の長崎県健康栄養調査によると、同県の糖尿病患者数は予備軍も含めて約29万人と推定され、今後も増加すると予想される。糖尿病はエネルギー源であるグルコースの体内での利用効率が低下する以外に、網膜症、腎症、神経障害などの合併症により罹患者のQOLが著しく低下することも問題である。また、日本糖尿病学会と日本癌学会合同の「糖尿病と癌に関する委員会」の平成25年の報告では、日本の8つのコホート研究(JPHC Studyなど)から糖尿病の人はそうでない人に比べてガンに1.2倍なりやすいと解析されており、糖尿病に至る肥満による炎症やインスリン抵抗性によって生じる増殖因子の増加などがガン発症の一因として報告されている。

報告者はガン誘発機序の一因に高血糖の条件下において、血管内皮細胞などから分泌されるエクソソームという細胞小胞が関与しているのではないかと考えており、その機序について明らかにし、ガンひいては糖尿病の発症メカニズム、重症化を進める原因などの解明することは予防法などを見出すことにつながると考えている。本研究の成果を血糖コントロールの重要性を示す上での基礎データとして確立し、食事指導の際などに活用し、長崎県の住民の方が食習慣改善に関心を持ち、健康増進の一助につながることを目標とした。

【研究内容・成果】

報告者はこれまでの研究から代謝産物を網羅的に解析するメタボローム解析の技術を用いて、2型糖尿病患者の血清を分析し、糖尿病の指標の一つであるHbA1c値が高値を示すほど、糖代謝(解糖系)の中間代謝産物のひとつである2/3ジホスホグリセリン酸(2/3-PG)が糖尿病患者の血清中で高値を示すことを見出している。この代謝産物は細胞内で生じるため、細胞外に分泌されるものではない。しかし血清中(細胞外)に見られたため、細胞外に分泌される機序があるのではと考え、その機序の一つとしてエクソソームという細胞小胞を用いたシステムで分泌されているのではないかと考えた。前年度の研究では高血糖と同等のグルコース(以下、糖と略す)濃度の条件下で血管内皮細胞から糖尿病患者の血清中から見出されたのと同じ代謝産物が検出されるかを検証すること計画し、糖尿病の様な細胞が作れるかを検証するため、細胞を正常な血糖値(糖濃度が100mg/dL)の条件下、高血糖(糖濃度が450mg/dL)の条件下で長期培養したが、1~3ヶ月それぞれの血糖濃度で培養した細胞を用いて、増殖速度を検証したところ、いずれの条件下でも有意な差はみられなかった。また細胞のインスリン受容体の発現量をウエスタ

ンブロット法で検証し高血糖の条件下ではインスリンレセプターの発現が減少していないかを検証したがやはり有意な差はみられず、糖尿病のような細胞は作成できなかった。

そこで今年度は2型糖尿病の特徴であるインスリン抵抗性を疑似的に作り出すため、RNA干渉の技術を活用してインスリン受容体の発現を減少させた細胞を作製することとした。インスリンの効果を抑えることで、細胞内への糖の取り込みを抑制し、培地中の糖濃度が高い状態が継続する培地環境にし、ヒトの高血糖と同等の状態を短期間で作りだそうと試みたが、インスリンレセプターの発現を減少させると、著しく細胞の生存率が下がった（図1）。また、生存した細胞のインスリン受容体の発現量をRT-qPCR法で検証したが、その細胞はインスリン受容体の発現量が維持されていたため、インスリン受容体の発現量を抑えられた（2型糖尿病の特徴を持つ）細胞は生存自体が困難になったと考察した。

前年度はエクソソームの単離・精製の確立・検証まではできていなかったため、今年度は報告されている単離・精製法の内どの方法が本研究に向いているかを検討した。プレ実験の要素が大きいため、検討には培養しやすい肝癌細胞株を用いて、試薬会社から販売されている精製キットを用いる方法と超遠心分離機を用いての遠心分離による単離の比較を行った。エクソソームの回収率はCD9を用いたウエスタンブロット法にて検討した。また、キットを用いた精製法は精製後に他の細胞への培養実験には使用できないが、遠心分離法であればフィルター滅菌後に細胞への培養実験に用いることができるため、フィルター滅菌後のエクソソームの回収率も併せて検討した。エクソソームの回収率は「遠心分離」>「キットでの精製」>「遠心分離+フィルター滅菌」の順であった（図2）。回収率から「遠心分離」による単離が一番いいと判断した。また、フィルター滅菌をしても回収できていることから細胞との培養実験は「遠心分離+フィルター滅菌」を用いることとした。さらに、「遠心分離」によって単離したエクソソームをテトラヒドロフランによって抽出し、メタボローム解析を行ったところ2/3-PGが検出された（図3）。このことからエクソソームに2/3-PGが含まれ、細胞外に分泌される可能性が示唆されたが、メタボローム解析ではわずかな他からの混入でも検出してしまうことがあるため、今後、エクソソームの定量化を図るとともに、再現性の検討が必要と考えられた。

【今後の研究】

RNA干渉法を用いてのヒト血管内皮細胞での2型糖尿病のモデル細胞の作成はうまくいかなかった。しかし、癌化した細胞ではあるが、肝癌細胞のエクソソームから2/3-PGが検出されたことから、2/3-PGが細胞外へ分泌され血流を介して、他の細胞に取り込まれる可能性がみられたことから、今後はヒトの正常肝細胞の2型糖尿病モデル（RNA干渉法でインスリン受容体の発現抑制をした細胞）、もしくは糖濃度を変えた培地で長期間維持し、そこから回収したエクソソームのメタボローム解析、および血管内皮細胞との培養実験を検討している。当初は血管内皮細胞⇒肝細胞へのアプローチを考えていたが、血管内皮細胞の扱いが困難であることと、食事から吸収された糖は肝臓に送られることを鑑みて、肝臓⇒血中（血管内皮細胞）へのアプローチも考えられるため、実験しやすい方法でより検証を重ねていきたいと考えている。糖尿病下における肝細胞から分泌されたエクソソームが他の細胞へ取り込まれた際に、炎症などを引き起こす可能性などを検討していきたいと考えている。

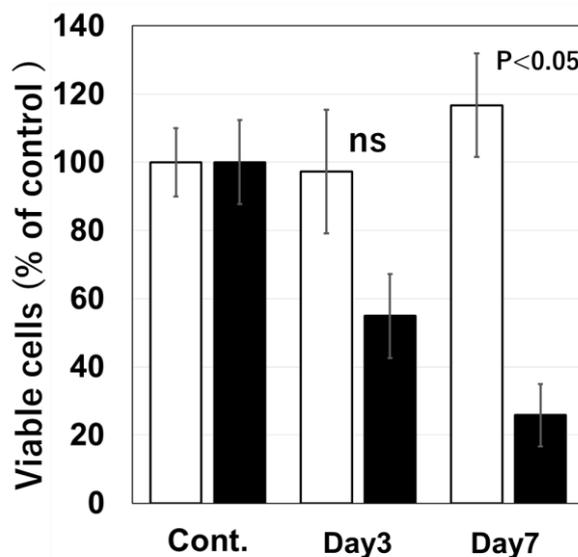


図1. ヒト血管内皮細胞でのインスリン受容体の RNA 干渉後の細胞の生存率

□ コントロール ■ インスリン受容体の発現を抑制

インスリン受容体の発現を抑えると細胞の生存率が著しく低下した。



図2. 肝癌細胞株におけるエクソソームの回収法によるエクソソームの回収率の比較

1:「遠心分離+フィルター滅菌」、2:「遠心分離」、3:「キットによる精製」

CD9（エクソソームのマーカータンパク質のひとつ）の抗体を用いたウエスタンブロット法によって、回収率を比較した。2>3>1の順に回収率が高かった。

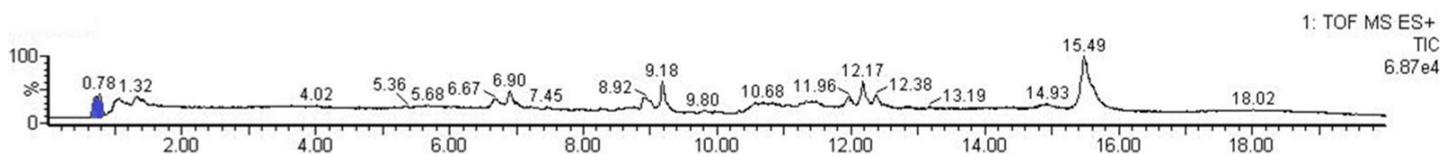


図3. 肝癌細胞株における「遠心分離」で単離したエクソソームのメタボローム解析

青く塗られた部分が2/3-PGと思われるピークエリア。