

肝臓内のリン脂質プロファイルに着目した、 糖尿病に対する遺伝子治療法の開発



若者

清水 かほり*

Development of Gene Therapy
for Diabetes Mellitus Targeting Hepatic Phospholipid Profiles

Key Words : phospholipid, diabetes mellitus, gene therapy, adenovirus vector, liver

はじめに

私は、岡山大学薬学部、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士前期課程を修了後、薬剤師、臨床開発モニターとして勤めたのち、大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程に入学・修了しました（水口裕之教授、櫻井文教准教授（現 近畿大学教授））。博士後期課程では、「改良型アデノウイルス（adenovirus; Ad）ベクター」の開発に関する研究に夢中で取り組みました。その後、日本学術振興会特別研究員を経て、大阪大谷大学薬学部において助教、専任講師として勤めました。大阪大谷大学に在籍時には、新しいテーマとして「改良型 Ad ベクターを用いた生活習慣病の新規治療法の開発」を立ち上げ、取り組みました。そして 2024 年 4 月、10 年ぶりに古巣である大阪大学大学院薬学研究科 分子生物学分野（水口裕之教授）に准教授として戻ってまいりました。研究をはじめてから今日までを振り返ると、研究だけでなく薬剤師業務や臨床開発に携わるなど、様々な経験をしましたが、「研究が好き」という気持ちを日々実感しながら、研究・教育に励んでおります。本稿では、私が進めております、肝臓においてリン脂質の多様性に寄与する遺伝子の発現を変動させることで、肝臓内のリン脂質プロファイルを変化させ、糖尿病に対する遺伝子治療を試みた研究につきまして紹介させていただきます。

糖尿病とリン脂質

世界の糖尿病有病者数は、2017 年の国際糖尿病連合の発表では 4 億 2500 万人でしたが、2024 年には 5 億 8900 万人にのぼり、成人の 9 人に 1 人が糖尿病罹患者と推定されています。このように糖尿病は、世界レベルで患者数が急増している疾患であり、革新的な治療法の開発が望まれています。先端医療として注目されている遺伝子治療は、疾患の治療を目的として、遺伝子または遺伝子を導入した細胞を体内に投与する治療です。遺伝子治療の対象疾患は、がんや先天性遺伝子疾患が多く、現在、日本においても遺伝子治療製品の承認が進み、活発に研究開発されております。一方で、糖尿病などの生活習慣病を対象とした遺伝子治療研究は立ち遅れています。しかしながら、糖尿病に対する遺伝子治療が実現すれば、治療薬の投与回数が数週間～数か月に一度になるなど、患者さんの生活の質が大きく向上することが期待されます。

近年、糖尿病を含む種々の疾患研究において、脂質が注目されています。脂質は種類が多く、まず、中性脂肪の主な成分であるトリアシルグリセロールやリン脂質など、複数の種類に分類されます。さらに、これらの脂質を構成する脂肪酸は、鎖長（炭素数）の違い（短鎖・中鎖・長鎖脂肪酸）、二重結合の有無（飽和・不飽和脂肪酸）、二重結合の位置（ ω 3、 ω 6 脂肪酸）の違いなど様々であるため、多数の種類の脂質が存在します。



*Kahori SHIMIZU

1982年8月生まれ
大阪大学大学院 薬学研究科
分子薬科学専攻 博士後期課程（2013年）
現在、大阪大学大学院 薬学研究科
分子生物学分野 准教授 博士（薬学）
専門/脂質疾患学 遺伝子治療学
TEL : 06-6879-8188
FAX : 06-6879-8186
E-mail : shimizu@phs.osaka-u.ac.jp

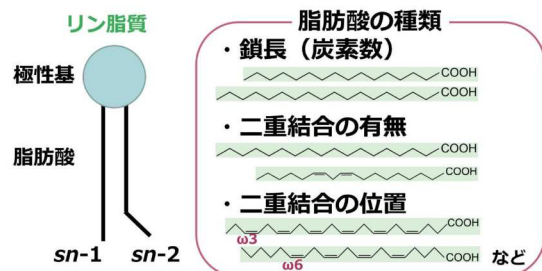


図1：リン脂質の多様性

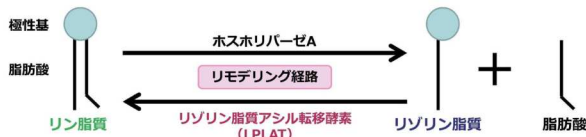


図2：リン脂質のリモデリング

リン脂質は生体膜の主要成分であり、極性基（コリン、セリンなど）と脂肪酸の組み合わせにより1000種類以上の分子種が存在すると考えられています（図1）。リン脂質は2本の脂肪酸を有し、ホスホリパーゼAによって脂肪酸が切り出されることで、脂肪酸が1本のリゾリン脂質になります。そして、リゾリン脂質は、リゾリン脂質アシル転移酵素（lysophospholipid acyltransferase; LPLAT）によって脂肪酸が付与されることでリン脂質にリモデリングされ、多様なリン脂質が産生されます（図2）。主要なリゾリン脂質であるリゾホスファチジルコリンは、細胞障害性を示すことや、糖尿病モデルマウスや代謝機能障害関連脂肪性肝疾患の患者さんにおいてその含有量が増加していることが報告されています。また、リン脂質を構成する脂肪酸組成の変化は、肥満や代謝機能障害関連脂肪性肝疾患の発症および進展に関与することが報告されています。そこで私たちは、リン脂質プロファイル（リン脂質の種類と量）の変化が糖・脂質代謝に影響を与え、新しい糖尿病治療につながると考えました。本研究では、糖・脂質代謝の中心臓器である肝臓において、リゾリン脂質からリン脂質への変換を触媒するLPLATを高発現させ、糖尿病に対する遺伝子治療を試みることにしました。

肝臓内のLPLAT10の高発現によるリン脂質プロファイルの変化

リゾリン脂質からリン脂質への変換を触媒することでリン脂質の多様性の形成に寄与するLPLATは、現在までに14種類同定されています。私たちは、LPLATのひとつであり、まだ機能が十分に解明されていないLPLAT10（別名LPCAT4、LPEAT2）に着目しました。遺伝子導入ベクターは、レンチウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターなど、様々な種類が存在します。その中で私たちは、肝臓でLPLAT10を高発現させるベクターとして、Adベクターを選択しました。Adベクターは、既存のベクターの中で遺伝子導入効率が最も高いことや、大量のベクターが回収可能であることなど、遺伝子導入ベクターとして多くの長所を有しており、新型コロナウイルス

感染症に対するワクチンのベクターとしても使用されました。一方で、従来のAdベクターは静脈内投与後に肝障害を誘発することがあるため、本研究では、私が博士後期課程時に開発しました、改良型アデノウイルスベクター「Ad-E4-122aT」¹⁾²⁾を用いて検討を行うこととしました。Ad-E4-122aTは、従来型Adベクターよりも肝障害性が低く、長期に渡って導入遺伝子を高発現させることが可能です。そこで、注目したLPLAT10を搭載したAdベクター「Ad-LPLAT10」を作製しました。作製したAd-LPLAT10が、マウスの肝臓においてLPLAT10をどの程度高発現可能かを調べるため、マウスにAd-LPLAT10を尾静脈内投与しました。そして2週間後に肝臓を回収し、LPLAT10のmRNA量およびタンパク質量を測定したところ、Ad-LPLAT10群はコントロール群と比較して、LPLAT10 mRNA およびタンパク質レベルが顕著に増大していました。

次に、LPLAT10の高発現により、肝臓内のリン脂質がどのように変化したかを調べるため、液体クロマトグラフィ・タンデム質量分析法（liquid chromatography-tandem mass spectrometry: LC-MS/MS）を用いて解析しました。その結果、Ad-LPLAT10群の肝臓では、主要な ω 3脂肪酸であるドコサヘキサエン酸（docosahexaenoic acid; DHA）を含むホスファチジルコリンが増加し、アラキドン酸を含むリゾホスファチジルコリンが減少するなど、変化が見られました。したがって、肝臓においてLPLAT10を高発現させることで、肝臓内のリン脂質プロファイルが変化することが示されました。

肝臓内のリン脂質プロファイルの変化が糖尿病に与える影響

糖尿病の患者さんは、食後のインスリン分泌が損なわれることで、食後高血糖を示すことが知られています。そこで、LPLAT10による肝臓内のリン脂質プロファイルの変化が、糖尿病に対する治療に有用であるかを調べるため、マウスにグルコースを投与し、血糖値を経時的に測定しました。その結果、Ad-LPLAT10群はコントロール群よりも、血糖値の上昇が抑制されていました。さらに、その時点におけるインスリン分泌量を測定したところ、Ad-LPLAT10群はコントロール群よりもインスリン分泌量が増加していました。したがって、肝臓内のリン脂質プロファイルを変化させることで、食後のインスリン分泌量が増加し、食後高血糖が抑制されたことが示されました。

次に、肝臓内のリン脂質プロファイルの変化が膵臓からのインスリン分泌に影響を与えるメカニズムの解明を試みました。私たちは、LPLAT10の高発現によって変化した肝臓内のリン脂質が血中に分泌され、膵臓に作用することで血糖レベルに反応してインスリン分泌が起きると考えました。そこで、まず血中のリン脂質プロファイルについてLC-MS/MSを用いて解析したところ、肝臓内と同傾向のリン脂質プロファイルを示しました。次に、変化した血中のリン脂質がインスリン分泌に影響を与えるかを調べました。Ad-LPLAT10を投与されたマウスの血清を用いて、グルコースの濃度に応じてインスリンを分泌可能なマウスインスリノーマ細胞であるMIN6細胞を培養し、高グルコース刺激下におけるインスリン分泌量を測定したところ、コントロール群よりもインスリン分泌量が増加しました。そこで、LPLAT10の高発現によってDHA含有リン脂質が増加したことから、DHAをMIN6細胞およびマウスから単離した膵島に作用させました。その結果、DHA作用群は高グルコース刺激下においてインスリン分泌量が増加しました。したがって、LPLAT10の肝臓における高発現は、肝臓内のリン脂質プロファイルの変化を介して、グルコース依存性インスリン分泌を促進することが示されました³⁾。

おわりに

本稿では、LPLAT10がつくる肝臓内のリン脂質プロファイルが、食後のインスリン分泌を増加させることで食後高血糖を抑制することを見出し、糖尿病に対する新しい遺伝子治療法の開発の一助となる研究成果をご紹介させていただきました。私はこのほか、他のLPLATやLPLATと反対の役割を担うホスホリパーゼAにも着目し、研究を進めております。今後も精力的に研究を行い、成果を発表できるよう、精進してまいります。

私は、臨床開発モニターとして勤めていた頃、大阪大学薬学部の卒業研修会に参加したり、大阪大学大学院薬学研究科公開講座を聴講したりしたことで、もう一度研究をしたいと強く思いました。公開講座の帰り道、真冬のモノレールで太陽の塔をみながら、大学院に入る決意をしたことを今でもよく覚えています。研究をはじめたから、まわり道をしたかもしれませんが、どの経験も無駄ではなかったと考えており、現在研究ができることをとても幸せに思っております。これからは、次の世代を担う学生とともに、多くの先生方にご指導いただきながら、研究・教

育に邁進していきたいと考えております。

謝辞

学生時代から自由な研究環境と多くのご指導・ご助言をいただきました大阪大学大学院薬学研究科 分子生物学分野 教授 水口裕之先生、近畿大学薬学部 教授 櫻井文教先生に深く感謝いたします。私の研究に関して多くのご指導・ご助言をいただきました大阪大学大学院薬学部 教授 富田晃司先生、国立健康危機管理研究機構 国立国際医療研究所 テニユアトラック部長 進藤英雄先生に深く感謝いたします。私を教員として迎えてくださいました大阪大学大学院薬学研究科の先生方に心より感謝いたします。本執筆の機会を与えてくださいました、大阪大学大学院薬学研究科 教授 赤井周司先生、「生産と技術」の関係者のみなさまに心より感謝いたします。

参考文献

- 1) Shimizu K, Sakurai F, Tomita K, Nagamoto Y, Nakamura S, Katayama K, Tachibana M, Kawabata K, Mizuguchi H, Suppression of leaky expression of adenovirus genes by insertion of microRNA-targeted sequences in the replication-incompetent adenovirus vector genome, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 1: 14035, 2014
- 2) Shimizu K, Sakurai F, Iizuka S, Ono R, Tsukamoto T, Nishimae F, Nakamura S, Nishinaka T, Terada T, Fujio Y, Mizuguchi H, Adenovirus Vector-Induced IL-6 Promotes Leaky Adenoviral Gene Expression, Leading to Acute Hepatotoxicity, *J. Immunol.*, 206 (2): 410-421, 2021
- 3) Shimizu K, Ono M, Mikamoto T, Urayama Y, Yoshida S, Hase T, Michinaga S, Nakanishi H, Iwasaki M, Terada T, Sakurai F, Mizuguchi H, Shindou H, Tomita K, Nishinaka T, Overexpression of lysophospholipid acyltransferase, LPLAT10/LPCAT4/LPEAT2, in the mouse liver increases glucose-stimulated insulin secretion, *FASEB J.*, 38 (2):e23425, 2024