

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591308

研究課題名(和文) 膵B細胞TBP-2の耐糖能障害における役割の解明

研究課題名(英文) Role of TBP-2 of pancreatic B cells in glucose intolerance

研究代表者

藤本 新平 (Fujimoto, Shimpei)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：00333576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵B細胞でのthioredoxin-binding protein 2 (TBP-2) の生体内での制御機構と耐糖能障害における役割を解明することが目的である。肥満型糖尿病モデルob/obマウスではTBP-2が全身で過剰発現しているが、全身のTBP-2欠損により血糖値が著明に改善する。そこで膵B細胞特異的TBP-2過剰発現マウスを作製して評価した所、耐糖能に著変はなかったが、膵B細胞面積の減少を認め、膵B細胞でのTBP-2が膵B細胞量の制御に重要な役割を果たすことが示唆された。また生体内では、高脂肪食負荷による肥満よりは、高血糖が膵B細胞のTBP-2過剰発現に関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to elucidate in vivo regulation of thioredoxin-binding protein 2 (TBP-2) and roles of TBP-2 in glucose intolerance. Disruption of TBP-2 in whole body ameliorates glucose level in ob/ob mouse, a model of obese diabetes. In B cell-specific TBP-2 transgenic mice, generated in this study, glucose tolerance was not altered, but B cell area was reduced, which suggests a role of TBP-2 in regulation of B cell mass. Treatment of ob/ob mice by hypoglycemic agents and high fat diet on normal mice revealed that hyperglycemia, not obese induced by high fat diet, plays a role in overexpression of TBP-2 in B cells in vivo.

研究分野：医歯学系

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：TBP-2 糖尿病 B細胞

1. 研究開始当初の背景

Thioredoxin-binding protein 2 [TBP-2、別名 Thioredoxin-interacting protein (Txnip)]は、近年、筋肉への糖の取り込み、肝臓におけるグルコース産生、膵細胞におけるアポトーシスなど糖代謝を制御する蛋白であることが判明した。我々は、肥満型糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスでは糖代謝関連臓器で TBP-2 の過剰発現がみられたので、TBP-2 欠損マウスと交配することにより、TBP-2 の耐糖能障害における役割を明らかにすることを試みた。その結果、TBP-2 欠損により ob/ob マウスの体重減少は観察されなかったが、血糖値は野生型レベルにまで著明に改善することが明らかになった。またこの血糖改善効果は、膵細胞におけるグルコースによるインスリン分泌障害の改善と筋におけるインスリンシグナル増強によることが示された。我々は糖尿病状態における膵細胞インスリン分泌障害においては、細胞内グルコース代謝障害が重要な役割を果たすことを示しており、さらに膵細胞におけるインスリン分泌障害の機序を検討した。その結果、TBP-2 欠損は、ミトコンドリアの ATP 産生を阻害する uncoupling protein-2 (UCP-2) の過剰発現を抑制し、膵細胞内 ATP 産生障害を改善することが明らかとなった。また TBP-2 欠損による UCP-2 の過剰発現抑制効果は、これまで報告されてきた TBP-2 の Thioredoxin による活性酸素種除去能抑制効果を介するものではなく、UCP-2 の転写活性抑制を介することが示された。

2. 研究の目的

我々は TBP-2 の発現亢進が糖尿病の発症、もしくは悪化に重要な作用を持つことを明らかにしたが、糖尿病状態において生体内でどのような因子が膵細胞の TBP-2 発現を調節しているのか、また膵細胞における TBP-2 過剰発現が耐糖能障害発現にどの程度寄与しているのかは明らかでない。本研究では、膵細胞 TBP-2 の生体内での制御機構とインスリン分泌障害・耐糖能障害における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病状態において生体内における TBP-2 発現制御を担う因子の解明するため以下の実験を行なった。非肥満型糖尿病モデルとして GK ラット、肥満型糖尿病モデルとして ob/ob マウス、高脂肪食を負荷した正常マウスの糖代謝関連臓器(膵島、筋肉、肝臓)の TBP-2 の発現量を RT-PCR、ウエスタンブロットを用い mRNA、蛋白レベルで評価した。また以下の治療を行ない各臓器における TBP-2 発現量を検討した。フロリジンは、SGLT 阻害薬であり、尿細管におけるグルコースの再吸収を阻害し、尿糖を増加し血糖を降下する。これにより、インスリン作用を増強することなく血糖降下がおこり、高血糖状態除去の影響が

純粹に評価できる。フロリジン治療をおこない糖代謝関連臓器の TBP-2 発現の変化を検討した。膵細胞においてインスリンシグナルが TBP-2 の産生を抑制するとの報告もあり、インスリン治療により血糖を降下させた場合の TBP-2 発現の変化も検討した。また肥満による生体内での TBP-2 発現制御を解明するため、高脂肪食で飼育された野生型マウスの糖代謝関連臓器の TBP-2 の発現量を通常食群と比較検討し評価した。

(2) 膵細胞における TBP-2 過剰発現の耐糖能障害発現における役割を検討するため以下の方法を用いた。インスリンプロモータ下に TBP-2 が過剰発現するベクターを導入し、膵細胞特異的 TBP-2 過剰発現マウスを作製した。膵細胞特異的 TBP-2 過剰発現マウスに通常食、高脂肪食を投与し、随時血糖、体重の推移を観察し、耐糖能のスクリーニングを実施した。腹腔内グルコース(1g/kg)負荷試験、経口グルコース(2g/kg)負荷試験を実施し耐糖能を評価した。膵臓のパラフィン切片を作製し 5 μ m の連続切片でインスリン抗体を用い免疫組織染色を行ない、細胞面積を評価した。またこれらのマウスから膵島をコラゲナーゼ法で単離し、低濃度(50mg/dl)グルコース、高濃度グルコース(300mg/dl)存在下で 30 分培養し、放出されるインスリンをラジオイムノアッセイで測定し、グルコースによるインスリン分泌を評価した。

4. 研究成果

(1) 高血糖・肥満をきたしている ob/ob マウスに 7~9 日インスリン治療を実施した。随時血糖は治療なし群では 300~500mg/dl であったが、インスリン治療群では、100~200mg/dl で推移した。この条件下で膵島の TBP-2 mRNA レベルは約 75%減少したが、骨格筋・肝臓の TBP-2 蛋白レベルには有意な変化はみられなかった。また ob/ob マウスにフロリジンを 3 日間投与すると、随時血糖は治療なし群では 300~400mg/dl であったが、フロリジン投与群では、200mg/dl で推移した。この条件下で膵島の TBP-2 mRNA レベルは約 80%減少し肝臓の TBP-2 蛋白レベルも約 60%減少したが、骨格筋の TBP-2 蛋白レベルには有意な変化はみられなかった。正常マウスに通常食(脂質エネルギー比 10%)、高脂肪食(脂質エネルギー比 60%)を 15 週間負荷すると体重は通常食群 30g に対し高脂肪食群 45g となった。この条件下で膵島 TBP-2 の mRNA レベルは変化なく、骨格筋、肝臓における TBP-2 蛋白レベルにも著変はなかった。したがって肥満型糖尿病モデルの TBP-2 過剰発現において膵細胞においては高血糖が重要であることが判明した。

(2) 膵細胞特異的 TBP-2 過剰発現マウス(RIP-TBP-2 マウス)の膵島における TBP-2 の遺伝子発現は line2 では約 3 倍、line5 では約

18 倍に過剰発現していた。以下の実験は line5 を使用して実施した。膵島では蛋白レベルでも約 4 倍の TBP-2 の過剰発現がみられた。RIP-TBP-2 マウスと野生型マウスを通常食で 4~12 週齢まで観察したが、体重、随時血糖に有意な変化はなかった。また 10~14 週齢で実施した腹腔内グルコース負荷試験では負荷後 15 分、60 分の軽度の血糖上昇を認めしたが、経口グルコース負荷試験では血糖上昇に有意差はみられず、血中インスリンレベルは両負荷試験において有意差はみられなかった。膵 細胞面積は RIP-TBP-2 マウスで約 30%の減少を認めた。しかし膵島からのグルコースによるインスリン分泌に有意差は認めなかった。RIP-TBP-2 マウスと野生型マウスを高脂肪食で 6~24 週齢まで観察したが、体重、随時血糖に有意な変化はなかった。20~24 週齢で実施した腹腔内グルコース負荷試験、経口グルコース負荷試験では血糖上昇、血中インスリンレベルとも有意差はみられなかった。RIP-TBP-2 マウスにおける通常食でみられた膵 細胞面積の減少は高脂肪食ではみられなかった。膵島からのグルコースによるインスリン分泌は高脂肪食 RIP-TBP-2 マウスにおいて約 20%増加していた。

(3)結論

生体内での膵島 TBP-2 の過剰発現には肥満よりも高血糖が関与していると考えられた。また膵島 TBP-2 の過剰発現によって膵島 細胞量の減少をきたすが耐糖能低下をきたすほどではなかった。またこの膵島 細胞量の減少は肥満によるインスリン抵抗性増大による膵 細胞量の代償性増加を阻害するものでないと考えられた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 16 件)

1 Sato Y, Fujimoto S, Mukai E, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N: Palmitate induces reactive oxygen species production and β -cell dysfunction by activating NADPH oxidase via Src signaling. *J Diabetes Invest* 5:19- 26, 2014, 査読あり

DOI: 10.1111/jdi.12124

2 Sasaki M, Fujimoto S, Sato Y, Nishi Y, Mukai E, Yamano G, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Nagashima K, Inagaki N: Reduction of reactive oxygen species ameliorates metabolism-secretion coupling in islets of diabetic GK rats by suppressing lactate overproduction. *Diabetes* 62: 1996-2003, 2013, 査読あり

DOI: 10.2337/db 12-0903

3 Abudukadier A, Fujita Y, Obara A, Ohashi A, Fukushima T, Sato Y, Ogura M, Nakamura Y, Fujimoto S, Hosokawa M, Hase

gawa H, Inagaki N: Tetrahydrobiopterin has a glucose-lowering effect by suppressing hepatic gluconeogenesis in an endothelial nitric oxide synthase-dependent manner in diabetic mice. *Diabetes* 62: 3033-3043, 2013, 査読あり

DOI: 10.2337/db12-1242

4 Ishihara M, Urushido M, Hamada K, Matsumoto T, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Horino T, Fujieda M, Fujimoto S, Terada Y: Sestrin-2 and BNIP3 regulate autophagy and mitophagy in renal tubular cells in acute kidney injury. *Am J Physiol* 305:F495-F509, 2013, 査読あり

DOI: 10.1152/ajprenal.00642.2012

5 田原裕美子、藤本新平、稲垣暢也 : 酸化ストレスと膵 細胞機能、*Diabetes Frontier* 24, 527-532, 2013, 査読なし

<http://www.m-review.co.jp/>

6 Ogata K, Shimamura Y, Hamada K, Hisa M, Bun M, Okada N, Inoue K, Taniguchi Y, Ishihara M, Kagawa T, Horino T, Fujimoto S, Terada Y: Upregulation of HNF-1 during experimental acute kidney injury plays a crucial role in renal tubule regeneration. *Am J Physiol* 303: F689-F699, 2012, 査読あり

DOI: 10.1152/ajprenal.00086.2012

7 Zhao LF, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Okazaki M, Nakayama S, Kambayashi M, Fujimoto S, Hashimoto K, Muraio K, Terada Y: Liver X receptor is involved in the transcriptional regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *Diabetes* 61: 1062-1071, 2012, 査読あり

DOI:10.2337/db11-1255

8 藤本新平 : グルコースによるインスリン分泌動態 惹起経路と増幅経路、*日本臨床 70 増刊(最新臨床糖尿病学)*:104-108, 査読なし

<http://www.nippon-rinsho.co.jp/>

9 Mukai E, Fujimoto S, Sato H, Oneyama C, Kominato R, Sato Y, Sasaki M, Nishi Y, Okada M, Inagaki N: Exendin-4 suppresses Src activation and reactive oxygen species production in diabetic GK rat islets in an Epac-dependent manner. *Diabetes* 60: 218-226, 2011, 査読あり

DOI: 10.2337/db10-0021

10 Nishi Y, Fujimoto S, Sasaki M, Mukai E, Sato H, Sato Y, Tahara Y, Nakamura Y, Inagaki N: Role of mitochondrial phosphate carrier in metabolism-secretion coupling in rat insulinoma cell line INS-1. *Biochem J* 435: 421-430, 2011, 査読あり

DOI:10.1042/BJ20101708

11 Cha CY, Nakamura Y, Himeno Y, Wang J

W, Fujimoto S, Inagaki N, Earm YE, Noma A: Ionic mechanisms and Ca²⁺ dynamics underlying the glucose response of pancreatic β -cells: A simulation study. *J Gen Physiol* 138:21-37, 2011, 査読あり
DOI: 10.1085/jgp.201110611

12 Takeda Y, Amano A, Noma A, Nakamura Y, Fujimoto S, Inagaki N: Systems analysis of GLP-1 receptor signaling in pancreatic β -cells. *Am J Physiol* 301:C792-C803, 2011, 査読あり
DOI: 10.1152/ajpcell.00057.2011

13 Fujimoto S, Mukai E, Inagaki N: Role of endogenous ROS production in impaired metabolism-secretion coupling of diabetic pancreatic β cells. *Prog Biophys Mol Biol* 107: 304-310, 2011, 査読あり
DOI:10.1016/j.pbiomolbio.2011.07.013

14 Fujimoto S: Molecular mechanism of impaired metabolism-secretion coupling in diabetic pancreatic β cells. *Diabetologia* 2: 122-126, 2011, 査読なし
DOI: 10.1007/s13340-011-0040-0

15 Fujimoto S, Inagaki N: Targeting β -cell functions in therapy for type 2 diabetes. *J Diabetes Investig* 2: 178-179, 2011, 査読なし
DOI: 10.1111/j.2040-1124.2011.00117.x

16 藤本新平, 稲垣暢也: 2 型糖尿病のインスリン分泌障害において膵 β 細胞の機能低下あるいは mass の減少のどちらが重要なのか? *内分泌・糖尿病・代謝内科* 32: 399-401, 2011, 査読なし
<http://www.kahyo.com/>

〔学会発表〕(計 12 件)

1 Sato Y, Fujimoto S, Mukai E, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Ogura M, Nagashima K, Seino Y, Inagaki N: Palmitate induces ROS production and β -cell dysfunction by activating NADPH oxidase via Src signaling, American Diabetes Association, 73rd Scientific Sessions, 23 June 2013, Moscone Center, Chicago, IL, USA

2 小倉かさね, 藤本新平, 稲垣暢也 (他 9 名)、リンゴ由来プロシアンジジン類による糖尿病モデルマウスにおける抗糖尿病作用の検討、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月 18 日、ホテル日航熊本他、熊本市

3 佐藤広規, 藤本新平, 稲垣暢也 (他 9 名)、Src はグルコキナーゼ活性調節を介して膵細胞グルコース応答性インスリン分泌に関与する、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月 16 日、ホテル日航熊本他、熊本市

4 田原裕美子, 藤本新平, 稲垣暢也 (他 9 名) Thioredoxin binding protein-2(TBP-2)が膵 β 細胞で果たす役割についての検討、

第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月 16 日、ホテル日航熊本他、熊本市

5 Sasaki M, Fujimoto S, Nishi Y, Mukai E, Yamano G, Sato Y, Sato H, Tahara Y, Ogura K, Nagashima K, Inagaki N: Persistent reduction of ROS ameliorates metabolism-secretion coupling in cultured diabetic GK Islets by suppressing Warburg effect, American Diabetes Association, 72nd Scientific Sessions, 10 June 2012, McCormick Place Convention Center, Philadelphia, PA, USA

6 佐々木真弓, 藤本新平, 稲垣暢也 (他 8 名) 活性酸素種抑制による Warburg 効果改善を介する GK ラットインスリン分泌障害改善効果 癌代謝類似代謝障害制御の重要性、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月 17 日、パシフィコ横浜、横浜市

7 Fujimoto S: Metabolic dysfunction in diabetes: Metabolic pathways at the crossroads of diabetes and cancer, The 16th Japan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus, 21 October 2011, ヒルトン東京ベイ, Tokyo, Japan

8 Fujimoto S: Impaired insulin secretion due to mitochondrial dysfunction in diabetes, The 16th Japan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus, 21 October 2011, ヒルトン東京ベイ, Tokyo, Japan

9 Fujimoto S, Mukai E, Inagaki N: Role of endogenous ROS production in amelioration of impaired metabolism-secretion coupling of diabetes β -cells by augmentation of GLP-1 signals, Asia Islet Biology & Incretin Symposium (AIBIS) 2011, 21 July 2011, Crowne Plaza, Beijing, China

10 藤本新平: 受賞講演 1 (リリー賞) 糖尿病における膵 β 細胞代謝-分泌連関障害の分子機構、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月 19 日、さっぽろ芸術文化の館、札幌市

11 Fujimoto S, Mukai E, Inagaki N: Role of endogenous ROS production in metabolism-secretion coupling of pancreatic β -cells, 2011 年 5 月 19 日、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、ロイトン札幌、札幌市

12 Fujimoto S: Impaired insulin secretion due to mitochondrial dysfunction in diabetes, Croucher Foundation Advance Study Institute (ASI) on "Mitochondrial Stress in Diabetes and Aging", 29 April 2011, Mrs Chen Yang Foo Oi Telemedicine Centre, Hong Kong, China

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 新平 (FUJIMOTO, Shimpei)
高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：00333576

(2)研究分担者

稲垣 暢也 (INAGAKI, Nobuya)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30241954