

200807018A

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノムテラード研究事業

小胞体ストレスによるインスリン分泌障害と糖尿病治療法開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡 芳知

平成21(2009)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

- 小胞体ストレスによるインスリン分泌障害と糖尿病治療法開発に関する研究----- 1
岡 芳知

II. 分担研究報告

1. 膵β細胞保持機構からの治療法開発に関する研究 ----- 6
片桐 秀樹
2. 遺伝子解析・ウオルフラム症候群の治療法開発に関する研究 ----- 10
谷澤 幸生
3. 小胞体ストレス関連遺伝子の機能解析と結合蛋白同定に関する研究 ----- 14
浅野 知一郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 16

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 19

小胞体ストレスによるインスリン分泌障害と糖尿病治療法開発に関する研究
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

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細胞負荷状況下で膵β細胞は小胞体ストレスによるアポトーシスに陥ることから、2型糖尿病の発症機序として、小胞体ストレスによる膵β細胞の減少が注目される。そこで本研究では、膵β細胞を保持・増加させる新規治療法の開発、および、膵β細胞が減少しやすい易糖尿病発症者の簡易抽出システム(SNPパネル)の開発とその患者応用を目的とし、以下のような成果をあげた。

膵β細胞を保護する創薬ターゲット:翻訳抑制因子4EBP1は慢性小胞体ストレス下での膵β細胞保護分子

*wfs1*欠損マウスの膵β細胞では、翻訳抑制因子4E-BP1の発現が著増しており、慢性小胞体ストレス下で誘導される転写因子ATF4の制御下にあることを見出した。4E-BP1がないと膵β細胞は小胞体ストレス下での生存能が低下する。*wfs1*欠損マウスあるいはAkitaマウスでさらに4E-BP1を欠損させると、β細胞の減少がさらに促進され血糖も悪化した。以上より、4E-BP1は、慢性の小胞体ストレス下で発現が誘導され、膵β細胞のオーバーワークを防ぎ、膵β細胞を保護していることを世界で初めて見出した (Yamaguchi S, Oka Y et al. Cell Metabolism 2008)。

ウォルフラム症候群モデルマウスの膵β細胞アポトーシスを防ぐ治療法開発

*wfs1*欠損agoutiマウスでの高脂肪食下でのβ細胞アポトーシスはインスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾンの投与により回避され、糖尿病発症はほぼ完全に抑制された (Akiyama M, Oka Y, Tanizawa Y et al. Diabetologia 2009)。

臓器間代謝情報ネットワークによる膵β細胞増殖:斬新な糖尿病治療法の発見

マウス肝臓のERK (extracellular signal regulated kinase) 経路を刺激すると、自律神経を使って、肝臓-脳-ラ氏島と代謝情報をリレーして膵β細胞が増殖するという画期的な新発見をした。膵β細胞が減少したために高血糖になったマウスの肝臓でERK経路を刺激すると、このネットワークを使って膵β細胞が増殖して血糖値が100にまで正常化した。これは体に内在する恒常性維持機構のひとつと考えられ、糖尿病治療だけではなく、従来とはまったく異なった斬新な再生治療への道を拓くものとして世界で注目されている (Imai J, Katagiri H, Oka Y et al. Science 2008)。

易糖尿病発症者簡易抽出システムの確立への糖尿病関連遺伝子SNPの検出

35歳以下発症2型糖尿病患者100例、スーパーノーマル100例でゲノムワイド34万箇所のSNP解析を行い、さらに一般の2型糖尿病患者1000例と健康者1000例において解析を進めた。ウォルフラム症候群原因遺伝子*wfs1*が日本人でも2型糖尿病の発症関連遺伝子であることを証明したほか、アポトーシスと関わる遺伝子が2型糖尿病、特に発症が若い2型糖尿病と関わることを見出しており、さらに解析を続けている。

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

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

A. 研究目的

糖尿病は増え続けている。糖尿病は年余の末に血管合併症をきたす。網膜症による失明は年間3000人以上、腎症のための新規2型血液透析導入は年間13,500人以上となり、血液透析だけでも年間 600万円×13,500人＝810億円の医療費の増加となる。糖尿病の予防と優れた

治療法開発は国民の健康・医療における緊急の課題である。

2型糖尿病患者での膵β細胞数の減少は今や世界で広く認識されることとなった。我々は2型糖尿病患者でみられるβ細胞量の減少メカニズムを明らかにし、その予防法や治療法を開発することを目的として、小胞体ストレスによるβ細胞量減少のためのインスリン分泌不全による糖尿病をきたす Wolfram 症候群をモデルとして研究を行ってきた。本研究では、この膵β細胞の生存・増殖機構とストレス応答とくに小胞体ストレスに焦点をあて、膵β細胞の減少をきたしやすい易糖尿病発症者の簡易抽出システムの開発および膵β細胞を増加させる新規治療法の開発を目的とする。

B. 研究方法

1) 膵β細胞の小胞体ストレス応答機構の解明から創薬ターゲットを見出す

小胞体ストレス下の膵β細胞では翻訳抑制因子 eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein (4E-BPs)のアイソフォームである4E-BP1のタンパク量が著増していることを平成19前年度に見出したので、この発現上昇の機構を明らかにする。すなわち、翻訳抑制因子4E-BP1の発現を制御している転写因子があるはずで、その同定と制御の分子機構を解明する。さらに、4E-BP1についての第1人者であるカナダ、Sonenberg教授との共同研究を進め、4E-BP1KOマウスも用いて4E-BP1が膵β細胞へどのような効果を及ぼすかを明らかにする。4E-BP1の創薬ターゲットとしての可能性に着目する。また、遊離脂肪酸 palmitate とグルコースにより glucolipotoxicity を惹起して、その際のインスリンシグナル、小胞体ストレス応答を解析し、膵β細胞を保護する薬剤ターゲットを見出す。

2) ウォルフラム症候群モデルマウスを用いた治療法開発

ウォルフラム症候群モデルマウスであるWFS1欠損マウスに肥満の遺伝子を加えた*wfs1*欠損yellow agoutiマウスを作成し、膵β細胞保護が報告されている糖尿病治療薬ピオグリタゾンと投与し、高脂肪食下での血糖、インスリン、小胞体ストレス応答などを検討する。

3) 臓器間代謝情報ネットワーク機構を用いた治療

我々が見出した自律神経を介した臓器間ネットワークに基づき、アデノウィルスを用いてマウスの肝臓のERK (extracellular signal regulated kinase)経路を活性化し、膵β細胞を増殖させ糖尿病の治療を試みる。

4) 易糖尿病発症者簡易抽出システムの確立のための候補遺伝子とそのSNP同定

小胞体ストレスに対し遺伝的脆弱性を有するものは若年で糖尿病を発症する可能性が高い。そこで、一般の糖尿病よりも遺伝因子が濃厚な35歳以下発症2型糖尿病患者を臨床データも含めて100例収集し、34万SNPsを解析する。そこで候補となる遺伝子SNPについては、さらに1000例の糖尿病患者で解析する。

倫理面への配慮

本研究の中のヒト遺伝子解析研究は、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コンセントのもとに取得され、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

慢性小胞体ストレス下では転写因子ATF4によって4EBP1が誘導され膵β細胞のオーバーワークを防ぐ

*wfs1*欠損マウスの膵β細胞では、翻訳抑制因子4E-BP1の発現が著増しており、4E-BP1遺伝子に転写因子ATF4認識部位が2箇所あり、4E-BP1発現がATF4の制御下にあることを見出した。4E-BP1がない膵β細胞は小胞体ストレス下での生存能が低下しており、特にアポトーシスを誘導するCHOPの発現が小胞体ストレス暴露の後期に増加していることが一因と考えられた。さらに、*wfs1*欠損マウスあるいはAkitaマウスと4E-BP1欠損マウスを交配すると、β細胞の減少がさらに促進され血糖も悪化した。以上より、4E-BP1は、慢性の小胞体ストレス下で発現が誘導され、膵β細胞のオーバーワークを防ぎ、膵β細胞を保護していることを世界で初めて見出した(Yamaguchi S, Oka Y et al. Cell Metabolism 2008)。

なお、glucolipotoxicity 機構については、グルコースと palmitate が小胞体ストレスを惹起し、転写因子 ATF3 の活性化、インスリンシグナルの重要分子 IRS2 の発現低下を介して膵β細胞の減少させていることを明らかにした。さらに、平成19年度に見出した Pin1 については、IRS-1との結合部位を解明し Pin1 がインスリンシグナルを亢進させβ細胞の増殖に関与していると考えられた。

ウォルフラム症候群モデルマウスの膵β細胞アポトーシスを防ぐ

インスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾンの投与により、*wfs1*欠損agoutiマウスでの高脂肪食下でのβ細胞アポトーシスが回避され、糖尿病発症はほぼ完全に抑制された。興味あることに、高脂肪食下での小胞体ストレス応答は減少しておらず、膵β細胞の生存はピオグリタゾンのβ細胞への直接保護効果ではないかと推測された(Akiyama M, Oka Y, Tanizawa Y et al. Diabetologia 2009)。

臓器間代謝情報ネットワークによる膵β細胞増殖:斬新な糖尿病治療法の発見

肝へ活性型MEK遺伝子を導入してインスリンシグナル経路のひとつであるERK経路を活性化することにより、糖に対する反応性のインスリンの分泌の著明な亢進が認められた。さらに、膵におけるBrdU染色により、膵β細胞に選択的な著明な増殖が認められた。このことから、肝でのERK経路の活性化により、なんらかの臓器間連関を介して、膵β細胞機能の亢進、増殖が起こるものと考えられた。そこで、この肝-膵間の情報連絡を解明するため、神経切断実験や薬理的遮断実験、中脳切断実験などを行い、肝からの代謝情報を内臓神経求心路が中枢神経に伝え、中枢神経で情報を統合し次に迷走神経遠心路を介して膵β細胞に伝えられる全く新しい神経ネットワーク機構を解明した。さらに、肥満モデルマウスを用い、肝への抑制型MEK遺伝子導入、内臓神経求心路の薬理的遮断、さらには、迷走神経の切断を行ったところ、肥満

の神経ネットワーク機構が実際に肥満の際の膵β細胞増殖に関与していることが証明された。つまり、この機構は、臓器間相互作用を用いて膵β細胞を増殖させるという、「体に内在する糖尿病予防システム」であると考えられた。そこで、この機構を活性化することにより、糖尿病の治療につなげることができるかを検討した。STZによる薬剤性膵β細胞の減少モデルと小胞体ストレスによる膵β細胞疲弊減少モデル(Akitaマウス)を用いて、肝へ活性化型MEK1遺伝子導入を行った。いずれのモデルにおいても、膵β細胞の増殖に伴うインスリン分泌の増加により、糖尿病が改善する効果が認められ、この血糖改善効果は長期持続した。これは、疲弊した膵β細胞であっても、神経系による臓器間相互作用を利用することで、再生・再活性化させることができることを示唆するものであり、過栄養時代の糖尿病の治療につながるものと考えられる (Imai J, Katagiri H, Oka Y et al. Science 2008)。

易糖尿病発症者簡易抽出システムの確立への糖尿病関連遺伝子SNPの検出

35歳以下発症2型糖尿病患者100例、スーパーノーマル100例でゲノムワイド34万箇所のSNP解析を行い、有力SNPについては、さらに収集した一般の2型糖尿病患者1000例と健常者1000例において、(株)ヒュービッドジェノミクスに委託してSNPs解析を進めた。ウオルフラム症候群原因遺伝子 $wfs1$ が日本人でも2型糖尿病の発症関連遺伝子であることを見出したほか、アポトーシスと関わる有力遺伝子が2型糖尿病、とくに発症が若い2型糖尿病と関わることを見出しており、さらに解析を続けている。

D.E. 考察および結論

なぜ糖尿病は増加しているのか。現代の飽食と運動不足はインスリン分泌を強要する。この環境下で膵βの小胞体ストレスが過大となると細胞はアポトーシスに陥る。このβ細胞数減少に着目することが、最近の糖尿病増加を解く鍵であり、新規治療法につながると思われる。

2008年度の研究で、翻訳抑制因子4EBP1が転写因子ATF4の制御によって慢性小胞体ストレス下での膵βに陥り、糖尿病を惹起する。小胞体ストレス下でも膵β細胞数を保持(増加)できる、従来の薬剤にはない全く新しい糖尿病治療薬のターゲットであり、さらに研究を進めている。

易糖尿病発症者のSNPの同定は、易糖尿病発症者を判別できるSNPパネルを確立し、肥満と運動不足(=β細胞の負荷増加)が糖尿病をきたしやすい体質者を簡易に抽出するシステムを開発につながる。

また、我々は神経系による臓器間ネットワークにより、各臓器の代謝が調節されていることを2006年に発見したが、本年度はこの機構を利用して肝臓刺激により膵β細胞を増加させることができるという、きわめて斬新な糖尿病治療法を見出し世界の注目を浴びている (Science 2008)。どのような分子が肝臓で自律神経末端を刺激して

いるのか、あるいは自律神経末端が膵β細胞に向かっているのか、あるいは自律神経末端が膵β細胞に向かっているのか、治療薬開発に直接につながる重要な課題であり、製薬企業とともに精力的に研究を進めている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yamada T, Oka Y, Katagiri H. Inter-organ metabolic communication involved in energy homeostasis: potential therapeutic targets for obesity and metabolic syndrome. *Pharmacol Ther.* 117(1): 188-98, 2008
- Yamaguchi S, Ishihara H, Yamada T, Tamura A, Usui M, Tominaga R, Munakata Y, Satake C, Katagiri H, Tashiro F, Aburatani H, Tsukiyama-Kohara K, Miyazaki J, Sonenberg N, Oka Y. ATF4-mediated induction of 4E-BP1 contributes to pancreatic β cell survival under endoplasmic reticulum stress. *Cell Metabolism* 7(3): 269-76, 2008
- Kato T, Ishiwata M, Yamada K, Kasahara T, Kakiuchi C, Iwamoto K, Kawamura K, Ishihara H, Oka Y. Behavioral and gene expression analyses of WFS1 knockout mice as a possible animal model of mood disorder. *Neuroscience Research* 61(2): 143-158, 2008
- Horikawa Y, Miyake K, Yasuda K, Enya M, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Yamamoto K, Tokunaga K, Takeda J, Kasuga M. Replication of genome-wide association studies of type 2 diabetes susceptibility in Japan. *J Clin Endocrinol Metab.* 93(8): 3136-41. Epub 2008
- Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Mori H, Jonsson A, Sato Y, Yamagata K, Hinokio Y, Wang HY, Tanahashi T, Nakamura N, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Takeda J, Maeda E, Shin HD, Cho YM, Park KS, Lee HK, Ng MC, Ma RC, So WY, Chan JC, Lyssenko V, Tuomi T, Nilsson P, Groop L, Kamatani N, Sekine A, Nakamura Y, Yamamoto K, Yoshida T, Tokunaga K, Itakura M, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics* 40(9): 1092-1097, 2008
- Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Suzuki T, Kudo H, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko

K, Ishihara H, Nijima A, Nakazato M, Asano T, Minokoshi Y, Oka Y. Regulation of pancreatic β cell mass by neuronal signals from the liver. Science 322(5905): 1250-1254, 2008

2. 学会発表

第14回日本糖尿病眼学会総会 3月15日 東京

- 糖尿病の最新の診療と今後の課題
岡 芳知

第81回日本内分泌学会学術総会 5月16日-18日 青森

- 膵 β 細胞小胞体ストレス応答における翻訳抑制因子4E-BP1役割
石原 寿光、山口 賢、山田 高弘、佐竹 千尋、薄井 正寛、富永 竜、岡 芳知

第51回日本糖尿病学会年次学術集会 5月22日-24日 東京

- ハーゲドーン賞(受賞講演) 2型糖尿病の統合的理解に向けた分子機構の解析
岡 芳知
- 膵 β 細胞量の調節における mRNA 翻訳制御の役割
石原 寿光、山口 賢、岡 芳知
- 肝からの神経を介した臓器間ネットワークとメタボリックシンドローム
宇野 健司、山田 哲也、岡 芳知、片桐 秀樹
- 動脈硬化発症・進展における小胞体ストレス応答の役割
高 俊弘、片桐 秀樹、石垣 泰、石原 寿光、山田 哲也、荻原 健英、今井 淳太、宇野 健司、長谷川 豊、金子 慶三、鈴木 俊伸、齊藤 徳郎、工藤 宏仁、突田 壮平、檜尾 好徳、森 正敬、岡 芳知
- 膵 β 細胞における小胞体ストレス応答と酸化ストレス応答の特徴
富永 竜、石原 寿光、丹治 泰裕、薄井 正寛、佐竹 千尋、山口 賢、檜尾 好徳、片桐 秀樹、岡 芳知
- 翻訳抑制因子 4E-BP1 は小胞体ストレス応答転写因子 ATF4 の直接ターゲットである
佐竹 千尋、石原 寿光、丹治 泰裕、薄井 正寛、富永 竜、山口 賢、檜尾 好徳、片桐 秀樹、岡 芳知
- 翻訳抑制因子 4E-BP1 は、慢性的な小胞体ストレス下の膵 β 細胞において、翻訳抑制を介して細胞を保護する
山口 賢、石原 寿光、佐竹 千尋、薄井 正寛、富永 竜、丹治 泰裕、鈴木 千登世、檜尾 好徳、片桐 秀樹、岡 芳知
- インスリン抵抗性における CHOP の役割の検討
石垣 泰、片桐 秀樹、高 俊弘、石原 寿光、山田 哲也、荻原 健英、今井 淳太、宇野 健司、長谷川

豊、金子 慶三、鈴木 俊伸、齊藤 徳郎、工藤 宏仁、突田 壮平、檜尾 好徳、森 正敬、岡 芳知

- 肝臓での IL-6 過剰発現による膵 β 細胞における糖反応性インスリン分泌促進
鈴木 俊伸、片桐 秀樹、今井 淳太、荻原 健英、石垣 泰、山田 哲也、宇野 健司、長谷川 豊、高俊弘、金子 慶三、齊藤 徳郎、工藤 宏仁、突田 壮平、石原 寿光、檜尾 好徳、岡 芳知

第44回日本肝臓学会総会 6月5日-6日 愛媛

- 神経系による臓器間代謝情報ネットワークの発見;特に肝からの自律神経シグナル
岡 芳知

第1回日本肥満症治療学会総会 6月14日-15日 東京

- メタボリックシンドロームとインスリン抵抗性の機序とその治療
岡 芳知

第5回内分泌研究会 10月11日 名古屋

- 肝臓における ERK 経路活性化は膵島再生を促進する
今井 淳太、片桐 秀樹、岡 芳知

第46回日本糖尿病学会中国四国地方会 11月14日 宇部

- 自律神経系による代謝情報ネットワークの発見 -膵 β 細胞もふやせるか
岡 芳知

第7回仙台糖尿病フォーラム 11月22日 仙台

- 膵 β 細胞での小胞体ストレス下における翻訳抑制因子 4E-BP1 の役割
山口 賢、石原 寿光、佐竹 千尋、薄井 正寛、富永 竜、丹治 泰裕、近藤 敬一、鈴木 千登世、檜尾 好徳、片桐 秀樹、岡 芳知

第2回東北大学大学院リトリート発表会 12月6日 仙台

- 神経系による代謝情報ネットワークの発見 - Metabolic Information Highway -
岡 芳知

第7回メタボリック症候群(生活習慣病)研究会 12月6日 京都

- 肝臓における ERK 経路活性化は膵島再生を促進する
今井 淳太、片桐 秀樹、岡 芳知

第20回分子糖尿病学シンポジウム 12月13日 東京

- 膵 β 細胞ストレス応答における翻訳制御の役割

山口 賢、石原 寿光、佐竹 千尋、薄井 正
寛、冨永 竜、丹治 泰裕、近藤 敬一、岡 芳
知

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

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

- Method For Enhancing Pancreatic Beta Cell Proliferation, Increasing Serum Insulin Concentration, Decreasing Blood Glucose Concentration And Treating And/Or Preventing Diabetes.

片桐 秀樹、岡 芳知、今井 淳太

PCT12/165,859

2008年7月1日 米国

膵β細胞保持機構からの治療法開発に関する研究
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

肥満者ではインスリン抵抗性が生じるが、その状況ですぐに糖尿病を発症することはまれで、多くの場合、インスリン抵抗性に対抗してインスリン分泌が増強される。中長期的には、膵β細胞が増殖することにより、インスリン過分泌状況が継続し、糖尿病の発症を防ぐ。このような、血糖上昇が起こる前にインスリン分泌亢進、膵β細胞増殖が起こるメカニズムについては、まったく不明であった。我々は、この機構について研究を進め、肝臓で肥満状況を感じし膵β細胞へ伝達される内臓神経求心路—中枢神経—迷走神経遠心路という全く新しい神経ネットワーク機構を解明し、この機構が、肥満の際の膵β細胞からのインスリン分泌の亢進と膵β細胞増殖に寄与していることを証明した。

そこで、この内在するインスリン分泌促進・膵β細胞増殖機構を刺激することで、糖尿病の治療につなげることができるかを検討した。2型糖尿病でも、酸化ストレスや小胞体ストレスなどにより、膵β細胞の数が減少していること、さらに、このことが血糖値の上昇につながっているという報告が続いている。そこで、酸化ストレスや小胞体ストレスによる2つの膵β細胞疲弊・減少のマウスモデルを用い、上記神経を介する臓器間作用を活性化したところ、膵β細胞を増殖、インスリン分泌を増加させて、糖尿病を改善させることができることを証明した。このことから、疲弊したあとの膵β細胞であっても、臓器間作用を用いることで、増殖・活性化させることができることを示した。このことは、1型糖尿病のみならず、2型糖尿病に対しても、神経系活性化による臓器間相互作用により糖尿病を治療できること意味し、全く新しい概念での再生治療につながる成果であると考えられる。

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が、それに応じ、血糖値を維持するために、膵β細胞はインスリンの分泌量を増加させる。この代償機構が十分に働けば、糖尿病の発症は予防できる。しかし、このような血糖が上昇する前にインスリン分泌が亢進・膵β細胞が増殖するメカニズムは不明であった。

一方で、膵β細胞でのインスリン過分泌自体、インスリン蛋白の過度の生合成などによる膵β細胞内での小胞体ストレスの増加を引き起こす。小胞体ストレスに対する応答については、最近解明が進みつつあるが、過度の小胞体ストレスが長期にわたり持続すると、細胞自体をアポトーシスする機序が働くようになり、膵β細胞が減少することになる。これがさらに残った膵β細胞への負担増加となり、膵β細胞の数の減少とそれに伴うインスリン分泌低下を引き起こし、糖尿病発症につながるものと考えられている。さらに、肥満症自体に基づく酸化ストレスの亢進も膵β細胞のアポトーシス・減少につながることも想定されている。このような状況を膵β細胞の「疲弊」と呼び、ヒトの病態において、1型糖尿病のみならず2型糖尿病においても、膵β細胞の数が減少していることが次々と報告されている。

そこで我々は、インスリン抵抗性の際に膵β細胞の機能亢進・膵β細胞増殖につながるメカニズムの解明を目指して以下の研究を行い、これに関わる臓器間相互作用を解明した。この機構を応用することは、疲弊した膵β細胞を増殖させ、全く新しい概念による糖尿病の再生治療の開発へつながるものと考えられる。

B. 研究方法

1. モデルマウスを用い、アデノウィルスを用いて一つの臓器に遺伝子導入を行い、その臓器で選択的に後天的に急性に代謝を変化させる。その結果、全身の糖・エネルギー代謝や他臓器・組織での代謝状態を検討する。具体的には、アデノウィルスを静注し、肝臓選択的に、肥満・脂肪肝の際に発現誘導あるいはシグナル増強されている分子を発現させる。本年度は、肝でのERK経路を活性化させるために、活性型のMEK遺伝子を導入した。また、その意義を確認するため、肝ERK経路が活性化している肥満糖尿病モデルマウスの肝に抑制型MEK1遺伝子を導入した。食事量・体重・酸素消費量・血圧・糖負荷試験（含インスリン分泌の検討）・インスリン負荷試験・グルコースクランプ・各組織での遺伝子発現、膵でのインスリン含量や膵β細胞の数、膵における細胞増殖（BrdU染色）などを検討することにより、膵β細胞からのインスリン分泌に及ぼす影響を検討する。さら

に、神経切断などの操作を行い、他臓器への代謝効果に及ぼす影響を検討することで、この遠隔効果の機序を解明する。

また、膵β細胞の「疲弊」の状況をmimicしたによる酸化ストレス(ストレプトゾトシン(STZ)投与)による膵β細胞減少モデルと小胞体ストレスによる膵β細胞減少モデル(Akitaマウス)に活性型のMEK遺伝子を導入を行い、膵β細胞の増殖や糖尿病に及ぼす影響を検討する。

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。また、遺伝子組み換え実験については、カルタヘナ法および東北大学における内規に基づいて実施し、東北大学遺伝子組み換え実験安全専門委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

肝へ活性型MEK遺伝子を導入することにより、糖に対する反応性のインスリンの分泌の著明な亢進が認められた。さらに、非常に興味深いことに、膵におけるBrdU染色により、膵β細胞においてきわめて選択的な増殖を認めた。このことから、肝でのERK経路の活性化により、なんらかの臓器間連関を介して、膵β細胞機能の亢進、増殖が起こるものと考えられた。そこで、この肝-膵間の情報連絡を解明するため、神経切断実験や薬理的遮断実験、中脳切断実験などを行い、肝からの代謝情報を内臓神経求心路が中枢神経に伝え、中枢神経においては、その情報処理に上位中枢が関与し、迷走神経遠心路を介して膵β細胞に伝えられる全く新しい神経ネットワーク機構を解明した。

さらに、肥満モデルマウスを用い、肝への抑制型MEK遺伝子導入、内臓神経求心路の薬理的遮断、さらには、迷走神経の切断を行ったところ、肥満の際に生ずる膵β細胞の増殖が阻害されたことから、この神経ネットワーク機構が実際に肥満の際の膵β細胞増殖に関与していることが証明された。つまり、この機構は、臓器間相互作用を用いて膵β細胞を増殖させるという、「体に内在する糖尿病予防システム」であると考えられる(Science 2008)。

そこで、この機構を活性化することにより、糖尿病の治療につなげることができるかを検討することとした。最近、1型糖尿病のみならず、2型糖尿病においても、膵β細胞の量の減少が報告され注目されている。その機構には、酸化ストレスや小胞体ストレスが関与していると考えられている。そこで、酸化ストレスや小胞体ストレスによる2種類の膵β細胞の疲弊・減少モデルマウスを用いて、同様の実験を行った。STZによる薬剤性膵β細胞の減少モデル(極端な膵β細胞をもちたすことから1型糖尿病モデルと考えられているが、酸化ストレス誘導による膵β細胞減

少なので、疲弊膵β細胞モデルとも考える)と小胞体ストレスによる膵β細胞疲弊減少モデル(Akitaマウス)を用いて、肝へ活性型MEK1遺伝子導入を行った。いずれのモデルにおいても、膵β細胞の増殖に伴うインスリン分泌の増加により、糖尿病が改善する効果が認められ、この血糖改善効果は長期持続した。これらの結果は、疲弊した膵β細胞であっても、神経系による臓器間相互作用を利用することで、再生・再活性化させることができることを示唆するものであり、過栄養時代の糖尿病の治療につながるものと考えられる。さらに、これは、ES細胞やiPS細胞などからのin vitroでの分化誘導が主流となっている再生治療の分野に、体内に備わった機構を利用して体内で自分の細胞を再生させるという全く新しい概念を示したもので、新たな再生治療の発展に寄与する可能性が期待される(Science 2008)。

D.E. 考察および結論

我々は、これまでの研究で、自律神経系が臓器間の代謝情報のやり取りに大いにかかわり、その調節の一翼を担っていること、また、これがメタボリックシンドロームの病態に深くかかわっていること、さらにこの機構をmodulateすることで、肥満・糖尿病を改善させることができることを示してきた。本研究も、それをさらに進め、インスリン分泌に基づく糖代謝の調節という重要なシステムに神経ネットワークによる臓器間相互作用が関与し、過栄養時の糖尿病発症を予防する機構として働いていることを証明した。さらにこの機構を利用することで、新たな視点からの膵β細胞再生治療につながることを示した。さらにこれらのシステムの解明を進め、肥満・糖尿病治療法の開発・実践につなげていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Yamada T, Oka Y, Katagiri H. (2008) Inter-organ metabolic communication involved in energy homeostasis: potential therapeutic targets for obesity and metabolic syndrome. *Pharmacol Ther.* 117(1):188-198.
- Okimoto H, Ishigaki Y, Koïwa Y, Hinikio Y, Ogihara T, Suzuki S, Katagiri H, Ohkubo T, Hasegawa H, Kanai H, Oka Y. (2008) A novel method for evaluating human carotid artery elasticity: possible detection of early stage atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 196 391-7.
- Yamaguchi S, Ishihara H, Yamada T, Tamura A, Usui M, Tominaga R, Munakata Y, Satake C, Katagiri H, Tashiro F, Aburatani H, Tsukiyama-Kohara K, Miyazaki J, Sonenberg N, Oka Y (2008) ATF4-Mediated Induction of 4E-BP1 Contributes to Pancreatic Beta Cell Survival under Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Metab.* 7: 269-76.

- Nedachi T, Kadotani A, Ariga M, **Katagiri H**, Kanzaki M (2008) Ambient Glucose Levels Qualify the Potency of Insulin Myogenic Actions by Regulating SIRT1 and FoxO3a in C2C12 myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 294: E668-78.
 - Ariga M, Nedachi T, **Katagiri H**, Kanzaki M (2008) Functional role of sortilin in myogenesis and development of insulin-responsive glucose transport system in C2C12 myocytes. *J Biol Chem* 283: 10208-20.
 - Ishigaki Y, **Katagiri H**, Gao J, Yamada T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Kaneko K, Ogihara T, Ishihara H, Sato Y, Takikawa K, Nishimichi N, Matsuda H, Sawamura T, Oka Y (2008) Impact of Plasma Oxidized LDL Removal on Atherosclerosis. *Circulation* 118: 75-83.
 - Imai J, **Katagiri H**, Yamada Y, Ishigaki Y, Suzuki T, Kudo H, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Ishihara H, Nijima A, Nakazato M, Asano T, Minokoshi Y, Oka Y (2008) Regulation of Pancreatic β cell Mass by Neuronal Signals from the Liver. *Science* 322: 1250-4.
 - Ikegami Y, Inukai K, Imai K, Sakamoto Y, **Katagiri H**, Kurihara S, Awata T, Katayama S. (2009) Adiponectin up-regulates Ferritin Heavy Chain in skeletal muscle cells. *Diabetes* 58: 61-70.
2. 学会発表(シンポジウムなど)
- **片桐秀樹** シンポジウム 自律神経による臓器間代謝情報ネットワークとメタボリックシンドローム 日本内分泌学会学術総会 2008年5月16-18日 青森
 - 宇野健司 **片桐秀樹** シンポジウム 肝からの神経による臓器間ネットワークとメタボリックシンドローム 第51回日本糖尿病学会2008年5月22-24日 東京
 - **片桐秀樹** シンポジウム 脂肪組織からの求心性神経シグナルによる食欲調節機構 第50回歯科基礎医学会学術大会・総会 2008年9月23-25日 東京
 - **片桐秀樹** シンポジウム Metabolic Information Highway ~自律神経による糖・エネルギー代謝の協調的調節機構~ 千里ライフサイエンスセミナー 2008年10月3日 大阪
 - 宇野健司, 山田哲也, 岡芳知, **片桐秀樹** シンポジウム 肥満症における肝臓の病態的意義 S7-1肝からの神経を介した臓器間ネットワークとメタボリックシンドローム 第29回日本肥満学会 2008年10月17-18日 大分
 - **片桐秀樹** Metabolic Information Highway ~自律神経による臓器間の協調的代謝調節機構~ 第5回「骨と関節の代謝調節を考える基礎の会」 2008年10月19日 かずさ
 - **片桐秀樹** シンポジウム 自律神経による臓器間代謝情報ネットワーク 徳島大学疾患酵素学研究中心シンポジウム 2008年12月5日 徳島
 - **片桐秀樹** 特別講演 Metabolic Information Highways ~自律神経による糖・エネルギー代謝の協調的調節機構~ 第36回内分泌代謝研究会 2008年12月13日 東京
 - **片桐秀樹** Lecture 肝臓からの神経シグナルによる糖・エネルギー代謝調節機構第43回糖尿病学の進歩 2009年2月20日 松本
 - Ishigaki Y, **Katagiri H**, Gao J, Oka Y. Impact of Plasma Oxidized LDL Removal on Atherosclerosis American Diabetes Association, 68th Scientific Sessions, June 6-10, 2008 San Francisco, USA
 - **Katagiri H**. Metabolic Information Highway Uehara Memorial Foundation Symposium 2008 "Systems Biology: The Challenge of Complexity" Jun 30-July 2, 2008 Tokyo, Japan
 - **Katagiri H**. Inter-Organ Metabolic Communication via Autonomic Nerve Circuits. The 39th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund "Metabolic Syndrome: Carcinogenesis and Prevention" Nov 11-13, 2008 Tokyo Japan
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- Method For Enhancing Pancreatic Beta Cell Proliferation, Increasing Serum Insulin Concentration, Decreasing Blood Glucose Concentration And Treating And/Or Preventing Diabetes.
片桐 秀樹, 岡 芳知, 今井 淳太
PCT12/165,859
2008年7月1日 米国
2. 実用新案登録
- なし
3. その他(研究に関する新聞記事等)
- 2008年7月2日毎日新聞 コレステロール悪玉成分解明 東北大グループ
 - 2008年11月21日産経新聞朝刊 神経ネットワーク刺激→インスリン分泌 東北大グループが発見
 - 2008年11月21日朝日新聞夕刊 インスリン細胞増加実験に成功 東北大、マウス使い
 - 2008年11月21日日本経済新聞夕刊 膵臓細胞増殖の仕組みを発見 東北大 糖尿病治療に応用も
 - 2008年11月21日NHK(全国) 血糖値下げる細胞の増殖解明 など
 - 2008年11月23日毎日新聞朝刊 インスリン分泌量3倍に 東北大 マウスの肝臓機能利用 糖尿病治療に応用も
 - 2008年11月23日Yahoo!JAPAN 主なトピックスページで紹介
 - 2008年11月30日読売新聞朝刊 肝酵素活性化化 糖尿

病マウス治療

- 2009年1月20日日経産業新聞 膵臓の再生治療 神経刺激で細胞増殖
- 2009年2月7日Newton 2009年2月号「インスリン分泌細胞を増やすことに成功」

遺伝子解析・ウオルフラム症候群の治療法開発に関する研究
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

2型糖尿病の発症と進展にβ細胞量の減少が重要であることが以前にも増して重要視されるようになった。β細胞量の減少を来す要因として小胞体ストレスが注目されている。我々はこれまで、Wolfram症候群でみられるβ細胞死に小胞体ストレスが関与することを示してきた。今回の研究では同じく小胞体ストレスの関与が示されているglucolipototoxicityのメカニズムについて検討を行うこととした。糖尿病患者では、高血糖とともに脂質代謝異常が共存し、glucolipototoxicityは糖尿病発症後のβ細胞死を加速する因子として重要である。

MIN6細胞を高濃度グルコース+400μM palmitate存在下で培養するとそれぞれ単独の場合に比べて強くアポトーシスが誘導される。この時、リン酸化PERK、リン酸化EIF2α、CHOPやATF3の発現誘導により小胞体ストレスが惹起されていることが示された。同時に、IRS2蛋白が著しく減少していた。Palmitate単独ではみられないSREBP-1の発現誘導が高濃度グルコース存在下で顕著に認められ、このSREBP-1とATF3の発現誘導によりIRS2の発現が抑制されたと考えられた。SREBP-1の誘導は小胞体ストレスによるInsig-1の分解によるものであることが示唆され、これら一連の現象はchemical chaperoneであるTUDCAによる小胞体ストレスの解除によりみられなくなった。IRS2の減少はインスリンシグナルを減弱し、このことがβ細胞死をさらに加速すると考えられた。ATF3のノックダウンやIRS2の過剰発現は高濃度グルコース+palmitateによるβ細胞死を回避させる。SREBP-1の発現は、加えてacetyl-CoA carboxylaseの発現誘導を介してβ細胞での脂肪酸酸化を抑制し、このことはさらにFFAによる小胞体ストレスを増強することで悪性サイクルを作用させると考えられた。

以上より、glucolipototoxicityは小胞体ストレスを増強してβ細胞死を惹起するが、その過程にはインスリンシグナルの障害、慢性的脂肪酸酸化抑制による一層の小胞体ストレスの増強が関与する。これらの過程は、β細胞保護の観点からの薬剤開発のターゲットとなりうる。

A. 研究目的

2型糖尿病の発症、進展にはインスリン分泌不全とインスリン抵抗性の双方が関与する。最近、糖尿病の発症にはインスリン抵抗性が重要であり、発症後の進展にはβ細胞からのインスリン分泌不全の進行がより重要であるとの考えが提示されている。インスリン分泌不全の側面からは、ブドウ糖応答性のインスリン分泌障害に代表される機能的異常とβ細胞量の減少によるインスリン分泌の減少が含まれるが、少なくとも糖尿病の進行にはβ細胞量の減少が深く関与することは疑いない。最近、β細胞量の減少を来す一因として、β細胞での小胞体ストレスが注目されている。我々は2型糖尿病患者でみられるβ細胞量の減少メカニズムを明らかにし、その予防法や治療法を開発することを目的としてインスリン分泌不全による糖尿病と視神経萎縮を主徴とするWolfram症候群をモデルとして研究を行ってきた。これまでの研究により、Wolfram症候群の原因遺伝子であるWFS1のノックアウト(WFS1^{-/-})マウスでは、WFS1蛋白の欠損自体が小胞体ストレスを惹起し、また、WFS1蛋白を欠損する膵β細胞は小胞体ストレスに脆弱でアポトーシスを来しやすいことを見いだしている。さらに肥満によるインスリン需要の増大はβ細胞に小

胞体ストレスを惹起し、WFS1^{-/-}マウスでのβ細胞脱落を加速することを見いだしている。これらのことは、WFS1蛋白がβ細胞での小胞体ストレスやその応答に密接に関与し、Wolfram症候群にみられるβ細胞死はERストレスに対する応答異常が引き金となることを示唆する。加えて、ひとたび高血糖が惹起されると、糖毒性、さらに、共存する脂質代謝異常と相まってglucolipototoxicityによるβ細胞障害が重積する。今回の研究では、小胞体ストレスとβ細胞障害の観点から、glucolipototoxicityによるβ細胞死に焦点を当て、そのメカニズムをERストレスとの関連で明らかにする。さらにはβ細胞保護の観点からの糖尿病治療薬の作用点開発につなげたい。

B. 研究方法

膵β細胞株であるMIN6およびINS1は既報の方法により培養した。培養液に種々の濃度のグルコースおよびpalmitateを添加することによりglucolipototoxicityを惹起して、その際のインスリンシグナル、小胞体ストレス等に関わる蛋白発現、リン酸化レベルの変化等を主にウエスタン法を用いて解析した。遺伝子のノックダウンには、shRNA発現カセットを組み込んだアデノウイルスベ

クターを作成し、用いた。

マウスから単離したラ氏島を用いた実験を行うにあたって、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。組換えDNA実験は山口大学組換えDNA実験安全管理規則に従って実施した。

C. 研究結果

1. 遊離脂肪酸(FFA)によるβ細胞のアポトーシスは共存するグルコースにより増強される。

MIN6細胞を400 μM palmitate存在下で培養すると死細胞が増加し、その際、活性型caspase3の増加が観察される。このことは、以前から知られているようにFFAがβ細胞のアポトーシスを惹起することを示す。今回我々は、高濃度グルコース共存下では、グルコース濃度依存性にアポトーシスがさらに増強されることを観察した。FFAはJNKを活性化することが知られているが、JNKの活性化は5mMグルコース共存下ですでに最大に達しており、ここで観察したグルコースによるβ細胞アポトーシスの増加は、JNK活性化以外のメカニズムが関与することが示唆された。

2. グルコースとpalmitateはERストレスを惹起し、ATF3の活性化、IRS2の発現低下を介してsynergisticにインスリンシグナルの減弱、pdx-1発現低下をもたらす。

FFAがインスリンシグナルを減弱させることが以前から知られている。そこで、その効果がグルコースにより増強されるか検討した。400 μM palmitateは5mMグルコース存在下ではIRS2タンパク量に変化がみられないが、グルコースの濃度上昇に連れてIRS2タンパク量の減少が観察された。グルコース単独ではAktやGsk3のリン酸化が亢進することが知られているが、400 μM palmitate存在下では、IRS2タンパク量の減少に伴い、これらのリン酸化が減弱していた。インスリンシグナルはβ細胞の生存に必須であることが知られており、このIRS2の減少がpalmitateとグルコースのsynergisticなβ細胞アポトーシスの誘導に関与することが示唆された。このインスリンシグナルの減弱に伴い、やはりβ細胞の生存と密接に関わるpdx-1の減少が認められた。

FFAはERストレスの活性化によりインスリンシグナルを減弱することが知られている。そこでその減少がグルコースにより増強されるか否かを検討した。グルコース単独ではみられないPERKとその基質eIF2αのリン酸化およびCHOPの誘導が400 μM palmitateの存在下で観察された。サイトカインによるERストレスにより活性化されるATFがIRS2の発現を抑制することが最近報告されているが、palmitateとグルコースの共存下でATF3の活性化が観察され、このことがIRS2の減少の一部を説明するものと考えられた。このことを裏付けるように、TUDCAによるERストレスの軽減は上記の過程をリバースした。

3. グルコースとpalmitateはERストレスによるInsig-1

の減少を介してsynergisticにSREBP1を活性化化する。

SREBP1は糖尿病動物のラ氏島で活性化されており、SREBP1の過剰発現はβ細胞量の減少、インスリン分泌障害を来することが知られている。同時に、SREBP1はIRS2の発現を抑制することも知られている。そこで、palmitateとグルコースのSREBP1活性化への影響を検討した。

MIN6において、palmitateとグルコースはsynergisticにSREBP1を活性化することが示された。SREBP1の活性化は、同時にSREBP1の標的分子であるacetyl-CoA carboxylase (ACC)の発現が増強していることでも裏付けられた。TUDCAの存在下では、palmitateとグルコースによるSREBP1の活性化が減少することから、このSREBP1の活性化にもERストレスが関与することが示唆された。さらに、このSREBP1の活性化にはERストレスによるInsig-1の分解が関与することが示唆された。

MIN6細胞で観察された上記のことは単離ラ氏島でも同様に認められることが確認できた。

4. ATF3のノックダウン、IRS2の過剰発現によりpalmitateとグルコースにより誘導されるβ細胞死が回避される。

palmitateとグルコースによるglucolipotoxicityにATF3の誘導とそれに伴うIRS2の発現低下が関わることをさらに証明するためにATF3のノックダウン及びIRS2過剰発現の効果を検討した。INS1細胞で、アデノウイルスベクターによりshATF3を導入してATF3発現をノックダウンすると25mM glucose/400 μM palmitateによるIRS2の減少がみられなくなった。同時に、Caspase 3の活性化も抑制された。同様に、アデノウイルスベクターによるIRS2過剰発現は、Caspase 3の活性化を抑制した。

5. FFAとグルコースによるERストレス及びアポトーシスはAMPKの活性化によるFFAの酸化促進によって抑制される。

ACCはmalonyl-CoAの生成を介してFFAの酸化を抑制する。一方、AICARはAMPKの活性化を介してACCをリン酸化することにより不活化し、脂肪酸酸化を促進する。AICARはβ細胞死に対して防衛的に働くことが示されていることから、β細胞での脂肪酸酸化はβ細胞死に対して抑制的に、脂肪酸酸化の抑制はβ細胞死に促進的に作用することが示唆される。palmitateとグルコースはERストレスを介してSREBP1を活性化し、β細胞死を誘導するが、その際、同時にACCの発現亢進がみられることを示した。このACC活性増加による慢性的FFA酸化抑制がpalmitateとグルコースによるβ細胞死に関与することが推測される。そこで、etomoxirおよびmetforminにより急性に脂肪酸酸化を抑制または亢進させ、その影響を観察した。

低濃度グルコース存在下ではEtomoxirによるFFA酸化の抑制はβ細胞死を惹起するが、高濃度グルコースとpalmitateによるCaspase3の活性化、CHOP発現誘導に影響を与えなかった。一方、metforminはpalmitate+高濃度グルコース存在下でAMPKを活性化し、ACCを

リン酸化して不活化することによりCaspase3の活性化やCHOP発現誘導を抑制する傾向が認められた。

D. 考察

高血糖下でのFFAはいわゆるglucolipotoxicityによりβ細胞死を惹起する。そのメカニズムとして、ERストレスが関与する。高グルコースはβ細胞での脂肪酸酸化を抑制するが、同時に、ERストレスによりInsig-1の分解を介してSREBP-1が活性化され、その結果ACCの発現が誘導される結果、脂肪酸酸化の抑制がさらに増強され、FFAによるERストレスが一層亢進する、という悪性のサイクルが作動することを示した。SREBP-1はIRS2の発現を抑制することが示されているが、同時に、ERストレスにより活性化されるATF3もIRS2の発現を抑制する。このため、IRS2蛋白が減少し、インスリンシグナルが減弱することはβ細胞死をさらに加速する。高濃度グルコースとpalmitateによるIRS2の減少、インスリンシグナルの減弱、β細胞死にERストレスが関与することは、chemical chaperoneであるTUDCAや、ATF3のノックダウンによりこれらの過程が抑止されることから証明された。

このように、glucolipotoxicityにおいては、ERストレスにより惹起されるβ細胞死に、インスリンシグナルの障害が重積し、さらにβ細胞死が増幅されると考えられる。

E. 結論

糖尿病患者では高血糖と同時に共存する脂質代謝異常のために血中FFAが増加しているが、このことは、glucolipotoxicityによりβ細胞死を加速する。GlucolipotoxicityにはERストレスが関与し、それはβ細胞での脂肪酸酸化の抑制によってさらに増強される。さらに同時に起こるIRS2の発現抑制とインスリン作用の減弱がβ細胞死をさらに進展させる。糖尿病患者でのβ細胞保護には、糖脂質代謝異常を是正することが第一義に重要であるが、同時にβ細胞でおこる上記のような過程を制御することも重要で、β細胞保護の観点から開発されるべき薬物の作用点となりうる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Taguchi A, Emoto M, Okuya S, Fukuda N, Nakamori Y, Miyazaki M, Miyamoto S, Tanabe K, Aburatani H, Oka Y, **Tanizawa Y**. Identification of Glypican3 as a novel GLUT4-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 369:1204-1208, 2008.
- Kawano J, **Tanizawa Y**, Shinoda K. Wolfram syndrome 1 (Wfs1) gene expression in the normal mouse visual system. *J Comp Neurol.* 510:1-23, 2008.
- Fukuda N, Emoto M, Nakamori Y, Taguchi A, Miyamoto S, Uraki S, Oka Y, **Tanizawa Y**. DOC2B: a novel syntaxin-4 binding protein mediating insulin-regulated GLUT4 vesicle fusion in adipocytes. *Diabetes* 58:377-384, 2009.

- Akiyama M, Hatanaka M, Ohta Y, Ueda K, Yanai A, Uehara Y, Tanabe K, Tsuru M, Miyazaki M, Saeki S, Saito T, Shinoda K, Oka Y, **Tanizawa Y**. Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell apoptosis in Wfs1 knockout mice. *Diabetologia* 52: 653-663, 2009.

2. 学会発表

- Katsuya Tanabe, Corentin Cras-Meneur, Morris F. White, Ernesto Bernal-Mizrachi, James P. Woodgett, M. Alan Permutt, **Yukio Tanizawa**. Genetic Deficiency of Glycogen Synthase Kinase-3beta Corrects Diabetes in Irs2 Knockout Mice by Preserving Beta Cell Mass. *Asia Islet Biology & Incretin Symposium (AIBIS) 2008, Oct.17-19, 2008, Incheon, Korea.*
- **Yukio Tanizawa**. Wolfram Syndrome: Mechanism of Genetically Programmed β-cell Death. *The 10th Symposium on Molecular Diabetology in Asia, The 1st Sun Yat-Sen Diabetes Forum (Abstract 36p) Educational Lecture, Nov 28-30, 2008, Guangzhou, CHINA.*
- Tanabe K, Cras-Meneur C, White MF, Bernal-Mizrachi E, Woodgett JR, Permutt MA, **Tanizawa Y**. Genetic Deficiency of Glycogen Synthase Kinase-3beta Corrects Diabetes in Irs2 knockout mice by preserving beta cell mass. *The 1st Insulin Resistance in Metabolic Disease Forum (September 20, 2008)*
- Miyamoto S, Taguchi T, Emoto M, Okuya S, Fukuda N, Nakamori Y, Miyazaki M, Tanabe K, Aburatani H, Oka Y, **Tanizawa Y**. Identification of Glypican3 as a novel GLUT4 binding protein. *The 1st Insulin Resistance in Metabolic Disease Forum (September 20, 2008)*
- Matsui K, Fukuda N, Emoto M, Nakamori Y, Taguchi A, Miyamoto S, Uraki S, Oka Y, **Tanizawa Y**. Doc2b: A Novel Syntaxin4 Binding Protein Mediating Insulin-Regulated Glut4-Vesicle Fusion in Adipocytes. *The 1st Insulin Resistance in Metabolic Disease Forum (September 20, 2008)*
- **谷澤幸生** インスリンによる糖取り込み促進機構とインスリン抵抗性が加速するβ細胞死 第51回日本糖尿病学会年次学術集会 ランチョンセミナー(平成20年5月22日、23日、24日 東京)
- 田口昭彦、江本政広、福田尚文、中森芳宜、宮本幸子、田部勝也、岡 芳知、奥屋 茂、**谷澤幸生** GPI アンカー蛋白 Glypican3は Lipid Raft において GLUT4の糖輸送活性を促進する 第51回日本糖尿病学会年次学術集会(平成20年5月22日、23日、24日 東京)
- 宮崎睦子、江本政広、福田尚文、田口昭彦、宮本幸子、松原 淳、奥屋 茂、**谷澤幸生** インスリン分泌機

構における DOC2b の役割 第51回日本糖尿病学会
年次学術集会(平成20年5月22日、23日、24日 東京)

- 奥屋 茂、田口昭彦、江本政広、岡 芳知、谷澤幸生
インスリン依存性糖取り込みを促進する ANK 構造蛋白 p61 は、インスリン抵抗性状態では発現が低下する
第51回日本糖尿病学会年次学術集会(平成20年5月22日、23日、24日 東京)
- 太田康晴、Yasuhiro Kosaka, Nicole Neubauer, Rosa Gasa, Evan Deneris, Michael German, 谷澤幸生 膝ラ氏島において、ETS 転写因子である Pet-1 は Neurogenin-Nkx 転写カスケードの下流に位置し、インスリンプロモーターに結合する 第51回日本糖尿病学会年次学術集会(平成20年5月22日、23日、24日 東京)

- 田部勝也、Woodgett JR, Permutt MA, 谷澤幸生
GSK-3 β の欠損は、IRS2 欠損マウスにおける糖尿病を改善させる 第20回分子糖尿病学シンポジウム
(平成20年12月13日 東京)

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

小胞体ストレス関連遺伝子の機能解析と結合蛋白同定に関する研究
分担研究者 浅野 知一郎 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨

膵β細胞の機能には、IRS-1/2を介したPI 3-kinase/Akt活性化が極めて重要な役割を果たしている。我々は、IRS-1に結合するタンパクを、免疫沈降からの複合体解析をLC/MS/MSのシステムを用いて網羅的に検索し、prolyl isomerase 1 (Pin1)を同定した。Pin1は、プロリンをtrans構造に変化させることでタンパクの構造変化をもたらす、機能を修飾する蛋白である。

重要なことに、Pin1はIRS-1に結合し、インスリンによるシグナル伝達を顕著に亢進させることが判明した。Pin1のKOマウスでは、肝臓や筋肉におけるインスリン抵抗性と共に、グルコース負荷による初期インスリン分泌の顕著な低下が認められた。実際、Pin1は膵臓内でβ細胞に特異的に豊富に存在している。また、高脂肪食などに伴って発現量が増加することも判明した。以上を併せ考えると、高栄養状態→Pin1の発現量増加→IRS-1を介するシグナル伝達亢進→β細胞の増殖能の亢進とインスリン分泌促進、という新たな概念が提唱される。また、Pin1はcyclin D1に結合することで細胞増殖を誘導すると共に、アポトーシスを抑制することも知られている。これらを総合的に判断すると、Pin1の発現を増加させたり、Pin1と結合するIRS-1のSer434周囲に結合しIRS-1をリン酸化されやすくする分子を探索することで、新規糖尿病治療薬への可能性が考えられる。

A. 研究目的

糖尿病は、インスリン分泌不全とインスリン抵抗性の両方の要因によって引き起こされる。近年、β細胞の機能および細胞増殖に、IRS-1/2を介したインスリンシグナル伝達が極めて重要であることが報告された。また、肥満糖尿病動物のβ細胞では、小胞体ストレスの他、脂肪毒性や糖毒性によって、IRS-1/2を介するインスリンシグナルの抑制が報告されている。

そこで、我々は、糖尿病治療薬の新たなターゲットを発見する目的で、IRS-1/2を介したインスリンシグナルを亢進、あるいは回復させる分子機構を探索し、Pin1をその候補分子として見出すに至った。

B. 研究方法

Pin1とIRS-1の結合特性は、各種の培養細胞を用いて検討した。結合に関与する部位を同定するためには、deletionやpoint mutationを導入したPin1及びIRS-1蛋白を作成した。

次に、Pin1のインスリンシグナルにおける役割を検討するために、Pin1の過剰発現、Pin1 siRNAによるgene silencing、Pin1 KOマウスを用いた。β細胞におけるPin1の発現は免疫染色によって行った。さらに、Pin1 KOマウスにおける耐糖能やインスリン分泌能を検討するとともに、肥満糖尿病モデルマウスにPin1をアデノウイルスで導入し、耐糖能がどのように変化するかを検討した。

C. 研究結果

Pin1とIRS-1の結合は、Si9細胞及びHepG2細胞での過剰発現系のみならず、マウスの肝臓においても確認され

た。また、この結合は、脱リン酸化酵素阻害剤オキサゲ酸処理により増強され、一方IRS-1の脱リン酸化処理を行うことにより消失することからIRS-1のセリンのリン酸化状態に依存していることが示唆された。さらに、deletion mutantを作成し、結合部位について検討したところ、Pin1ではN末側に存在するWWドメインが、一方、IRS-1ではSAINDドメイン内の434 Serを含む配列が、その結合に必要であることが明らかとなった。

Pin1によるインスリンシグナルに対する影響を検討するために、各種培養細胞にPin1を過剰発現させたところ、IRS-1チロシンリン酸化の亢進及び、下流に位置するAkt、GSK3・のリン酸化促進が、いずれも顕著に認められた。逆に、Pin1阻害剤Jugloneの処理やPin1のsiRNA処理によって、インスリンによるIRS-1、Akt、GSK3・のリン酸化は明らかに抑制された。膵臓の切片をPin1に対する抗体で染色するとβ細胞に特異的にPin1が高発現していることが明らかとなった。さらに、高脂肪食負荷によりPin1の発現量が増加しており、空腹時状態では、Pin1の発現量が減少した。

Pin1の代謝における役割を明らかにするために、Pin1 KOマウスを用いて検討した。Pin1 KOマウスは、グルコース負荷によって初期のインスリン分泌が顕著に低下しており、耐糖能異常を呈した。これは、β細胞からの初期分泌不全と、末梢臓器におけるインスリン抵抗性の両方の要因が関与していると考えられた。また、ob/obマウスでは、顕著な血糖上昇が認められるが、Pin1をアデノウイルスで導入することによって、IRS-1を介するインスリンシグナルを正常化させ、耐糖能を改善させることが可能であった。

D. 考察

Pin1の発現量は高栄養状態で上昇すること、そして、Pin1はIRS-1と結合することによって、インスリンシグナルを亢進させることが示唆された。これは、 β 細胞においては、グルコース刺激における初期分泌や β 細胞の増殖に関与していると考えられる。また、Pin1は、FOXOやRAR、cyclin D1等の転写因子にも結合することが知られており、Pin1のKOマウスでは、 β 細胞の増殖抑制も相まって、インスリン分泌不全に至りやすいと考えられた。

E. 結論

β 細胞のアポトーシスの抑制や増殖の誘導、小胞体ストレスに対する防御機構として、Pin1の発現誘導が重要であると考えている。この機構に作用する薬剤は β 細胞の機能改善に有用となる可能性を考え、さらに検討を進めている段階であり、有意義な成果が期待できる状況にある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Egawa, M., Kamata, H., Kushiyama, A., Sakoda, H., Fujishiro, M., Horike, N., Yoneda, M., Nakatsu, T., Ying, G., Jun, Z., Tsuchiya, Y., Takata, K., Kurihara, H., and Asano, T. Long-term forskolin stimulation induces AMPK activation and thereby enhances tight junction formation in human placental trophoblast BeWo Cells. *Placenta* 29; 1003-8, 2008
- Horike, N., Sakoda, H., Kushiyama, A., Ono, H., Fujishiro, M., Kamata, H., Nishiyama, K., Uchijima, Y., Kurihara, Y., Kurihara, H., and Asano, T. AMP-activated Protein Kinase Activation Increases Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase 3 β and Thereby Reduces cAMP-responsive Element Transcriptional Activity and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase C Gene Expression in the Liver. *Diabetes* 57(49); 33902-10, 2008
- Ono, H., Pocai, A., Wang, Y., Sakoda, H., Asano, T., Backer, JM., Schwartz, GJ and Rossetti, L. Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *J. Clin. Invest.* 118; 2959-68, 2008
- Koketsu, Y., Sakoda, H., Fujishiro, M., Kushiyama, A., Fukushima, Y., Anai, M., Kikuchi, T., Fukuda, T., Kamata, H., Uchijima, Y., Kurihara, H., and Asano, T. Hepatic overexpression of a dominant negative form of Raptor enhances Akt phosphorylation and restores insulin resistance in K/K^{AY} mice. *Am. J. Physiol. Endo. Metab.* 294; E719-25, 2008
- Makita, R., Uchijima, Y., Nishiyama, K., Amano, T.,

Chen, Q., Takeuchi, T., Mitani, A., Nagase, T., Yatomi, Y., Aburatani, H., Nakagawa, O., Small, EV., Cobo-Stark, P., Iquarashi, P., Murakami, M., Tominaga, J., Sato, T., Asano, T., Kurihara, Y., and Kurihara, H. Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 294; F542-53, 2008

- Kurihara, Y., Kawamura, Y., Uchijima, Y., Amano, T., Kobayashi, H., Asano, T. and Kurihara, H. Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1. *Developmental Biology.* 313; 335-46, 2008
- Ikegami, Y., Inukai, K., Awata, T., Asano, T., Katayama, S. SH3 domain of the phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit is responsible for the formation of a sequestration complex with insulin receptor substrate-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365; 433-8, 2008
- Fujio, J., Kushiyama, A., Sakoda, H., Fujishiro, M., Ogihara, T., Fukushima, Y., Anai, M., Horike, N., Kamata, H., Uchijima, Y., Kurihara, H., and Asano, T. Regulation of gut-derived resistin-like molecule b expression by nutrients. *Diab. Res. Clin. Pract.* 79; 2-10, 2008
- Ikubo, M., Wada, T., Fukui, K., Ishiki, M., Ishihara, H., Asano, T., Tsuneki, H., and Sasaoka, T. Impact of lipid phosphatases SHIP2 and PTEN on the time- and Akt isoform-specific amelioration of TNF[alpha]-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296(1); E157-64, 2009

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

大腸癌、動脈硬化症、又はメタボリックシンドロームの検出方法
特願2007-321240号

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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamada T, Oka Y , Katagiri H .	Inter-organ metabolic communication involved in energy homeostasis: potential therapeutic targets for obesity and metabolic syndrome.	Pharmacol Ther	117 (1)	188-198	2008
Yamaguchi S, Ishihara H, Yamada T, Tamura A, Usui M, Tominaga R, Munakata Y, Satake C, Katagiri H , Tashiro F, Aburatani H, Tsukiyama-Kohara K, Miyazaki J, Sonenberg N, Oka Y .	ATF4-mediated induction of 4E-BP1 contributes to pancreatic β cell survival under endoplasmic reticulum stress.	Cell Metabolism	7 (3)	269-76	2008
Kato T, Ishiwata M, Yamada K, Kasahara T, Kakiuchi C, Iwamoto K, Kawamura K, Ishihara H, Oka Y .	Behavioral and gene expression analyses of WFS1 knockout mice as a possible animal model of mood disorder.	Neuroscience Research	61 (2)	143-158	2008
Horikawa Y, Miyake K, Yasuda K, Enya M, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y , Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Yamamoto K, Tokunaga K, Takeda J, Kasuga M.	Replication of genome-wide association studies of type 2 diabetes susceptibility in Japan.	J Clin Endocrinol Metab	93 (8)	3136-41	2008
Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Mori H, Jonsson A, Sato Y, Yamagata K, Hinokio Y, Wang HY, Tanahashi T, Nakamura N, Oka Y , Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Takeda J, Maeda E, Shin HD, Cho YM, Park KS, Lee HK, Ng MC, Ma RC, So WY, Chan JC, Lyssenko V, Tuomi T, Nilsson P, Groop L, Kamatani N, Sekine A, Nakamura Y, Yamamoto K, Yoshida T, Tokunaga K, Itakura M, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M.	Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus.	Nature Genetics	40 (9)	1092-1097	2008
Imai J, Katagiri H , Yamada T, Ishigaki Y, Suzuki T, Kudo H, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Ishihara H, Niiijima A, Nakazato M, Asano T, Minokoshi Y, Oka Y .	Regulation of pancreatic β cell mass by neuronal signals from the liver.	Science	322 (5905)	1250-1254	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okimoto H, Ishigaki Y, Koiwa Y, Hinikio Y, Ogihara T, Suzuki S, Katagiri H , Ohkubo T, Hasegawa H, Kanai H, Oka Y .	A novel method for evaluating human carotid artery elasticity: possible detection of early stage atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes.	Atherosclerosis	196	391-7	2008
Nedachi T, Kadotani A, Ariga M, Katagiri H , Kanzaki M.	Ambient glucose levels qualify the potency of insulin myogenic actions by regulating SIRT1 and FoxO3a in C2C12 myocytes.	Am J Physiol Endocrinol Metab	294	E668-78	2008
Ariga M, Nedachi T, Katagiri H , Kanzaki M.	Functional role of sortilin in myogenesis and development of insulin-responsive glucose transport system in C2C12 myocytes.	J Biol Chem	283	10208-20	2008
Ishigaki Y, Katagiri H , Gao J, Yamada T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Kaneko K, Ogihara T, Ishihara H, Sato Y, Takikawa K, Nishimichi N, Matsuda H, Sawamura T, Oka Y .	Impact of plasma oxidized LDL removal on atherosclerosis.	Circulation	118	75-83	2008
Taguchi A, Emoto M, Okuya S, Fukuda N, Nakamori Y, Miyazaki M, Miyamoto S, Tanabe K, Aburatani H, Oka Y , Tanizawa Y .	Identification of Glypican3 as a novel GLUT4-binding protein.	Biochem Biophys Res Commun.	369	1204-1208	2008
Kawano J, Tanizawa Y , Shinoda K.	Wolfram syndrome 1 (Wfs1) gene expression in the normal mouse visual system.	J Comp Neurol.	510	1-23	2008
Egawa M, Kamata H, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Horike N, Yoneda M, Nakatsu T, Ying G, Jun Z, Tsuchiya Y, Takata K, Kurihara H, and Asano T .	Long-term forskolin stimulation induces AMPK activation and thereby enhances tight junction formation in human placental trophoblast BeWo Cells.	Placenta	29	1003-8	2008
Horike N, Sakoda H, Kushiyama A, Ono H, Fujishiro M, Kamata H, Nishiyama K, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H, and Asano T .	AMP-activated Protein Kinase Activation Increases Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase 3 β and Thereby Reduces cAMP-responsive Element Transcriptional Activity and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase C Gene Expression in the Liver.	J Biol Chem	283 (49)	33902-10	2008
Ono H, Pocai A, Wang Y, Sakoda H, Asano T , Backer JM, Schwartz GJ and Rossetti L.	Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats.	J Clin Invest	118	2959-68	2008
Koketsu Y, Sakoda H, Fujishiro M, Kushiyama A, Fukushima Y, Anai M, Kikuchi T, Fukuda T, Kamata H, Uchijima Y, Kurihara H, and Asano T .	Hepatic overexpression of a dominant negative form of Raptor enhances Akt phosphorylation and restores insulin resistance in K/KAy mice.	Am J Physiol Endocrinol Metab	294	E719-25	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Makita R, Uchijima Y, Nishiyama, K, Amano T, Chen Q, Takeuchi T, Mitani A, Nagase T, Yatomi Y, Aburatani H, Nakagawa O, Small EV, Cobo-Stark P, Iquarashi P, Murakami M, Tominaga J, Sato T, Asano T , Kurihara Y, and Kurihara H.	Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ.	Am J Physiol Renal Physiol	294	F542-53	2008
Kurihara Y, Kawamura Y, Uchijima Y, Amano T, Kobayashi H, Asano T , and Kurihara H.	Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1.	Developmental Biology	313	335-46	2008
Ikegami Y, Inukai K, Awata T, Asano T , Katayama S.	SH3 domain of the phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit is responsible for the formation of a sequestration complex with insulin receptor substrate-1.	Biochem Biophys Res Commun	365	433-8	2008
Fujio J, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Ogihara T, Fukushima Y, Anai M, Horike N, Kamata H, Uchijima Y, Kurihara H, and Asano T .	Regulation of gut-derived resistin-like molecule b expression by nutrients.	Diab Res Clin Pract	79	2-10	2008
Ikegami Y, Inukai K, Imai K, Sakamoto Y, Katagiri H , Kurihara S, Awata T, Katayama S.	Adiponectin up-regulates ferritin heavy chain in skeletal muscle cells.	Diabetes	58	61-70	2009
Fukuda N, Emoto M, Nakamori Y, Taguchi A, Miyamoto S, Uraki S, Oka Y , Tanizawa Y .	DOC2B: a novel syntaxin-4 binding protein mediating insulin-regulated GLUT4 vesicle fusion in adipocytes.	Diabetes	58	377-384	2009
Akiyama M, Hatanaka M, Ohta Y, Ueda K, Yanai A, Uehara Y, Tanabe K, Tsuru M, Miyazaki M, Saeki S, Saito T, Shinoda K, Oka Y , Tanizawa Y .	Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell apoptosis in Wfs1 knockout mice.	Diabetologia	52	653-663	2009
Ikubo M, Wada T, Fukui K, Ishiki M, Ishihara H, Asano T , Tsunek i H, and Sasaoka T.	Impact of lipid phosphatases SHIP2 and PTEN on the time- and Akt isoform-specific amelioration of TNF{alpha}-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes.	Am J Physiol Endocrinol Metab	296 (1)	E157-64	2009