

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17960

研究課題名（和文）細胞保護を目指した新規糖尿病治療法の開発

研究課題名（英文）Development of diabetes treatment method aiming at beta cell protection

研究代表者

安間 太郎（Yasuma, Taro）

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80773887

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：細胞の死は糖尿病の進行の原因と考えられているが、それを抑制する有用な治療法は未だ確立されていない。トロンボモジュリンは抗凝固因子として知られるが、近年、細胞保護作用を有することが注目されている。我々は糖尿病マウスにおいて、トロンボモジュリンが細胞を保護し、インスリン分泌を改善することにより、血糖値の上昇を抑制することを証明した。トロンボモジュリンが細胞保護効果を持つ新しい糖尿病治療薬として有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病人口は世界中で爆発的に増え続け、糖尿病有病者数は世界で4億人以上といわれており、医療経済的にも問題となっている。糖尿病の主な型のうち、1型糖尿病は自己免疫的要因により膵細胞が選択的に破壊され発症する。2型糖尿病は生活習慣などの環境因子と遺伝因子が関与し、インスリン抵抗性とインスリン分泌不全により発症する。いずれの型の糖尿病においても、細胞のアポトーシスは糖尿病の病態進展の主要な機序であると考えられているが、それを抑制する有用な治療法は確立されていない。本研究成果はトロンボモジュリンの細胞保護および抗糖尿病効果を示すものであり、糖尿病の進展抑制につながる有意義な研究である。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction is involved in the progression of diabetes. Thrombomodulin is a glycoprotein on the surface of endothelial cells which has inhibitory effect on cell apoptosis. We evaluated the effect of thrombomodulin on  $\beta$ -cell apoptosis and glucose tolerance in diabetic mice. Thrombomodulin attenuated hyperglycemia, ameliorated insulin secretion, and reduced  $\beta$ -cell apoptosis. These results indicate that thrombomodulin has antidiabetic effect by suppressing  $\beta$ -cell apoptosis.

研究分野：糖尿病

キーワード：細胞 糖尿病 トロンボモジュリン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病人口は世界中で爆発的に増え続けており、糖尿病有病者数は世界で 4 億人以上といわれている。糖尿病の主な型のうち、1 型糖尿病は遺伝的、環境的および自己免疫的要因により膵細胞が選択的に破壊され発症する。2 型糖尿病は生活習慣などの環境因子と遺伝因子が関与し、インスリン抵抗性とインスリン分泌不全により相対的なインスリン作用不足となり発症する。いずれの型の糖尿病においても、細胞のアポトーシスは糖尿病の病態進展の主要な機序であると考えられているが、それを抑制する有用な治療法は未だ確立されていない。トロンボモジュリン(TM)は、血管内でトロンビンと結合しプロテイン C を活性化プロテイン C(APC)に変換することで抗凝固作用を有するが、近年、細胞保護作用を有することが注目されている。実臨床においては、リコンビナントヒトトロンボモジュリン(rhTM)が DIC 治療薬として承認され、使用されている。我々は、以前に TM がアポトーシスを抑制することにより肺線維症に保護的に働くことを報告した。TM が抗炎症作用や抗アポトーシス作用を介して膵細胞に対しても保護的に働き糖尿病を改善する可能性があると考えられる。

### 2. 研究の目的

膵細胞のアポトーシスは、いずれの病型の糖尿病においても病態進展の主要な機序であると考えられているが、それを抑制する有用な治療法は未だ確立されていない。本研究は血液凝固制御因子であるトロンボモジュリン(TM)の抗アポトーシス作用・抗炎症作用に着目し、糖尿病マウスによる *in vivo* 実験、および膵細胞株を用いた *in vitro* 実験により、膵細胞保護効果を有する新しい糖尿病治療薬としての可能性を見出し、その機序についても明らかにし、臨床応用への展開を計る研究基盤を構築する事を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ストレプトゾトシン(STZ)による糖尿病モデルでの TM の効果の検討

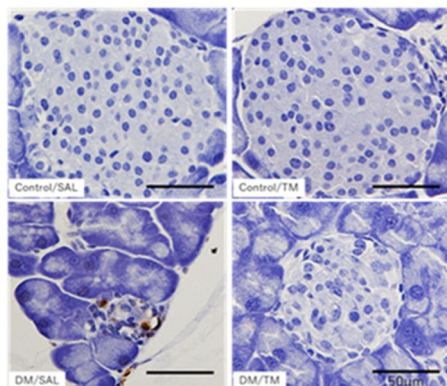
野生型マウスに 5 日間連続で STZ の腹腔内注射を行い糖尿病を誘発する。非糖尿病群には生理食塩水を投与する。同時に、週に 3 回、腹腔内注射にて rhTM または生理食塩水の投与を行う。薬剤投与前、投与後 1 週後、2 週後、3 週後、4 週後に血糖値を測定し、腹腔内グルコース負荷試験、腹腔内グルコース刺激インスリン分泌試験を施行した後、採血および膵摘出を行う。

#### (2) 培養細胞における検討

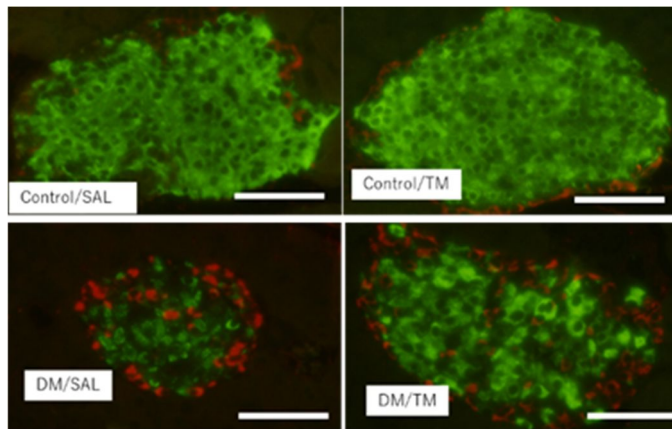
マウス膵細胞株 MIN6 を TM による前処置の有無で培養し、STZ によりアポトーシスを誘導し、Annexin 、Propidium iodide (PI)を用いてフローサイトメトリーにより定量化を行う。

### 4. 研究成果

本研究では STZ 誘発糖尿病マウスモデルおよび膵細胞株 MIN6 を用いて、rhTM 投与による耐糖能および膵細胞のアポトーシスに対する効果を検討した。STZ 誘発糖尿病マウスにおいて、rhTM の投与群では非投与群と比較して、腹腔内ブドウ糖負荷 60 分後の血糖値が有意に抑制され、ブドウ糖負荷前および負荷 30 分後の血中インスリン濃度が有意に高かった。また膵組織において、rhTM 投与群では STZ 投与による膵島面積の減少が有意に抑制され、インスリン・グルカゴン 2 重染色では rhTM 非投与群と比較し、インスリン陽性面積が保たれ、グルカゴン陽性面積が小さかった。TUNEL 染色では rhTM 投与群において膵島内のアポトーシスが抑制されていた。また、膵細胞株 MIN6 において、rhTM 投与により、STZ に誘発されるアポトーシスが有意に抑制された。以上の結果から、外因性 rhTM の投与は膵細胞を抑制し、糖尿病に保護的に働くことが示され、新規糖尿病治療薬としての有効な可能性が示唆された。



膵 TUNEL 染色。STZ 糖尿病マウスでは膵島でのアポトーシスが増加したが、rhTM の投与によりアポトーシスの抑制を認めた。



膵インスリン・グルカゴン二重染色。STZ 糖尿病マウスではインスリン陽性(緑)の面積が低下し、グルカゴン陽性(赤)の面積が増加した。rhTM の投与によりインスリン陽性面積低下とグルカゴン面積増加が抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 D' Alessandro-Gabazza Corina N., Kobayashi Tetsu, Yasuma Taro, Toda Masaaki, Kim Heejin, Fujimoto Hajime, Hataji Osamu, Takeshita Atsuro, Nishihama Kota, Okano Tomohito, Okano Yuko, Nishii Yoichi, Tomaru Atsushi, Fujiwara Kentaro, D' Alessandro Valeria Fridman, Yano Yutaka, Cann Isaac, Gabazza Esteban C	4. 巻 11
2. 論文標題 A Staphylococcus pro-apoptotic peptide induces acute exacerbation of pulmonary fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1539-1539
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15344-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Malya Irine Yunhafita, Wu Jing, Harada Etsuko, Toda Masaaki, D' Alessandro-Gabazza Corina N, Yasuma Taro, Gabazza Esteban C, Choi Jae-Hoon, Hirai Hirofumi, Kawagishi Hirokazu	4. 巻 -
2. 論文標題 Plant growth regulators and Axl and immune checkpoint inhibitors from the edible mushroom <i>Leucopaxillus giganteus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1743170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kobayashi Tetsu, Hataji Osamu, Fujimoto Hajime, D' Alessandro-Gabazza Corina, Yasuma Taro, Gabazza Esteban C	4. 巻 -
2. 論文標題 Too Premature to Deny the Potential of Thrombomodulin-alfa in Idiopathic Pulmonary Fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1164/rccm.202002-0271LE	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asayama Kentaro, Kobayashi Tetsu, D' Alessandro Gabazza Corina N, Toda Masaaki, Yasuma Taro, Fujimoto Hajime, Okano Tomohito, Saiki Haruko, Takeshita Atsuro, Fujiwara Kentaro, Fridman D' Alessandro Valeria, Nishihama Kota, Totoki Toshiaki, Inoue Ryo, Takei Yoshiyuki, Gabazza Esteban C	4. 巻 -
2. 論文標題 Protein S protects against allergic bronchial asthma by modulating Th1/Th2 balance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/all.14261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishii Yoichi, Yasuma Taro, Ito Kentaro, Suzuki Yuta, Watanabe Fumiaki, Kobayashi Tetsu, Nishihama Kota, D'Alessandro-Gabazza Corina N, Fujimoto Hajime, Gabazza Esteban C, Asano Fumihiro, Taguchi Osamu, Hataji Osamu	4. 巻 20
2. 論文標題 Factors leading to failure to diagnose pulmonary malignant tumors using endobronchial ultrasound with guide sheath within the target lesion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 207-207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-019-1178-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Yoshinori, Kobayashi Tetsu, D'Alessandro-Gabazza Corina N, Toda Masaaki, Fujiwara Kentaro, Okano Tomohito, Fujimoto Hajime, Asayama Kentaro, Takeshita Atsuro, Yasuma Taro, Nishihama Kota, Inoue Ryo, Qin Liqiang, Takei Yoshiyuki, Taguchi Osamu, Gabazza Esteban C	4. 巻 10
2. 論文標題 Protective Role of Matrix Metalloproteinase-2 in Allergic Bronchial Asthma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1795-1795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.01795	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Taro Yasuma, Atsuro Takeshita, Yuko Okano, Kentaro Asayama, Kentaro Fujiwara, Tomohito Okano, Yoshinori Takahashi, Hajime Fujimoto, Corina N. D'Alessandro-Gabazza, Masaaki Toda, Tetsu Kobayashi, Esteban C. Gabazza
2. 発表標題 Protective effect of protein S in allergic bronchial asthma
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaaki Toda, Taro Yasuma, Atsuro Takeshita, Kentaro Fujiwara, Tomohito Okano, Yuko Okano, Kentaro Asayama, Ryo Inoue, Corina N. D'Alessandro-Gabazza, Esteban C. Gabazza
2. 発表標題 Regulation of cytokine release from dendritic cells by protein S
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Akihiro Uchida, Atsuro Takeshita, Yuko Okano, Taro Yasuma, Chisa Inoue,Kota Nishihama, Corina N. D ' Alessandro-Gabazza, Masaaki Toda, Yutaka Yano,Esteban C.Gabazza
2 . 発表標題 A noninvasive mouse model of renal fibrosis induced by podocyte-specific overexpression of human transforming growth factor-1
3 . 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Yuko Okano, Chisa Inoue, Akihiro Uchida, Atsuro Takeshita, Kota Nishihama,Taro Yasuma, Corina N. D ' Alessandro-Gabazza, Masaaki Toda, Yutaka Yano,Esteban C.Gabazza
2 . 発表標題 Protective effect of thrombomodulin against the development of diabetic nephropathy
3 . 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Atsuro Takeshita, Yuko Okano, Taro Yasuma, Akihiro Uchida, Kota Nishihama, Corina N. D ' Alessandro-Gabazza, Masaaki Toda, Yutaka Yano, Esteban C.Gabazza
2 . 発表標題 Attenuation of renal fibrosis by recombinant thrombomodulin
3 . 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 内田 明宏、竹下 敦郎、岡野 優子、西濱 康太、安間 太郎、ガバザ コリナ
2 . 発表標題 トロンボモジュリンによるポデサイトの抗アポトーシス効果の検証
3 . 学会等名 第34回日本糖尿病合併症学会・第25回日本糖尿病眼学会総会
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 安間 太郎
2. 発表標題 トロンボモジュリンによるポドサイト保護効果の検証
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------