

## <高血糖条件下における培養細胞を用いた2型糖尿病予防に関する研究>

研究年度 令和5年度

研究期間 令和5年度～令和6年度

研究代表者名 岡本 恭子

### 【はじめに】

日本では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1000万人以上、「可能性を否定できない人(予備軍)」も1000万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、令和3年度の長崎県健康栄養調査によると、「医療機関や健診で糖尿病と言われたことがある」と言われた人の内、34.7%~36.6%の人は治療や生活習慣の改善をしていないと回答していたことから、糖尿病はコントロールが可能な疾患ではあるが進行する疾患のため、少なくとも1/3以上の人が今後重症化していくことが予想される。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、2型糖尿病の病態のひとつであるインスリン抵抗性を持つモデル細胞を作製し、その細胞から分泌されるエクソソームの解析をすることで、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た。しかしインスリン抵抗性の血管内皮細胞のモデル細胞の生存率が低いことから研究続行が困難となり、細胞種を扱いがしやすい肝細胞を用いて、同様のモデル細胞を作製し解析をすることを本年度では研究することとした。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、長崎県闘病病と診断された方が食習慣改善に関心を持ち、生活習慣を改善する意欲につながる一助になることを目標とした。

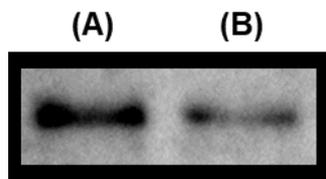
### 【研究内容・研究成果】

糖尿病モデルのヒト正常肝細胞の作製するため、インスリン受容体のRNA干渉後、どの程度インスリン受容体の量が変化したかをウェスタンブロット(WB)法によって検証し、実験に適した細胞が得られるような条件を決定した。糖尿病の状態を疑似させるため、高血糖と同じ程度のグルコース濃度の培地中にインスリンを添加し実験を行った。

上記の細胞の培地から遠心分離によってエクソソームを単離し、メタボローム解析を行い、いくつか標準試料を解析することで、代謝産物の特定の精度を上げたいと考えたため、標準試料に糖代謝産物をいくつか用いることとした。⇒停電(計画停電ではなく、突発的な停電)の影響だと思われる不具合に

より、メタボロームの解析用の機器が作動しなくなった。3月の保守点検まで解析を保留することとなった。保守点検後、無事に機器が作動したが、解析に必要なアルゴンガスが不足するため、予算の処理の関係上、次年度の発注となり、まだ解析結果はできていない状況である。

単離したエクソソームがほかの細胞へ取り込まれ、どのような影響を及ぼすかを検証するためにエクソソームの暴露実験を行った。単離したエクソソームが暴露した細胞に取り込まれるかを検証するため、エクソソームを蛍光試薬で染色し、本学のLSM700・レーザー顕微鏡下で観察を行ったが、エクソソームを検出することができなかった。これはエクソソームを単離後に滅菌する必要があるため、フィルター滅菌法を用いたが、その際にエクソソームを失った可能性が考えられた。そのため、フィルター滅菌後のエクソソームのマーカータンパク質をウエスタンブロット法で確認し、エクソソームを失ったかを検証した。下図に示すように、フィルター滅菌後は確かにエクソソームのマーカータンパク質の量が減少しているため、蛍光染色したエクソソームをレーザー顕微鏡下で観察するには検出限界以下になっている可能性が示唆された。エクソソームの回収量を増やすことなどを検討しているが、その後、顕微鏡のレーザー光源の劣化が報告された。今後、細胞への取り込みを検証する方法自体を変えることが必要になる可能性があるため、実施できるかも踏まえて検討が必要となった。



図：エクソソームマーカータンパク質（CD9タンパク質）のウエスタンブロット  
(A)エクソソーム回収後、(B)染色・フィルター滅菌後

の研究の成果は学会発表にてフィードバックを受けたいと考えていたため、第46回日本分子生物学会年会にてオンラインにて発表する予定であったが、成果が得られなかったため、来年度へ持ち越すこととした。

長期研究計画で計画していた糖尿病自然発症ラットの血清及び盲腸内容物のメタボローム解析（世羅先生との共同研究）では、初めて分析するものであるため、本格的な研究は次年度の予定であるが、試行錯誤が必要となるため、今年度から準備を開始している。現在、サンプリングに必要な凍結乾燥機が不具合を起こしているため、次年度は修理後、順次解析を進める予定である。