

＜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3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

研究協力者 Anton M. Jetten、Hong Soon Kang

【はじめに】

厚生労働省によると、平成30年度の国民医療費は43兆億円を超えており、年々増加傾向にある。そのうち糖尿病が占める医療費は1.2兆円以上を占めており、高齢化率の上昇に伴い年々増加しているとされる。長崎県でも高齢化が進んでいることから2型糖尿病（以下、糖尿病と記す）の罹患率もそれに伴い増加傾向にある。また、長崎県の一人当たりの医療費は高知県に次いで高く、42万円/年を超えている。長崎県は食事に砂糖を多く使う味付けなど食文化的に高血糖に陥りやすい背景があり、高血糖に起因される糖尿病は網膜症や腎症、神経障害など合併症の発症により、罹患者のQOLが著しく低下するこが懸念される。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）から糖尿病罹患者は非罹患者に比べてガンに1.2倍（肝ガンは1.97倍）なりやすいと解析されている。その為、糖尿病を引き起こすほどの高血糖条件下で血管内皮細胞や糖代謝で重要な役割を担う肝細胞でどのような影響が及ぶかを検証し、ヒトの健康増進に寄与する一助となる基礎研究になることを目的とする。

【研究内容・成果】

報告者は以前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、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）の中間代謝産物である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。しかし、この代謝産物は細胞内で生じるものであり、細胞外に分泌されるものではないにもかかわらず血清中に見られたため、細胞外に分泌される機序が存在することが考えられた。そこで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ている。本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、それは細胞から分泌されるエクソソームに含有されるかを検証することとした。

本研究はヒトの血管内皮細胞を用いることとし、まずは血管内皮細胞にて実施することとした。細胞は国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所JCRB細胞バンクより、HUEhT-1細胞を入手した。細胞培養用の培地には細胞の成育のためウシ胎児血清を添加するが、この血清由来のエクソソームは限外濾過にて取り除いた血清を用いた。まずは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することとした。3日毎に培地を新しいものと交換しながら、1、2、3ヶ月後の細

胞、培地を用いて検証した（培地が高価なので、1回の実験で細胞を維持できる期間が最長3ヶ月と見積もった）。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（トリパンプル一法にて1~7日間の細胞の数を測定）を検証したが、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なかった。

プレ実験で癌細胞（培地が安価）を用いてエクソソームが分泌される条件を定めることを試み、培地中の糖濃度を450 mg/dL（高血糖濃度）で3日毎に培地交換しながら1ヶ月間培養し、新しい培地に交換した1時間後、2時間後、6時間後、24時間後の培地中のエクソソームを単離・精製した後、エクソソームのマーカータンパク質であるCD9に対する抗体を用いたウエスタンブロット法にて、CD9の発現量を検証したところ、24時間後が一番多く見られた。このことからヒト血管内皮細胞の培養の1~3ヶ月それぞれのそれぞれの時点で、新しく培地を交換した24時間後にメタボローム解析用の培地を5mL回収して-80℃で保管しておいた。細胞の成育速度、インスリンレセプターの発現量に差がないことから、糖尿病様の細胞になっていないと考えたため、培地中のエクソソームは単離・精製せずに、まずは培地の一部を用いてメタボローム解析を実施したが、予想通り糖尿病患者の血清に見られた2/3-PGは有意差どころか検出するのが困難なほどわずかであった。この時点で、糖尿病様の細胞になっていないと判断し、培地中のエクソソームの単離・精製は実施しなかった。

【今後の研究】

まずは糖尿病様の細胞がないと研究が進まないなので、RNA干渉の技術を活用し、インスリンレセプターの発現を減少させた細胞を作製してインスリンを作用させにくくして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出すことで研究のスピードアップを図る。培地に添加するウシの胎児血清に元々インスリンが含まれるため今回の実験ではインスリンを新たに添加しなかったが、今後はインスリンの濃度を5ng/mLほどまで振ってみて、高インスリンの条件下での実験も検証していきたいと思う。

また、培地のメタボローム解析では培地の一部ではなく、凍結乾燥の技術を用いて濃縮し、全量用いて解析の感度を増加させたいと考えている。エクソソームの単離に関しては、キットを用いると費用の面から制限がかかるので、超遠心法を用いて、精製度は下がるが実験数を増やすことで、実験間の誤差を少なくする方にシフトする予定である。

【その他】

糖尿病の重症化は眼圧の上昇の一因となり、緑内障を発症する場合がある。この眼圧上昇の機序に関与するGLIS1遺伝子の働きについての研究成果を共著としてnature communicationsに掲載することができた。

“GLIS1 regulates trabecular meshwork function and intraocular pressure and is associated with glaucoma in humans” Nature Communications volume 12, Article number: 4877 (2021).