

200500141 A

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

糖尿病発症遺伝子WFS1の機能解明と新規治療法の開発

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡 芳知

平成18(2006)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

糖尿病発症遺伝子WFS1の機能解明と新規治療法の開発に関する研究 ----- 1

岡 芳知

II. 分担研究報告

1. WFS1の機能解明(膵 β 細胞維持再生機構)に関する研究 ----- 7

片桐 秀樹

2. 遺伝子解析・モデル動物解析に関する研究 ----- 10

谷澤 幸生

3. WFS1の機能解析(関連遺伝子クローニング)に関する研究 ----- 13

浅野 知一郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 15

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 18

糖尿病発症遺伝子WFS1の機能解明と新規治療法の開発に関する研究

主任研究者 岡 芳知 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

なぜ糖尿病は増加しているのか。現代の飽食・肥満・運動不足は膵β細胞にインスリン分泌の増加を強要する。このような膵β細胞に負荷（小胞体ストレス）が加わった状況下においては、膵β細胞の維持・生存機構が遺伝的に脆弱な者が糖尿病を発症するようになると考えられる。糖尿病発症遺伝子WFS1は小胞体ストレス状況下での膵β細胞の維持機構に関わることから、最近の糖尿病増加を解く鍵と考え、その機能解明を進めた。我々が作製に成功したWFS1ノックアウトマウスは膵β細胞の進行性減少により糖尿病を発症するが、このWFS1蛋白欠損膵島では、PERKリン酸化の亢進、XBP1mRNAのスプライシング増強によるXBP1蛋白発現の亢進、ATF6の誘導によるシャペロン蛋白の発現増加が認められ、小胞体ストレス反応（UPR）の3つの経路が活性化していた。さらに、WFS1欠損によりβ細胞の増殖障害が生じ、これには細胞周期に関わる遺伝子の発現変化が関与していること、WFS1は小胞体カルシウムの恒常性維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした。この膵β細胞に負荷をかけるとアポトーシスがさらに促進されることも明らかにした。WFS1欠損agoutiマウスはagoutiマウスと同様に軽度に肥満するが、6週齢ですでに約半数の個体で明らかな高血糖を示し、16週頃からは全個体でインスリン分泌不全による著明な高血糖を来し、膵ラ氏島ではβ細胞の著しい選択的脱落を認めた。興味あることに、インスリン抵抗性改善薬ピオグリタゾンに離乳後より投与することにより、膵β細胞が保持され糖尿病の発症が予防された。現在根本的治療法のないウオルフラム症候群の治療法を開発するうえで貴重な知見である。なお、膵β細胞への負荷を軽減させる対策のひとつとしての過食の制御があるが、内臓脂肪から脳へ向かう食欲調節シグナルの存在を世界で初めて明らかにした。膵β細胞を守る観点からも肥満糖尿病治療に新たな方向性をもたらすものである。

分担研究者

片桐 秀樹

東北大学・大学院医学系研究科・教授

谷澤 幸生

山口大学・大学院医学研究科・教授

浅野 知一郎

東京大学・大学院医学研究科・助教授

解明から新たな治療法開発を目指すことである。同時に、膵β細胞の負担を軽減する視点からの肥満糖尿病治療を開発する。本研究により、肥満すれば糖尿病を発症する可能性が高い予備軍を拾い上げられ、効率よい予防施策に反映でき、さらには、膵β細胞保護（維持・再生）という、新しいコンセプトの糖尿病治療法の開発につながる。

A. 研究目的

なぜ糖尿病は増加しているのか。近年のライフスタイルの変化が糖尿病の増加を来していることに疑いはない。しかし、環境と遺伝とに分けてその成因を考えるのではなく、現代の飽食と運動不足がインスリン分泌を強要する環境下で初めて問題となる遺伝的脆弱さに着目することが、最近の糖尿病増加を解く鍵と考え、本研究を進めている。キーワードは、ウオルフラム症候群原因遺伝子WFS1の機能、小胞体ストレス、肥満などの「負担」を契機に緩徐に進む膵β細胞脱落である。

本研究の目的はまず、糖尿病におけるWFS1とその関連遺伝子の関与を解明することである。特に、飽食の時代の膵β細胞維持・再生の観点から解析を進める。具体的には、WFS1機能に関連する遺伝子の同定とその機能の

B. 研究方法

1) WFS1ノックアウトマウスを用いたWFS1蛋白機能解析
WFS1ノックアウトマウスの糖尿病発症の経過、膵組織所見、さらにWFS1欠損膵ラ氏島を用いて、WFS1機能を解析する。また、膵ラ氏島や培養細胞に小胞体ストレスを負荷し、WFS1を含めた小胞体ストレス反応を解析する。

2) インスリン分泌強要下での糖尿病発症とWFS1機能
WFS1ノックアウトマウスをインスリン分泌強要下におくために、過食による軽度の肥満と耐糖能異常を示すagoutiマウスと交配し、糖尿病発症、膵島変化、小胞体ストレス反応を検討するとともに、薬剤投与による糖尿病発症抑制を目指す。

3) 膵ラ氏島におけるDNA microarrayを用いての検討
ノックアウトマウスと野生型マウスから膵ラ氏島を単離し、DNA microarrayを用いて発現に違いがある遺伝子を網

羅的に見出す。糖尿病を発症してからでは代謝状態により発現が変化した遺伝子も検出してしまうため、糖尿病発症以前でしかも膵β細胞の減少が始まる前の若齢マウスの膵ラ島を用いる。また、単離膵ラ島にERストレスを負荷し、KOマウスと野生型マウス膵ラ島の間で発現変化に違いがみられる遺伝子をDNA microarrayで検出する。

4) WFS1-associated protein の同定

我々が作成した抗WFS1抗体を用いて免疫沈降をおこない、WFS1と共沈する蛋白を質量分析にて解析し、WFS1に結合している分子を同定し、WFS1機能を明らかにする。

5) 膵β細胞への負荷を減少させる対策のひとつとしての過食の制御

高脂肪食負荷により肥満・糖尿病を発症させたマウスの腹腔内脂肪組織に、ミトコンドリアでのATP産生を抑制し基礎代謝を亢進させる働きがあるUCP1遺伝子を後天的に発現させ、腹腔内脂肪組織における代謝亢進が個体の糖・脂質代謝へどのような影響を及ぼすか、また、膵β細胞からのインスリン分泌に与える効果を検討する。

6) 患者遺伝子解析のための候補遺伝子とそのSNP同定
小胞体ストレス下での膵β細胞の維持・再生という切り口で患者遺伝子解析を進める。特に、WFS1機能に関わる遺伝子、たとえば、上述のWFS1-associated proteinも解析遺伝子に加えて検討を進める。

倫理面への配慮

本研究の中のヒト遺伝子解析研究は、3省庁合同指針「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して計画、実施され、東北大学医学部倫理委員会で承認されている(承認番号2003-265 審査結果通知書添付)。すなわち、人権擁護に十分な配慮がなされており、DNA検体はインフォームド Consentのもとに取得され、非連結匿名化されている。WFS1ノックアウトマウス作製ならびにWFS1機能解析のための組替えDNA実験は東北大学倫理委員会にて承認されている。また、マウス動物実験については、麻酔薬を用いるなど疼痛除去に充分配慮している。

C. 研究結果

WFS1欠損により膵β細胞では小胞体ストレス反応(UPR)の3つの経路が活性化

ウオルフラム症候群における糖尿病の成因を明らかにするために、WFS1欠損マウスを作製した。129系統のWFS1欠損マウスを、5世代にわたってB6マウスに交配し、129/B6混合系統のWFS1欠損マウスと共に随時血糖測定とブドウ糖負荷試験を行ったところ、129/B6混合系統のKOマウスでは、60%以上のマウスで明らかな高血糖を認めた。B6系統のWFS1欠損マウスでは、糖負荷試験で有意な血糖値の上昇と、インスリン分泌反応の低下を認めた。膵島所見としては、いずれのマウスの系統においても、膵β細胞数の進行性の減少が認められ、これがインスリン分泌低下の原因と考えられた。

ついで、WFS1が、小胞体ストレス応答のコンポーネント

の1つであり、小胞体ストレスから細胞を守る働きを担う可能性が示唆されていたので、B6系統のWFS1欠損単離膵島を用い小胞体ストレスによるアポトーシスの誘導を解析したところ、小胞体ストレス惹起物質であるタプシガルギンおよびツニカマイシンに対し、WFS1欠損マウスの膵島ではアポトーシスによるDNA断片化が亢進していた。しかし、小胞体ストレス経路とは異なる経路でアポトーシスを誘導するTNF α とIFN γ によるDNA断片化については、野生型マウス膵島と差を認めなかった。すなわち、WFS1欠損膵島では小胞体ストレスに対する応答が脆弱になっていると考えられた。そこで、さらに我々は、WFS1欠損膵島での小胞体ストレス応答の詳細を検討した。小胞体ストレス応答では、PERKのリン酸化を起点とする翻訳抑制、ATF6の活性化やIRE1によるXBP1の活性化に始まるシャペロン蛋白の発現誘導が惹起される。WFS1欠損膵島では、PERKリン酸化の亢進、XBP1 mRNAのスプライシング増強によるXBP1蛋白発現の亢進、ATF6の誘導によるシャペロン蛋白の発現増加が認められ、小胞体ストレス応答が亢進していることが観察された。また、小胞体ストレス応答の亢進に伴ってCHOPの発現およびcaspase-3の切断の亢進も認められ、アポトーシスシグナルが活性化されていることも明らかにした。

WFS1欠損によりβ細胞の増殖障害が生じ、これには細胞周期に関わる遺伝子の発現変化が関与

WFS1欠損膵島ではBrdUの取り込みが減少しており、β細胞の増殖障害が認められた。その分子機構に関与するものとして、DNA microarrayを用いた検討から、細胞周期に関わる遺伝子p21cip1の発現亢進を見出した。さらに、検討を進め、単離膵島を小胞体ストレス下におくとp21cip1の発現が転写レベルで増強すること、さらには、WFS1欠損MIN6細胞を作成することに成功し、この細胞でもp21cip1発現が増強しており、WFS1の導入により野生型と同様のレベルに戻ることを明らかにした。

WFS1は小胞体カルシウムの恒常性維持に重要な役割

WFS1欠損マウス膵島およびアデノウイルスベクターによりWFS1蛋白を過剰発現させた膵島の細胞内カルシウム動態、インスリン分泌を検討した。小胞体からのカルシウム放出を介してインスリン分泌を惹起するカルバコールおよびグルコースでWFS1欠損膵島を刺激すると、インスリン分泌は約30%低下していた。また細胞質のカルシウム濃度変化をβ細胞で測定すると、どちらの刺激に対してもWFS1欠損β細胞において30-40%の低下を認めた。一方、WFS1蛋白を過剰発現させた膵島では、インスリン分泌が両刺激に対し35-50%増加した。そこで、細胞内カルシウム動態制御におけるWFS1蛋白の役割を解析するため、ドキシサイクリン誘導性にWFS1蛋白を過剰発現あるいはノックダウンするHEK293細胞を作製し解析した。その結果、過剰発現細胞では小胞体カルシウム濃度が増加し、さらに小胞体カルシウム枯渇により惹起される容量性カルシウム流入の増加が認められた。対照的に、WFS1蛋白をノックダウ

ンするHEK293細胞では、小胞体カルシウム濃度および容量性カルシウム流入の減少が認められた。これらより、WFS1は小胞体カルシウムの恒常性の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

WFS1欠損agoutiマウスでは糖尿病が早期に重症化するが、インスリン抵抗性改善薬pioglitazoneにより発症予防が可能

*wfs1*欠損agoutiマウス(C57BL/6J-*wfs1*^{-/-}・A^y)はagoutiマウス(C57BL/6J-A^y)同様、軽度に肥満するが、6週齢ですでに約半数の個体で明らかな高血糖を示した。生後16週頃からは全個体でインスリン分泌不全による著明な高血糖を来した。同時に体重は減少に転じ、20週以降にはケトシスを来した。膵ラ氏島ではβ細胞の著しい選択的脱落を認め、TUNEL陽性細胞の出現、活性型caspase-3の発現増加により、β細胞の消失はアポトーシスによることが証明された。

単離ラ氏島によるウェスタン解析では、小胞体ストレス応答に関するBip蛋白の発現が野生型マウスと比較し、agoutiマウスや*wfs1*欠損マウスで増加していたが、*wfs1*欠損agoutiマウスではさらに増加していた。この*wfs1*欠損agoutiマウスにWeaning後、餌に混入することによりインスリン抵抗性改善薬pioglitazone pioglitazoneを経口投与したところ、非投与群に比べて体重の増加が認められた。しかしながら、血糖値の上昇は抑制され、24週後においても随時血糖は大部分の個体で対照(agouti)マウスと同等であった。それに呼応して、膵ではβ細胞が残存していた。このように、インスリン抵抗性改善薬である、pioglitazoneの投与により、*wfs1*欠損agoutiマウスでのβ細胞のアポトーシス、顕性糖尿病の発症はほぼ完全に抑制された。

内臓脂肪から脳へ向かう食欲調節シグナルの存在

食事性肥満・糖尿病モデルマウスの腹腔内脂肪組織(精巣上体脂肪)へ、アデノウィルスを用いて、UCP1の遺伝子導入を行ったところ、その発現は、精巣上体脂肪組織の脂肪細胞の5%足らずと、極めて限定的であり、全身の基礎代謝量に影響を与えるほどではなかった。しかし、糖代謝・インスリン感受性・レプチン感受性に与える影響は多大なものであった。

まず、空腹時血糖値の有意な低下、糖負荷試験による耐糖能の著明な改善を認めた。さらに、インスリン感受性試験により、高脂肪食負荷により惹起されたインスリン抵抗性の著明な改善が観察された。さらに興味深いことに、血中レプチン濃度は約50%に低下し、摂食量は約60%に減少した。レプチンは、視床下部に働き食欲を抑制する働きのあるアディポサイトカインであるため、このレプチンと摂食の協調的な低下は、視床下部におけるレプチンの感受性が亢進したことを意味する。すなわち、食事性肥満に伴うレプチン抵抗性が、腹腔内脂肪のごく一部の細胞における代謝の亢進により解除されたことが示された。

遺伝子を導入した腹腔内脂肪から脳内の視床下部へと遠隔効果をもたらす機序として、アディポサイトカインのような血流因子のほか、神経系の関与が考えられる。そこで、

この腹腔内脂肪(精巣上体脂肪)組織近傍でその脂肪組織につながる神経を切断し、その後に遺伝子導入を行う手法を用いて、神経シグナルの関与を検討した。興味深いことに、神経切断は、インスリン抵抗性解除の効果には影響しなかったが、レプチン抵抗性解除効果は、ほぼ完全に抑制された。上行神経を遮断するカプサイシン投与にても同様の結果が認められ、腹腔内脂肪組織での代謝が活発となった際に発せられるインスリン抵抗性改善とレプチン抵抗性改善のシグナルは、別々の経路で伝わっていること、特にレプチン抵抗性改善には神経系が関わっていることが示された。

D. 考察

近年、小胞体ストレスと細胞死(アポトーシス)や疾患との関連が大きな注目を浴びているが、我々の結果から、WFS1は小胞体ストレスへの防御機能を有しており、その機能欠如が徐々に膵β細胞死を導き、糖尿病を発症するとの可能性を考えさせる。肥満・過食・運動不足は膵β細胞にインスリン分泌を強要する。このような膵β細胞に小胞体ストレスを強いる状況下で、WFS1が関わる経路が遺伝的に脆弱な者では、膵β細胞が徐々に減少し、年余の後に遂には糖尿病を発症する可能性は高い。WFS1が欠損した膵島では、3つの小胞体ストレス応答経路のいずれもが増強していることから、WFS1は小胞体ストレス反応の根幹(ないしその近傍)に位置すると推測される。

また、2型糖尿病治療薬として用いられているピオグリタゾンが*wfs1*欠損agoutiマウスの糖尿病発症を予防したことは、現在、根本的治療のないWolfram症候群患者の治療を考える上で貴重な知見である。

E. 結論

WFS1蛋白は、小胞体カルシウムの恒常性の維持に重要な役割を果たしており、ウオルフラム症候群では、WFS1蛋白の欠損が小胞体の機能異常を来し、インスリン分泌低下をもたらすとともに、小胞体ストレスによるβ細胞の増殖抑制・アポトーシスの亢進によってβ細胞量の低下に至る結果、糖尿病を発症すると考えられる。

したがって、WFS1の機能解明は膵β細胞維持という新たなコンセプトの創薬につながる点できわめて重要であり、また、WFS1関わる遺伝子(群)は膵β細胞を守るという観点からの有力な糖尿病候補遺伝子と思われる。

また、食欲を統御する脂肪組織発の神経シグナルは、世界初の発見であり、膵β細胞を守る観点からも肥満糖尿病治療に新たな方向性をもたらすものである。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ishigaki Y, Katagiri H, Yamada T, Ogihara T, Imai J,

- Uno K, Hasegawa Y, Gao Junhong, Ishihara H, Shimosegawa T, Sakoda H, Asano T, and Oka Y. Dissipating excess energy stored in the liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity. *Diabetes* 54: 322-332, 2005
- Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Uno K, Hasegawa Y, Ishihara H, Sasano H, Mizuguchi H, Asano T and Oka Y. Constitutively active PDX1 induced efficient insulin production in adult murine liver. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 402-9, 2005
 - Pan J, Singh US, Takahashi T, Oka Y, Palm-Leis A, Herbelin BS, Baker KM. PKC mediates cyclic stretch-induced cardiac hypertrophy through Rho family GTPases and mitogen-activated protein kinases in cardiomyocytes. *J Cell Physiol*. 202:536-53, 2005
 - Iwasaki N, Horikawa Y, Tsuchiya T, Kitamura Y, Takahiro Nakamura, Tanizawa Y, Oka Y, Hara K, Kadowaki T, Awata T, Honda M, Yamashita K, Oda N, Li Y, Yamada N, Ogata M, Kamatani N, Iwamoto Y, del Bosque-Plata L, Hayes MG, Cox NJ, Bell GI. Genetic variants in the calpain-10 gene and the development of type 2 diabetes in the Japanese population. *J Hum Genet*. 50, 92 -98, 2005
 - Marthinet E, Bloc A, Oka Y, Tanizawa Y, Wehrle-Haller B, Bancila V, Dubuis JM, Philippe J, Schwitzgebel VM. Severe Congenital hyperinsulinism due to a mutation in the Kir6.2 Subunit of the KATP channel impairing trafficking and function. *J Clin Endocrinol Metab*. 90: 5401-5406, 2005
 - Ueda K, Kawano J, Takeda K, Yujiri T, Tanabe K, Anno T, Akiyama M, Nozaki J, Yoshinaga T, Koizumi A, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y. Endoplasmic reticulum stress induces Wfs1 gene expression in pancreatic β -cells via transcriptional activation. *Eur J Endocrinol*. 153: 167-176, 2005
 - Satoh J, Takahashi K, Takizawa Y, Ishihara H, Hirai M, Katagiri H, Hinokio Y, Suzuki S, Tsuji I, Oka Y. Secondary sulfonylurea failure: Comparison of period until insulin treatment between diabetic patients treated with gliclazide and glibenclamide. *Diabetes Res Clin Pract*. 70: 291-7, 2005
 - Anai M, Shojima N, Katagiri H, Ogihara T, Sakoda H, Onishi Y, Ono H, Fujishiro M, Fukushima Y, Horike N, Viana A, Kikuchi M, Noguchi N, Takahashi S, Takata K, Oka Y, Uchijima Y, Kurihara H, Asano T. A novel protein kinase B (PKB)/AKT-binding protein enhances PKB kinase activity and regulates DNA synthesis. *J Biol Chem*. 280: 18525-35, 2005
 - Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y, Yamada T, Yoshizumi S, Suzuki C, Satoh J, Oka Y. WRN gene 1367 Arg allele protects against development of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 69: 287-92, 2005
 - Kushiyaama A, Shojima N, Ogihara T, Inukai K, Sakoda H, Fujishiro M, Fukushima Y, Anai M, Ono H, Horike N, Viana AY, Uchijima Y, Nishiyama K, Shimosawa T, Fujita T, Katagiri H, Oka Y, Kurihara H, Asano T. Resistin like molecule beta activates MAPKs, suppresses insulin signaling in hepatocytes and induces diabetes, hyperlipidemia and fatty liver in transgenic mice on a high-fat diet. *J Biol Chem*. 280: 42016-25, 2005
 - Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, Nguyen LX, Allen JR, Oka Y, Urano F. WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. 280: 39609-15, 2005
 - Nonogaki K, Ohashi-Nozue K, Oka Y. A negative feedback system between brain serotonin systems and plasma active ghrelin levels in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 341: 703-707, 2006
 - Takahashi R, Ishihara H, Tamura A, Yamaguchi S, Yamada T, Takei D, Katagiri H, Endou H, Oka Y. Cell-type specific activation of metabolism reveals that β -cell secretion suppresses glucagon release from α -cells in rat pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 290:308-316, 2006
 - Yamada T, Katagiri H, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Nijima A, Mano H, Aburatani H, Asano T, Oka Y. Signals from Intra-Abdominal Fat Modulate Insulin and Leptin Sensitivity through Different Mechanisms: Neuronal Involvement in Food Intake Regulation. *Cell Metabolism* 3: 223-9, 2006
 - Yamada T, Ishihara H, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Tokita A, Satake C, Tashiro F, Katagiri H, Aburatani H, Miyazaki J-I, Oka Y. WFS1-deficiency enhances endoplasmic reticulum stress, triggers apoptotic pathway and impairs cell cycle progression specifically in pancreatic β -cells. *Hum Mol Genet*. in press
2. 学会発表
- The 65th scientific sessions of American Diabetes Associations. 6.10-6.14, 2005, San Diego, USA
- Poster Presentation : A role of eNOS in pancreatic β Cell regeneration after bone marrow transplantation in streptozotocin-induced diabetic mice. Hasegawa Y, Katagiri H, Ogihara T, Ishigaki Y, Yamada T, Imai J, Uno K, Gao Junhong, Oka Y
 - Poster Presentation : Depression-associated factors in Japanese subjects with diabetes. Yoshida S, Hirai M, Suzuki S, Awata S, Yamashita M, Ohara A, Hinokio Y, Sora I, Matsuoka H, Oka Y
 - Poster Presentation : Hepatic PPAR γ expression induced

redistribution of fat storage and improved insulin resistance in obese mice.

Uno K, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Hasegawa Y, Oka Y

- Poster Presentation: Dissociation of 5-HT_{2C} receptor signaling and central melanocortin pathways in the regulation of appetite.

Nonogaki K, Oka Y

- Poster Presentation: Modulation of hypothalamic leptin resistance by signals from intra-abdominal fat tissue.

Yamada T, Katagiri H, Ishigaki Y, Oka Y

第48回日本糖尿病学会年次学術集会 2005年5月12日-14日, 神戸市

- WFS1 欠損 β 細胞における小胞体ストレス下の代謝分泌連関

石原 寿光、田村 明、高橋 累、山田 高弘、山口 賢、鵜田 藍、武井 大祐、檜尾 好徳、荻原 健英、鈴木 進、片桐 秀樹、宮崎 純一、岡 芳知

- WFS1 欠損膵島における小胞体ストレス応答の検討

山田 高弘、石原 寿光、鵜田 藍、山口 賢、高橋 累、田村 明、武井 大祐、檜尾 好徳、荻原 健英、鈴木 進、片桐 秀樹、岡 芳知

- WFS1 欠損マウスにおける小胞体ストレス応答ならびに β 細胞脱落への遺伝的背景の関与

高橋 累、石原 寿光、田村 明、山田 高弘、山口 賢、鵜田 藍、武井 大祐、檜尾 好徳、荻原 健英、鈴木 進、片桐 秀樹、岡 芳知

- WFS1 蛋白による細胞内カルシウム動態制御機構の解析

武井 大祐、石原 寿光、田村 明、高橋 累、山田 高弘、山口 賢、鵜田 藍、檜尾 好徳、荻原 健英、鈴木 進、片桐 秀樹、岡 芳知

- 肝臓のエネルギー消費亢進が脂肪組織・筋肉・視床下部に及ぼす影響

石垣 泰、片桐 秀樹、山田 哲也、荻原 健英、今井 淳太、宇野 健司、長谷川 豊、高 俊弘、檜尾 好徳、鈴木 進、岡 芳知

- 肝における PPAR γ 過剰発現は脂肪肝の増悪をきたすが耐糖能を改善する

宇野 健司、片桐 秀樹、山田 哲也、荻原 健英、石垣 泰、今井 淳太、長谷川 豊、高 俊弘、檜尾 好徳、鈴木 進、岡 芳知

- 肝へのガングリオシド特異的シアリダーゼ NEU3 遺伝子導入によるインスリン感受性と耐糖能改善の分子機序

善積 信介、鈴木 進、鈴木千登世、山田 高弘、沖本 久志、平井 完史、檜尾 好徳、荻原 健英、片桐 秀樹、山口 壹範、宮城 妙子、岡 芳知

- 急性の高インスリン血症は血中アディポネクチン濃度を低下させる

平井 完史、石垣 泰、野々垣勝則、檜尾 好徳、山田

高弘、善積 信介、沖本 久志、高橋 和眞、石原 寿光、荻原 健英、片桐 秀樹、鈴木 進、岡 芳知

- 血中グレリン濃度と脳内メラノコルチン系による食欲調節機構

野々垣勝則、岡 芳知

- 骨髄移植に伴う STZ 膵 β 細胞障害後の再生における eNOS の役割

荻原 健英、片桐 秀樹、長谷川 豊、石垣 泰、山田 哲也、今井 淳太、宇野 健司、高 俊弘、檜尾 好徳、鈴木 進、岡 芳知

- 骨髄移植による WFS1 遺伝子欠損マウスにおける慢性 β 細胞障害の改善

長谷川 豊、片桐 秀樹、荻原 健英、石原 寿光、石垣 泰、山田 哲也、今井 淳太、宇野 健司、高 俊弘、檜尾 好徳、鈴木 進、岡 芳知

- heme oxygenase 遺伝子プロモーター多型と2型糖尿病の臨床像との関連

檜尾 好徳、鈴木 進、鈴木千登世、沖本 久志、善積 信介、山田 高弘、平井 完史、石垣 泰、石原 寿光、高橋 和眞、荻原 健英、片桐 秀樹、岡 芳知

- 新規動脈硬化診断法(血管壁弾性特性測定)の糖尿病患者での有用性

沖本 久志、石垣 泰、小岩 喜郎、長谷川 英之、金井 浩、荻原 尚、反中 由直、檜尾 好徳、平井 完史、山田 高弘、善積 信介、田村 明、山田 哲也、石原 寿光、高橋 和眞、荻原 健英、鈴木 進、片桐 秀樹、岡 芳知

- 腹腔内脂肪組織による視床下部レプチン感受性調節

山田 哲也、片桐 秀樹、石垣 泰、荻原 健英、今井 淳太、宇野 健司、長谷川 豊、高 俊弘、檜尾 好徳、鈴木 進、岡 芳知

- マウス肝への活性型 PDX1 遺伝子導入によるインスリン欠乏糖尿病の治療

今井 淳太、片桐 秀樹、荻原 健英、石垣 泰、山田 哲也、宇野 健司、長谷川 豊、高 俊弘、檜尾 好徳、鈴木 進、岡 芳知

- マウス肝臓への活性型 PDX1 遺伝子導入の効果

今井 淳太、片桐 秀樹、長谷川 豊、宇野 健司、山田 哲也、石垣 泰、鈴木 進、荻原 健英、岡 芳知

- ミニマルモデル検査によるインスリン感受性 SI 腸腰筋 CT 値との関連の検討

鈴木 慎二、赤井 裕輝、福澤 正光、平井 敏、早坂 恭子、永富 良一、岡 芳知

- 余剰脂肪蓄積が糖代謝に及ぼす影響

高 俊弘、片桐 秀樹、石垣 泰、山田 哲也、荻原 健英、今井 淳太、宇野 健司、長谷川 豊、檜尾 好徳、鈴木 進、岡 芳知

Keystone Symposia: Diabetes Mellitus and the Control of Cellular Energy Metabolism.. 1.21-1.26, 2006, Vancouver, British Columbia, Canada

- Role of eNOS in beta cell regeneration after bone Marrow transplantation in STZ-diabetic mouse models (Oral presentation)
Ogihara T, Katagiri H, Hasegawa Y, Oka Y.

H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)

1. 特許取得
準備中
2. 実用新案登録
なし
3. その他(研究に関する新聞記事等)
2006年3月8日朝刊 新聞報道
毎日新聞 「内臓脂肪に食欲ブレーキ内蔵－東北大グ

ループ」
朝日新聞 「内臓脂肪、神経介し「食欲抑制」－東北大発見」
読売新聞「内臓脂肪からやせる信号－東北大グループ」
日経工業新聞「内臓脂肪、食欲に関与－東北大が解明」
日刊工業新聞「食欲調節に関与－東北大 肥満治療創薬に道」など
2006年3月8日テレビ報道
NHKニュース 「内臓脂肪の神経信号が食欲調節」など

WFS1の機能解明（膵β細胞維持再生機構）に関する研究
分担研究者 片桐 秀樹 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

肥満・2型糖尿病の患者では、インスリン抵抗性を生じることによる血糖値の上昇が惹起されるのみならず、膵β細胞からの有効なインスリン分泌の低下が認められることがその発症機序として重要であることが知られている。このことから、肥満の状態は、膵β細胞における小胞体ストレスの増加を引き起こしていることが推察される。つまり、WFS1の変異により生じるWolfram症候群での糖尿病発症メカニズムと共通の機序が、一般の糖尿病でも認められるわけである。そこで、我々は、肥満の病態を明らかとするとともに、新規治療法を開発することを目指し、高脂肪食を負荷することで肥満・糖尿病を惹起させた生活習慣病モデルマウスを用いて実験を行っている、肥満・糖尿病を発症させた後、後天的に腹腔内脂肪組織へ代謝を亢進させる遺伝子UCP1を導入を試みたところ、実際の遺伝子発現は極めて局所・限定的であったにもかかわらず、血糖値の低下・過食の改善が認められ、その機序として、インスリン抵抗性やレプチン抵抗性の著明な改善が示された。さらに、この腹腔内脂肪組織近傍で神経切断を行ったところ、UCP1遺伝子導入によるインスリン抵抗性改善効果は影響がなく、レプチン抵抗性改善効果はほとんど消失した。これらから、脂肪組織発の神経シグナルが、視床下部におけるレプチン感受性を調節することで食欲を統御していることが示された。この発見は、脂肪組織が神経シグナルの発信源となっていることを示したという生物学的な意義に加え、今まで全く機序が不明であった肥満時における食欲のブレーキがかからない現象（レプチン抵抗性）の機序の解明、さらには、肥満やメタボリックシンドロームに対する全く新しい視点からの治療法開発につながる点から、大きな意味があるものと考えられる。

A. 研究目的

近年、過食などの生活習慣による肥満に基づく糖尿病患者の増加が社会的な問題になっている。肥満になると、インスリン抵抗性が惹起されるのみならず、膵β細胞での小胞体ストレスが増加することが引き金となって、インスリン分泌が低下することが、糖尿病発症につながるものと考えられる。そこで、我々は、肥満の病態や発症機序を解明し、肥満・糖尿病に対する新規治療法や予防法の開発を目指すことを本研究の目的とする。特に、肥満になると、食欲のブレーキをかけるアディポサイトカインであるレプチンが視床下部で働かなくなる（レプチン抵抗性）の状態になることが知られており、それが、肥満を維持し悪化させる主因と推察されている。そこで、本研究では、その機序を明らかとし、視床下部におけるレプチン感受性の改善による肥満・糖尿病に対する新規治療法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

1. 高脂肪食負荷により、肥満・糖尿病を発症させたマウスの腹腔内脂肪組織に、アデノウイルスを用いて、ミトコンドリアでのATP産生を抑制し基礎代謝を亢進させる働きがあるUCP1遺伝子を後天的に発現させ、腹腔内脂肪組織における代謝亢進による全身の糖・脂質代謝への影響、膵β細胞からのインスリン分泌に与える

効果を観察する。

WFS1^{-/-}マウスへの様々な食事負荷による糖尿病発症機序の検討

WFS1^{-/-}マウスに様々な種類の食事を負荷し、WFS1^{-/-}マウスの糖尿病発症に与える影響を観察する。

2. 倫理面への配慮

本年度の研究は細胞及び動物モデルを用いた解析に限られているため、倫理面への配慮が必要な事項に該当しない。動物実験は東北大学動物実験指針に基づいて実施し、東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

食事性肥満・糖尿病モデルマウスの腹腔内脂肪組織（精巣上体脂肪）へ、アデノウイルスを用いて、UCP1の遺伝子導入を行ったところ、その発現は、精巣上体脂肪組織の脂肪細胞の5%足らずと、極めて限定的であり、全身の基礎代謝量に影響を与えるほどではなかった。しかし、糖代謝・インスリン感受性・レプチン感受性に与える影響は多大なものであった。

まず、空腹時血糖値の有意な低下、糖負荷試験による耐糖能の著明な改善を認めた。さらに、インスリン感受性試験により、高脂肪食負荷により惹起されたインスリン抵

抗性の著明な改善が観察された。これにともない、空腹時の血中インスリン濃度は低下し、膵β細胞への負荷の減少が示唆された。さらに興味深いことに、血中レプチン濃度は約50%に低下し、摂食量は約60%に減少した。レプチンは、視床下部に働き食欲を抑制する働きのあるアディポサイトカインであるため、このレプチンと摂食の協調的な低下は、視床下部におけるレプチンの感受性が亢進したことを意味する。実際、レプチン負荷試験にて、著明なレプチン感受性の亢進が直接証明され、また、視床下部では、食欲促進ペプチドであるNPYの発現が著明に減少していることが観察された。これらから、食事性肥満に伴うレプチン抵抗性が、腹腔内脂肪のごく一部の細胞における代謝の亢進により解除されたことが示された。

次に、この摂食量減少、つまり、レプチン抵抗性改善の機序の解明を試みた。遺伝子を導入した腹腔内脂肪から脳内の視床下部へと遠隔効果をもたらす機序として、アディポサイトカインのような血流因子のほか、神経系の関与が考えられる。そこで、この腹腔内脂肪(精巣上体脂肪)組織近傍でその脂肪組織につながる神経を切断し、その後、遺伝子導入を行う手法を用いて、神経シグナルの関与を検討した。興味深いことに、神経切断は、インスリン抵抗性解除の効果には影響しなかったが、レプチン抵抗性解除効果は、ほぼ完全に抑制された。上行神経を遮断するカプサイシン投与にても同様の結果が認められ、腹腔内脂肪組織での代謝が活発となった際に発せられるインスリン抵抗性改善とレプチン抵抗性改善のシグナルは、別々の経路で伝わっていること、特にレプチン抵抗性改善には神経系が関わっていることが示された。

D.E 考察および結論

肥満症の病態として、インスリン抵抗性とレプチン抵抗性が重要な役割を果たしていることが知られている。インスリン抵抗性は、肥満に基づく糖尿病・高脂血症・高血圧や動脈硬化症の基盤として、注目を集めており、これは、膵β細胞における負荷・ストレスの増加につながるものである。一方、レプチン抵抗性は、肥満自体の維持・悪化の原因として重要である。多くの肥満患者では血中レプチン濃度は増加しているにもかかわらず、視床下部におけるレプチンの作用が低下しているため、食欲の抑制が効かないというわけである。そこで、レプチン抵抗性を改善させることができれば、肥満自体が改善し、肥満に基づく種々の病態(メタボリックシンドローム)をまとめて治療することが可能であると考えられる。

本研究では、局所の脂肪組織の一部の細胞への遺伝子導入により、著明なインスリン抵抗性の改善、レプチン抵抗性の改善を認めたことから、遺伝子導入され代謝が活発となった細胞から発せられるこれらの病態に対する改善シグナルが存在することが示唆された。さらに、神経切断や薬物による遮断の実験から、レプチン抵抗性改善シグナルは神経系を介していること、インスリン抵抗性改善シグナルはこの神経経路を介していないことが示された。本研究で示

された食欲を統御する脂肪組織発の神経シグナルは、世界初の発見であり、生物学的意義は多大であると考えられる。また、このシグナルがレプチン感受性に関与していることから、肥満における病態の解明に点からも意義深い。さらに重要なことは、本研究で得られた結果のように、この神経経路を活性化させることにより、レプチン抵抗性が改善され肥満の根本治療につなげることができると考えられ、全く新しい視点からの治療法開発につながることを期待されることである。

本研究は、Cell Metabolism誌に掲載され、その号の featured previewにも紹介され、その意義が高く評価された。今後は、この研究を進展させ、この神経シグナルの詳細・分子機序を解明し、この系を活性化する薬剤等の開発につなげたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Yamada, T., **Katagiri, H.**, Ishigaki, Y., Ogihara, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Ishihara, H., Nijijima A., Mano, H., Aburatani, H., Asano, T., Oka Y. (2006) Signals from intra-abdominal fat modulate insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: Neuronal involvement in food intake regulation.. *Cell Metab.*3, 223-9
- Anai, M., Shojima, N., **Katagiri, H.**, Ogihara, T., Sakoda, H., Onishi, Y., Ono, H., Fujishiro, M., Fukushima, Y., Horike, N., Viana, A., Kikuchi, M., Noguchi, N., Takahashi, S., Tanaka, K., Oka, Y., Uchijima, Y., Kurihara, H., Asano, T. (2005) A novel protein kinase B (PKB)/AKT-binding protein enhances PKB kinase activity and regulates DNA synthesis. *J Biol Chem.* 280, 18525-35.
- Ishigaki, Y., **Katagiri, H.**, Yamada, T., Ogihara, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Ishihara, H., Shimosegawa, T., Sakoda, H., Asano, T., Oka, Y. (2005) Dissipating excess energy stored in the liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity. *Diabetes.* 54, 322-332
- Imai, J., **Katagiri, H.**, Yamada, T., Ishigaki, Y., Ogihara, T., Uno, K., Hasegawa, Y., Ishihara, H., Sasano, H., Mizuguchi, H., Asano, T., Oka, Y. (2005) Constitutively active PDX1 induced efficient insulin production in adult murine liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 326, 402-9
- Shojima, N., Ogihara, T., Inukai, K., Fujishiro, M., Sakoda, H., Kushiya, A., **Katagiri, H.**, Anai, M., Ono, H., Fukushima, Y., Horike, N., Viana, A.Y., Uchijima, Y., Kurihara, H., Asano T. (2005) Serum concentrations of resistin-like molecules beta and gamma are elevated in high-fat-fed and obese db/db mice with increased production in the intestinal tract and bone marrow. *Diabetologia.* 48, 984-92.
- Kushiya, A., Shojima, N., Ogihara, T., Inukai, K.,

- Sakoda, H., Fujishiro, M., Fukushima, Y., Anai, M., Ono, H., Horike, N., Vianna, A.Y., Uchijima, Y., Nishiyama, K., Shimosawa, T., Fujita, T., **Katagiri, H.**, Oka, Y., Kurihara, H., Asano, T. (2005) Resistin like molecule beta activates MAPKs, suppresses insulin signaling in hepatocytes and induces diabetes, hyperlipidemia and fatty liver in transgenic mice on a high-fat diet. *J. Biol. Chem.* 280. 42016-25.
- Takahashi, R., Ishihara, H., Tamura, A., Yamaguchi, S., Yamada, T., Takei, D., **Katagiri, H.**, Endou, H., Oka Y. (2005) Cell-type specific activation of metabolism reveals that beta-cell secretion suppresses glucagons release from alpha-cells in rat pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290, E308-16.
2. 学会発表
- **片桐秀樹**, 荻原健英, 今井淳太, 長谷川豊, 岡芳知 シンポジウム9 内分泌領域における再生医療学 インスリン欠乏モデルマウスへの糖尿病再生治療 第78回日本内分泌学会学術総会 2005年7月2日東京
 - **片桐秀樹** UCP1遺伝子導入による肥満・糖尿病に対する治療法開発 体温調節、温度受容研究会 2005年9月27-28日 自然科学研究機構岡崎研究所
 - **片桐秀樹**, 宇野健司, 山田哲也, 岡芳知 ワークショップ脂肪肝 肝におけるPPAR γ 発現は、脂肪肝・肝インスリン抵抗性を悪化させるが、肥満や耐糖能を改善させる 第20回日本糖尿病合併症学会 2005年10月7日-8日 東京
 - **片桐秀樹**, 石垣泰, 山田哲也, 宇野健司, 岡芳知 ワークショップ肥満・糖尿病の発症機構 臓器・組織間ネットワーク・代謝情報ネットワーク機構とその治療応用 第28回日本分子生物学会年会 2005年12月7日-10日 福岡
 - **片桐秀樹** 個体における代謝調節とメタボリックシンドローム 第24回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー 2006年1月17日 東京
 - Ogiwara T., **Katagiri H.**, Hasegawa Y., Oka Y. Regeneration of Pancreatic β Cells after Bone Marrow Transplantation in Streptozotocin-treated Mice. Keystone Symposia, Diabetes Mellitus: Molecular Mechanisms, Genetics and New Therapies. Jan 27-Feb 2, 2005 Keystone, Colorado, USA
 - Uno K., **Katagiri H.**, Hasegawa Y., Oka Y. Hepatic PPAR γ Expression Induced Redistribution of Fat Storage and Improved Insulin Resistance in Obese Mice. American Diabetes Association, 65th Scientific Sessions, June 10-14 2005 San Diego, California, USA
 - Yamada T., **Katagiri H.**, Ishigaki Y., Oka Y. Modulation of Hypothalamic Leptin Resistance by Signals from Intra-Abdominal Fat Tissue. American Diabetes Association, 65th Scientific Sessions, June 10-14 2005 San Diego, California, USA
 - Hasegawa Y., **Katagiri H.**, Ogiwara T., Ishigaki Y., Yamada T., Imai J., Uno K., Gao J., Oka Y. A Role of eNOS in Pancreatic β cell Regeneration after Bone Marrow Transplantation in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. American Diabetes Association, 65th Scientific Sessions, June 10-14 2005 San Diego, California, USA
 - **Katagiri H.** Cross-talk between organs/tissues in the regulation of glucose and energy metabolism. Tohoku University 21st century COE program The 2nd International Symposium -Signal Transduction and Metabolic Disorders- November17-18 2005, Sendai, Japan
 - Ogiwara T., **Katagiri H.**, Hasegawa Y., Oka Y. Role of eNOS in β cell regeneration after bone marrow transplantation in STZ-diabetic mouse models. Hot Topics I. Keystone Symposia, Diabetes Mellitus and the control of cellular energy metabolism. Jan 21-26, 2006 Vancouver, British Columbia, Canada
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 準備中
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他(研究に関する新聞記事等)
 - 2006年3月8日朝刊 新聞報道 毎日新聞「内臓脂肪に食欲ブレーキ内蔵―東北大グループ」
 - 朝日新聞「内臓脂肪、神経介し「食欲抑制」―東北大発見」
 - 読売新聞「内臓脂肪からやせる信号―東北大グループ」
 - 日経工業新聞「内臓脂肪、食欲に関与―東北大が解明」
 - 日刊工業新聞「食欲調節に関与―東北大 肥満治療創薬に道」など
 - 2006年3月8日テレビ報道 NHKニュース「内臓脂肪の神経信号が食欲調節」など

遺伝子解析・モデル動物解析に関する研究

分担研究者 谷澤 幸生 山口大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

*wfs1*欠損マウスの膵β細胞はERストレスに脆弱であることが現在までの研究により示唆されている。しかし、β細胞障害の発現はマウスの遺伝的背景に依存し、C57BL/6Jを遺伝的背景とする*wfs1*欠損マウス(C57BL/6J-*wfs1*^{-/-})の耐糖能異常は軽度にとどまる。一方、yellow agoutiマウス(C57BL/6J-*A*^y)は過食のため軽度の肥満とインスリン抵抗性をきたす。しかしながら、耐糖能異常は軽度で、高インスリン血症によって代償されるため血糖値は野生型と比較してほとんど上昇しない。そこで、両者を交配することにより、*wfs1*欠損agoutiマウスを作成し、インスリン抵抗性負荷時のβ細胞の応答を検討した。*wfs1*欠損agoutiマウス(C57BL/6J-*wfs1*^{-/-}・*A*^y)はagoutiマウス同様、軽度に肥満するが、6週齢ですでに約半数の個体で明らかな高血糖を示した。生後16週頃からは全個体でインスリン分泌不全による著明な高血糖を来した。同時に体重は減少に転じ、20週以降にはケトシスを来した。膵ラ氏島では著しいβ細胞の選択的脱落を認め、TUNEL陽性細胞の出現、活性型caspase-3の発現増加により、β細胞の消失はアポトーシスによることが証明された。残存するβ細胞ではインスリン分泌顆粒の減少と、小胞体の顕著な膨化が電子顕微鏡で観察された。単離ラ氏島のウエスタン解析では、小胞体ストレス応答に関するBip蛋白の発現が野生型マウスと比較し、agoutiマウスや*wfs1*欠損マウスで増加していたが、*wfs1*欠損agoutiマウスではさらに増加していた。これらのことは、*wfs1*が欠損したβ細胞は、ERストレスに対する応答異常のために容易にアポトーシスに陥ることを示している。

インスリン抵抗性改善薬である、pioglitazoneの投与により、*wfs1*欠損agoutiマウスでのβ細胞のアポトーシス、顕性糖尿病の発症はほぼ完全に抑制された。

2型糖尿病患者においても、膵β細胞は緩徐ではあるが進行性に減少してゆく。*wfs1*欠損agoutiマウスでのβ細胞死のメカニズムをさらに詳細に解析することにより、2型糖尿病の発症、進展との共通メカニズムを解明して行きたい。

A. 研究目的

*wfs1*欠損マウスの膵β細胞はERストレスに脆弱であることが現在までの研究により示唆されている。そこで、モデル動物を用いた解析によりこの仮説を検証し、β細胞死のメカニズムを明らかにすることでWFS1遺伝子の機能およびその異常による糖尿病の発症機構を解明する。さらには糖尿病の新規治療薬の開発を目指す。

B. 研究方法

WFS1蛋白は、ERストレスにより発現が誘導され、また、*wfs1*欠損マウスの膵β細胞はERストレスに脆弱であることが示唆されている。一方、肥満はインスリン抵抗性を惹起し、膵β細胞ではインスリン抵抗性を代償するためにインスリンの産生、分泌が亢進する。この際、β細胞はERストレスを負荷された状態にあると予想される。yellow agouti(*A*^y)マウス(C57BL/6J-*A*^y)は過食のため軽度の肥満と耐糖能異常を示す。そこで、明らかな膵β細胞の異常が認められるものの、耐糖能異常は軽度にとどまるC57BL/6Jを遺伝的背景とする*wfs1*欠損マウス(C57BL/6J-*wfs1*^{-/-})と交配し、*wfs1*欠損yellow agoutiマウス(C57BL/6J-*wfs1*^{-/-}・*A*^y)を作成する。このマウスの耐糖能の変化を経時的に観察し、同時に膵ラ氏島の形態学的変化、各種分子発現の変化を(免疫)組織化学的解析、ウエスタン法等により検討した。また、

電子顕微鏡によるβ細胞の微細構造の変化を検討した。

動物実験は山口大学医学部山口大学医学部動物実験指針に基づいて、動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

*wfs1*欠損マウス(C57BL/6J-*wfs1*^{-/-})をyellow agouti(*A*^y)マウス(C57BL/6J-*A*^y)と交配し、*wfs1*欠損yellow agoutiマウス(C57BL/6J-*wfs1*^{-/-}・*A*^y)を作成した。

(1) *wfs1*欠損マウスの耐糖能

*wfs1*ホモ欠損マウス(C57BL/6J-*wfs1*^{-/-})と野生型littermate(C57BL/6J-*wfs1*^{+/+})の体重や随時血糖値には24週齢までの観察で有意差を認めなかった。糖負荷時のインスリン分泌はコントロールに比べて低下しており、耐糖能の異常が認められた。膵では、24週齢においても組織化学的にはラ氏島はほぼ正常で、β細胞もほぼ正常に認められ、少数のα細胞がラ氏島中央部に侵入するなど、構築の異常が軽度に認められるのみであった。

(2) agoutiマウスの耐糖能

agoutiマウス(C57BL/6J-*A*^y)は野生型littermate(C57BL/6J)と比較すると、10週齢から有意な体重増加を認めた。随時血糖値の有意な上昇は認めなかったが、高インスリン血症を認め、インスリン抵抗性を有すると考えられた。膵ではラ氏島数の増加と個々のラ氏島の肥大が見られた。また、

単離ラ氏島では分子シャペロン Bipの発現が増加していた。さらに、ERAI (ER stress Activated Indicator)システムを導入した遺伝子改変マウス(奈良先端科学技術大学院大学、河野憲二教授より供与)との交配により、*in vivo*での小胞体ストレス状態を検討すると、ラ氏島内のGFP発現が野生型マウスと比較して増加し、*XBP-1* mRNAのスプライシングの亢進が示唆された。これらのことより、agoutiマウスのラ氏島では小胞体ストレスが存在することが示唆された。

(3) *wfs1*欠損agoutiマウス

*wfs1*欠損agoutiマウス(C57BL/6J-*wfs1*^{-/-}・A^y)はagoutiマウス(C57BL/6J-A^y)同様、軽度に肥満するが、6週齢ですでに約半数の個体で明らかな高血糖を示した。生後16週頃からは全個体でインスリン分泌不全による著明な高血糖を来した。同時に体重は減少に転じ、20週以降にはケトーシスを来した。臍ラ氏島ではβ細胞の著しい選択的脱落を認め、TUNEL陽性細胞の出現、活性型caspase-3の発現増加により、β細胞の消失はアポトーシスによることが証明された。

単離ラ氏島によるウェスタン解析では、小胞体ストレス応答に関するBip蛋白の発現が野生型マウスと比較し、agoutiマウスや*wfs1*欠損マウスで増加していたが、*wfs1*欠損agoutiマウスではさらに増加していた。

(4) *wfs1*欠損agoutiマウスに対するpioglitazoneの治療効果

軽度の肥満とそれに伴うインスリン抵抗性の賦与により著しいβ細胞の喪失と糖尿病を発症した*wfs1*欠損agoutiマウスに対するインスリン抵抗性改善薬pioglitazoneの治療効果を検討した。Weaning後、餌に混入することによりpioglitazoneを経口投与した。

Pioglitazone投与により、*wfs1*欠損agoutiマウスは非投与群に比べて体重の増加が認められた。しかしながら、血糖値の上昇は抑制され、24週後においても随時血糖は大部分の個体で対照(agouti)マウスと同等であった。それに呼応して、臍ではβ細胞が残存していた。

(5) 電子顕微鏡による臍の観察

臍β細胞の障害に対応する微細構造の変化を電子顕微鏡観察により検討した。野生型マウスのβ細胞は分泌顆粒に富み、粗面小胞体が発達していた。*wfs1*欠損マウスでは野生型マウスと比較して粗面小胞体の膨張が見られたが、その程度は細胞により異なっていた。分泌顆粒は中心部の電子密度がやや低下していたが、ほぼ正常に存在した。*wfs1*欠損agoutiマウスでは、観察した臍β細胞ほぼすべてにおいて粗面小胞体の構造が変化し、膨張が著しく、いびつな形態を呈したのも多く含まれた。分泌顆粒の数は減少し、残存する分泌顆粒では顆粒の電子密度が著しく低下していた。膨大したミトコンドリアも散見された。これらの変化はpioglitazoneの投与により著明に改善していた。

D. 考察

agoutiマウスのラ氏島ではBip蛋白の発現が亢進し、また、

XBP-1 mRNAのスプライシングによりGFPが発現されるERAIシステムの導入によりラ氏島でのGFPの発現が増加することから、肥満・インスリン抵抗性を代償するインスリン分泌増大時にはβ細胞でのERストレスが亢進していることが示された。このことと併せて、*wfs1*欠損agoutiマウスでの早期から顕著なβ細胞死と糖尿病の発症は、WFS1蛋白がβ細胞でERストレスに対して防御的な役割を演じるという仮説を支持する。

一方、pioglitazoneはβ細胞の減少、糖尿病の発症を顕著に抑制した。pioglitazone投与によりインスリン抵抗性が減じ、β細胞でのERストレスが減少したためと推測されるが、予備的な検討ではpioglitazone投与*wfs1*欠損agoutiマウスのラ氏島でのBip蛋白の発現は、コントロールとしたagoutiマウスと比較して必ずしも軽減しておらず、pioglitazoneのβ細胞への直接作用の結果である可能性も考慮する必要がある。これら劇的な表現型の変化の背景にあるβ細胞での分子イベントのさらなる解明がWFS1蛋白の機能と、wolfram症候群での糖尿病発症の機序を明らかにするために必要である。

E. 結論

*wfs1*欠損マウスでは、β細胞はERストレスに対して脆弱であり、インスリン抵抗性が負荷されることによって急速に細胞死にいたる。このことから、WFS1蛋白はβ細胞でERストレスに対して防御的な役割を演じることが示唆された。2型糖尿病患者においても、臍β細胞は緩徐ではあるが進行性に減少してゆく。肥満、インスリン抵抗性とβ細胞の小胞体ストレス、さらに2型糖尿病でのβ細胞数の減少の関連について*wfs1*欠損agoutiマウスをモデルとしてさらに詳細に解析することにより、2型糖尿病の発症、進展との共通メカニズムが明らかになることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ueda K, Kawano J, Takeda K, Yujiri T, Tanabe K, Anno T, Akiyama M, Nozaki J, Yoshinaga T, Koizumi A, Shinoda K, Oka Y, **Tanizawa Y**. Endoplasmic Reticulum Stress Induces *Wfs1* Gene Expression in Pancreatic β-cells via Transcriptional Activation. *Eur J Endocrinol* 153:167-176, 2005
2. Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Taniguchi S, Umetsu M, Atsumi T, Wada N, Yoshioka N, Ono Y, **Tanizawa Y**, Koike T. A novel mutation of WFS1 gene in a Japanese man of Wolfram syndrome with positive diabetes-related antibodies. *Diabetes Res Clin Pract*. 2006 in press
3. Nakamori Y, Emoto M, Fukuda N, Taguchi A, Okuya S, Tajiri M, Miyagishi M, Taira K, Wada Y, **Tanizawa Y**. Myosin motor Myo1c and its receptor NEMO/IKK-g promote TNF-α induced serine³⁰⁷ phosphorylation of IRS-1. *J Cell Biol*. in press
4. Muraki K, Okuya S, **Tanizawa Y**. Estrogen receptor α regulates insulin sensitivity through IRS-1 tyrosine phosphorylation in mature 3T3-L1 adipocytes. *Endocrine J* in press

2. 学会発表

1. 秋山優 他 *wfs1*欠損マウスではインスリン需要増大時に膵β細胞が選択的に脱落する 第78回日本内分泌学会学術総会(平成17年7月2日 東京都)
2. 秋山優 他 *wfs1*欠損 *agouti* マウスにおける膵β細胞脱落機序の検討 第43回日本糖尿病学会中国四国地方会(平成17年11月11日 高松市)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

膵β細胞特異的に発現される人工タンパク質、該タンパク質をコードしたレポーター遺伝子及び膵β細胞量の測定方法(出願中)

2. 実用新案登録

なし

3. その他(研究に関する新聞記事等)

なし

WFS1の機能解析（関連遺伝子クローニング）に関する研究
分担研究者 浅野 知一郎 東京大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨

WFS1遺伝子の変異によって膵β細胞は脆弱になるが、膵β細胞のアポトーシスがどのように調節されているかは殆ど明らかにされていない。Aktの活性化はアポトーシスの抑制に重要な役割を果たしていることから、我々は、Aktの機能低下はWFS1遺伝子の変異と相まって膵β細胞のアポトーシスを促進すると考えている。そこで、Aktの活性調節を解明するために、Aktをbaitに用いたyeast two hybrid法によって約200kDaからなる新規の結合蛋白を同定した。また、このタンパクを過剰発現させると、成長因子の非刺激下におけるAktのリン酸化レベルを顕著に上昇させる作用が認められたことから、我々はこのタンパクをAPE(Akt Phosphorylation Enhancer)と名付けた。WortmanninやLY294002によってPI3-キナーゼを不活化するとAPEによるAktのリン酸化が認められないことから、APE自体がキナーゼ活性を有するのでは無く、結合することでAktをリン酸化されやすくするのか、または、Aktの脱リン酸化を抑制していることが示唆された。

siRNAを用いて、培養細胞のAPEの発現を抑制するとDNA合成が抑制されること、また、APEとAktを過剰発現させると、DNA replicationが引き起こされることから、APEは細胞増殖やcell cycleの調節に関与している事が示唆された。以上のことより、APEはAktを介したシグナル伝達の調節に重要な機能を有しており、膵β細胞においてもWFS1と協調して細胞の増殖やアポトーシスの抑制に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

インスリンの分泌不全をもたらす遺伝子異常としてはWFS1遺伝子の変異が重要である。一方、Akt/PKBはインスリンを含めた多くの成長因子、がん遺伝子産物等によって活性化され、アポトーシスの抑制や細胞増殖等の生命現象に関与している。そこで、WFS1遺伝子の変異による膵β細胞のアポトーシスに、Aktの活性化は拮抗するように働くと考えられる。しかし、Aktのリン酸化や活性化が、どのように調節されているかは、未だ不十分な理解に留まっている。

我々は、Aktをbaitに用いたyeast two hybrid法によって、Akt特異的に結合する全く新規のタンパクを見いだした。この蛋白は、Aktのリン酸化を顕著に亢進させることから、我々はAPE (Akt Phosphorylation Enhancer)と名付けた。また、その後、他のグループによってもAktの作用に重要であることが証明され、彼らはこの蛋白をGirdinと名付けている。APE/Girdinは、胎生初期から発現しており、脳を含む種々の臓器に発現しているが、癌化細胞では発現の増加している株が多く、マクロファージにも特に高い発現が認められる。そこで、我々は、APE/Girdinが種々の細胞現象や癌、動脈硬化、代謝などの病態にどのように関与しているかを明らかにしたいと考えている

B. C. 研究方法及び研究結果

我々は、Aktの活性や細胞内局在を調節する蛋白を同定する目的で、Aktをbaitにyeast two hybrid systemを用いることで、結合蛋白のクローニングを試みた。その結果、200kDaの新規タンパクの同定に成功した。このタンパクは、Human, mouse, rat, Canis familiaris (イヌ), Gallus gallus (ニワトリ), Pan troglodytes (チンパンジー)などにはhomologyを持つ遺

伝子が存在するが、Drosophila, Xenopus, C.elegans以下の生物にはAkt/PKBに結合する部分を含んだ遺伝子が存在しないことが、遺伝子検索の結果、明らかとなった。

そこで、このタンパクが実際にAktに結合することを確かめるために、それぞれを大腸菌に発現させ、精製タンパクによるin vitroの結合を検討した。また、マウスの精巢やHela細胞において、内因性に発現しているAktとのin vivoにおける結合を、免疫沈降によって、確認した。次に、結合に関与しているドメインを明らかにするため、それぞれのdeletion mutantを作成し、検討した。その結果、Aktとクローニングされた200kDaタンパクは、それぞれのC端側で結合していることが証明された。また、興味深いことに、この200kDaタンパクは、Aktに類似する他のキナーゼには結合しないことが示された。すなわち、このタンパクはAktの2つのアイソフォームのみに特異的に結合するようである。

次に、我々は、クローニングされた200kDaのタンパクを培養細胞に発現させ、Aktのリン酸化に与える影響を検討した。まず、HepG2細胞に発現させたところ、AktのT308及びS473のリン酸化が顕著に亢進することが認められた。このAktのリン酸化亢進は細胞の種類によらず認められ、また、Aktの下流に位置するGSK-3bおよびFKHR(Foxo1)のリン酸化も亢進していた。これらのことより、我々は、新規に同定されたこの200kDaタンパクを、Akt Phosphorylation Enhancer (APE)と名付けた。APEのマウスにおける発現は、ほぼすべての臓器において認められるが、特に精巢とマクロファージに多く発現していた。また、種々のヒトがん細胞株においては、約半数に高い発現が認められた。

逆に、SiRNAを用いて、内因性のAPEの発現量を低下さ

せ、Aktのリン酸化及び活性に対する影響を検討した。HepG2細胞にSiRNAを導入すると、APEの発現量を90%以上、減少させることが認められた。この条件で、AktのT308及びS473のリン酸化を検討したところ、インスリン非刺激時、刺激時共に明らかにリン酸化が抑制されていた。また、GSK3 fragmentを用いた、Aktのキナーゼ活性の測定によってもSiRNAによるAPEの発現量低下によって、Aktのキナーゼ活性が低下することが認められ、さらに細胞増殖も抑制された。すなわち、APEはAktに特異的に結合し、そのリン酸化と活性を亢進させる作用を有することが明らかとなった。

しかし、興味深いことにAPEは核内に豊富に存在し、実際、核内のAktのリン酸化も顕著に亢進させる。そこで、細胞周期に対する影響を検討した。その結果、APEとAktを同時に発現させると、Aktの高いリン酸化とキナーゼ活性が検出されるが、DNAの過剰複製が認められた。過剰複製はDNAの損傷を誘導することが知られており、これはATMやATRの活性化を誘導する。実際、これらの下流に位置するChk2のリン酸化が、APEとAktを過剰発現させた細胞に検出された。Chk2はp53を安定化させ、アポトーシスを誘導するが、我々は、APEとAktを過剰発現させた細胞でPARPの切断を検出しており、APEとAkt両者の発現量が増加した場合、アポトーシスを誘導する機序となる可能性が示唆された。過剰複製がどのような機序によって、引き起こされているかはチェックポイントに関わるタンパクへの影響を今後、検討していく予定である。

倫理面については、ヒト由来のサンプルを用いた研究はしていない。また、動物実験に関しては、東京大学の定める動物実験指針に基づき、当該施設の管理の下で行っており、本研究計画では、動物愛護上の問題は生じない。

D.E 考察および結論

以上の結果から、APEが細胞の増殖と、アポトーシスの抑制に関与する可能性が高い。しかし、細胞や臓器の種類によって異なる作用を呈している可能性も考えられる。また、癌細胞株には、APEの発現量が増加しているものが半数を占めていることや、SiRNAによる発現抑制で細胞の増殖が低下し、アポトーシスを起こしやすくなることは注目に値することである。

我々は、今後、培養細胞を用い過剰発現やSiRNAによるノックダウンのシステムによる検討に加え、 β 細胞特異的なノックアウトマウスを作成し、 β 細胞のアポトーシスにおけるWFS1タンパクとAPEの相互作用について、検討していきたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Nelson-Degrave, VL., Wickenheisser, JK., Hendricks, KL., Asano, T., Fujishiro, M., Legro, RS., Kimball, SR., Strauss, JF. 3rd, and McAllister, JM. Alterations in MEK and ERK Signaling in Theca Cells Contribute to Excessive Androgen Production in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Mol Endocrinol.* 19(2): 379-90, 2005
- Sasaoka, T., Fukui, K., Wada, T., Murakami, S., Kawahara, J., Ishihara, H., Funaki, M., Asano, T., and Kobayashi, M.

Inhibition of endogenous SHIP2 ameliorates insulin resistance caused by chronic insulin treatment in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia* 48(2): 336-44, 2005

- Abell, K., Bilancio, A., Clarkson, R.W.E., Tiffen, P.G., Altaparmakov, A., Burdon, T.G., Asano, T., Vanhaesebroeck, B., and Watson, C.J. Stat3 induced apoptosis requires a molecular switch in PI(3)K subunit composition. *Nat Cell Biol.* 7(4): 392-8, 2005
- Shojima, N., Ogihara, T., Inukai, K., Fujishiro, M., Sakoda, H., Kushiyama, A., Katagiri, H., Anai, M., Ono, H., Fukushima, Y., Horike, N., Viana, A., Uchijima, Y., Kurihara, H. and Asano, T. Serum concentrations of RELM β and α are elevated in high-fat diet fed and obese *db/db* mice, with increased productions in intestinal tract and bone marrow. *Diabetologia* 48(5): 984-92, 2005
- Anai, M., Shojima, N., Katagiri, H., Ogihara, T., Sakoda, H., Onishi, Y., Ono, H., Fujishiro, M., Fukushima, Y., Horike, N., Viana, A., Kikuchi, M., Noguchi, N., Takahashi, SI., Takata, K., Oka, Y., Uchijima, Y., Kurihara, H. and Asano, T. A novel PKB/AKT-binding protein enhanced PKB kinase activity and regulates DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 280(18): 18525-35, 2005
- Sakoda, H., Fujishiro, M., Shojima, N., Ogihara, T., Kushiyama, A., Fukushima, Y., Anai, M., Ono, H., Kikuchi, M., Horike, N., Viana, A., Uchijima, Y., Kurihara, H. and Asano, T. Glycogen debranching enzyme association with β -subunit enhances AMP-activated protein kinase activity *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(3): E474-81, 2005
- Igata, M., Motoshima, H., Tsuruzoe, K., Kojima, K., Matsumura, T., Kondo, T., Taguchi, T., Nakamura, K., Yano, M., Kukidome, D., Matsumoto, K., Toyonaga, T., Asano, T., Nishikaa, T., and Araki, E. Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Suppresses Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Through the Inhibition of Cell Cycle Progression. *Circulation Res.* 97(8): 837-44, 2005
- Kushiyama, A., Shojima, N., Ogihara, T., Inukai, K., Sakoda, H., Fujishiro, M., Fukushima, Y., Anai, M., Ono, H., Horike, N., Viana, A., Uchijima, Y., Nishiyama, K., Shimosawa, T., Fujita, T., Katagiri, H., Oka, Y., Kurihara, H. and Asano, T. Resistin like molecule β activates MAPKs, suppresses insulin signaling in hepatocytes and induces diabetes, hyperlipidemia and fatty liver in transgenic mice on a high-fat diet. *J. Biol. Chem.* 280(51): 42016-25, 2005
- Murakami, M., Tominaga, J., Makita, R., Kurihara, Y., Nakagawa, O., Asano, T. and Kurihara, H. Transcriptional activity of Pax3 is co-activated by TAZ. *Biochem Biophys Res Commun.* 339(2):533-539, 2006

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他(研究に関する新聞記事等)

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishigaki, Y., Katagiri, H., Yamada, T., Ogihara, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Ishihara, H., Shimosegawa, T., Sakoda, H., Asano, T., Oka, Y.	Dissipating excess energy stored in the liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity.	Diabetes.	54	322-332	2005
Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Ogihara, T., Uno, K., Hasegawa, Y., Ishihara, H., Sasano, H., Mizuguchi, H., Asano, T., Oka, Y.	Constitutively active PDX1 induced efficient insulin production in adult murine liver.	Biochem Biophys Res Commun.	326	402-9	2005
Pan J, Singh US, Takahashi T, Oka Y, Palm-Leis A, Herbelin BS, Baker KM.	PKC mediates cyclic stretch-induced cardiac hypertrophy through Rho family GTPases and mitogen-activated protein kinases in cardiomyocytes.	J Cell Physiol.	202	536-53	2005
Iwasaki N, Horikawa Y, Tsuchiya T, Kitamura Y, Takahiro Nakamura, Tanizawa Y, Oka Y, Hara K, Kadowaki T, Awata T, Honda M, Yamashita K, Oda N, Li Y, Yamada N, Ogata M, Kamatani N, Iwamoto Y, del Bosque-Plata L, Hayes MG, Cox NJ, Bell GI.	Genetic variants in the calpain-10 gene and the development of type 2 diabetes in the Japanese population.	J Hum Genet.	50	92 -98	2005
Marthinet E, Bloc A, Oka Y, Tanizawa Y, Wehrle-Haller B, Bancila V, Dubuis JM, Philippe J, Schwitzgebel VM.	Severe Congenital hyperinsulinism due to a mutation in the Kir6.2 Subunit of the KATP channel impairing trafficking and function.	J Clin Endocrinol Metab.	90	5401-5406	2005
Ueda K, Kawano J, Takeda K, Yujiri T, Tanabe K, Anno T, Akiyama M, Nozaki J, Yoshinaga T, Koizumi A, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y.	Endoplasmic reticulum stress induces Wfs1 gene expression in pancreatic beta-cells via transcriptional activation.	Eur J Endocrinol	153	167-176	2005
Satoh J, Takahashi K, Takizawa Y, Ishihara H, Hirai M, Katagiri H, Hinokio Y, Suzuki S, Tsuji I, Oka Y.	Secondary sulfonylurea failure: Comparison of period until insulin treatment between diabetic patients treated with gliclazide and glibenclamide.	Diabetes Res Clin Pract.	70	291-7	2005
Anai, M., Shojima, N., Katagiri, H., Ogihara, T., Sakoda, H., Onishi, Y., Ono, H., Fujishiro, M., Fukushima, Y., Horike, N., Viana, A., Kikuchi, M., Noguchi, N., Takahashi, S., Tanaka, K., Oka, Y., Uchijima, Y., Kurihara, H., Asano, T.	A novel protein kinase B (PKB)/AKT-binding protein enhances PKB kinase activity and regulates DNA synthesis.	J Biol Chem.	280	18525-35	2005

Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y, Yamada T, Yoshizumi S, Suzuki C, Satoh J, <u>Oka Y.</u>	WRN gene 1367 Arg allele protects against development of type 2 diabetes mellitus.	Diabetes Res Clin Pract.	69	287-92	2005
Kushiyaama, A., Shojima, N., Ogihara, T., Inukai, K., Sakoda, H., Fujishiro, M., Fukushima, Y., Anai, M., Ono, H., Horike, N., Vianna, AY., Uchijima, Y., Nishiyama, K., Shimosawa, T., Fujita, T., Katagiri, H., Oka, Y., Kurihara, H., Asano, T.	Resistin like molecule beta activates MAPKs, suppresses insulin signaling in hepatocytes and induces diabetes, hyperlipidemia and fatty liver in transgenic mice on a high-fat diet.	J. Biol. Chem.	280	42016-25	2005
Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, Nguyen LX, Allen JR, Oka Y, Urano F.	WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells.	J Biol Chem.	280	39609-15	2005
Shojima, N., Ogihara, T., Inukai, K., Fujishiro, M., Sakoda, H., Kushiyaama, A., Katagiri, H., Anai, M., Ono, H., Fukushima, Y., Horike, N., Viana, AY., Uchijima, Y., Kurihara, H., Asano T.	Serum concentrations of resistin-like molecules beta and gamma are elevated in high-fat-fed and obese db/db mice with increased production in the intestinal tract and bone marrow.	Diabetologia.	48	984-92	2005
Nelson-Degrave, VL., Wickenheisser, JK., Hendricks, KL., Asano, T., Fujishiro, M., Legro, RS., Kimball, SR., Strauss, JF. 3rd, and McAllister, JM.	Alterations in MEK and ERK Signaling in Theca Cells Contribute to Excessive Androgen Production in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS).	Mol Endocrinol.	19(2)	379-90	2005
Sasaoka, T., Fukui, K., Wada, T., Murakami, S., Kawahara, J., Ishihara, H., Funaki, M., Asano, T., and Kobayashi, M.	Inhibition of endogenous SHIP2 ameliorates insulin resistance caused by chronic insulin treatment in 3T3-L1 adipocytes.	Diabetologia	48(2)	336-44	2005
Abell, K., Bilancio, A., Clarkson, R.W.E., Tiffen, P.G., Altaparmakov, A., Burdon, T.G., Asano, T., Vanhaesebroek, B., and Watson, C.J.	Stat3 induced apoptosis requires a molecular switch in PI(3)K subunit composition.	Nat Cell Biol.	7(4)	392-8	2005
Sakoda, H., Fujishiro, M., Shojima, N., Ogihara, T., Kushiyaama, A., Fukushima, Y., Anai, M., Ono, H., Kikuchi, M., Horike, N., Viana, A., Uchijima, Y., Kurihara, H. and Asano, T.	Glycogen debranching enzyme association with β -subunit enhances AMP-activated protein kinase activity.	Am J Physiol Endocrinol Metab	289	E474-81	2005
Igata, M., Motoshima, H., Tsuruzoe, K., Kojima, K., Matsumura, T., Kondo, T., Taguchi, T., Nakamura, K., Yano, M., Kukidome, D., Matsumoto, K., Toyonaga, T., Asano, T., Nishikaa, T., and Araki, E.	Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Suppresses Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Through the Inhibition of Cell Cycle Progression.	Circulation Res.	97	837-44	2005
Nonogaki K, Ohashi-Nozue K, Oka Y.	A negative feedback system between brain serotonin systems and plasma active ghrelin levels in mice.	Biochem Biophys Res Commun.	341	703-707	2006

Takahashi, R., Ishihara, H., Tamura, A., Yamaguchi, S, Yamada, T., Takei, D., Katagiri, H., Endou, H., Oka Y.	Cell-type specific activation of metabolism reveals that beta-cell secretion suppresses glucagons release from alpha-cells in rat pancreatic islets.	Am J Physiol Endocrinol Metab.	290	E308-16	2006
Yamada, T., Katagiri, H., Ishigaki, Y., Ogihara, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Ishihara, H., Niijima A., Mano, H., Aburatani, H., Asano, T., Oka Y.	Signals from intra-abdominal fat modulate insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: Neuronal involvement in food intake regulation.	Cell Metab.	3	223-9	2006
Murakami, M., Tominaga, J., Makita, R., Kurihara, Y., Nakagawa, O., Asano, T. and Kurihara, H.	Transcriptional activity of Pax3 is co-activated by TAZ.	Biochem Biophys Res Commun.	339	533-539	2006
Yamada T, Ishihara H, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Tokita A, Satake C, Tashiro F, Katagiri H, Aburatani H, Miyazaki J-I, Oka Y.	WFS1-deficiency enhances endoplasmic reticulum stress, triggers apoptotic pathway and impairs cell cycle progression specifically in pancreatic β -cells.	Hum Mol Genet.		in press	2006
Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Taniguchi S, Umetsu M, Atsumi T, Wada N, Yoshioka N, Ono Y, Tanizawa Y, Koike T.	A novel mutation of WFS1 gene in a Japanese man of Wolfram syndrome with positive diabetes-related antibodies.	Diabetes Res Clin Pract.		in press	2006
Nakamori Y, Emoto M, Fukuda N, Taguchi A, Okuya S, Tajiri M, Miyagishi M, Taira K, Wada Y, Tanizawa Y.	Myosin motor Myo1c and its receptor NEMO/IKK-g promote TNF-a induced serine ³⁰⁷ phosphorylation of IRS-1.	J Cell Biol.		in press	2006
Muraki K, Okuya S, Tanizawa Y.	Estrogen receptor a regulates insulin sensitivity through IRS-1 tyrosine phosphorylation in mature 3T3-L1 adipocytes.	Endocrine J		in press	2006

Perspectives in Diabetes

Dissipating Excess Energy Stored in the Liver Is a Potential Treatment Strategy for Diabetes Associated With Obesity

Yasushi Ishigaki,¹ Hideki Katagiri,² Tetsuya Yamada,¹ Takehide Ogihara,² Junta Imai,^{1,2} Kenji Uno,^{1,2} Yutaka Hasegawa,^{1,2} Junhong Gao,^{1,2} Hisamitsu Ishihara,¹ Tooru Shimosegawa,³ Hideyuki Sakoda,⁴ Tomoichiro Asano,⁴ and Yoshitomo Oka¹

For examining whether dissipating excess energy in the liver is a possible therapeutic approach to high-fat diet-induced metabolic disorders, uncoupling protein-1 (UCP1) was expressed in murine liver using adenoviral vectors in mice with high-fat diet-induced diabetes and obesity, and in standard diet-fed lean mice. Once diabetes with obesity developed, hepatic UCP1 expression increased energy expenditure, decreased body weight, and reduced fat in the liver and adipose tissues, resulting in markedly improved insulin resistance and, thus, diabetes and dyslipidemia. Decreased expressions of enzymes for lipid synthesis and glucose production and activation of AMP-activated kinase in the liver seem to contribute to these improvements. Hepatic UCP1 expression also reversed high-fat diet-induced hyperphagia and hypothalamic leptin resistance, as well as insulin resistance in muscle. In contrast, intriguingly, in standard diet-fed lean mice, hepatic UCP1 expression did not significantly affect energy expenditure or hepatic ATP contents. Furthermore, no alterations in blood glucose levels, body weight, or adiposity were observed. These findings suggest that ectopic UCP1 in the liver dissipates surplus energy without affecting required energy and exerts minimal metabolic effects in lean mice. Thus, enhanced UCP expression in the liver is a new potential therapeutic target for the metabolic syndrome. *Diabetes* 54:322–332, 2005

From the ¹Division of Molecular Metabolism and Diabetes, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan; the ²Division of Advanced Therapeutics for Metabolic Diseases, Center for Translational and Advanced Animal Research, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan; the ³Division of Gastroenterology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan; and the ⁴Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Address correspondence and reprint requests to Hideki Katagiri, MD, PhD, Division of Advanced Therapeutics for Metabolic Diseases, Center for Translational and Advanced Animal Research, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan. E-mail: katagiri-tky@umin.ac.jp.

Received for publication 19 April 2004 and accepted in revised form 13 October 2004.

Y.I., H.K., and T.Y. contributed equally to this work.

ACC1, acetyl-CoA carboxylase 1; AMPK, AMP-activated protein kinase; CPT1, carnitine palmitoyltransferase 1; IRS1, insulin receptor substrate 1; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SREBP, sterol regulatory element binding protein; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; UCP, uncoupling protein.

© 2005 by the American Diabetes Association.

An explosive increase in the number of diabetic patients, which has become a major public health concern in most industrialized countries in recent decades (1), is mainly the result of excess energy intake and physical inactivity. When food intake chronically exceeds metabolic needs, efficient metabolism causes excess energy storage and results in obesity, a common condition associated with diabetes, hyperlipidemia, and premature heart disease. Excess energy in cells lowers the response to insulin, namely insulin resistance. However, the major treatment modalities for diabetes, including insulin injection and oral sulfonylureas, aim at lowering blood glucose levels by driving glucose into cells in peripheral tissues such as muscle and fat. This further exacerbates insulin resistance when energy intake is in excess, resulting in a vicious cycle. Therefore, novel therapies that promote increased energy expenditure are needed.

Inefficient metabolism, such as the generation of heat instead of ATP, is a potential treatment strategy for type 2 diabetes associated with obesity. Uncoupling proteins (UCPs) were discovered members of the mitochondrial inner membrane carrier family. These proteins leak protons into the mitochondrial matrix, dissipating energy as heat rather than allowing it to be captured in ATP (2). UCP1 (thermogenin) was originally identified in brown adipose tissue and demonstrated to mediate nonshivering thermogenesis. UCP1 plays an important role in mediating cold exposure-induced thermogenesis (3) and is also a likely regulator of diet-induced thermogenesis (4).

Several laboratories have reported overexpression of UCPs, using the transgenic approach, in mice (5–8). These reports indicate that overexpression of UCPs in white adipose tissue and skeletal muscle has preventive effects on development of genetic and dietary obesity and the resultant insulin resistance. However, it is still unclear whether ectopic UCP1 expression exerts therapeutic effects after the development of diabetes associated with obesity.

The liver is one of the major metabolic organs involved in glucose and lipid metabolism and insulin action. In addition, the liver can store and release abundant fat