

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 7 年 3 月 26 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 早稲田大学
職 名 教授
研究代表者 合田 亘人

下記のとおり令和6年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:24007)

1. 共同研究課題名	肝臓由来のニューレグリン 1 を標的とした新しい糖尿病治療法の開発				
2. 共同研究目的	本研究では、ニューレグリン 1 を標的とした膵β細胞の増殖活性化に基づく 2 型糖尿病に対する新しい治療戦略の確立を目指す。具体的には、将来のヒト臨床応用にも耐えうるニューレグリン 1 を標的とした抗体類似タンパク質医薬品の開発に取り組む。本研究によって、ニューレグリン 1 およびニューレグリン 1 を標的とした抗体類似タンパク質医薬品がヒト膵β細胞の細胞増殖活性化能を示すことが明らかになれば、ニューレグリン 1 は既存の治療薬とは異なる作用点を持つ新しい治療標的になり、糖尿病の根治療法に道を拓くことができる。				
3. 共同研究期間	令和6年4月1日 ～ 令和7年3月31日				
4. 共同研究組織					
氏 名	所属等		職名等		役 割 分 担
(研究代表者) 合田 亘人	早稲田大学理工学術院		教授・博士(医学)・1997年3月		研究の総括
(分担研究者) 和井内 貞朝 清水 千陽	早稲田大学先進理工学研究科 同上		修士2年 修士1年		実験の遂行 同上
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	代謝疾患医科学		氏 名	白川 純

次の6, 7, 8の項目は、枠を自由に変更できます(横幅は変更不可)。6, 7, 8の項目全体では2頁に収めてください。

6. 共同研究計画

本共同研究では、ニューレグリン 1 を標的とした膵β細胞の増殖活性化に基づく 2 型糖尿病に対する新しい治療戦略の確立を目指す。具体的には、将来のヒト臨床応用を見据え、ニューレグリン 1 を標的とした抗体類似タンパク質医薬品ヒト IgG 融合ニューレグリン 1 の開発に取り組み、その糖尿病改善効果を分子レベルで検証する。

今年度は、以下の実験計画を立案し、研究に取り組んだ。

1. 一過性ヒト IgG 融合ニューレグリン 1 遺伝子導入によるヒト IgG 融合ニューレグリン 1 タンパク質発現解析
2. ヒト IgG 融合ニューレグリン 1 タンパク質の in vitro 活性評価
3. ヒト IgG 融合ニューレグリン 1 タンパク質の血中半減期の解析
4. ヒト膵島細胞を用いたニューレグリン 1 タンパク質増殖活性評価

これらの計画を介して、ニューレグリン 1 タンパク質が示す抗糖尿病作用を明らかにする。

7. 共同研究の成果

1. 一過性ヒト IgG 融合ニューレグリン 1 遺伝子導入によるヒト IgG 融合ニューレグリン 1 タンパク質発現解析

pCAG-Neo hIgG-Fc 発現ベクターに、ニューレグリン 1 タンパク質の活性化ドメイン部の DNA 配列を導入した。その際、IgG の Fc 領域とニューレグリン 1 遺伝子の間を、繰り返し回数を変えた G4S リンカーで結合できるような配列とした。作成したヒト IgG 融合ニューレグリン 1 遺伝子発現ベクターを、PEI トランスフェクションによって HEK293 細胞に導入し一過性に発現させた。導入 24 時間後から無血清培地に変え、さらに 72 時間まで培養を行ったところ、時間依存性に培地に分泌されるヒト IgG 融合ニューレグリン 1 タンパク質量が増加することが分かった。また、リンカーの繰り返し数にかかわらず、融合タンパク質が同程度に分泌されることを確認した。この結果は、作出した発現ベクターで Fc 融合タンパク質を分泌させかつ、リンカーの長さがタンパク質の分泌されやすさを規定していないことを示唆している。

2. ヒト IgG 融合ニューレグリン 1 タンパク質の in vitro 活性評価

ヒト IgG 融合ニューレグリン 1 タンパク質を含む培養上清を用いて、ERBB3 とその下流の細胞内シグナル経路の活性化能を、タンパク質のリン酸化を指標に検証を行った。この検証のために、全ての種類の ERBB 遺伝子を発現するヒト乳がん細胞株 T47D 細胞を培養上清で 30 分間刺激した。対照群として、IgG の Fc タンパク質を含む培養上清を設定した。その結果、ヒト IgG 融合ニューレグリン 1 タンパク質を含む培養上清で細胞を刺激すると、Fc タンパク質と比較して、ERBB3、AKT および ERK のリン酸化が増強することが分かった。予想に反して、リンカーの繰り返し数にかかわらずヒト IgG 融合ニューレグリン 1 タンパク質がこれらのタンパク質を同程度にリン酸化することが分かった。一方、ERBB3 とその下流シグナルの活性化能は、大腸菌で作出した同程度の濃度のリコンビナントニューレグリン 1 タンパク質と比較して高いことが分かった。また、培養上清からカラム精製したヒト IgG 融合ニューレグリン 1 タンパク質を用いて解析した場合にも同じ結果が得られた。この結果は、ヒト IgG 融合ニューレグリン 1 タンパク質の受容体と下流シグナル経路の活性化にリンカーの有無と長さが影響を与えないことを示唆している。

3. ヒト IgG 融合ニューレグリン 1 タンパク質の血中半減期の解析

ヒト IgG 融合ニューレグリン 1 タンパク質の血中動態を正常マウスを用いて解析した。この解析に当たっては、600ng/g 体重でリンカー付きヒト IgG 融合ニューレグリン 1 タンパク質を腹腔内投与した。その結果、投与後 4 時間で 4000ng/ml の血中濃度を示し、その後時間依存性に漸減することが分かった。また、この結果に基づき、ヒト IgG 融合ニューレグリン 1 タンパク質の血中半減期が 16.9 時間であることが分かった。

4. ヒト膵島細胞を用いたニューレグリン 1 タンパク質増殖活性評価

大腸菌で作出したニューレグリン 1 タンパク質が、マウス膵β細胞由来細胞株 MIN6 細胞およびマウス初代培養膵島細胞の細胞増殖を活性化することを示す結果をこれまでに得ていた。しかしながら、マウスとヒトの膵β細胞の応答性が異なることはよく知られている。そこでまず、大腸菌で作出したニューレグリン 1 タンパク

質がヒト膵β細胞の増殖を活性化できるか否かを検討した。本研究遂行に当たって、共同研究者の白川教授の仲介で分与していただいたヒト膵臓から分離した膵島細胞を用いた。その結果、Edu とインスリンの共陽性細胞の割合が増加する傾向が認められた。しかしながら、サンプル間でのばらつきが大きいため、ニューレグリン 1 タンパク質の増殖活性化能の評価は十分とは言えず、さらに継続して解析する必要がある。また、ヒト IgG 融合ニューレグリン 1 タンパク質を用いた解析も今後行う予定である。

8. 共同研究成果に関連する学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換

- ① 本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文
該当なし
- ② この共同研究に基づくとの記載のある論文
該当なし
- ③ 学会発表を行った主なもの3件以内(学会名, 開催日, 演題)
第2回複雑生命系秩序懇談会総会、2024年9月26日、肝臓の低酸素応答と糖尿病
第7回医薬品毒性機序研究会 2025年1月9日 肝臓由来液性因子ニューレグリン1がつなぐ臓器連環
- ④ 本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)
ヒト膵島分離方法について白川研で手技を教授いただいた。
ヒト膵島の受取のための情報をいただき実験を行った。