

論文の内容の要旨

膵臓 細胞死における糖毒性と脂肪毒性の機序の解析

奥山亮

2型糖尿病は、インスリン作用臓器（筋肉、肝臓、脂肪）でのインスリン感受性の低下（インスリン抵抗性）と膵臓ランゲルハンス島細胞からのインスリン分泌の不全によって特徴付けられる慢性高血糖を呈する代謝疾患である。末梢組織でのインスリン抵抗性は当初膵臓からのインスリン過分泌によって代償されるが、次第に膵臓細胞の疲弊・脱落を来たしてインスリン分泌不全を生じ、高血糖へと転じる。持続的高血糖状態は更なる膵臓細胞の機能不全と細胞死を誘導し、2型糖尿病を重篤化させる。したがって未だ十分に解明されていない高血糖に伴う膵臓細胞の疲弊のメカニズムを明らかにすることは、2型糖尿病の成因を理解し、その治療薬を探索する上で極めて重要である。

持続的高血糖時に膵臓細胞が障害される機序として、これまで糖毒性と脂肪毒性の概念が提唱されてきた。前者は高糖濃度自体が細胞疲弊を起こすとの考え方で、長時間膵臓細胞を高グルコース濃度で処置することによって、インスリン分泌能は低下し、細胞の生存率も低下することが報告されてきた。こうした糖毒性は、グルコースの代謝経路のひとつであるヘキソサミン経路の亢進によってもたらされるとの仮説が支持されているが、同経路への過剰流入がどういったメカニズムで細胞疲弊をもたらすかは分かっていない。一方、脂肪毒性の概念は、通常肥満・糖尿病患者で見られる高遊離脂肪酸血症が膵臓細胞の機能不全やアポトーシスに原因を担っているとの考え方で、高遊離脂肪酸濃度に長時間さ

らされた 細胞ではグルコース応答性インスリン分泌低下や細胞死の亢進が起こることが多くの研究例で報告されている。しかしながらその細胞内メカニズムについては、一酸化窒素 (NO) やセラミドの関与、トリグリセリド (TG) の細胞内への蓄積など諸説あり、結論は出ていない。また最近この糖毒性と脂肪毒性が協調的に働いて膵 細胞疲弊を増悪させるとの報告があり注目されるが、その機序については全く不明である。

私は、糖尿病状態での膵 細胞の細胞死誘導のメカニズムを明らかにするため、上述のヘキサミン経路を介した糖毒性の機序及び脂肪毒性が高糖条件で増強される機序について以下のような検討を行った。

I. ヘキサミン経路の亢進による膵 細胞死における蛋白 O 結合型 *N*-acetyl-D-glucosamine(GlcNAc)修飾の関与について

ヘキサミン経路はグルコースの代謝経路のひとつで、生体に必須の UDP 糖のひとつである UDP-GlcNAc を生ずる経路である。UDP-GlcNAc は蛋白の糖鎖修飾の直接の基質として用いられるほか、プロテオグリカンの構成やシアル酸生合成の前駆体等様々な生体反応に利用される。そのひとつが蛋白の O 結合型 GlcNAc 修飾である。本糖鎖修飾は蛋白のセリン/スレオニン残基に GlcNAc が O 結合型で付加されるもので、ゴルジ体で蛋白に付加される長鎖の糖鎖とは異なり、単一の GlcNAc 分子のみが短い turn over で修飾アミノ酸と結合・乖離を起こすユニークな糖鎖修飾反応である。本糖鎖修飾の亢進が膵 細胞の細胞死を引き起こす、との説が報告されたため、私は高血糖時のヘキサミン経路への流入量の増加に引き続いて起こると考えられる本糖鎖修飾の増加が、 細胞死における糖毒性の機序を説明するメカニズムである可能性があると考え検討を行った。O-GlcNAc 修飾については研究例がそれほど多くなく方法論の確立が十分ではないため、まず本糖鎖修飾を研究するツールとして O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) の簡便なアッセイ法を確立した。本法では、組織・細胞より抽出し脱塩したサイトソル画分を酵素源として用い、豊富な O-GlcNAc 糖鎖修飾を受けることが知られる p62 nuclear pore protein の serine/threonine rich domain のリコンビナント蛋白を受容蛋白基質として標識した UDP-GlcNAc の基質蛋白への付加量をカウントすることによって組織・細胞中の OGT 活性を簡便に測定することを可能とした。本アッセイ法は受容蛋白基質量及び酵素源のサイトソル量に依存したカウント量が得られかつ OGT に対する抗体で活性が中和されることで validate された。さらに本酵素アッセイ法を用いて OGT の酵素的特性を精査したところ、OGT 活性は他の組織に比較して脳に非常に高いこと、ミリモル濃度の塩の存在下で酵素活性は阻害され、その様式は基質への酵素の親和性を下げることで活性が低下していること、サイトソル中の OGT は 37 °C で急峻に不活性化されるが核抽出液中の OGT は 37 °C でもより安定なこと、しかしながらサイトソル OGT と核 OGT は抗 OGT 抗体を用いた western blot 法では等しい分子サイズに検出され、その活性も共に同抗体で中和されることが明らかとなった。さらに組織・細胞抽出液中の O-GlcNAc 糖鎖量を測定するため既報に基づいて ³H-galactose labeling 法を立ち上

げ、脳抽出液中の *O*-GlcNAc 糖鎖量を測定したところ、本糖鎖はサイトソルより核内により豊富であることが確認された。こうした *O*-GlcNAc 研究に有用な方法論を使ってヘキサミン経路亢進をもたらす膵臓 細胞死における *O*-GlcNAc 糖鎖修飾の関与の有無について検討した。細胞株である HIT-T15 株と Min6 株に、細胞内に取り込まれてヘキサミン経路に流入するグルコサミンを処置することによってヘキサミン経路を亢進させたところ、グルコサミン処置濃度を 10mM まで上げて初めて処置後 24 時間より有意な細胞生存率の低下が両細胞株で観察された。しかしこのとき細胞質内の *O*-GlcNAc 糖鎖量を測定したところ、*O*-GlcNAc 量は 2 から 5 mM グルコサミン処置で既にコントロールと比して有意な増加がみられ、10mM グルコサミン処置では逆に *O*-GlcNAc 量がコントロールレベルまで戻っており、グルコサミン処置をもたらす 細胞死誘導と細胞質 *O*-GlcNAc 蓄積との間には濃度的な乖離が認められた。また *O*-GlcNAc を蛋白より脱離させる酵素である *O*-GlcNAcase の選択的阻害剤 PUGNAc を両 細胞株に処置したところ細胞質内 *O*-GlcNAc 量は有意に上昇したが細胞生存率は全く変化しなかった。*O*-GlcNAc 蓄積が膵細胞死を誘導するとの既報によると、*O*-GlcNAcase の阻害作用を有する化合物である streptozotocin が 細胞選択的に細胞死を誘導する理由として、細胞の OGT 発現量が他の組織に比して高く、これが 細胞に *O*-GlcNAc 蓄積を起こしやすいためと説明されている。しかしながら HIT-T15 と Min6 細胞の OGT 活性は膵臓以外の組織由来の細胞株と比しても特に高くなかった。また両細胞に有意な *O*-GlcNAc 量増加をもたらす 5mM のグルコサミンを処置しても両細胞株のインスリン分泌量も変化が無く、*O*-GlcNAc 蓄積は 細胞死のみならずその機能不全にも関与していないと考察された。

II. 膵 細胞死における脂肪毒性の高糖条件での増強のメカニズムの解析

2 型糖尿病時の進行と共に見られる膵臓ランゲルハンス島 細胞の細胞死の原因として、脂肪毒性という概念が提唱されている。これは 細胞が高濃度の遊離脂肪酸に長時間暴露されることによってグルコース応答性インスリン分泌機能が減弱したり、細胞生存率が低下する、という考え方である。私はこの脂肪毒性が細胞外グルコース濃度が高いときにより増強されることを見出した。膵 細胞株である HIT-T15 株に 0.5-1.5mM パルミチン酸を 24 時間処置することにより、細胞生存率はコントロールと比して低下したが、このパルミチン酸の細胞毒性作用は、細胞外グルコース濃度が 12.8mM の条件では 2.8mM の場合と比して有意に強まっていた。パルミチン酸の 細胞毒性作用は 2.8mM 及び 12.8mM グルコース条件で共に NO 合成阻害剤の L-NMMA や L-NAME の処置によって有意に抑制され、パルミチン酸の細胞死誘導作用は NO の合成を介していることが示唆された。実際パルミチン酸処置で HIT 細胞からの NO 産生は有意に増加しており、しかしながらこの増加の程度は 2.8mM グルコースと 12.8mM グルコース条件で差は見られなかった。細胞外グルコース濃度の上昇は細胞内での活性酸素の発生量を増加させることが知られているため、脱共役剤の CCCP や superoxide dismutase mimetic の MnTBAP を処置して細胞内の

superoxide の産生を抑制したところ、12.8mM グルコース条件でのみパルミチン酸の細胞毒性作用が有意に減弱した。NO による細胞死誘導は、NO が superoxide anion と反応して出来る反応性の高いフリーラジカルである peroxynitrite が重要な役割を担うと言われており、高グルコース条件で産生の増した superoxide anion がパルミチン酸処置によって発生する NO と反応してその細胞障害活性を増強することが、高グルコース条件でパルミチン酸の細胞毒性が強まるメカニズムではないかと考察された。

上記研究より以下の結論が得られた。

- 1 .ヘキソサミン経路の亢進による膵細胞死には、同経路の最終産物である UDP-GlcNAc が利用される蛋白の O-GlcNAc 修飾は関与しないと考えられた。
- 2 .膵細胞のパルミチン酸による細胞生存率の低下は細胞外グルコース濃度が高いときに増強された。パルミチン酸の細胞毒性作用は NO の産生増加を介しており、高グルコースは活性酸素の生成を介してこの細胞毒性作用を強めていると考えられた。