

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09415

研究課題名(和文) HDL代謝賦活による膵細胞の脂肪毒性解除のストラテジー

研究課題名(英文) Therapeutic strategy for lipotoxicity of pancreatic beta-cells by activation of HDL metabolism

研究代表者

村尾 孝兎 (MURAO, Koji)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：20291982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要(和文)：糖尿病の病因的にはヘテロな集団ではあるが、日本においてはインスリンの分泌不全が重要な要因である。最近、インスリン分泌不全の原因として膵細胞においてHDL粒子にコレステロールを転送するABCA1遺伝子の発現低下による脂肪毒性が注目されている。我々は、膵細胞におけるABCA1遺伝子の発現を調節する分子メカニズムとして細胞内情報伝達系(CaMKK/CaMKIV) 転写因子(PREB)を網羅的実験手法により同定した。さらに膵細胞の脂肪毒性の解除に向けた治療として、anti-microRNA-33遺伝子を導入する新たなトランスレーショナルを検討した。

研究成果の概要(英文)：Recently, abnormalities in cholesterol metabolism have emerged as a potential contributor to beta-cell dysfunction. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), a cytoplasmic membrane protein, is a pivotal regulator of lipid efflux from cells to apolipoproteins and plays an important role in reverse cholesterol transport. Pancreatic islets isolated from ABCA1-deficient mice demonstrated altered cholesterol homeostasis and impaired insulin secretion in vitro. We have revealed the link between ABCA1 signal transduction pathway and transcriptional factor that regulated ABCA1 gene expression. Pancreatic islets isolated from these mice demonstrated altered cholesterol homeostasis and impaired insulin secretion in vitro. These results establish a new role for the ABCA1 gene in beta cell cholesterol homeostasis and insulin secretion, indicating that cholesterol accumulation may contribute to beta cell dysfunction in type 2 diabetes, so called "pancreatic lipotoxicity".

研究分野：代謝学

キーワード：糖尿病 代謝学 HDL代謝 膵細胞 脂肪毒性 トランスレーショナルリサーチ 細胞内情報伝達系  
インスリン分泌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病における膵細胞からの**インスリン分泌低下**をまねく病態として“**脂肪毒性 (lipotoxicity)**”が最近注目されている。その病態の中心である膵細胞におけるインスリン生合成低下の分子メカニズムは不明であるが、最近、膵細胞における**ATP-binding cassette transporter A1(ABCA1)**の重要性が報告された。ABCA1はコレステロールを細胞内から High density lipoprotein (HDL)へ転送する分子であり、膵細胞選択的な ABCA1 の knockout は膵細胞への脂肪の沈着 (脂肪毒性) を惹起し、グルコース応答性インスリン分泌不全をおこす。膵細胞における脂肪毒性を解除する分子ターゲットとして ABCA1 が注目されているが、その発現調節機構は不明であった。

(2) 脂肪毒性の病態の中心である膵細胞におけるインスリン生合成低下の分子メカニズムは不明であるが、**細胞内情報伝達系**が関与するとの報告がある。生体内の生命現象は、タンパク質のリン酸化反応により調節されている。このタンパク質リン酸化反応をおこなう酵素が**プロテインキナーゼ**である。**プロテインキナーゼ**は、大きく分けるとセリン・スレオニンキナーゼとチロシンキナーゼの2種類に分類することができる。我々は2種類のキナーゼの保存された触媒ドメインをもとに、セリン・スレオニンキナーゼを網羅する抗体 (Multi-PK)、チロシンキナーゼを網羅する抗体 (Multi-YK) を作成し、脂肪毒性に関連した細胞内情報伝達系に関連した分子の同定を進めてきた。

## 2. 研究の目的

(1) **膵細胞における ABCA1 発現調節と CaMKK/CaMKIV pathway の役割を明らかにする。**プロテインキナーゼの網羅的検討にて CaMKK/CaMKIV pathway が脂肪毒性にともない発現が低下し、インスリン合成分泌も減少した。細胞内情報伝達系 CaMKK/CaMKIV pathway は、ABCA1 の発現をと主調節系である。我々は膵細胞の脂肪毒性に重要な役割をになう ABCA1 は GLP-1 のアナログ Exendin-4 投与により脂肪毒性が解除されることを報告した (Li et al J Cell Mol Med 14:1083, 2010)。この機序は、Exendin-4 が CaMKK/CaMKIV pathway を活性化し、ABCA1 遺伝子発現をプロモーターレベルで刺激することであることを報告した。今回の検討では、CaMKK/CaMKIV pathway 活性化による ABCA1 遺伝子発現メカニズム解明を目指す。すでに DNA マイクロアレイで ABCA1 制御因子として転写因子 PREB を同定している

(2) 膵細胞における ABCA1 発現調節因子 PREB の役割について解明する。膵細胞における PREB による ABCA1 発現調節のメカニズムの解析をおこなう。また膵細胞における PREB 発現の意義について検討するために **PREB 過剰発現トランスジェニックマウス (PREB-Tg; 組み替え DNA 承認番号: 10219)** を作成した。PREB-Tg マウスではコントロールマ

ウスと比較して、予想通り ABCA1 の強発現が認められた。PREB-Tg マウスに高脂肪食を負荷したモデルでは、ブドウ糖負荷に対するインスリン分泌が改善し、脂肪毒性の改善が認められた。一方驚いたことには、膵ランゲルハンス島が増殖していた。そこで今回は、脂肪毒性の解除だけでなく、膵細胞の増殖メカニズムに関しても検討し、その機序を明らかにする目的である。

## 3. 研究の方法

膵細胞における脂肪毒性について細胞内情報伝達系を中心に網羅的な解析をおこなう。特に ABCA1 発現低下による脂肪毒性が膵細胞に及ぼす影響について、脂肪毒性の key molecule、ABCA1 の発現調節メカニズムを解析し、細胞内情報伝達系 CaMKK/CaMKIV pathway および転写因子 PREB による調節されるメカニズムを解析する。細胞内情報伝達系 CaMKK/CaMKIV pathway による microRNA-33 の発現調節メカニズムについて明らかにし、最終的には、microRNA-33 の発現抑制を目指した新規の遺伝子導入療法について translational research として取り組む。また PREB 遺伝子変異マウスを作成し、in vivo の系で膵細胞の脂肪毒性の解除の機序について研究をおこなう。

## 4. 研究成果

### (1) **膵細胞の脂肪毒性-インスリン分泌不全と ABCA1 発現-HDL 代謝**

糖尿病における膵細胞からの**インスリン分泌低下**をまねく病態として“**脂肪毒性 (lipotoxicity)**”が最近注目されている。その病態の中心である膵細胞におけるインスリン生合成低下の分子メカニズムは不明であるが、最近、膵細胞における**ATP-binding cassette transporter A1(ABCA1)**の重要性が報告された。ABCA1はコレステロールを細胞内から High density lipoprotein (HDL)へ転送する分子であり、膵細胞選択的な ABCA1 の knockout は膵細胞への脂肪の沈着 (脂肪毒性) を惹起し、グルコース応答性インスリン分泌不全をおこす。膵細胞における脂肪毒性を解除する分子ターゲットとして ABCA1 発現調節メカニズムとしては、calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMKIV)であることを同定した。GLP-1 による膵細胞の改善に関しては、GLP-1 受容体を介した CaMKK-CaMKIV pathway が重要であることを明らかにした。

(2) 膵細胞における脂肪毒性に関連する ABCA1 発現抑制と細胞内情報伝達系-転写因子

我々は、HDL 代謝、特に ABCA1 遺伝子発現と脂肪毒性が膵細胞に及ぼす影響について、特に**細胞内情報伝達系**に焦点をあて網羅的に検討してきた。タンパク質リン酸化反応を

おこなう酵素がプロテインキナーゼであるが、プロテインキナーゼは大きく分けると2種類に分類することができる。我々は2種類のキナーゼの保存された触媒ドメインをもとに、セリン・スレオニンキナーゼを網羅する抗体 (Multi-PK)、チロシンキナーゼを網羅する抗体 (Multi-YK) を作成した。膵細胞にコレステロールを負荷し脂肪毒性を誘導し、プロテインキナーゼの発現パターンを上記の multi-kinase 抗体で検討した。Multi-PK では、コントロールと比較して、脂肪毒性で約 200kD, 150kD, 90kD バンドが強く発現され、約 60kD のバンドが消失した。上記の変動を認めたバンドに関しては、質量分析法にて解析をおこない約 60kD は calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMKIV) であることを同定した。以前に我々は CaMKIV pathway がグルコース応答性インスリン合成を促進することを報告している。一方、細胞内情報伝達系の下流に存在する転写因子についても、膵細胞において CaMKK-CaMKIV の強発現モデルに DNA マイクロアレイを用いた網羅的な解析をおこなった (Mol Biol Evol 2013)。CaMKK-CaMKIV pathway を仲介する転写因子の候補として prolactin regulatory element binding (PREB) が抽出できた。転写因子 PREB は、膵細胞において非常に強い発現を認めインスリン遺伝子やグルコキナーゼ遺伝子のプロモーターに特異的な DNA 結合配列を認め、ABCA1 遺伝子プロモーターにも存在することをすでに報告している。膵細胞における脂肪毒性を解除する分子ターゲットとして ABCA1 が注目されているが、臨床的な役割は不明である。最近我々は、インクレチンの一つである GLP-1 が CaMKK/CaMKIV pathway を介して ABCA1 遺伝子転写を促進し、インスリン分泌能を回復することを報告し、脂肪毒性解除に向けた治療法を見いだしている。以上のことより、HDL 代謝を賦活化する ABCA1 分子をターゲットとして、膵細胞の脂肪毒性を解除する治療戦略を検討することにした。

### 3, ABCA1 を分子標的とした translational research

ABCA1 を分子標的とした translational research を検討する。ストラテジーとしては、インクレチン、GLP-1 の投与、CaMKK/CaMKIV pathway の活性化を検討したが、ABCA1 の選択的な活性化の手法が確立できていない。そこで新規転写因子 PREB に着目している。CaMKK/CaMKIV pathway の支配下にある PREB が ABCA1 遺伝子のプロモーターに結合し、ABCA1 発現を促進することが報告した。細胞内情報伝達系 CaMKK/CaMKIV pathway による ABCA1 発現増強作用と PREB による促進が相関することより、膵細胞に選択的に PREB を遺伝子導入し、ABCA1 の活性化を検討する。前実験として ABCA1 遺伝子導入よりも PREB 遺伝子導入が効率的であることが判明している。PREB 遺伝子導入法に関しては、マイクロバブルと PREB 発現ベクターでミセルを形成し、ウイルスベクターなどの外来性抗原の暴露がなく、侵襲性が少なく、臓

器選択性に遺伝子導入が可能な超音波法を利用した Ultrasonic microbubble destruction 法を検討し、臨床応用に向けた治療法の開発を行った。

### 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 11 件)

- 1, Effects of bilirubin photoisomers on the measurement of direct bilirubin by the bilirubin oxidase method.  
Okada H, Kawada K, Itoh S, Ozaki M, Kakutani I, Arai T, Koyano K, Yasuda S, Iwase T, Murao K, Kusaka T.  
Ann Clin Biochem. 2018 Mar;55(2):276-280. doi: 10.1177/0004563217716474. 査読あり
- 2, Thyroid stimulating hormone stimulates the expression of glucose transporter 2 via its receptor in pancreatic  $\beta$  cell line, INS-1 cells.  
Lyu J, Imachi H, Yoshimoto T, Fukunaga K, Sato S, Ibata T, Kobayashi T, Dong T, Yonezaki K, Yamaji N, Kikuchi F, Iwama H, Ishikawa R, Haba R, Sugiyama Y, Zhang H, Murao K.  
Sci Rep. 2018 Jan 31;8(1):1986. doi: 10.1038/s41598-018-20449-3. 査読あり
- 3, Effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors on urinary excretion of intact and total angiotensinogen in patients with type 2 diabetes.  
Yoshimoto T, Furuki T, Kobori H, Miyakawa M, Imachi H, Murao K, Nishiyama A.  
J Investig Med. 2017 Oct;65(7):1057-1061. doi: 10.1136/jim-2017-000445. 査読あり
- 4, Eicosapentaenoic acid down-regulates expression of the selenoprotein P gene by inhibiting SREBP-1c protein independently of the AMP-activated protein kinase pathway in H4IIEC3 hepatocytes.  
Tajima-Shirasaki N, Ishii KA, Takayama H, Shirasaki T, Iwama H, Chikamoto K, Saito Y, Iwasaki Y, Teraguchi A, Lan F, Kikuchi A, Takeshita Y, Murao K, Matsugo S, Kaneko S, Misu H, Takamura T.  
J Biol Chem. 2017 Jun 30;292(26):10791-10800. doi: 10.1074/jbc.M116.747006. 査読あり
- 5, Prolactin regulatory element-binding protein is involved in suppression of the adiponectin gene in vivo.  
Zhang XZ, Imachi H, Lyu JY, Fukunaga K, Sato S, Ibata T, Kobayashi T, Yoshimoto T, Kikuchi F, Dong T, Murao K.  
J Endocrinol Invest. 2017 Apr;40(4):437-445. doi: 10.1007/s12020-017-1200-0. 査読あり
- 6, Cardioprotective Effects of Serca2a Overexpression Against Ischemiareperfusion-induced Injuries in Rats.  
Jiang Y, Tian LL, Wang LH, Zhao XD, Chen JW, Murao K, Zhu W, Dong L, Wang GQ, Sun WP, Zhang GX. Curr Gene Ther. 2017;17(3):248-258.

doi: 10.2174/1566523217666171110175251. 査読あり

10.1007/s40618-016-0589-3. 査読あり

7, Recurrent convulsions, hypocalcemia, and hypoparathyroidism related to delayed diagnosis of 22q11.2 deletion syndrome in a middle-aged man. Okazaki T, Hifumi T, Ibata T, Manabe A, Hamaya H, Yoshimoto T, Imachi H, Murao K, Kawakita K, Kuroda Y.

Acute Med Surg. 2016 May 2;3(4):397-399. doi: 10.1002/ams2.216. 査読あり

8, Insulin-like Growth Factor 1 Regulates the Expression of ATP-Binding Cassette Transporter A1 in Pancreatic Beta Cells.

Lyu J, Imachi H, Iwama H, Zhang H, Murao K.

Horm Metab Res. 2016 May;48(5):338-44. doi: 10.1055/s-0035-1569272. 査読あり

9, Immunoreactive insulin in diabetes mellitus patient sera detected by ultrasensitive ELISA with thio-NAD cycling.

Ito E, Kaneda M, Kodama H, Morikawa M, Tai M, Aoki K, Watabe S, Nakaishi K, Hashida S, Tada S, Kuroda N, Imachi H, Murao K, Yamashita M, Yoshimura T, Miura T.

Biotechniques. 2015 Dec 1;59(6):359, 361-7. doi: 10.2144/000114355. 査読あり

10, Roles of lipoprotein receptors in the entry of hepatitis C virus.

Lyu J, Imachi H, Fukunaga K, Yoshimoto T, Zhang H, Murao K.

World J Hepatol. 2015 Oct 28;7(24):2535-42. doi: 10.4254/wjh.v7.i24.2535. 査読あり

11, Contribution of the renin-angiotensin system in chronic foot-shock induced hypertension in rats.

Wang LH, Dong T, Liu BB, Zhao XD, Chen JW, Murao K, Zhu W, Zhang GX.

Life Sci. 2015 Jan 15;121:135-44. doi: 10.1016/j.lfs.2014.12.004. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

1, ICT、K-MIX を介した香川県での糖尿病地域医療連携

村尾孝児、井町仁美

第 51 回糖尿病学の進歩 京都 2017 年 2 月 17 日～18 日 招待講演

2, 香川大学における生活習慣病への取り組み

村尾孝児、井町仁美

第 13 回合同地方会 岡山 2017 年 2 月 11 日～12 日 招待講演

3, 動脈硬化進展抑制を見据えた糖尿病治療について

村尾孝児

日本糖尿病学会中国四国地方第 54 回総会  
高知 2016 年 11 月 11 日～12 日

招待講演

4, 糖尿病の病態形成における HDL 代謝の関与

村尾孝児

第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会  
東京 2016 年 7 月 14 日～15 日 招待講演

5, 糖尿病・メタボリックシンドロームと動脈硬化予防

村尾孝児

第 7 回日本動脈硬化学会 市民公開講座  
高松 2016 年 4 月 24 日招待講演

6, 肝細胞における ABCA1 を介した脂肪蓄積に対する IL-1 の作用機序について

呂静雅、井町仁美、張曉舟、薫涛、福長健作、長地友紀、小林俊博、井端智裕、米崎加津子、菊池史、吉本卓生、村尾孝児

第 89 回日本内分泌学会学術総会 京都  
2016 年 4 月 21-23 日 国内学会

〔図書〕(計 3 件)

1, 新時代の臨床糖尿病学(下)

クリニカルパスの実践の現状と課題

村尾孝児、井町仁美、吉本卓生、菊池史、福長健作

7 4 巻、673-677, 2016

日本臨床

2, 新時代の臨床糖尿病学(上)

インスリン、血中 CPR、24 時間尿 CPR 排泄量、CPR インデックス

井町仁美、村尾孝児

7 4 巻、384-387, 2016

日本臨床

3, 脂質代謝異常と関連疾患(上巻)

第 9 節 SR-BI

215-220, 2015

村尾孝児、井町仁美、深田陽子、西内崇将

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村尾 孝児 (MURAO Koji)

香川大学・医学部医学研究科・教授

研究者番号：20291982

### (2) 研究分担者

井町 仁美 (IMACHI Hitomi)

香川大学・医学部医学研究科・准教授

研究者番号：80380187

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：