

## 審査の結果の要旨

氏名 奥山 亮

2 型糖尿病はインスリン標的臓器でのインスリン抵抗性と膵臓 細胞からのインスリン分泌不全からなる慢性高血糖を呈する代謝疾患である。本疾患においては、持続的高血糖状態が膵 細胞の細胞死・機能不全を惹起・進行させ、病態を重篤化させることが知られている。したがって、糖尿病状態での細胞外環境によって 細胞死が誘導されるメカニズムを探ることは、本疾患の進行の機序を解明し、治療薬探索への応用を考えていく上で極めて重要である。

糖尿病状態での膵 細胞死誘導の原因として、糖毒性と脂肪毒性という 2 つの概念が提唱されており、この各々について、学位申請者奥山亮はその機序を解析する目的で以下のような研究を行った。

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

2 型糖尿病時の膵臓 細胞死の機序の一つとして提唱されている糖毒性という概念は、細胞が長時間高グルコース濃度に晒されることによって高糖濃度自体が 細胞障害を引き起こす、という考え方である。この糖毒性の機序としては、グルコースの代謝経路の一つであるヘキサミン経路の亢進によることがこれまでの研究で報告されてきた。しかしながら同代謝経路への過剰流入がどういったメカニズムで 細胞死を誘導するかについては分っていない。申請者は、ヘキサミン経路の最終代謝物である UDP-GlcNAc が利用される糖鎖修飾反応の一つである蛋白 O-GlcNAc 修飾に着目し、この糖鎖修飾の蓄積が 細胞死を誘導する可能性について検討を行った。

蛋白 O-GlcNAc 修飾についてはその研究者の少なさから方法論の確立が十分でないため、まず O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) の簡便な酵素アッセイ法を確立し、その酵素的特性を調べた。組織・細胞より抽出し脱塩したサイトソルもしくは核抽出画分を酵素源とし、p62 nuclear pore protein の serine/threonine rich domain を受容基質として、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で酵素活性を測定する方法を確立した。本法を用い、OGT 比活性が脳に非常に高いこと、ミリモル濃度の塩で阻害を受け、このとき基質への親和性が低下していること、サイトソル OGT は 37 °C で急峻に不活性化を受けるが核抽出液中の OGT はより安定なこと、しかしながらサイトソルと核の OGT は分子サイズが等しく同一の抗体で活性が中和できることを明らかとした。引き続き、組織・細胞抽出液中の O-GlcNAc 糖鎖量を定量的に測定する <sup>3</sup>H-galactose labeling 法の確立も行った。

こうした方法論を用いて、膵臓 細胞死における O-GlcNAc 糖鎖修飾の蓄積の関与について検討した。細胞株である HIT-T15 及び Min6 にグルコサミンを処置して薬理的にヘキサミン経路を亢進させたところ、10mM グルコサミン処置で両細胞株で有意に細胞生存率が低下したものの、サイトソル O-GlcNAc 糖鎖蓄積は既に 5mM で最大増加を示し、細胞死誘導と O-GlcNAc 糖鎖蓄積の間にグルコサミン濃度の乖離が見られた。また O-GlcNAc 糖鎖を蛋白より脱離させる O-GlcNAcase の阻害剤である PUGNAc を両細胞株に処置すると、サイトソル O-GlcNAc 糖鎖量は大きく増加したが、細胞生存率には変化がなかった。また 5mM グルコサミン処置では両細胞

株でインスリン分泌量にも変化はなく、以上の結果より *O*-GlcNAc 糖鎖蓄積は 細胞死と機能不全のいずれにも関与していないと考察された。

・ 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 型糖尿病時の膵臓 細胞死の機序の一つとして、脂肪毒性という考え方が提唱されている。これは 細胞が長時間高濃度の遊離脂肪酸に晒されることによって細胞死が誘導される、との概念である。申請者は、 細胞株 HIT-T15 にパルミチン酸を処置したときに誘導される細胞死が、細胞外グルコース濃度を 2.8mM から 12.8mM に上昇させた時に有意に増強されることを見出した。パルミチン酸の 細胞毒性は一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害剤の処置で有意に抑制され、本細胞死誘導作用は 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時の HIT-T15 の NO 産生量は有意に増加していたが、この増加の程度は 2.8mM グルコースと 12.8mM グルコースで変化がなかった。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、薬理的処置で superoxide を減少させたところ、12.8mM グルコース条件でのみパルミチン酸の 細胞毒性作用は有意に減弱した。NO による細胞毒性は NO が superoxide anion と反応してできる 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加した superoxide がパルミチン酸処置で発生する NO と反応してその細胞傷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。

以上の研究より、膵臓 細胞死における糖毒性の機序について、まず蛋白 *O*-GlcNAc 糖鎖蓄積の関与は否定的であることが明らかとなった。糖毒性は UDP-GlcNAc の生合成経路であるヘキサミン経路の亢進が原因とされているが、UDP-GlcNAc が利用されるどの生理反応が糖毒性による 細胞死誘導に関与しているかについては殆ど研究例がなく、今回 *O*-GlcNAc 糖鎖との関連について知見を示したことは新規性を有する内容である。2 番目に、脂肪毒性の機序について、細胞死において糖毒性と脂肪毒性の相乗作用があることを示したことは新しい知見であり、さらにその機序としてパルミチン酸で合成が増加する NO と高グルコースで産生が増加する superoxide が反応して NO の細胞傷害性を強めるというメカニズムを示したことは新規性が高く、2 型糖尿病での膵 細胞死の分子的機序に新しいメスを入れる重要な発見であると考えられる。

上記の理由より、本研究は糖尿病治療研究の進歩に貢献する内容と判断され、博士 (薬学) の学位を授与するに値するものと判定された。