

令和元年 7 月 30 日

## インスリン分泌の新規メカニズムを解明 ～ 神経難病と糖尿病の意外な関係 ～

名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学の勝野 雅央 教授、愛知医科大学の祖父江 元 理事長、名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学の有馬 寛 教授、同医学部附属病院脳神経内科の荒木 邦彦 医員（筆頭著者）らの研究グループは、難治神経変性疾患<sup>※1</sup>のひとつである筋萎縮性側索硬化症（ALS<sup>※2</sup>）は、病初期からインスリン分泌能が低下することを見つけ、ALS 患者の膵臓にあるβ細胞<sup>※3</sup>の核において ALS の病態分子である TAR DNA-binding protein of 43kDa（TDP-43<sup>※4</sup>）が喪失していることを見出した。さらに、TDP-43 が電位依存性 Ca チャネル<sup>※5</sup>（CaV1.2）の転写活性<sup>※6</sup>を調整することによってインスリン分泌を制御していることを明らかにした。

本研究成果は、2019 年 7 月 30 日付け（日本時間午前 5 時）米国科学雑誌「Journal of Clinical Investigation」電子版に掲載されます。

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンの死滅を原因とする急速進行性の筋萎縮により、発症後、数年で死に至る神経変性疾患である。2006 年に孤発性 ALS<sup>※7</sup>の病態分子として TDP-43 が発見された。TDP-43 は、本来、核内に存在するが、ALS 患者の運動ニューロンでは核内の TDP-43 は消失し、核の外側（細胞質）に異常な蛋白質の塊である封入体を形成することから、TDP-43 の機能異常（Loss of function）と TDP-43 凝集体の細胞毒性（gain of toxic）の両者が病態に影響すると考えられている。勝野教授らの研究チームは、これまで TDP-43 の機能異常（Loss of function）に注目し、ニューロンの核から TDP-43 が消失すると細胞が弱ることを明らかにしてきたが、TDP-43 喪失からニューロン変性にいたるメカニズムは不明であった。

勝野教授らの研究チームは ALS の神経系以外の全身症状に着目をし、ALS 患者でブドウ糖負荷試験<sup>※8</sup>を行った結果、インスリンの分泌能は低下した。また、患者の膵臓組織（死後に病理解剖で得られたもの）において、インスリンを産生する β 細胞の核内で TDP-43 が喪失していることを見つけた。そこで、β 細胞の TDP-43 喪失がインスリン分泌能低下を引き起こすという仮説を立て、β 細胞株（MIN6 細胞<sup>※9</sup>）を用いて TDP-43 をノックダウン<sup>※10</sup>し、インスリン分泌能低下を立証した。また、TDP-43 ノックダウン時の MIN6 細胞の網羅的な遺伝子解析から CaV1.2 の低下を認め、TDP-43 が CaV1.2 の遺伝子プロモーター領域<sup>※11</sup>に結合し、転写活性を上昇させることを示した。次に、膵臓特異的 TDP-43 ノックアウトマウス<sup>※12</sup>を作製し、β 細胞における CaV1.2 の発現低下とインスリン分泌能の低下を確認した。

本研究では、運動ニューロンにのみ変性が起きるとされていた ALS において、糖代謝異常が生じ、膵臓にまで病気が広がっていることを証明した。将来的に膵臓におけるインスリン分泌能が ALS の病態を反映する生体指標（バイオマーカー）となることが期待される。また、インスリン分泌機構における TDP-43 の役割が明らかとなったことから、糖尿病の新たなメカニズム解明にもつながると考えられる。

## ポイント

- 筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンが選択的に変性する神経変性疾患のひとつである。TDP-43 は ALS に最も深く関連するタンパク質であり、ALS 患者の運動ニューロンでは核内の TDP-43 が喪失していることが知られている。
- ALS 患者は、しばしば血糖が上がりやすくなること（糖代謝異常）が知られているが、その原因は不明であった。
- 今回、ALS 患者では早期相のインスリン分泌が低下していること及び ALS 患者の膵臓において  $\beta$  細胞の核内で TDP-43 が喪失していることを見出した。
- さらに、細胞やマウスを用いた解析により、TDP-43 が  $\beta$  細胞において電位依存性 Ca チャネルである CaV1.2 の遺伝子発現を制御することを明らかにした。
- この研究結果により、ALS の病態に関わる TDP-43 が CaV1.2 を介してインスリン分泌機構にも関与していることを証明し、ALS における糖代謝異常の原因を明らかにした。
- 膵臓で認められた現象が神経系においても同様に起きている可能性があり、TDP-43 の ALS 病態への更なる解明に貢献することが期待される。
- TDP-43 が ALS 患者以外の糖尿病に関与している可能性もあり、糖尿病の新たなメカニズムの解明につながる可能性がある。

## 1. 背景

2006 年に TAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43) が ALS の神経病理学的マーカーとして同定されて以来、TDP-43 の分子機能の解析が進められた。TDP-43 は核内にあるタンパク質であり、RNA<sup>※13</sup> 代謝（転写、スプライシング<sup>※14</sup>、輸送）、神経伝達（シナプス小胞輸送、神経伝達物質の分泌、シナプス伝達）、発達や細胞形態に関連して多様に働いている。TDP-43 は全身に広く発現しており、ALS 患者の運動ニューロンでは核内の TDP-43 は消失し、細胞質に封入体を形成することから、勝野教授らの研究チームは TDP-43 の機能異常（Loss of function）が病態に影響すると考え、これまで TDP-43 喪失により運動ニューロンが変性することを示してきた。しかし、その分子経路については不明であった。

勝野教授らの研究チームは TDP-43 の機能異常の病態解明とともに運動ニューロン疾患のバイオマーカー開発を進めており、今回、ALS 患者でブドウ糖負荷試験の際のインスリン分泌が低下すること及び ALS 患者の膵臓組織において  $\beta$  細胞核内の TDP-43 が消失することを見出し、TDP-43 の機能低下によりインスリン分泌が低下すると考え、TDP-43 の機能異常によるインスリン分泌能低下の分子経路（病気の仕組み）の解明を行った。

## 2. 研究成果

健常コントロール群と ALS 患者群における経口ブドウ糖負荷試験（75gOGTT）の血糖値とインスリン値の検査結果から、ALS 患者群ではインスリン分泌能が低下した（図 1）。また、ALS 患者における死後の膵臓で核内の TDP-43 も喪失した（図 1）。

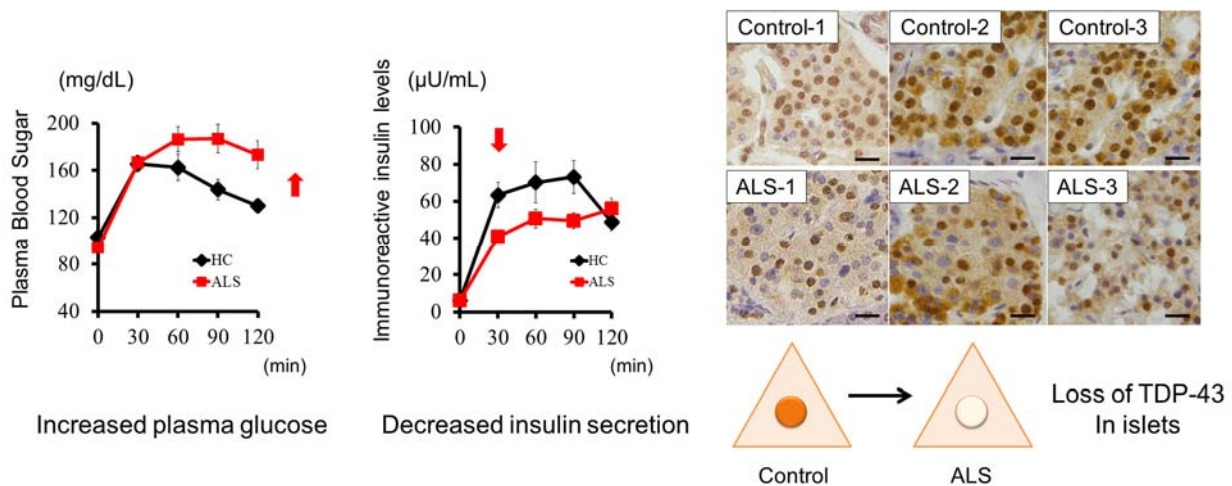


図 1. 糖負荷試験および TDP-43 免疫染色

ALS 患者で血糖高値、インスリン分泌能低下となった  
β 細胞核内で TDP-43 は消失していた

インスリン分泌は、基礎分泌とブドウ糖負荷による 2 相性（早期相と後期相<sup>※15</sup>）分泌の 3 つに分かれる。膵臓の β 細胞株（MIN6 細胞）におけるインスリン分泌機能を評価したところ、TDP-43 をノックダウンした MIN6 細胞でグルコース負荷による早期相のインスリン分泌低下を認めた。また、特殊な顕微鏡技術を用いてインスリン分泌を、直接、視覚的に評価することにより、早期相のインスリン分泌が低下していることが検証できた。

次に、網羅的に遺伝子解析を行った結果、TDP-43 をノックダウンした MIN6 細胞で電位依存性 Ca チャネル（*Cacnalc*, *CaV1.2* をコードする遺伝子）は低下し、*CaV1.2* を補充するとインスリン分泌能は回復した。また、電気生理学的な解析を行ったところ、TDP-43 をノックダウンした MIN6 細胞では、Ca イオンの細胞内流入は低下し、Ca チャネル電流の電流密度も明らかに減少した。

TDP-43 は DNA 及び RNA 結合タンパクであり、転写活性や RNA 代謝などに機能していることが知られており、既存のデータよりコンピューター解析すると TDP-43 は Ca チャネルのプロモーター領域への結合を認め、TDP-43 をノックダウンした MIN6 細胞では、Ca チャネルの転写活性を阻害していることが分かった。

次に、膵臓特異的 TDP-43 ノックアウトマウスを作成し、コントロールマウス（TDP-43 をノックアウトしていないマウス）と比較したところ、ブドウ糖負荷試験及びインスリン試験で、早期相のインスリン分泌が低下した。TDP-43 をノックアウトした β 細胞及び TDP-43 ノックアウトマウスから取り出した膵臓を用いて行った実験においても、明らかにインスリン分泌が低下した。

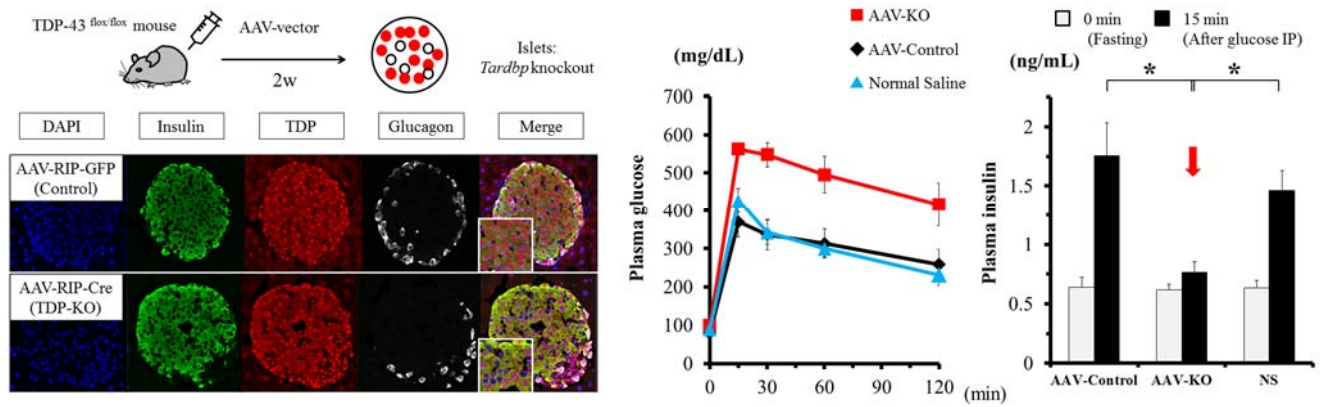


図 2. 膵臓特異的 TDP-43 ノックアウトマウスの糖負荷試験とインスリンテスト  
膵臓特異的 TDP-43 ノックアウトマウスではインスリン分泌の低下を認めた

### 3. 今後の展開

研究の結果、運動ニューロンに選択的な変性が起きていると思われていた ALS において、糖代謝異常が生じていることを証明した。これは、ALS における運動ニューロン以外での TDP-43 の機能喪失を示した重要な知見である。ALS の病態分子である TDP-43 の喪失が、電位依存性 Ca チャネルの転写活性を阻害し、結果的にインスリンの開口放出を阻害した。将来的には、糖代謝が ALS 患者に対する病態マーカーに寄与することが期待される。また、インスリン分泌機構における TDP-43 の分子機能が明らかとなったことから、糖尿病の新たなメカニズム解明にもつながる可能性がある。

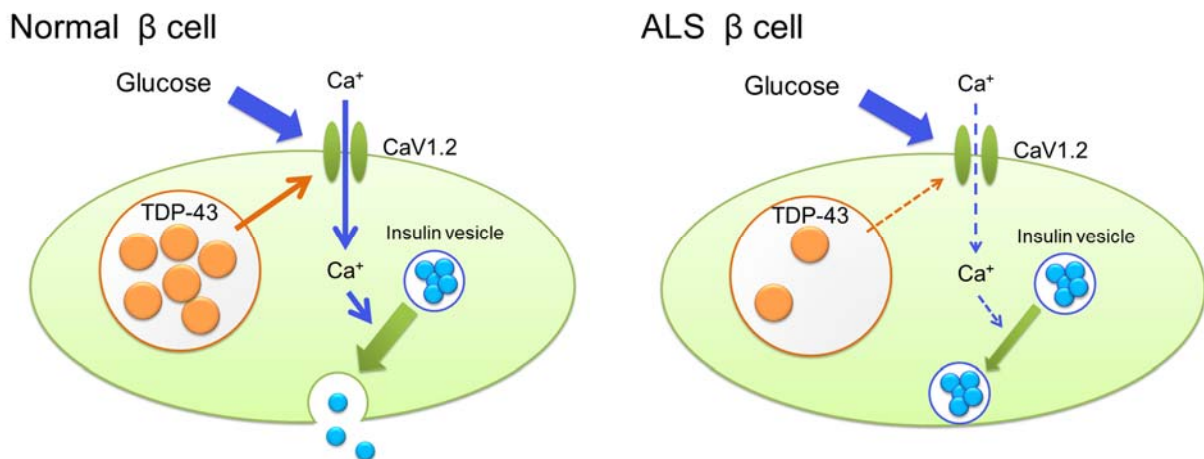


図 3. 正常と ALS の β 細胞

通常の β 細胞と比較し、核内の TDP-43 喪失が、CaV1.2 チャンネルの低下を介しインスリン顆粒の開口放出（インスリン分泌）を阻害する。

#### 4. 用語説明

- ※1 難治神経変性疾患：特定の種類の神経細胞が進行性に変性する（死滅する）難治性疾患の総称。アルツハイマー病、レビー小体型認知症、パーキンソン病、脊髄小脳変性症、運動ニューロン疾患など様々な病気が含まれる。これらの神経変性疾患に共通する病理学的な特徴として、神経細胞の中や周囲に異常なタンパク質が蓄積し（その一部が封入体と呼ばれる）、それによって特定の種類の神経細胞が障害されることが知られている。
- ※2 筋萎縮性側索硬化症（ALS）：成人に発症する神経難病の一つ。運動ニューロンのみが選択的に変性（細胞死）を来し、全身の筋肉が萎縮し、嚥下障害（のどのまひ）や呼吸障害が進行し、発症から3～5年で死に至る。TDP-43（※3参照）が神経病理学的マーカー（患者さんの組織を顕微鏡で観察した際の診断の目印となるもの）であり、核内のTDP-43喪失と細胞質でのTDP-43の凝集がALSの病気の仕組みに深く関連していると考えられている。
- ※3  $\beta$ 細胞：膵臓は内分泌細胞と外分泌細胞に分かれる。さらに内分泌細胞はA細胞（ $\alpha$ ）、B細胞（ $\beta$ ）、D細胞（ $\delta$ ）に分かれ、それぞれグルカゴン、インスリン、ソマトスタチンを分泌する。この中で $\beta$ 細胞は、血糖値が上昇した際にインスリンを分泌して血糖を下げる役割を担っている。
- ※4 TDP-43：TAR DNA-binding protein of 43kDaの略で、全身に豊富に存在しているタンパク質。細胞の核内に存在し、その機能としてはDNAやRNAに結合し、転写活性やRNA代謝に働いていることが知られている。ALS患者の病理解析において、運動ニューロンの核からTDP-43が消失し、細胞体で凝集体を形成することが知られており、TDP-43が核で機能しないことがALSの原因の一つと考えられている。
- ※5 電位依存性Caチャネル：形質膜（細胞膜）に存在するイオンチャンネルで、脱分極に応じて活性化し開口する。開口すると細胞外から細胞内へCaイオンを選択的に流入するようになり、神経伝達物質やホルモンの放出、筋収縮、など様々なCaイオン依存性の細胞応答を制御する。電気生理学的特性や薬理学的特性により10種類以上の機能分類が存在する。
- ※6 転写：DNAからRNAを合成する仕組み。DNAの一部に転写因子と呼ばれるタンパク質などが結合し、遺伝子の構造を変化させることなどによってDNAを鋳型としてメッセンジャーRNAが産生される。
- ※7 孤発性ALS：ALS患者のほとんど（90～95%）は家族内にALS患者がおらず、そうした遺伝によらないALSのことを孤発性ALSと呼ぶ。一方、ALS患者の5～10%では家族内にALSを発症する者がおり、家族性ALSと呼ばれる。家族性の多くは遺伝子変異によるものと推定されるが、全ての家族性ALS患者で遺伝子が同定されているわけではない。他方、家族歴のない孤発性ALS患者でも家族性ALSの原因遺伝子異常と同じものが見つかることがある。
- ※8 ブドウ糖負荷試験：患者にブドウ糖の水溶液（糖分を高く含んだジュース）を飲んでもらい、その後、血糖値やインスリン分泌がどのように変化するかを調べる検査。糖尿病の診断などに利用される。マウスなどの実験動物で行う場合、動物にブドウ糖水溶液を注射して、同様に血糖値やインスリン分泌を調べる。
- ※9  $\beta$ 細胞株（MIN6）：マウスの膵臓 $\beta$ 細胞由来の細胞株。生理的なグルコース濃度依存的にインスリン分泌能を規定するので、インスリン分泌能を評価するために細胞実験で使われている。

- ※10 ノックダウン：人工的に合成した核酸（siRNA）を細胞に与えることで、特定の遺伝子の転写量を減少させる操作。
- ※11 遺伝子プロモーター領域：DNAの配列の一部。DNAのうち、タンパク質をコードしている部分よりも上流にあり、ここに転写因子などが結合することで転写（※5参照）が促される。
- ※12 ノックアウト：特定の遺伝子を欠損させること。ノックアウトマウスを解析することで、ノックアウトした特定の遺伝子の機能解析ができる。
- ※13 RNA：核酸の一種。RNAポリメラーゼによりDNAを鋳型にして転写（※6参照）される。生体内での挙動や構造により、伝令RNA（メッセンジャーRNA、mRNA）、運搬RNA（トランスファーRNA、tRNA）、リボソームRNA（rRNA）、ノンコーディングRNA（ncRNA）、リボザイム、二重鎖RNA（dsRNA）などに分類される。
- ※14 スプライシング：主として、RNAの一部を切り貼りすることでRNAの配列を編集することを指す。スプライシングのうちもっとも代表的なpre-mRNAスプライシングは、DNAから転写されたmRNA前駆体からイントロン（タンパク質をコードしていない部分）を取り除き、残りの部分を結合して完全なタンパク質配列を示すmRNAを作ることをいう。
- ※15 早期相と後期相：糖分の刺激直後に急速にインスリンが分泌されるのを早期相、その後ゆっくりと持続的にインスリンが分泌されるのを後期相という。

## 5. 発表雑誌

雑誌名：Journal of Clinical Investigation（2019年7月29日PM 4:00（米国東部時間））

論文タイトル：TDP-43 regulates early-phase insulin secretion via CaV1.2-mediated exocytosis in islets

著者：Kunihiko Araki<sup>1\*</sup>, Amane Araki<sup>1\*</sup>, Daiyu Honda<sup>1</sup>, Takako Izumoto<sup>2</sup>, Atsushi Hashizume<sup>1</sup>, Yasuhiro Hijikata<sup>1</sup>, Shinichiro Yamada<sup>1</sup>, Yohei Iguchi<sup>1</sup>, Akitoshi Hara<sup>3</sup>, Kazuhiro Ikumi<sup>1</sup>, Kaori Kawai<sup>1</sup>, Shinsuke Ishigaki<sup>1</sup>, Yoko Nakamichi<sup>4</sup>, Shin Tsunekawa<sup>2</sup>, Yusuke Seino<sup>5</sup>, Akiko Yamamoto<sup>6</sup>, Yasunori Takayama<sup>7</sup>, Shihomi Hidaka<sup>5</sup>, Makoto Tominaga<sup>7</sup>, Mica Ohara-Imaizumi<sup>4</sup>, Atsushi Suzuki<sup>5</sup>, Hiroshi Ishiguro<sup>6</sup>, Atsushi Enomoto<sup>3</sup>, Mari Yoshida<sup>8</sup>, Hiroshi Arima<sup>2</sup>, Shin-ichi Muramatsu<sup>9,10</sup>, Gen Sobue<sup>11</sup>, Masahisa Katsuno<sup>1\*\*</sup>

\*These authors contributed equally to this work

\*\* Corresponding author

所属：

1. Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan
2. Department of Endocrinology and Diabetes, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan
3. Department of Pathology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan
4. Department of Biochemistry, Kyorin University School of Medicine, Mitaka, Japan.
5. Department of Endocrinology and Metabolism, Fujita Health University, Toyoake, Japan
6. Department of Human Nutrition, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

7. Division of Cell Signaling, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan
8. Department of Neuropathology, Institute for Medical Science of Aging, Aichi Medical University, Nagakute, Japan
9. Division of Neurological Gene Therapy, Jichi Medical University, Shimotsuke, Japan
10. Center for Gene & Cell Therapy, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan
11. Brain and Mind Research Center, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

DOI : <https://doi.org/10.1172/JCI124481>.

English ver.

[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_E/research/pdf/Jou\\_Clin\\_Inv\\_190730en.pdf](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Jou_Clin_Inv_190730en.pdf)