

【目的】糖尿病は生活習慣病のうち最大のものであり、わが国における患者とその予備軍の数は 1,000 万人を超えている。病態の核心を担う膵β細胞からのインスリン分泌不全の機序には不明な点が多く、その根本的な治療法は開発途上にある。また非アルコール性肝疾患においては、健康診断を受ける成人の 2~3 割が NAFLD、そのうち約 1~2 割が NASH、さらにそのうち 5~20%が 5~10 年で肝硬変に至るが、NASH/NAFLD の病態生理ならびに治療法は未だほぼ不明である。本研究では、細胞内物質輸送に携わるキネシン分子モーター欠失マウスがこれら代謝疾患の表現型を示す予備的成果から、これらのマウスならびにその初代培養細胞・ノックダウン細胞を実験系として、細胞内物質輸送の新たな観点から疾患病態生理の解明・新規治療法の開発をめざすことを目的とした。

【方法・結果】以下の 2 つの相互に関連するテーマに沿って研究を行った。

1. キネシン分子モーターの膵β細胞刺激-分泌連関における新しい役割の解明

キネシン分子モーターのノックアウトマウスはインスリン分泌不全による耐糖能異常を呈しており、膵島還流試験等により特に第二相のインスリン分泌に障害を生じていることが明らかとなった。またβ細胞の刺激-分泌連関を詳細に解析したところ、グルコース刺激時の電気生理学的あるいは細胞内カルシウムの反応性が顕著に低下していた。そこで、ノックアウトマウスβ細胞およびノックダウン MIN6 細胞について、免疫沈降法等の生化学的手法、近接ライゲーションアッセイ法、超高解像顕微鏡等の形態学的手法を用いて解析し、カルシウムチャネルタンパク質群がタンパク質分解経路の亢進によって不安定化していることを示す結果を得た。これらの成果は、キネシン分子モーターのインスリン分泌制御における新たな役割を示唆し、2 型糖尿病の病態解明・治療戦略創出への新しいアプローチを拓くものである。

2. キネシン分子モーターの肝細胞脂質代謝における新しい役割の解明

キネシン分子モーターのノックアウトマウス肝は進行性の脂肪肝・肝線維症の知見を生じ、ヒト遺伝性 NASH 家系においてもキネシン遺伝子変異が同定された。またヒト HepG2 細胞においてキネシン遺伝子のノックダウンを行うと、脂肪滴の顕著な貯留が生じた。表現型レスキュー実験により、キネシン中間ドメインがこの脂肪滴貯留に必要十分であるとの知見を得た。次にこの中間ドメインの遺伝子断片を用いて、BioID 法により結合タンパク質を精製し質量分析法により解析したところ、カルボキシル基転移酵素群が新規キネシン結合タンパク質として同定され、さらにノックアウト肝において酵素活性の異常な上昇を示唆するデータを得た。ヒト線維芽細胞をレトロウイルスベクターにより肝 iHep 細胞に分化させたところ、患者変異群では確かに脂肪滴貯留が亢進しており、これに対してキネシン中間ドメインを強制発現することで表現型の改善が可能になった。これらの成果は、キネシン分子モーターの肝細胞脂質代謝における新たな役割を示唆し、NASH/NAFLD の病態解明・治療戦略創出への新しいアプローチを拓くものである。

キネシン分子モーターを通じた代謝疾患への新しいアプローチ

