

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：30111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18876

研究課題名(和文)骨格筋における糖代謝調節に関わるADAM17の制御機構と生理的意義の解明

研究課題名(英文)Role of ADAM17 for glucose metabolism in skeletal muscle cells

研究代表者

高栗 郷 (Takaguri, Akira)

北海道薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90623710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋におけるインスリン情報伝達系の抑制は、インスリン抵抗性を惹起し、2型糖尿病の進展に寄与している。本研究は、インスリン情報伝達系における細胞膜メタロプロテアーゼADAM17の役割を検討した。小胞体ストレスは、細胞膜メタロプロテアーゼADAM17の活性化を介して、インスリン情報伝達系を抑制することが示唆された。また、ADAM17新規結合タンパク質GIPC1は、アンジオテンシンII受容体を介したインスリン情報伝達系抑制に関与することが示唆された。ADAM17は、インスリン情報伝達系を制御する重要な因子であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Inhibition of insulin signal transduction in skeletal muscle cell contributes to the development of type 2 diabetes. In this study, we investigated the role of a disintegrin and metalloprotease (ADAM) 17 in insulin signal transduction in skeletal muscle. Firstly, we found that ER stress induced by tunicamycin inhibits insulin signal transduction through the ADAM17 activation. Secondly, we found that GIPC1, a binding partner for ADAM17, is involved in angiotensin II-induced insulin resistance. Collectively, these data suggest that ADAM17 play a crucial role in regulation of insulin signal transduction.

研究分野：薬理学

キーワード：インスリン抵抗性 ADAM17 GIPC1 骨格筋細胞 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えている我が国において、糖尿病の有病率・罹患率はますます増加することが予想される。そのため、糖尿病三大合併症（腎症、網膜症、神経症）および糖尿病に基づく動脈硬化発症を予防する観点から、糖尿病の克服は、我が国において急務となっている。糖尿病のうち、約90%を占める2型糖尿病は、末梢組織におけるインスリン抵抗性と膵臓でのインスリン分泌不全によって、発症及び進展する。

インスリン抵抗性とは、骨格筋、脂肪細胞および肝臓において、インスリンの作用が出にくい状態のことを指す。すなわち、これら細胞におけるインスリン情報伝達系が抑制されることを意味している。肥満による脂肪細胞の肥大化は、TNF- α やインターロイキンおよびレプチンなどの種々のサイトカインの産生を亢進させる。放出されたこれらサイトカインが、糖取り込みを主に担う骨格筋や脂肪に作用し、インスリン受容体のdownregulation やインスリン受容体基質(IRS)のチロシン残基のリン酸化抑制を惹起し、最終的に糖輸送体である glucose transporter 4 (GLUT4)の細胞膜移行を障害する。

細胞膜メタロプロテアーゼ a disintegrin and metalloprotease (ADAM)17 は、細胞膜に局在する TGF- β や HB-EGF などの前駆体の細胞外ドメインを切断し、それらの成熟体を形成することで、細胞間および細胞内シグナルを制御しており、心疾患やがんの発症及び進展に関与していることが知られている。しかしながら、骨格筋におけるインスリン情報伝達系に及ぼす ADAM17 の役割は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、骨格筋細胞を用い、インスリン情報伝達系に及ぼす ADAM17 の役割と活性制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

細胞は、L6 骨格筋細胞を用いて実験を行った。10%FBS 含有 DMEM にて 80-90%コンフルエントまで培養後、2% HS 含有 DMEM にて繊維芽細胞から筋管細胞へと分化誘導を行った。

(2) タンパク質発現

RIPA バッファーを用いて、細胞抽出液を得て、SDS-PAGE 後、ウエスタンブロッティング法にてタンパク質発現およびリン酸化を検討した。

(3) 酵母ツーハイブリッド法と変異体作製

pGBKT7 に ADAM17 の細胞質ドメインをクローニングし、human universal cDNA ライブラリーを用いて、クロンテックの Matchmaker Gold Yeast Two-hybrid System の方法に従って行った。ADAM17 の細胞質欠損変異体および C 末端欠損変異体 (821E-T-E-C824) を site-directed mutagenesis kit により作製した。

(4) アデノウイルスを用いた遺伝子導入

L6 骨格筋細胞から total RNA を抽出し、逆転写にて cDNA を作製した。上記、酵母ツーハイブリッド法により同定された GIPC1 の全長を PCR 法にて増幅させ、pIRES-AcGFP ベクターにクローニングした。エンターベクターに移した後、アデノウイルスベクターとレコンビネーションさせ、HEK293A にトランスフェクションすることによりアデノウイルスを作製した。ウイルスベクターを分化した L6 骨格筋細胞に、100 MOI で感染させ、2 日後に種々のアッセイを行った。

(5) siRNA の導入

細胞を分化誘導させた後、lipofectamin RNAiMAX を用いて、invitrogen より購入した siRNA を導入し、48 時間後にアッセイを行った。

(6) 安定発現株の作製

TGF- β および HB-EGF 前駆体とその N 末端側にアルカリフォスファターゼ (AP) を融合させ、pIRES2-AcGFP ベクターにクローニングし、エレクトロポレーションを用いて、CHO-K1 細胞にこれらのベクターを導入し、G418 にて数週間セクションをかけた。それぞれの発現は、ウエスタンブロッティング法およびホルボールエステル (PMA) 刺激で ADAM17 にて切断された培地中の AP 活性の測定により確認した。

4. 研究成果

(1) 小胞体ストレスによるインスリン情報伝達系抑制に対する ADAM17 の役割

L6 骨格筋細胞に小胞体ストレス誘導剤タプシガルギン进行处理すると、インスリン刺激

による受容体以降のシグナル分子である IRS-1 のチロシンリン酸化および Akt のリン酸化が抑制された。MEK の阻害剤 U0126 前処置でこれらの抑制が解除されたことから、タブシガルギンは ERK を介してインスリン情報伝達系を抑制することが示唆された。ERK は、IRS-1 のセリンリン酸化を介して、IRS-1 のチロシン残基を抑制することから、タブシガルギンが IRS-1 のセリンリン酸化を惹起させるのかを検討した。その結果、タブシガルギンは IRS-1 の 307 部位および 636/639 部位のセリン残基のリン酸化を引き起した。次に、タブシガルギンが ADAM17 の活性化に影響するのかを検討したところ、タブシガルギンは ADAM17 の maturation およびその活性を増加させた。アデノウイルスによる ADAM17 の過剰発現下では、タブシガルギンによるインスリン情報伝達系をさらに抑制することはなかったが、ADAM17 に対する shRNA によって、ADAM17 をノックダウンすると、タブシガルギンによる ERK のリン酸化を抑制し、IRS-1 のチロシン残基のリン酸化抑制は部分的に解除された。これらの結果から、小胞体ストレスによるより惹起されるインスリン情報伝達系の抑制は、ADAM17 を部分的に介していることが示唆される。骨格筋における小胞体ストレスによる ADAM17 の活性化機構について、今後詳細に検討していく必要がある。さらに、ADAM17 が切断する際の基質がインスリン情報伝達系抑制に関わってくるのかを同定していく必要がある。

(2) ADAM17 の新規結合タンパク質の同定と機能的役割

ADAM17 の活性調節機構を明らかにするために、酵母ツーハイブリッド法を用いて ADAM17 の新規結合タンパク質の同定を試みたところ、GIPC PDZ domain containing family, member 1 (GIPC1) を同定した。ADAM17 細胞質欠損体および C 末端欠損変異体 (821E-T-E-C824) と GIPC1 との結合を免疫沈降法により確認したところ、その結合は認められなかった。従って、GIPC1 は、ADAM17 の細胞質領域 (821E-T-E-C824) が結合に必須であることを明らかとなった。さらに、AP-TGF- および AP-HB-EGF の安定発現株を用いた実験から、GIPC1 を過剰発現すると、PMA による AP 活性が増加した。これらの結果から、GIPC1 は ADAM17 の正の調節因子として機能することが示唆された。

アデノウイルスによる GIPC1 の過剰発現および GIPC1 に対する siRNA によるノックダウンは、インスリン単独処理に影響を及ぼさなかった。一方で、GIPC1 および ADAM17 のノックダウンは、アンジオテンシン受容体を介した ERK のリン酸化を抑制した。アンジオテンシン II は、ERK の活性化を介して、インスリン情報伝達系を抑制することが知られている。従って、GIPC1 は、アンジオテンシン受容体を介したインスリン情報伝達系の抑制に対する重要な調節因子であることが明らかとなった。今後、生理的な条件下において、ADAM17 の活性調節およびインスリン情報伝達系に対する GIPC1 の重要性を検討する必要がある。

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4件)【すべて査読有】

(1) Takaguri A, Kubo T, Mori M, Satoh K. : The protective role of YAP1 on ER stress-induced cell death in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.*, 815, 470-477(2017). doi:10.1016/j.ejphar.2017.09.033.

(2) Wakame K, Komatsu KI, Nakata A, Sato K, Takaguri A, Masutomi H, Nagashima T, Uchiyama H.: Transcriptome Analysis of Skin from SMP30/GNL Knockout Mice Reveals the Effect of Ascorbic Acid Deficiency on Skin and Hair. *In Vivo.*, 31(4), 599-607(2017). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28652426>

(3) Takaguri A, Inoue S, Kubo T, Satoh K. : AMPK activation by prolonged stimulation with interleukin-1 contributes to the promotion of GLUT4 translocation in skeletal muscle cells. *Cell Biol Int.*, 40(11), 1204-1211(2016). doi:10.1002/cbin.10673.

(4) Takaguri A, Morimoto M, Imai S, Satoh K. : Cilostazol inhibits interleukin-1-induced ADAM17 expression through cAMP independent signaling in vascular smooth muscle cells. *Cell Biol Int.*, 40(3), 269-276 (2016). doi:10.1002/cbin.10559.

〔学会発表〕(計8件)

(1)発表者：高栗郷、井上沙綾、今井伸一、

佐藤久美
学会の名称：日本薬学会第 136 年会
会期：2016 年 3 月 26 日（土）～29 日（火）
場所：横浜パシフィコ
発表タイトル：L6 骨格筋細胞のインスリンシグナル伝達におけるインターロイキン-1 の長時間処理の影響

(2) 発表者：久保貴司、高栗郷、井上紗綾、佐藤久美
学会の名称：日本薬学会北海道支部第 143 回例会

会期：2016 年 5 月 14 日（土）
場所：札幌
発表タイトル：L6 骨格筋細胞の GLUT4 細胞膜移行におけるインターロイキン-1 の長時間処理の影響

(3) 発表者：高栗郷、井上紗綾、久保貴司、佐藤久美
学会の名称：第 67 回日本薬理学会北部会
会期：2016 年 9 月 30 日（金）
場所：札幌
発表タイトル：Interleukin-1 長時間処理による GLUT4 トランスポーターにおける AMPK の関与

(4) 発表者：Takashi Kubo, Akira Takaguri, Kumi Satoh
学会の名称：第 90 回日本薬理学会
会期：2017 年 3 月 15 日（水）～17 日（金）
場所：長崎
発表タイトル：The role of YAP1 on ER stress-induced cell death in vascular smooth muscle cells

(5) 発表者：高栗郷、久保貴司、佐藤久美
学会の名称：日本薬学会第 137 年会
会期：2017 年 3 月 24 日（金）～27 日（月）
場所：仙台

発表タイトル：血管平滑筋細胞における ER ストレス誘導性細胞死に対する YAP1 の役割
(6) 発表者：高栗郷

学会の名称：日本薬学会北海道支部第 144 回例会
会期：2017 年 5 月 20 日（土）
場所：札幌

発表タイトル：インスリンシグナル伝達に対するサイトカインの多様な作用

(7) 発表者：久保貴司、高栗郷、佐藤久美
学会の名称：第 68 回薬理学会北部会
会期：2017 年 9 月 15 日（金）～16 日（土）
場所：山形

発表タイトル：ER ストレス誘導性細胞死に対する YAP1 の保護的役割

(8) 発表者：久保貴司、高栗郷、佐藤久美

学会の名称：日本薬学会第 138 年会
会期：2018 年 3 月 25 日（日）～28 日（水）
場所：金沢
発表タイトル：血管平滑筋細胞における YAP1 のシグナル伝達機構

6. 研究組織

(1) 研究代表者
高栗 郷 (TAKAGURI Akira)
北海道薬科大学・薬理学分野・准教授
研究者番号：90623710