

200907005A

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21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡 芳知

平成22(2010)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 ----- 7

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 ----- 11

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 ----- 17

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 20

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細胞負荷状況下で小胞体ストレスが過大となると膵β細胞は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ている。Wolfram症候群は若年性の視神経萎縮とインスリン依存性糖尿病を主徴とし、我々が同定したWFS1遺伝子の欠損により発症する。WFS1蛋白は小胞体に発現され、細胞内カルシウムホメオスタシス、小胞体ストレス応答に関与することが明らかになっている。今回、浅野らはプロリル異性化酵素Pin1が膵β細胞に豊富に発現していることから、これに結合するタンパクを検索したところ、CRTC2を同定した。さらに、糖尿病モデルob/obマウスにPin1を過剰発現させるとCRE関連遺伝子の発現が抑制され、血糖値も改善された。以上より、Pin1はCRTC2と結合することにより、CRE転写活性を制御し、β細胞におけるインスリン分泌やアポトーシスの調節に関与していると考えられた。谷澤らを中心とする共同研究チームは、膵β細胞においてはWFS1蛋白が小胞体に加えて、インスリン分泌顆粒に存在し、*wfs1*欠損マウスのβ細胞ではインスリン分泌顆粒の酸性化が障害され、同時にインスリンのプロセッシング障害や分泌顆粒の細胞内での局在の変化を見出した。また、共同研究者の片桐らは、肝臓で肥満状況を感知し膵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見出し、これを治療に応用することで、インスリン分泌不全の糖尿病における再生治療につながる成果を報告しているが（Science 2008）、神経を直接刺激することで膵β細胞量を調節して糖尿病を治療する試みを行っている。さらに、WFS1欠損マウス、および、小胞体ストレス反応経路に位置するCHOPの欠損マウスを用い、小胞体ストレスが血管においても動脈硬化発症に重要であることを見出した。このことから、糖尿病・インスリン抵抗性・メタボリックシンドロームの状態では、膵β細胞のみならず血管壁においても小胞体ストレスが惹起され、さまざまな病態に関与していること、さらにその軽減は、総合的な治療法開発につながることを示すものである。これらの知見は、WFS1蛋白の新たな機能を示唆するものである。

このように我々が同定した糖尿病をきたすウオルフラム症候群の原因遺伝子WFS1が欠損すると、小胞体ストレスが惹起され、膵β細胞だけでなく動脈硬化の点でも糖尿病・メタボリックシンドロームに関わることが明らかとなり、新たな創薬ターゲットと思われる。さらに我々は全く新しい神経ネットワーク機構をみいだしたので、この分子機構を解明して膵β細胞が減少したインスリン分泌不全の糖尿病の新たな治療法確立を目指している。

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、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。

なぜ糖尿病は増加しているのか。現代の飽食と運動不足の環境下では、インスリン分泌を強要する。膵β細胞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。

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。米国（Butler, Diabetes 2003）や韓国（Yoon, JCEM 2003）から、膵β細胞数の減少（健常者の半分以上）が示され、さらにこれがアポトーシスの増加によることも明らかとなり、この膵β細胞数減少に現代生活における小胞体ストレスが深く関わるということが、大きな注目を集めている。

そこで、本研究では、この膵β細胞のアポトーシスを惹起する小胞体ストレスに焦点をあてる。すでに、2008-2009年度に慢性の小胞体ストレス下で翻訳抑制因子4EBP1が膵β細胞を保護していることを見出したが (Cell Metabolism 2008)、これは新規糖尿病薬のターゲットである。さらに、我々は肝 (Science 2006) や脂肪組織 (Cell Metabolism 2006) が神経シグナルを介して他臓器での代謝状態を制御していることを世界で初めて明らかにした。膵β細胞もそのターゲットであり、この機構を使えば、膵β細胞を増やせることを示した (Science 2008)。さらに、小胞体ストレスが肥満によって惹起されることの報告があり、世界の注目を集めている。そこで、本研究では小胞体ストレスとWFS1の関係をさらに広い視野で見ると共に、我々が独自に見出した臓器間の神経ネットワークを利用して、インスリン分泌不全の糖尿病の新たな治療法確立を目指す。以上は、わが国発のきわめて独創性の高い研究である。

B. 研究方法

創薬

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 (岡・谷澤・浅野)

【2009年度】

2007-2008年度の研究により、WFS1KOマウスの膵β細胞、あるいは膵β細胞株MIN6でWFS1を除いた細胞を、野生型と遺伝子発現を比較することにより、慢性ストレス下では翻訳抑制因子4EBP1の発現が膵β細胞の生存にとって重要であり、そしてこれが転写因子ATF4の支配下にあることを世界に先駆けて見出した (Cell Metabolism 2008)。しかし、非膵β細胞では、慢性ストレス下でATF4が活性化されてもこのような事は生じない。この違いは膵β細胞に特異的に存在する分子によると考えられ、この機構を明らかにすることは、膵β細胞を守る創薬につながる。4EBP1遺伝子のある領域がこれに関係するとのpreliminaryな結果を得ており、South-Western法で証明を試みる。このように発現が増加する機構の解明のほか、過剰発現、RNAiによる発現抑制で検証する。

治療

臓器間ネットワーク機構を利用した膵β細胞数増加をめざした治療 (岡・片桐)

【2009年度】

我々は臓器間代謝情報ネットワークの存在を発見報告した (Science 2006, Cell Metabolism 2006)。すなわち、末梢臓器の脂肪組織や肝臓がその代謝情報 (例えば肥満という情報) を自律神経を介して脳に送り、続いて脳は末梢組織に神経を介して情報を送るというものである。代謝情報は神経を介してリレーされるのである。このよう

な経路があること自体、非常な驚きをもって世界に受け止められたが、2008年度には、これをさらに発展させてさらに世界が驚く成果をあげた。それは、生体の肝臓を刺激して膵β細胞を殖やすのである (Science 2008)。肝への常時活性化型 extracellular regulated kinase 遺伝子の導入により、膵β細胞数の増加による膵ラ島の増大が生じ、これが肝臓—脳—膵β細胞と神経を介した代謝情報が伝達されることによることを明らかにした。換言すれば、肝臓に「肥満した」と思わせるのである。この機構を用いると、膵β細胞が増殖して糖尿病が治癒したのである。ヒトの肝臓にERKを導入するわけにはいかないもので、どのような物質が神経末端を刺激して情報を伝えているかを、2009年度は明らかにしたい。これは、再生医療のまったく新しい治療に結びつくものである。

予防

易糖尿病発症者簡易抽出システムの確立 (岡・谷澤)

【2009年度】

2007-2008年度の研究によって、遺伝因子がより強いと考えられる35歳以下発症2型糖尿病患者で小胞体ストレス関連遺伝子も含めた遺伝子解析を進め、100余りの候補遺伝子SNPを同定した。そこで、このSNPについて、糖尿病1000例対照例1000例でさらに解析を進めている。特に、小胞体ストレスに対して弱い者は、耐糖能が正常域にあってもインスリン分泌反応が低下・遅延している可能性が考えられる。これらの結果をもとに、易糖尿病発症者簡易抽出システム (小胞体ストレス脆弱SNPパネル) を確立する。

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)。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

1) 創薬: 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開発を目指している。2008年度までに、ターゲット分子・遺伝子として、WFS1に加えて翻

ターゲット分子・遺伝子として、WFS1に加えて翻訳抑制因子4EBP1を同定した。2009年度はWFS1との結合蛋白を同定しようとしたが、難渋を極め、候補分子が血中に出現することから、個体に小胞体ストレスが加わっていることのバイオマーカーとならないか、検討をしている。

2) 治療：我々が世界に先駆けて作成したWFS1欠損マウスをモデルでは、動脈硬化が進行することを世界で初めて見出した。CHOPノックアウトマウスでも同様の傾向が見られた。これは予想外のことであったが、小胞体ストレスと肥満・糖尿病との関係が近年世界で注目されており、きわめて意義深い発見である。これは小胞体ストレスが広い意味で糖尿病など生活習慣病の治療と結びつくことを示している。また、我々は膵β細胞が減少するウオルフラム症候群の治療法を開発することを目的としている。2008年度までに、膵β細胞が減少して糖尿病が発症するSTZ糖尿病やAkitaマウスで神経ネットワークを用いて治療できることを示したが、2009年度は、これをさらに発展させ、神経を直接刺激することで膵β細胞量を調節して糖尿病を治療する試みを行っている。

3) 予防：易糖尿病発症者を抽出できるSNPを数個見出した。このパネルを確立し、肥満と運動不足(=β細胞の小胞体ストレス増加)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の開発を目指している。

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細胞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考える。

我々は、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細胞保護分子となることを世界で初めて示した。4EBP1がない膵β細胞は小胞体ストレス下でアポトーシスに陥り、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、易糖尿病発症者を抽出できる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、さらに2008年度に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ふ、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細胞に向かってどのような分子を放出するのかは、治療薬開発に直接つながる重要な課題であり、製薬企業とともに現在精力的に研究を進めている。同時に、神経を直接刺激することで膵β細胞量を調節して糖尿病を治療する試みを行っている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yoshida S, Hirai M, Suzuki S, Awata S, Oka Y. Neuropathy is associated with depression independently of health-related quality of life in Japanese patients with diabetes. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 63(1): 65-72, 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(2): 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(4):653-663, 2009 (Epub ahead 2009 Feb 4)
- Tokita A, Ishigaki Y, Okimoto H, Hasegawa H, Koiwa Y, Kato M, Ishihara H, Hinokio Y, Katagiri H, Kanai H, Oka Y. Carotid arterial elasticity is a sensitive atherosclerosis value reflecting visceral fat accumulation in obese subjects. *Atherosclerosis* 206: 168-72, 2009 (Epub 2009 Feb 20)
- Kaneko K, Yamada T, Tsukita S, Takahashi K, Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Obesity Alters Circadian Expressions of Molecular Clock Genes in the Brainstem. *Brain Res.* 1263: 58-68, 2009 (Epub 2009 Jan 15)
- Kawano J, Fujinaga R, Yamamoto-Hanada K, Oka Y, Tanizawa Y, Shinoda K. Wolfram syndrome 1(Wfs1) mRNA expression in the normal mouse brain during postnatal development. *Neuroscience Research* 64: 213-230, 2009
- Fujiwara M, Kobayashi T, Jomori T, Maruyama Y, Oka Y, Sekino H, Imai Y, Takeuchi K. Pattern recognition analysis for ¹H NMR spectra of plasma from hemodialysis patients. *Anal Bioanal Chem* 394: 1655-1660, 2009

- Osawa H, Furuta H, CY Ng M, Hirota Y, Mori H, Ido K, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Wang H, Tanahashi T, Nakamura N, Takeda J, Maeda E, Yamamoto K, Tokunaga K, CW Ma R, S Wing-Yee, Juliana CN Chan, Kamatani N, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Construction of a prediction model for type 2 diabetes mellitus in the Japanese population based on 11 genes with strong evidence of the association. *Journal of Human Genetics* 54: 236-241, 2009
- Ogihara T, Katagiri H, Yamada T, Kudo H, Imai J, Hinokio Y, Yamagiwa Y, Ueno Y, Shimosegawa T, Oka Y. Peginterferon(PEG-IFN)Plus ribavirin combination therapy, but neither interferon nor PGE-IFN alone, induced Type 1 diabetes in a patient with chronic hepatitis C. *Internal Medicine* 48: 1387-1390, 2009
 - Imai J, Oka Y, Katagiri H. Identification of a novel mechanism regulating β -cell mass. *Islets* 1(1), 73-75, 2009
 - Imai J, Yamada T, Saito T, Ishigaki Y, Hinokio Y, Kotake H, Oka Y, Katagiri H. Eradication of insulin resistance. *Lancet*. 374:264, 2009
 - Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Circulating oxidized LDL-a biomarker and a pathogenic factor. *Current Opinion in Lipidology* 20:363-369, 2009
2. 学会発表
- 第 43 回糖尿病学の進歩 2 月 20 日 松本
- Metabolic Information Highway - 中枢と末梢をつなぐ自律神経系による代謝情報ネットワーク
岡 芳知
 - 糖尿病研究の将来展望
岡 芳知
- 第1回バイマンスリーセミナー 4月15日 神戸
- Metabolic Information Highway - 自律神経による臓器間の協調的代謝調節機構
岡 芳知
- 第 82 回日本内分泌学会学術総会 4 月 23 日-25 日 群馬
- 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 52 回日本糖尿病学会年次学術集会 5 月 21 日-24 日 大阪
- 動脈硬化症・進展における CHOP の役割の検討
高 俊弘、片桐 秀樹、石垣 泰、石原 寿光、山田 哲也、澤田正二郎、荻原 健英、今井 淳太、宇野 健司、長谷川 豊、金子 慶三、鈴木 俊伸、齋藤 徳郎、突田 壮平、高橋 圭、檜尾 好徳、森 正敬、岡 芳知
 - 腹部内臓脂肪面積の頸動脈血管弾性特性に及ぼす影響の検討
嶋田 藍、石垣 泰、沖本 久志、長谷川英之、小岩 喜郎、加藤 真、長谷川 豊、山口 賢、澤田正二郎、今井 淳太、山田 哲也、石原 寿光、檜尾 好徳、片桐 秀樹、金井 浩、岡 芳知
 - 肝からの神経を介した、肥満に伴う高血圧の発症機序
宇野 健司、片桐 秀樹、山田 哲也、石垣 泰、今井 淳太、長谷川 豊、高 俊弘、金子 慶三、齋藤 徳郎、鈴木 俊伸、荻原 健英、岡 芳知
 - 肥満による延髄孤束核における概日リズムの変調
金子 慶三、片桐 秀樹、山田 哲也、荻原 健英、石垣 泰、今井 淳太、宇野 健司、長谷川 豊、澤田正二郎、高 俊弘、鈴木 俊伸、齋藤 徳郎、突田 壮平、高橋 圭、檜尾 好徳、岡 芳知
 - 自律神経を介した肝臓-膵 β 細胞連関による膵 β 細胞増殖機構
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、金子 慶三、鈴木 俊伸、齋藤 徳郎、突田 壮平、高橋 圭、檜尾 好徳、岡 芳知
 - IL-6 の持つ糖反応性インスリン分泌促進作用とそのメカニズムについて
鈴木 俊伸、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、澤田正二郎、高 俊弘、金子 慶三、齋藤 徳郎、突田 壮平、高橋 圭、檜尾 好徳、岡 芳知
 - NOD マウス骨髄由来樹状細胞におけるパターン認識分子とアクチン調節分子発現の網羅的解析
高橋 和眞、岡 芳知、佐藤 諒
 - 膵 β 細胞における ATF6 α 欠損マウスを用いた検討
薄井 正寛、石原 寿光、鈴木千登世、近藤 敬一、丹治 泰裕、富永 竜、佐竹 千尋、山口 賢、石垣 泰、檜尾 好徳、片桐 秀樹、森 和俊、岡 芳知
- MOVD2009-第10回血管拡張機序に関する国際シンポジウム-(10th International Symposium on Mechanisms of Vasodilatation) 6月1日-3日 宮城
- Blockade of Endothelial NF-kB Pathway Prevents Obesity- and Age-related Insulin Resistance and Prolongs Longevity
Hasegawa Y, Saito T, Ogihara T, Fujita T, Oka Y, Katagiri H
- The 69th Scientific Sessions of American Diabetes Associations June5-9th New Orleans, USA
- Obesity and Insulin Resistance Alter Circadian Expressions of Molecular Clock Genes in the Brainstem

Brainstem

Kaneko K, Yamada T, Oka Y, Katagiri H

- Wolfram Syndrome1(Wfs1) Protein Localizes in Beta Granules and May Contribute to Insulin Processing
Hatanaka M, Ohta Y, Tanabe K, Kondo M, Akiyama M, Yanai A, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y

仙台市内科医会春季総会 6月15日 仙台

- 2型糖尿病の現状と課題
岡 芳知

第10回徳島糖尿病フォーラム 7月10日 仙台

- Metabolic Information Highway -神経系も糖・エネルギー代謝に重要-
岡 芳知

第2回日本肥満症治療学会学術集会 7月10日-11日 東京

- 超音波測定による頸動脈血管弾性は内臓肥満に伴う早期動脈硬化を評価できる
石垣 泰、鴫田 藍、片桐 秀樹、岡 芳知

第28回日本脳神経超音波学会 7月11日-12日 大阪

- 頸動脈血管弾性特性による肥満、代謝異常にともなう早期動脈硬化の評価
石垣 泰、鴫田 藍、沖本 久志、長谷川 英之、小岩 喜郎、加藤 真、檜尾 好徳、片桐 秀樹、金井 浩、岡 芳知

日本糖尿病学会第47回東北地方会 11月7日仙台

- 行動変容につなげるPLCに基づいた糖尿病療養指導の試み
山田沙智子、由良有希子、鈴木 紀子、木原 弓枝、檜尾 好徳、片桐 秀樹、岡 芳知
- 1型糖尿病と宣告された患者の感情変化と看護介入
千葉 明美、高宮あすか、今野 朱美、檜尾 好徳、片桐 秀樹、岡 芳知
- 東北大学病院フットケアセンター開設1年の歩み
林 殿聡、後藤 均、橋本 彰、由良有希子、多田 恵子、石垣 泰、岡 芳知、舘 正弘
- 若年発症の稀な膵悪性腫瘍(solid pseudopapillary tumor)術後に1型糖尿病を発症した1例
高橋 圭、片桐 秀樹、前嶋 隆平、近藤 敬一、突田 壮平、齋藤 徳郎、鈴木 俊伸、金子 慶三、澤田正二郎、長谷川 豊、宇野 健司、今井 淳太、山田 哲也、石垣 泰、荻原 健英、檜尾 好徳、岡 芳知
- ターナー症候群に合併した1型糖尿病の1例
鈴木 俊伸、片桐 秀樹、前嶋 隆平、高橋 圭、近藤 敬一、突田 壮平、工藤 宏仁、齋藤 徳郎、金子 慶三、澤田正二郎、長谷川 豊、宇野 健司、今

井 淳太、山田 哲也、石垣 泰、荻原 健英、檜尾 好徳、岡 芳知

- 色素性痒疹を伴って発症した1型糖尿病ケトーシスの1例
角田 宇衣子、檜尾 好徳、工藤 宏仁、丹治 泰裕、山口 賢、石垣 泰、金澤 智美、小川 栄作、片桐 秀樹、岡 芳知
- 髄膜腫術後に診断された多発性内分線種瘍症(MEN)1型が疑われるインスリノーマの1例
丹治 泰裕、山口 賢、山田友里恵、近藤 敬一、工藤 宏仁、石川 素子、薄井 正寛、富永 竜、長谷川 豊、石垣 泰、檜尾 好徳、片桐 秀樹、岡 芳知
- 2009 宮城県小児糖尿病サマーキャンプの報告
東海林 渉、由良有希子、藤原 幾磨、菅野 潤子、薄井 正寛、岡 芳知
- MELASと診断された後に糖尿病を発症したミトコンドリア遺伝子異常の1例
突田 壮平、片桐 秀樹、前嶋 隆平、高橋 圭、近藤 敬一、齋藤 徳郎、鈴木 俊伸、金子 慶三、長谷川 豊、宇野 健司、今井 淳太、山田 哲也、石垣 泰、荻原 健英、檜尾 好徳、岡 芳知、日高 浩史
- 多発膵腫瘍により膵全摘を余儀なくされインスリン導入となったVHL病の1例
近藤 敬一、檜尾 好徳、丹治 泰裕、工藤 宏仁、突田 壮平、石川 素子、薄井 正寛、富永 竜、長谷川 豊、山口 賢、石垣 泰、荻原 健英、片桐 秀樹、元井 冬彦、江川 新一、海野 倫明、藤島 史喜、中村 保宏、渡辺 みか、岡 芳知
- 1型糖尿病患者のインスリンアレルギーに対し抗ヒスタミン剤2剤併用が有効であった1例
金子 慶三、片桐 秀樹、前嶋 隆平、高橋 圭、近藤 敬一、突田 壮平、齋藤 徳郎、鈴木 俊伸、澤田正二郎、長谷川 豊、宇野 健司、今井 淳太、山田 哲也、石垣 泰、荻原 健英、檜尾 好徳、岡 芳知
- 化膿性骨髄炎・腎盂腎炎を合併した2型糖尿病放置症例
前嶋 隆平、片桐 秀樹、高橋 圭、近藤 敬一、突田 壮平、齋藤 徳郎、鈴木 俊伸、金子 慶三、澤田正二郎、長谷川 豊、宇野 健司、今井 淳太、山田 哲也、石垣 泰、荻原 健英、檜尾 好徳、岡 芳知
- ヘリコバクター・ピロリの除菌によりB型インスリン抵抗症の完治に成功した1例
齋藤 徳郎、片桐 秀樹、今井 淳太、山田 哲也、前嶋 隆平、高橋 圭、近藤 敬一、突田 壮平、鈴木 俊伸、金子 慶三、長谷川 豊、宇野 健司、澤田正二郎、石垣 泰、荻原 健英、檜尾 好徳、小竹 英俊、岡 芳知
- インスリン自己免疫症候群様インスリン抗体を有するも経口剤のみでコントロールできた1例

工藤 宏仁、檜尾 好徳、木下 知、藤澤 夏行、近藤 敬一、丹治 泰裕、石川 素子、薄井 正寛、富永 竜、佐竹 千尋、角田 宇衣子、鴫田 藍、山口賢、石垣 泰、片桐 秀樹、岡 芳知

- テストステロン療法が減量に奏功した低ゴナドトロピン性腺機能低下症合併の肥満症の1例
澤田正二郎、片桐 秀樹、前嶋 隆平、高橋 圭、突田 壮平、齋藤 徳郎、鈴木 俊伸、金子 慶三、長谷川 豊、宇野 健司、今井 淳太、山田 哲也、森本 玲、佐藤 文俊、伊藤 貞嘉、石垣 泰、檜尾 好徳、岡 芳知
- 糖負荷試験における血糖上昇と頸動脈血管弾性特性の検討
鴫田 藍、石垣 泰、沖本 久志、長谷川英之、小岩喜郎、加藤 真、今井 淳太、山田 哲也、檜尾 好徳、金井 浩、片桐 秀樹、佐々木 毅、岡 芳知
- 入院中に口腔環境改善を試みた治療コンプライアンスの低い2型糖尿病の1例
丹田奈緒子、檜尾 好徳、由良有希子、鷲尾 純平、高橋 信博、小関 健由、片桐 秀樹、岡 芳知
- 食事療法によるインスリン減量と血糖認識トレーニングで自覚が可能となった無自覚性低血糖
荻原 健英、片桐 秀樹、山田 哲也、今井 淳太、前嶋 隆平、高橋 圭、近藤 敬一、突田 壮平、鈴

木 俊伸、齋藤 徳郎、金子 慶三、澤田 正二郎、長谷川 豊、石垣泰、檜尾 好徳、岡 芳知

社保支払基金審査委員勉強会学術講演会 11月25日
仙台

- 糖尿病診療の課題岡 芳知

H. 知的所有権の出願・取得状況

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)

- 2009年4月21日朝刊
読売新聞「みやぎ健康寺子屋 メタボ予防は自己管理 東北大・岡教授が講演」
- 2009年4月27日
週刊医学会新聞「第106回日本内科学会/シンポジウム」
- 2009年7月19日朝刊
朝日新聞「ピロリ除菌で糖尿病完治」

膵β細胞保持機構からの治療法開発

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。我々は、このインスリン分泌亢進・膵β細胞増殖の機序として、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た。これを応用することで、インスリン分泌不全の糖尿病における再生治療につながる成果を報告した。さらにこれを発展させ、神経を直接刺激することで膵β細胞量を調節する試みを行っている。効果は弱いながらも、ラットの迷走神経を刺激することで、膵β細胞の増加・膵インスリン含量の増加を認めており、効率を上げるための条件検討を続けている。

一方、肥満者などでは、上記ように膵β細胞の代償性増殖が起こるにもかかわらず、小胞体ストレスなどの細胞内ストレス経路の活性化により、膵β細胞のアポトーシスが惹起され、最終的には膵β細胞の数の減少を伴う糖尿病が発症し進行する。WFS1は、Wolfram症候群の遺伝子異常として同定され、その異常は小胞体ストレスを増加させ、アポトーシスにより膵β細胞量が減少し糖尿病が発症するため、2型糖尿病の進行期のモデルと考えられる。今回、我々は、このWFS1欠損マウス、および、小胞体ストレス反応経路に位置するCHOPの欠損マウスを用い、このような小胞体ストレスが、血管においても動脈硬化発症に重要であり、これを軽減することで、メタボリックシンドロームなどで生じる動脈硬化の発症を遅らせることができることを見出した。このことから、糖尿病・インスリン抵抗性・メタボリックシンドロームの状態では、膵β細胞のみならず血管壁においても小胞体ストレスが惹起され、さまざまなメタボリックシンドロームの病態に関与していること、さらにその軽減は、総合的な治療法開発につながることを示すものである。

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。我々はこの機序として、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見出した（Science 2008）。

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。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。しかし、この「疲弊」した膵β細胞でさえ、上記神経ネットワーク機構により、再増殖しインスリンを十分分泌することを見出した（Science 2008）。そこで、さらにこれを発展させ、ラットを用いて、神経を直接電気刺激することで膵β細胞を増殖させる試みを行っている。

また、WFS1遺伝子の異常は、膵β細胞における小胞体ストレスを惹起させ、アポトーシスを誘導すると考えられることから、WFS1タンパクは、小胞体ストレスの消去・軽減の役割を担っていることが推測されている。我々は、独自の研究成果により、LDLの中でも酸化LDLが動脈硬化発症に関与し

（Circulation 2008）、酸化LDLは血管壁における小胞体ストレスを惹起することも見出している。

そこで我々は、血管における小胞体ストレスの動脈硬化における役割を解明するため、WFS1欠損マウスを用いて、動脈硬化の発症を検討した。本研究は、膵β細胞研究から発展したWFS1・小胞体ストレスの検討を動脈硬化の治療法開発につなげるものと考え

B. 研究方法

1. ラットを用い、腓に分布する迷走神経に直接電気刺激を行い、腓β細胞の増殖や腓におけるインスリン含量を測定する。

2. WFS1欠損マウス、および、小胞体ストレスを増強する働きがあると考えられるCHOPを欠損させ、小胞体ストレス反応を抑えたマウスを用い、apolipoprotein E欠損マウスと交配することで、高コレステロール血症モデルにおける粥状動脈硬化発症に与える影響を検討する。

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

1. 腓へ分布する迷走神経の電気刺激により、腓β細胞の若干の増加、腓におけるインスリン含量の増加を認めた。このことは、神経刺激により腓β細胞が増殖しうることを直接示したものと考えられ、意義深い。しかし、この効果は、昨年報告したアデノウイルスによる肝へ活性型MEK遺伝子導入の効果に比べれば弱いものであった。現在、電気刺激の周波数やアンプリチュード、刺激時間などのパラメーターをさまざまに試行し、さらに強い効果の出る条件を検討している。

2. apolipoprotein E欠損マウスによる粥状動脈硬化は、WFS1を欠損することで、著明に増悪した。その機序として血管内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージの相互作用による炎症性反応を亢進させることが見出され、血管壁における小胞体ストレスが動脈硬化の発症・進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、次に、小胞体ストレス反応のうち、特にアポトーシス惹起経路に位置すると考えられていたCHOPを欠損するマウスを用い、同様の実験を行ったところ、動脈硬化の進展は著明に抑制された。さらに、この機序として、意外なことに、アポトーシスの抑制以外に、小胞体ストレス反応全般の抑制・炎症の抑制が認められた。これらから、CHOPは小胞体ストレスにより誘導され、小胞体ストレス反応そのものを増幅させる役割を持つものと考えられる。

以上から、血管壁における小胞体ストレス反応は、動脈硬化発症に関与し、その抑制は、動脈硬化の発症・進展を抑える予防・治療法となることが示された。

E. 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。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、神経を刺激することでそれを人為的に調節しうることを証明しつつある。このことは、新たな視点からの糖尿病治療デバイスの開発につながるものとしてきた死される。

さらに腓β細胞の疲弊から始まった小胞体ストレス研究により、動脈硬化も同様の発症機序を持ち、小胞体ストレス軽減治療は、動脈硬化の発症・進展に対しても、効果があることが示された。小胞体ストレスの制御は、腓β細胞の保持のみならず、全身の治療・予防を考慮しても、有用な治療となるものと考えられ、開発・実践につなげていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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.
- Kaneko K, Yamada T, Tsukita S, Takahashi K, Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. (2009) Obesity Alters Circadian Expressions of Molecular Clock Genes in the Brainstem. *Brain Res* 58-68
- Katagiri H (2009) Metabolic Information Highway: Interorgan Metabolic Communication Via the Autonomic Nervous System. *Systems Biology: The Challenge of Complexity*, 221-7, Springer
- Tokita A, Ishigaki Y, Okimoto H, Hasegawa H, Koiwa Y, Kato M, Ishihara H, Hinokio Y, Katagiri H, Kanai H, Oka Y. (2009) Carotid arterial elasticity is a sensitive atherosclerosis value reflecting visceral fat accumulation in obese subjects. *Atherosclerosis* 206(1):168-72.
- Imai J, Oka Y, Katagiri H. (2009) Identification of a Novel Mechanism Regulating β Cell Mass: Neuronal relay from the Liver to Pancreatic β Cells. *Islets* 1(1) 73-5.
- Katagiri H, Imai J, Oka Y. (2009) Neural Relay from the Liver Induces Proliferation of Pancreatic β Cells: A Path to Regenerative Medicine using the Self-Renewal Capabilities. *Commun Integr Biol.* 2:425-7,

2009

- Ogihara T, Katagiri H, Yamada T, Kudo H, Imai J, Ishigaki Y, Hinokio Y, Yamagiwa Y, Ueno Y, Shimosegawa T, Oka Y Peginterferon (PEG-IFN) plus Ribavirin Combination Therapy, but neither Interferon nor PGE-IFN Alone, Apparently Induced Type 1 Diabetes in a Patient with Chronic Hepatitis C. (2009) *Internal Medicine* 48:1387-90.
- Imai J, Yamada T, Saito T, Ishigaki Y, Hinokio Y, Kotake H, Oka Y, Katagiri H (2009) Eradication of insulin resistance. *The Lancet* 374: 264.
- Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H (2009) Circulating oxidized LDL - a biomarker and a pathogenic factor. *Curr Opin Lipidol* 20(5): 363-9.
- Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T, Shimabukuro M, Sakaguchi K, Ito T, Nakagata N, Yamada T, Katagiri H, Kasuga M, Ando Y, Ogawa H, Mochizuki N, Itoh H, Oike Y (2009) Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab.* 10:178-88.
- Kadotani A, Tsuchiya Y, Hatakeyama H, Katagiri H, Kanzaki M (2009) Different Impacts of Saturated and Unsaturated Free Fatty Acids on COX-2 Expression in C2C12 Myotubes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(6):E1291-303.

2. 学会発表(シンポジウムなど)

- 片桐秀樹 Keynote Lecture 自律神経を介した臓器間代謝調節機構 Cardiovascular Diabetology Conference 2009 年1月31日 山口
- 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20-21日 松本
- 片桐秀樹 シンポジウム 膵β細胞の分化増殖と臨床展開 臓器間連関による膵β細胞再生機構 第82回日本内分泌学会学術総会 2009年4月23-25日 前橋
- 片桐秀樹 肥満・糖尿病の成因とその対策 日本内科学会東北地方会生涯教育講演会 2009年6月20日 仙台
- 片桐秀樹 シンポジウム ストレス応答の新機軸 神経系による糖・エネルギー代謝の協調的調節 第82回日本生化学会 2009年10月21-24日 神戸
- 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センターシンポジウム 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
- Katagiri H. (Invited Speaker) Symposium Brain Signaling in Glucose and Fat Metabolism. Metabolic Pathways of Neurons. American Diabetes Association, 69th Scientific Sessions, June 5-9, 2009 New Orleans, LA, USA
- Katagiri H. (Invited Speaker) Metabolic harmony via neuronal information highways. The 4th International Workshop on Cell Regulation in Division and Arrest Nov 29-Dec 3, 2009 Okinawa, Japan
- Katagiri H. Obesity induces pancreatic β cell proliferation with neuronal network originating in the liver. Tohoku University Global COE The 1st International Symposium -Challenge to Medical Innovation- Dec 7-8, 2009 Sendai, Japan

2. 知的財産権の出願・登録状況

なし

3. その他(研究に関する新聞記事等)

- 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 メディカルトピックス「インスリン分泌細胞を増やすことに成功」
- 2009年7月10日 河北新報朝刊(第1面) 東北大 糖尿病がん 国民病“完治事業”着手
- 2009年7月18日 ニュース NHK(全国) 東北大 ピロリ菌除去で糖尿病の一種が完治 など
- 2009年7月18日 産経新聞朝刊 血糖値異常の病気 ピロリ菌除菌で治癒
- 2009年7月19日 朝日新聞朝刊(第2面)ピロリ菌除菌で糖尿病が完治 東北大チーム 治療法ない特殊症例
- 2009年7月19日 読売新聞朝刊(第2面)糖尿病の一種原因にピロリ菌 東北大教授ら発表
- 2009年7月19日 Yahoo!JAPAN 主なトピックスページで紹介
- 2009年7月31日 毎日新聞朝刊(第18面)「B型インスリン抵抗症」ピロリ菌除菌で完治 東北大大学院チームが成功
- 2009年9月4日 科学新聞 膵臓のインスリン分泌細胞

を増殖させる肝臓からの神経ネットワークを発見～糖尿病の再生治療に応用性～

- 2009年10月7日Newton 2009年10月号 メディカルトピックス「ピロリ菌は胃以外にも悪さする！」
- 2009年11月19日Medical Tribune (Vol 42, No47) 「糖尿病の完治を目指して協調的代謝調節機能を生かし

た治療法に期待

- 2009年11月19日Medical Tribune (Vol 42, No47) 「H. pylori除菌でB型インスリン抵抗症が完治」

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

Wolfram症候群は若年性の視神経萎縮とインスリン依存性糖尿病を主徴とし、WFS1遺伝子の欠損により発症する。WFS1蛋白は小胞体に発現され、細胞内カルシウムホメオスターシス、小胞体ストレス応答に関与することが現在までの研究で明らかになっている。今回、我々は膵β細胞においてはWFS1蛋白が小胞体に加えて、インスリン分泌顆粒に存在するを見いだした。さらに、*wfs1*欠損マウスのβ細胞では、インスリン分泌顆粒の酸性化が障害され、同時にインスリンのプロセッシング障害や分泌顆粒の細胞内での局在の変化が観察された。インスリン分泌顆粒の酸性化はインスリンのプロセッシングに重要であると同時に、Readily Releasable Poolに属する顆粒の補充のために重要であり、インスリンのエクソサイトーシスに関与することが示唆されている。これらの知見は、WFS1蛋白のβ細胞での新たな機能を示唆するものである。

A. 研究目的

我々は、家族性の若年発症糖尿病と視神経萎縮を主徴とする Wolfram 症候群の原因遺伝子である *WFS1* を以前に同定した。原因遺伝子 *WFS1* の遺伝子産物である WFS1 蛋白は既知の蛋白とは相同性を有しない新規蛋白であり、これまでの heterologous cell を用いた検討から主に小胞体膜に存在することが明らかにされている。WFS1 蛋白は小胞体ストレス応答に関与すること、その機序として、WFS1 蛋白の欠損により小胞体へのカルシウムの再取り込みが障害にされること。また、*wfs1* 欠損マウスの解析などから、Wolfram 症候群における膵β細胞量減少とインスリン分泌障害がβ細胞における小胞体ストレス応答の異常や細胞内カルシウム動態の異常に基づくことが示唆されている。しかしながらその分子機能は今日まで十分に解明されていない。我々は WFS1 蛋白がβ細胞ではインスリン分泌顆粒にも存在していることを見出したことから、WFS1 蛋白のインスリン分泌顆粒に関連する機能について検討を行った。

B. 研究方法

膵β細胞におけるWFS1蛋白の局在について、野生型マウス膵切片に対し抗WFS1抗体を用いて免疫染色法と免疫電顕法を行うことで解析を行った。12週齢野生型および*wfs1*欠損マウスのラ氏島細胞を好酸性物質であるDAMPやLysoTracker®とインキュベーションした後にインスリン免疫染色を行った。インスリン陽性細胞における好酸性物質由来

の蛍光強度を測定することで、インスリン分泌顆粒内酸性化能を解析した。また、12週齢マウスの単離ラ氏島を用いたウェスタン解析にてインスリン、プロインスリン、PC1/3、PC2レベルについて解析を行った。さらに通常電顕にてβ細胞の分泌顆粒直径と細胞質面積あたりの数（密度）について解析した。

動物実験は、山口大学医学部における動物実験に関する倫理委員会の審査、承認を受けて行った。

C. 研究結果

免疫染色法による解析では、WFS1蛋白が野生型マウス膵β細胞において小胞体マーカー（Bip）だけでなく、分泌顆粒マーカー（Chromogranin A）と共局在することが明らかになった。さらに免疫電顕法を用いた局在解析において、*wfs1*欠損マウスβ細胞では一切のimmuno-reactivityを認めなかったが、野生型マウスβ細胞では小胞体だけでなく、分泌顆粒上にWFS1 immuno-reactivityが確認された。以上の結果から、WFS1蛋白はマウス膵β細胞において小胞体だけでなく、分泌顆粒にも局在することが判明した。金コロイド粒子を用いた免疫電顕を行い、細胞面積あたりの金コロイド粒子数を定量したところ、粒子数はβ細胞において小胞体よりも分泌顆粒上に有意に多いことが判明した。以上の結果からWFS1蛋白がβ細胞において小胞体だけでなく分泌顆粒上においても何らかの機能的意義を有する可能性が示唆された。

インスリン分泌顆粒にWFS1蛋白が豊富に存在する

ことが明らかとなり、またこれまでの報告でWFS1蛋白はイオンチャネルあるいはイオンチャネルレギュレーターとして機能することが示唆されていることから、次に*Wfs1*欠損がβ細胞分泌顆粒内酸化性能にもたらす影響についての解析を行った。*wfs1*欠損膵β細胞の好酸性物質 (DAMP、LysoTracker[®]) 由来の蛍光強度は野生型と比較して有意に低下していた。これらの結果から*wfs1*欠損β細胞では顆粒内酸化障害をきたしていることが示唆された。さらに12週齢マウス単離ラ氏島を用いたウェスタン解析では*wfs1*欠損単離ラ氏島におけるインスリン/プロインスリン比は野生型に比し有意に低下していた。またPC2レベルには有意差を認めなかったが、PC1/3レベルは*Wfs1*欠損単離ラ氏島において有意に減少していた。

これらの結果は、WFS1蛋白がインスリン顆粒の酸化化に関与し、*wfs1*欠損β細胞ではその障害のために、また、同時にPC1/3の発現低下のためにインスリンプロセッシングの障害を来していることを意味する。

12週齢*wfs1*欠損マウスにおいては、膵β細胞面積は野生型と同等であり、耐糖能障害についてもごく軽度しか認めなかったが、グルコース応答性インスリン分泌は著しく障害されていた。通常電顕法を用いた解析では、*wfs1*欠損膵β細胞における分泌顆粒の直径や密度には変化を認めなかったが、細胞膜直下のインスリン分泌顆粒 (docked granule) 密度が野生型に比し有意に減少していた。

D. 考察

本研究によりマウス膵β細胞においてWFS1蛋白がインスリン分泌顆粒にも存在することが示され、またインスリン分泌顆粒内酸化におけるWFS1蛋白の重要性が示唆された。WFS1は分泌下流の酸化化に重要である、プロトンチャネルや塩素イオンチャネルの機能と共役するのかも知れない。分泌顆粒は成熟するにつれて内部の酸化化すなわちacidificationが段階的に進むことが知られている。膵β細胞ではこのacidificationが障害されるとProhormone Convertase ファミリーに属するPC1/3、PC2の活性低下を介してインスリンプロセッシング障害をきたすとされており (Nature 333 (6168), 93-96 (1988))、*wfs1*欠損マウスで認められたプロセッシング障害に顆粒内酸化化障害が関与していることが推察される。また*wfs1*欠損マウスで認められたPC1/3発現レベル低下についてもプロセッシング障害に関与している可能性が考えられるが、PC1/3レベルが減少する正確な機序については不明であり、その解明のために今後の検討を要する。

最近の報告により、顆粒内酸化化がインスリン分泌顆粒のReadily Releasable Pool補充のために重要

であり、インスリン分泌顆粒のエクソサイトーシスやインスリン分泌に関与することが示唆されている (J Cell Sci 114: 2145-2154 (2001), Cell Metab 10: 316-323 (2009), Cell Metab 10: 309-315 (2009))。興味深いことに我々の検討においては、*wfs1*欠損β細胞のdocked granule が有意に減少していた。*wfs1*欠損マウスで認めるグルコース応答性インスリン分泌障害に、小胞体カルシウムホメオスタシスの異常に加えて、一部には顆粒内酸化化障害が関与している可能性について考えられ、興味深い所見である。今回の研究結果は、WFS1蛋白のインスリン生合成や調節性分泌に関連する機能を考える上での新たな手がかりとなる可能性があり、今後更なる検討を行っていきたい。

E. 結論

WFS1蛋白がインスリン分泌顆粒に存在し、顆粒内酸化化能維持に寄与していることが示唆された。インスリン分泌顆粒内酸化化障害に基づく膵β細胞機能障害がWolfram症候群における糖尿病発症機構の少なくとも一部である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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.
- Tanimura A, Yujiri T, Tanaka Y, Hatanaka M, Mitani N, Nakamura Y, Mori K, Tanizawa Y. The anti-apoptotic role of the unfolded protein response in Bcr-Abl-positive leukemia cells. Leuk Res 33: 924-928, 2009.
- Miyazaki M, Emoto M, Fukuda N, Hatanaka M, Taguchi A, Miyamoto S, Tanizawa Y. DOC2b is a SNARE regulator of glucose-stimulated delayed insulin secretion. Biochem Biophys Res Commun. 384:461-5, 2009.
- Kawano J, Fujinaga R, Yamamoto-Hanada K, Oka Y, Tanizawa Y, Shinoda K. Wolfram syndrome 1 (*Wfs1*) mRNA expression in the normal mouse brain during postnatal development. Neurosci Res. 64:213-230, 2009.

2. 学会発表

- Manabu Kondo, Yasuharu Ohta, Masayuki Hatanaka, Katsuya Tanabe, Yukio Tanizawa. Long-term administ Masayuki Hatanaka, Katsuya Tanabe, Yasuharu Ohta, Akie Yanai, Masaru Akiyama, Manabu Kondo, Koh Shinoda, Yoshitomo Oka, Yukio Tanizawa Wolfram Syndrome 1 Gene (wfs1) Product Localizes to Secretory Granule and Determines Acidification of Granule in Pancreatic Beta Cells. The 15th Korea-Japan Symposium on Diabetes Mellitus. Nov.20-21, 2009, Jeju, Korea.
- ration of exendin-4 improves glucose tolerance in *Wfs1*-deficient mice. The 11th Symposium on Molecular Diabetology in Asia, Dec. 19, 2009, Taipei, TAIWAN.
- 田部勝也、MA Permutt、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82回日本内分泌学会学術総会(平成21年4月23日、24日、25日 前橋市)
- 下斗米孝之、谷澤幸生、田部勝也、山田祐一郎 WFS-1遺伝子の G736D 変異を認めた Wolfram 症候群の1例 第52回日本糖尿病学会年次学術集会(平成21年5月21日、22日、23日、24日 大阪)
- 田部勝也、幡中雅行、近藤 学、太田康晴、Mashall Alan Permutt 谷澤幸生 GSK-3 β は膵 β 細胞においてインスリン情報伝達を抑制的に制御する 第52回日本糖尿病学会年次学術集会(平成21年5月21日、22

日、23日、24日 大阪)

- 幡中雅行、太田康晴、柳井章江、田部勝也、秋山 優、近藤 学、鶴 政俊、篠田 晃、谷澤幸生 WFS1蛋白はインスリン分泌顆粒に局在する 第52回日本糖尿病学会年次学術集会(平成21年5月21日、22日、23日、24日 大阪)
- 松井久未子、奥屋 茂、宮本幸子、江本政広、谷澤幸生 SNARE 結合蛋白p34 は脂肪細胞における糖輸送を調節する 第52回日本糖尿病学会年次学術集会(平成21年5月21日、22日、23日、24日 大阪)
- 幡中雅行、田部勝也、太田康晴、柳井章江、秋山 優、近藤 学、篠田 晃、岡 芳知、谷澤幸生 WFS1蛋白はインスリン分泌顆粒に局在し、顆粒内酸性化能維持に重要である 第21回分子糖尿病学シンポジウム(平成21年12月12日 和歌山市)

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

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

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

β 細胞の機能には、インスリンシグナルやCRE転写活性が大きな役割を果たしている。CRE転写活性化は、CBP-CRTC2-CREB複合体がDNAに結合することで誘導されるが、CRTC2は細胞質と核内を移動することで、この活性調節に関与している。我々は、プロリル異性化酵素Pin1が膵 β 細胞に豊富に発現していることから、これに結合するタンパクを検索したところ、CRTC2が同定された。この結合はCRTC2のリン酸化依存的であり、Pin1のWW domainとCRTC2のNLS内にある136Serを介していた。培養細胞にPin1を過剰発現させるとフォルスコリン刺激によるTORC2の核移行、CREBとの結合、プロモーター上への結合及びCRE転写活性が抑制された。また、糖尿病モデルob/obマウスにPin1を過剰発現させるとCRE関連遺伝子(PEPCK, G6Pase)の発現が抑制され、血糖値も改善された。これらの結果より、Pin1はCRTC2と結合することにより、CRE転写活性を制御し、 β 細胞におけるインスリン分泌やアポトーシスの調節に関与していると考えられた。

A. 研究目的

糖尿病の病因として、インスリンを分泌する β 細胞の減少と機能低下は極めて重要な要素である。私達は、昨年までの研究成果として、prolyl isomerase I (Pin1)がインスリンシグナルを正に制御することを見出した。 β 細胞において、インスリンシグナルが低下すると、インスリン分泌が障害されることは、海外の研究グループによって既に証明されている。

本年度、私達は、インスリンシグナルの制御に関与するPin1の発現を β 細胞において検討したところ、非常に発現量が高いことが判明した。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。しかし、Pin1が結合し、 β 細胞の機能調節に関与するタンパクが、多数、存在する可能性を考え、Pin1の結合タンパクを網羅的に検索した結果、CRTC2が同定された。そこで、Pin1とCRTC2の結合の生理的意義、さらには β 細胞における役割の解明を進めた。

B. 研究方法

Pin1のN端にmyc tag、TEV protease site、FLAG tagを取り付けたcDNAコンストラクトを作成し、これを発現するアデノウイルスを調整した。このアデノウイルスを肝臓細胞およびMIN6細胞に発現させ、tagを用いて、Pin1に結合するタンパクを分離、精製した。この分離されたタンパクを質量分析装置およびWestern blottingによる検討を行なった結果、

CRTC2が新規に β 細胞の機能に関与するPin1結合タンパクとして同定された。

Pin1がCRTC2に結合する部位の同定をmutationを作成して検討するとともに、CREの転写活性やCRTC2の細胞内局在に与えるPin1の作用を検討した。さらに、Pin1 KOマウスにおけるインスリン分泌能および、単離させたランゲルハンス島を用いて、Pin1の β 細胞における役割の解明をすすめた。

C. 研究結果

Pin1とCRTC2の結合は、Sf9細胞、HepG2細胞での過剰発現系のみならず、マウス肝においても認められた。また、この結合は脱リン酸化阻害剤オカダ酸処理により増強され、一方TORC2の脱リン酸化処理を行うことにより消失することからCRTC2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Pin1とCRTC2の結合部位について検討したところ、Pin1はN末側にあるWW domainが必要であり、CRTC2はNLSにある136Serがその結合に必要なことが明らかとなった。次に転写活性に対する影響を検討するためにCRE配列を組み込んだレポーターアッセイをおこなったところ、Pin1過剰発現により、CRTC2は細胞質に分布し、フォルスコリン(FKS)による核内への移動と、CRE転写活性化が抑制された。逆にsiRNAによるPin1ノックダウンでは増強した。また、Pin1過剰発現により、FKS刺激によるCRTC2

の核内移行、CRTC2 と CREB の結合量及び TORC2 のプロモーター上へのリクルートは減少した。さらに糖尿病モデル ob/ob マウスにおける CRE 関連遺伝子 (PEPCK, G6Pase) の発現増加はアデノウイルスによる Pin1 過剰発現により抑制され、血糖値も改善した。

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。

D. 考察

Pin1 は膵 β 細胞に豊富に発現しており、しかも高栄養状態で上昇することから、 β 細胞機能における重要性が示唆される。私達の、昨年の研究結果より、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、そして本年の結果からは Pin1 が CRTC2 に結合して、CRE 転写活性を抑制することを明らかにした。 β 細胞において、CRE 転写活性は高血糖によって抑制され、この制御が β 細胞の生存やアポトーシスに関与することが報告されている。

今回、明らかになった結果に加え、Pin1 は FOXO や RAR、cyclin D1 等の転写因子にも結合することから、 β 細胞の増殖や機能に極めて重要な役割を果たしている可能性が高く、今後、治療ターゲット分子の有望候補と考えられる。実際、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。このモデル動物を用いた β 細胞の研究からさらなる成果が期待できる状況である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- Yoneda, M., Guo, Y., Ono, H., Nakatsu, Y., Zhang, J., Cui, X., Iwashita, M., Kumamoto, S., Tsuchiya, Y., Sakoda, H., Fujishiro, M., Kushiyama, A., Koketsu, Y., Kikuchi, T., Kamata, H., Nishimura, F., and Asano, T. Decreased SIRT1 expression and LKB1 phosphorylation occurs with long-term high-fat diet feeding, in addition to AMPK phosphorylation impairment in the early phase. *Obesity Res Clin Pract.* 2010 (in press)
- Cui, X., Kushiyama, A., Yoneda, M., Nakatsu, Y., Guo, Y., Zhang, J., Ono, H., Kanna, M., Sakoda, H., Ono, H., Kikuchi, T., Fujishiro, M., Shiomi, M., Kamata, H., Kurihara, H., Kikuchi, M., Kawazu, S., Nishimura, F., and Asano, T. Macrophage foam cell formation is augmented in serum from patients with diabetic angiopathy. *Diabetes Res Clin Pract.*

87(1):57-63, 2010

- Ishii, N., Matsumura, T., Kinoshita, H., Motoshima, H., Kojima, K., Tsutsumi, A., Kawasaki, S., Yano, M., Senokuchi, T., Asano, T., Nishikawa, T., and Araki, E. Activation of AMP-activated protein kinase suppresses oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage proliferation. *J Biol Chem.* 284(50):34561-9, 2009.
- Aoki, K., Matsui, J., Kubota, N., Nakajima, H., Iwamoto, K., Takemoto, I., Tsuji, Y., Ohno, A., Mori, S., Tokuyama, K., Murakami, K., Asano, T., Aizawa, S., Tobe, K., Kadowaki, T., and Terauchi, Y. *Am. J. Physiol. Endo. Metab.* 296(4):E842-53, 2009
- Sasaki-Suzuki, N., Arai, K., Ogata, T., Kasahara, K., Sakoda, H., Chida, K., Asano, T., Pessin, J.F., Hakuno, F., and Takahashi, SI. GH inhibition of glucose uptake in adipocytes occurs without affecting GLUT4-translocation through an IRS-2-PI 3-kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 284(10):6061-70, 2009
- 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 α -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296; E157-64, 2009

2. 学会発表

- Nakatsu, Y., Sakoda, H., Kushiyama, A., Fujishiro, M., Yoneda, M., Ohno, H., Kamata, H., Uchida, T., and Asano, T. Pin1 Binds to IRS-1, and Function as a Nutrient-Sensing Enhancer of insulin Signaling 69th Scientific Sessions of American Diabetes association June 5-June 9, 2009
- Yoneda, M., Ohno, H., Nakatsu, Y., Sakoda, H., Fujishiro, M., Kushiyama, A., Kamata, H., Nishimura, F., and Asano, T. Hepatic LKB1-AMPK Pathway is Activated by Both Insulin and Energy Deficiency, and Is regulated Differently between High-Fat Diet Fed and Ob/ob Mice. 69th Scientific Sessions of American Diabetes association June 5-June 9, 2009
- Kikuchi, T., Sakoda, H., Koketsu, Y., Fujishiro, M., Kushiyama, A., Fukuda, T., Ono, H., and Asano, T. Impaired mTORc1 Stability Results in LST8 Transfer to mTORc2 and the Enhancement of Akt Phosphorylation in HepG2 Cells. 69th Scientific Sessions of American Diabetes association June 5-June 9, 2009
- 岩下未咲, 熊本園子, 迫田秀之, 櫛山暁史, 藤城緑, 中津祐介, 大野晴也, 大谷裕一郎, 土谷佳弘, 鎌田英明, 西村英紀, 浅野知一郎

LPSによる脂肪組織インスリン抵抗性へのマクロファージの関与と、ARBによるインスリン抵抗性改善作用の機序 分子糖尿病研究会 2009（和歌山）

- 浅野知一郎、米田真康、大野晴也、櫛山暁史、藤城緑、迫田秀之
慢性炎症によるインスリン抵抗性の機序（シンポジウム）日本糖尿病学会 2009（大阪）
- 大谷裕一郎，中津祐介，米田真康、迫田秀之，櫛山暁史，藤城緑，大野晴也，鎌田英明，荻原健英、内田隆史、浅野知一郎
Pin1はIRS-1結合し、インスリンシグナルを促進する。

日本糖尿病学会 2009（大阪）

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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshida S, Hirai M, Suzuki S, Awata S, <u>Oka Y.</u>	Neuropathy is associated with depression independently of health-related quality of life in Japanese patients with diabetes.	Neurosciences	63(1)	65-72	2009
Fukuda N, Emoto M, Nakamori Y, Taguchi A, Miyamoto S, Uraki S, <u>Oka Y, Tanizawa Y.</u>	DOC2B: A novel syntaxin-4 binding protein mediating insulin-regulated GLUT4 vesicle fusion in adipocytes.	Diabetes	58(2)	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, <u>Oka Y, Tanizawa Y.</u>	Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell apoptosis in Wfs1 knockout mice.	Diabetologia	52(4)	653-63	2009
Tokita A, Ishigaki Y, Okimoto H, Hasegawa H, Koiwa Y, Kato M, Ishihara H, Hinokio Y, <u>Katagiri H, Kanai H, Oka Y.</u>	Carotid arterial elasticity is a sensitive atherosclerosis value reflecting visceral fat accumulation in obese subjects.	Atherosclerosis	206	168-72	2009
Kaneko K, Yamada T, Tsukita S, Takahashi K, Ishigaki Y, <u>Oka Y, Katagiri H.</u>	Obesity Alters Circadian Expressions of Molecular Clock Genes in the Brainstem.	Brain Res	1263	58-68	2009
Kawano J, Fujinaga R, Yamamoto-Hanada K, <u>Oka Y, Tanizawa Y,</u> Shinoda K.	Wolfram syndrome 1(Wfs1) mRNA expression in the normal mouse brain during postnatal development.	Neuroscience Research	64	213-230	2009
Fujiwara M, Kobayashi T, Jomori T, Maruyama Y, <u>Oka Y,</u> Sekino H, Imai Y, Takeuchi K.	Pattern recognition analysis for ¹ H NMR spectra of plasma from hemodialysis patients.	Anal Bioanal Chem	394	1655-1660	2009
Miyake K, Yang W, Hara K, Yasuda K, Horikawa Y, Osawa H, Furuta H, CY Ng M, Hirota Y, Mori H, Ido K, Yamagata K, Hinokio Y, <u>Oka Y,</u> Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Wang H, Tanahashi T, Nakamura N, Takeda J, Maeda E, Yamamoto K, Tokunaga K, CW Ma R, S Wing-Yee, Juliana CN Chan, Kamatani N, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M.	Construction of a prediction model for type 2 diabetes mellitus in the Japanese population based on 11 genes with strong evidence of the association.	Journal of Human Genetics	54	236-241	2009
Ogihara T, <u>Katagiri H,</u> Yamada T, Kudo H, Imai J, Hinokio Y, Yamagiwa Y, Ueno Y, Shimosegawa T, <u>Oka Y.</u>	Peginterferon(PEG-IFN)Plus ribavirin combination therapy, but neither interferon nor PGE-IFN alone, induced Type 1 diabetes in a patient with chronic hepatitis C.	Internal Medicine	48	1387-1390	2009
Imai J, <u>Oka Y, Katagiri H.</u>	Identification of a novel mechanism regulating β -cell mass.	Islets	1(1)	73-75	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Imai J, Yamada T, Saito T, Ishigaki Y, Hinokio Y, Kotake H, <u>Oka Y</u> , <u>Katagiri H</u> .	Eradication of insulin resistance.	The Lancet	374	264	2009
Ishigaki Y, <u>Oka Y</u> , <u>Katagiri H</u> .	Circulating oxidized LDL-a biomarker and a pathogenic factor.	Current Opinion in Lipidology	20	363-369	2009
Ikegami Y, Inukai K, Imai K, Sakamoto Y, <u>Katagiri H</u> , Kurihara S, Awata T, Katayama S.	Adiponectin up-regulates Ferritin Heavy Chain in skeletal muscle cells.	Diabetes	58	61-70	2009
<u>Katagiri H</u> .	Metabolic Information Highway: Interorgan Metabolic Communication Via the Autonomic Nervous System.	Systems Biology: The Challenge of Complexity		221-7	2009
<u>Katagiri H</u> , Imai J, <u>Oka Y</u> .	Neural Relay from the Liver Induces Proliferation of Pancreatic β Cells: A Path to Regenerative Medicine using the Self-Renewal Capabilities.	Commun Integr Biol	2	425-7	2009
Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T, Shimabukuro M, Sakaguchi K, Ito T, Nakagata N, Yamada T, <u>Katagiri H</u> , Kasuga M, Ando Y, Ogawa H, Mochizuki N, Itoh H, Oike Y.	Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance.	Cell Metab	10	178-88	2009
Kadotani A, Tsuchiya Y, Hatakeyama H, <u>Katagiri H</u> , Kanzaki M.	Different Impacts of Saturated and Unsaturated Free Fatty Acids on COX-2 Expression in C2C12 Myotubes.	Am J Physiol Endocrinol Metab	297 (6)	E1291-303	2009
Tanimura A, Yujiri T, Tanaka Y, Hatanaka M, Mitani N, Nakamura Y, Mori K, <u>Tanizawa Y</u> .	The anti-apoptotic role of the unfolded protein response in Bcr-Abl-positive leukemia cells.	Leuk Res	33	924-928	2009
Miyazaki M, Emoto M, Fukuda N, Hatanaka M, Taguchi A, Miyamoto S, <u>Tanizawa Y</u> .	DOC2b is a SNARE regulator of glucose-stimulated delayed insulin secretion.	Biochem Biophys Res Commun	384	461-5	2009
Ishii N, Matsumura T, Kinoshita H, Motoshima H, Kojima K, Tsutsumi A, Kawasaki S, Yano M, Senokuchi T, <u>Asano T</u> , Nishikawa T, Araki E.	Activation of AMP-activated protein kinase suppresses oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage proliferation.	J Biol Chem	284 (50)	34561-9	2009
Aoki K, Matsui J, Kubota N, Nakajima H, Iwamoto K, Takemoto I, Tsuji Y, Ohno A, Mori S, Tokuyama K, Murakami K, <u>Asano T</u> , Aizawa S, Tobe K, Kadowaki T, Terauchi Y.	Role of the liver in glucose homeostasis in PI 3-kinase $p85 \alpha$ -deficient mice.	Am J Physiol Endo Metab	296 (4)	E842-53	2009