

<研究課題>

新規膵臓β細胞由来神経保護因子によるアルツハイマー病発症抑制への関わりの検討

代表研究者 山陽小野田市立山口東京理科大学 教授 細井 徹
共同研究者 山陽小野田市立山口東京理科大学 講師 中川 直
山陽小野田市立山口東京理科大学 助教 野田泰裕

【まとめ】

本研究では、糖尿病はアルツハイマー病の発症リスクを高めるとの疫学的エビデンスに基づき、インスリン分泌を行い、血糖値を下げる役割を担っているすい臓のβ細胞に着目して検討を行った。本研究では、膵臓のβ細胞からは、アルツハイマー病を抑制できる因子が分泌されているのではないかと考え、その分泌因子の同定を試みた。

1. 研究の目的

超高齢化社会を迎えた我が国において、高齢者の健康寿命の延伸の必要性が叫ばれている。神経変性疾患に代表されるアルツハイマー病は、脳内において老人斑や神経原線維変化を認め、進行性に神経脱落が生じ、認知機能が低下する疾患である。我が国における認知症の患者数は462万人(2012年、厚生労働省)であり、今後も増加すると推計されている。その中でアルツハイマー型認知症は65%以上を占めているが、明確な発症メカニズムは未だ不明である。

興味深いことに疫学調査による研究の結果、糖尿病の患者のアルツハイマー病の発症リスクの相対危険度は1.2~2.3と高値であり、統計学的にも有意な差があることが報告されている(日老医誌 2010, 47: 385-389)。糖尿病の病態は膵臓のβ細胞の疲弊によりインスリンが分泌できなくなることによって生じる。従って、膵臓のβ細胞の機能とアルツハイマー病発

症の間には何らかの因果関係があると考えられる。現在までに、インスリンは神経保護作用を有することから(J Biol Chem. 2001, 276: 32814-32821.)、末梢のβ細胞より産生されたインスリンがアルツハイマー病発症に抑制的に働く可能性が考えられた。しかし、インスリンはアルツハイマー病発症抑制には効果がないことを示す報告が数多くされており(J Exp Med. 2016, 213:1375-1385)、β細胞由来のインスリンのみではアルツハイマー病発症原因を全て説明できていないのが現状である。そこで本研究では、膵臓のβ細胞からは、インスリン以外の新規の神経保護因子が分泌されており、この新規神経保護因子がアルツハイマー病発症抑制に働くのではないかと仮説を立てた(図1)。本研究ではβ細胞由来の神経保護因子を同定し、末梢の膵臓のβ細胞由来因子による脳内神経保護機構の解明を目指す。

本研究では膵臓末梢臓器による中枢神経機能制御を明らかにし、新たな神経保護因子の同定を目指す。このような研究により新しいタイプの神経保護因子を同定し、難治性疾患であるアルツハイマー病予防・治療への手がかりを得ることを目指した。

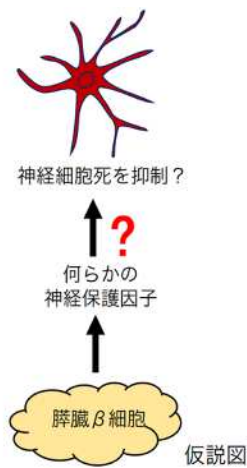


図1. 本研究では膵臓β細胞から神経保護因子が分泌されていると仮定し、本保護因子の同定を目指す。

2. 研究方法と経過

膵臓β細胞特異的に遊離される神経保護因子の同定

膵臓β細胞株である min6 細胞の培養上清から、神経保護因子が分泌されている可能性が示されている。一方、興味深いことに神経細胞やグリア細胞などの他の細胞の培養上清では、その様な神経保護効果は認められなかった。さらに、膵臓β細胞の培養上清を熱処理した後に神経細胞に処理すると、膵臓β細胞の保護効果が消失したことより、膵臓β細胞由来因子は、タンパク質などの熱感受性物質であることが示唆された。従って、これらの結果より膵臓β細胞特異的に神経保護作用を示すタンパク質性の因子が分泌されている可能性が考えられた。そこで、以下に示すアプローチで膵臓β細胞由来の神経保護因子の探索を行った。

2-1 網羅解析による膵臓β細胞株神経保護候補因子の絞り込み

神経保護因子が分泌される膵臓β細胞株 (min6 細胞) と神経保護因子が分泌されない神経細胞 (SH-SY5Y) およびグリア細胞 (U251) を用いて、網羅的な mRNA の発現解析を RNAseq 解析により実施した。解析により、他の細胞株 (神経細胞とグリア細胞) では発現せず膵臓β細胞株のみで発現している因子の絞り込みを行った。さらに、膵臓β

細胞株で発現上昇している因子の中で分泌シグナルを有する mRNA のみを選択し、これらの因子を神経保護因子の候補因子とした。その後、本候補因子に関して文献等の調査を行い、絞り込みを行った。絞り込んだ個々の因子に関して、個別のプライマーを用いた RT-PCR 解析を min6, SH-SY5Y 細胞、U251 細胞において実施し、再現性を確認した。

RT-PCR 解析は min6 細胞、SH-SY5Y 細胞、U251 細胞から total RNA を回収後、逆転写酵素反応により cDNA を作成後、個々の遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR 解析を実施した。

2-2 実験 2-1 で絞り込んだ因子の神経保護効果の検証

実験 2-1 で絞り込んだ候補因子が神経保護効果を有するか検討した。神経モデル細胞である PC12 細胞にアルツハイマー病の原因因子であるアミロイドベータペプチド (Aβ) を処置した時の細胞死に及ぼす神経保護候補因子の効果について検証した。実験では、実験 2-1 で絞り込んだ候補因子のリコンビナントタンパク質を PC12 細胞に処置後、Aβ による細胞死に及ぼす影響について細胞死の指標である LDH の遊離を測定することで検証した。実験で用いた Aβ は 1-42 アミノ酸のヒト Aβ を用いた。Aβ は 10μM で処置後 48 時間後の神経細胞死に及ぼす候補因子の影響を検討した。

3. 研究の成果

3-1 膵臓β細胞で発現している分泌タンパク質の同定

膵臓β細胞株 (min6 細胞) と神経保護因子が分泌されない神経細胞 (SH-SY5Y) およびグリア細胞 (U251) を用いた RNAseq 解析による網羅解析の結果、膵臓β細胞株 (min6 細胞) で多く発現し、神経細胞 (SH-SY5Y) およびグリア細胞 (U251) ではほとんど発現していない分泌因子を 25 種類絞り込むことに成功した。絞り込んだ 25 種類の因子の中で文献調査を行い、神経保護作用が

起きる可能性がある因子を絞り込んで、個別の発現について RT-PCR 解析を実施した。その結果、RNAseq 解析と同様に膵臓 β 細胞株 (min6 細胞) のみで発現が高い因子の絞り込みができた。

3-2 $A\beta$ による神経細胞死に及ぼす候補因子の保護効果の検証

本研究では 3-1 の検討で絞り込んだ候補因子のうち、文献調査等も含めて検証し、Trefoil factor family (TFF3) と Urocortin3 (UCN3) に着目し、TFF3 と UCN3 の $A\beta$ による神経細胞死保護効果について検証することとした。検討の結果、TFF3、UCN3 のドーズを振って、さらに処理時間もいくつか異なる条件等、様々な条件で検証したが、本実験条件では TFF3 と UCN3 が $A\beta$ による神経細胞死を有意に抑制するとの結果は得られなかった。

4. 今後の課題

今回、膵臓 β 細胞由来因子に関して、RNAseq 解析や RT-PCR 解析により、神経細胞やグリア細胞での発現が弱く、比較的膵臓 β 細胞特異的に発現して、分泌されるタン

パク質の絞り込み・同定に成功した。これらの因子の中で、今回、2つの因子 (TFF3 と UCN3) に絞り込み、 $A\beta$ による神経細胞死保護効果について検証したが、有意な神経保護効果は認められなかった。従って、今回同定した TFF3 と UCN3 はアルツハイマー病の発症抑制効果は有していないと考えられた。今回の絞り込んだ2因子に関しては、神経保護効果は認められなかったが、検索条件等を変更するなどして、他の候補因子の絞り込みを行うなどして、引き続き膵臓 β 細胞由来神経保護因子の同定を目指していきたいと考えている。ある程度絞り込みができた時点で、マウス血液中に実際に分泌されているか、膵臓 β 細胞を破壊したマウスではその発現レベルが下がっているか等の動物レベルでの検証も実施していきたい。

5. 研究成果の公表方法

上記、研究結果をもとに、今後の課題で述べた様な追加解析を実施して、その結果をまとめ、学会発表や研究論文として投稿し、公表する予定である。

以上