

令和元年5月26日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19902

研究課題名(和文)液性因子SPARCに着目した膵ホルモンを介さない血糖調節機構

研究課題名(英文)Elucidation of the Glucose Homeostasis Mechanism Not Induced by Pancreatic Hormones by Focusing on the Pancreatic Humoral Factor SPARC

研究代表者

武田 純 (Takeda, Jun)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40270855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：オステオネクチン(SPARC)強発現マウスの肝臓では、グルコキナーゼ(GK, MODY2)、PAI-1の発現増加がみられた。既知メジャーMODYは互いに密接に連携した転写因子ネットワークを構成してインスリン分泌不全に連関するが、SPARCもこの「膵島機能ネットワーク」に属することが判明した。一方、中性脂肪含量増加によると思われる肝臓重量の増加や、空腹時および随時血糖の低下および耐糖能の改善も認められた。膵液性因子 SPARC による、「膵ホルモン(インスリン、グルカゴン)に依存しない肝の糖取込みの亢進または糖放出の抑制」と「血糖降下に誘導された体脂肪分解と肝への移行」の代謝リンクが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病に肥満の合併は高頻度であり、発症予防や治療において体脂肪の減量は重要である。特に、心血管イベントのリスク軽減では、高血糖と過体重の双方の改善が求められる。従って、インスリン分泌能の回復のみならず、2型糖尿病で障害されているインスリン・グルカゴン作用に依存しない、効率的な血糖降下と体脂肪減が同時に見込める膵液性因子SPARC治療は理想的であり、特に高齢化社会では高いニーズが見込める。さらに「分泌蛋白」はヒトにおいて血中測定や投与が比較的容易であるので、臨床応用に展開しやすい利点があり、SPARC経路は糖尿病治療薬の創薬対象になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Increased expression of glucokinase (GK, MODY2) and PAI -1, was observed in the liver of osteonectin (SPARC) -overexpressing mice. The known major MODY forms a closely linked network of transcription factors that is linked to insulin secretion failure, and SPARC has been found to belong to this "pancreatic islet functional network". On the other hand, an increase in liver weight, probably due to an increase in triglyceride content, a decrease in fasting and casual blood glucose, and an improvement in glucose tolerance were also observed. A metabolic link between "Increased hepatic glucose uptake or reduced glucose release independent of pancreatic hormones (insulin and glucagon)" and "Hypoglycemic induced lipolysis and migration to the liver" by the pancreatic humoral factor SPARC was suggested.

研究分野：糖尿病

キーワード：SPARC インスリン分泌不全 MODY インスリン抵抗性 脂肪肝 糖尿病大血管症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

若年発症糖尿病 MODY は一連の HNF 転写因子の異常で発症し、グルコースに対するインスリン分泌不全を初期の特徴とする。我々は、MODY のインスリン分泌不全のメカニズムを解明するために、原因遺伝子にコードされる HNF 転写因子の標的産物を網羅的に集積するトランスクリプトーム研究 (EST) を展開した。なかでも膵島トランスクリプトームの成果である EST シーズ解析として、血中測定や投与が容易である「分泌蛋白」の解析に着手したところ、インスリン分泌が正常である膵島と分泌能を欠失した細胞とのサブトラクションで同定した分泌蛋白オステオネクチン (SPARC) が、インスリン分泌不全の進行メカニズムの解析において重要であると考えた。そこで SPARC 強発現マウスを解析したところ、肝臓の糖取り込み亢進または糖放出抑制により、インスリン分泌に変化を与えず血糖値が低下していることを偶然見出した。体重と体脂肪の減少、高 TG 血症や肝重量の増大が観察され、血糖低下現象に誘導された脂肪分解とコンポーネントの肝臓への移行が考えられた。

2. 研究の目的

SPARC は脂肪組織でも発現しており、アディポサイトカインの一員でもある。そこで本研究では、膵島、肝、脂肪の個々の組織における、膵ホルモンを介さない SPARC 固有の役割を先ず解析する。第一に、インスリンを介さない血糖降下作用の解明である。加えて、生活習慣病をキーワードとして、組織トライアングルにおける SPARC の組織間の協調的意義を解明する。さらに、SPARC 機能におけるインスリン作用経路との協調性や独立性についても評価する。

3. 研究の方法

【SPARCの血糖降下作用と膵島における解析】

SPARC の膵β細胞自身への、オートクリン、パラクリン効果は不明である。受容体経路も不明である。そこで、インスリン産生細胞株に SPARC を強発現させたり、SPARC 培養液で処理したりして、SPARC 発現に関連したインスリン分泌調節への影響を解析する。対照細胞を併用してマイクロアレイ解析を行い、SPARC の発現の多寡が膵β細胞に及ぼす表現型の変化を包括的に解析する。

【肝細胞における解析】

肝細胞の一次培養を用いて SPARC 負荷を行い、負荷細胞と対照細胞から mRNA を抽出してマイクロアレイ解析を行い、SPARC で誘導される細胞内経路と糖脂質代謝の表現型を比較解析する。特に、肝細胞内への糖輸送と細胞内代謝、グリコーゲン合成と分解、糖新生、脂質合成に関する経路やキー分子について、mRNA 発現レベルや蛋白レベルの変化について解析する。また、肝細胞にインスリンを負荷した場合との比較解析を行い、SPARC 経路と、インスリン作用経路との共通性と固有性に関する機能を解析する。

【脂肪細胞における解析】

脂肪細胞由来の SPARC の、脂肪細胞自体へのオートクリン、パラクリン効果も不明である。3T3L1 細胞株に SPARC 負荷を行い、脂肪細胞への分化、脂肪合成や分解への影響を解析する。さらに、siRNA や抗体による抑制効果も検討し、膵島や肝細胞との表現型の相違について検討する。

【分泌蛋白と細小血管症、動脈硬化の臨床的関連解析】

細小血管症、動脈硬化との関連解析あるいは治療効果を検定するためには、病変の定量化が重要である。我々は既に冠動脈の石灰化 (CT 値 130 以上) の定量的評価法を開発している。既に約 800 名のゲノム採取とともに他の診断的意義が確立されているレプチン、アディポネクチン、アポ蛋白、高感度 CRP、TNF- α 、IL-6、PAI-1 などの液性因子を測定し、糖尿病関連データとリンクしたデータベースを作成している。

4. 研究成果

【SPARCの血糖降下作用と膵島での効果】

アデノ発現系を用いて SPARC を強発現させると、門脈経路で肝臓に置ける SPARC mRNA 発現が誘導され、血糖値の低下が生じた。興味深いことに、インスリン値には変化を認めなかった。また、SPARC 強発現マウスでは脂肪組織の萎縮および肝中性脂肪含量増加によると思われる肝臓重量の増加や、空腹時および随時血糖の低下および耐糖能の改善が認められた (右図)。

膵β細胞系細胞株である MIN6-m9 に SPARC を強発現して、INS-1、-2 と GK の mRNA レベル、2.5、25mM のブドウ糖濃度でのインスリン分泌量、細胞内 ATP 含量、乳酸含量を測定、比較検討するも

SPARC 強発現マウスの血清プロファイル

	fasted		ad.lib. Fed	
	GFP	SPARC	GFP	SPARC
insulin (ng/ml)	0.24±0.05	0.27±0.05	1.04±0.30	0.40±0.14*
SPARC (μg/ml)	0.71±0.25	40.1±6.8*	1.56±0.18	40.4±11.2*
TG (mg/dl)	129±24	156±36*	149±20	176±29*
T.Chol (mg/dl)	86±6	78±17	98.2±7.0	100.5±3.1
Glucose (mg/dl)	108±10	67±14*	132±17	103±16*
FFA (mM)	2.25±0.09	2.70±0.19*	0.83±0.24	0.98±0.38
3HB (mM)	1.62±0.12	2.24±0.71	0.38±0.19	0.39±0.15

肝臓内グリコーゲンおよび中性脂肪 (TG) 含量

	GFP	SPARC
	Liver TG (mg/g liver)	10.3±1.9
Liver glycogen (mg / g liver)	118±13	73.6±23.7*

全て有意な変化はなかった。さらに 25mM のブドウ糖で刺激して細胞内カルシウム濃度を測定したが、変化に有意差はなかった。一方、SPARC 強発現マウスでの ITT によるインスリン抵抗性指標には有意差なく、SPARC 強発現の C2C12 細胞株においてインスリン受容体シグナリング AKT リン酸化にも有意な変化は確認できなかった。

【脂肪細胞での効果】

萎縮脂肪細胞では GLUT4 やレプチンなどの成熟脂肪細胞で発現レベルの高い遺伝子の低下が認められた。SPARC を腹腔内に強発現させると、血糖低下と共に、肝臓において PAI-1 の発現が強く誘導された。このことは、メタボ病態で上昇するとされる血中 PAI-1 は、実は脂肪組織由来ではなく、膵島 SPARC による肝臓由来かもしれない。他のアディポカインも同様である。

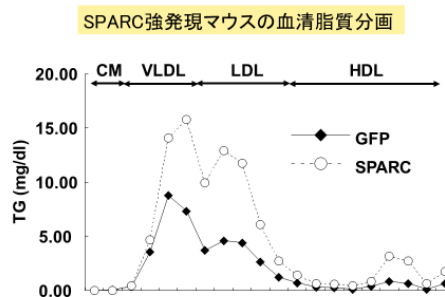
【肝臓での効果】

SPARC 強発現マウスの肝臓ではグルコキナーゼ(GK, MODY2)、PAI-1 の発現増加がみられたため(右図)単離肝細胞に Ad-SPARC を感染させ、GK の発現誘導がおこるか検討した。培養肝細胞、単離肝細胞においても GK、PAI-1 の発現誘導が認められ、これらが肝細胞における SPARC のオートクリン、パラクリン両作用の効果であることが確認できた。また高脂肪食および ob/ob マウスのみでは NASH のような繊維化を伴う脂肪肝は得られないが、これらのマウスの肝臓では SPARC の発現の上昇が認められなかった。そこで SPARC が NASH のセカンドヒット要因となる可能性を考え NASH サンプルを用いてスクリーニングした。約 100 名の NASH サンプルにてタンパク変異等の検討を行い、H211Q を含む 3 個の cSNP と 1 個の rSNP を獲得した。

SPARC 強発現マウス 肝臓における mRNA 発現変化		
		Ad SPARC/ GFP
Glycolysis	SPARC	237 ± 14.3
	GK	2.25 ± 0.09
Gluconeogenesis	G-6-Pase	0.66 ± 0.04
	PEPCK	0.33 ± 0.01
de novo lipogenesis	ACC1	1.16 ± 0.01
	FAS	1.13 ± 0.04
lipolysis	ACC2	0.99 ± 0.02
	CPT1	0.89 ± 0.04
	ACOX	0.93 ± 0.04
	COL1A1	4.24 ± 0.30
	PAI-1	12.9 ± 1.85
	TGFβ	1.08 ± 0.07

【SPARC 遺伝子多型と糖尿病関連形質との関連解析】

血中 SPARC 濃度は体重と正の相関があり、冠動脈疾患を有する患者では正常に比べ有意に高いとの報告がある。我々の解析でも血清 C ペプチド、BMI、mean IMT、PAI-1 血中濃度と有意な正の相関が認められた。アディポネクチンについては有意な負の相関が認められた。また SPARC 強発現マウスの血清脂質分画解析では、VLDL、IDL 分画の上昇と HDL 分画の低下を伴う高中性脂肪血症が認められた(右図)。2 型糖尿病患者で SPARC 全エクソンのシーケンスを終了し、3 個の cSNP を獲得している(1 個はミスセンス変異 H211Q)。レポーターアッセイにより最小プロモーター領域を決定後、転写調節領域も検討した。既に 14 個の頻度の高い(15% 以上)の iSNP を獲得した。患者 800 名、健常者 600 名の遺伝子タイピングした結果、SNP130 で糖尿病発症との関連が SNP137 で血清 SPARC 濃度との関連が認められた。



【考察】

2 型糖尿病に肥満の合併は高頻度であり、発症予防や治療において体脂肪の減量は重要である。特に、心血管イベントのリスク軽減では、高血糖と過体重の双方の改善が求められる。しかし、食事療法による体脂肪減や血糖低下には長期の努力を要し、十分な改善に至らない場合が多い。運動療法はインスリン抵抗性の改善に欠かせないが、増殖網膜症、腎障害、心機能の低下などの合併症では困難な場合が多い。従って、効率的な血糖降下と体脂肪減が同時に見込める SPARC 治療は理想的であり、特に高齢化社会では高いニーズが見込める。

2 型糖尿病の研究は、インスリンやグルカゴンの分泌・作用が中心に進んできた。また、高 TG 血症はよく観察される随伴病態であり、インスリンが関与する。本研究が提案する、膵島の液性因子(SPARC)による、「膵ホルモン(インスリン、グルカゴン)に依存しない肝の糖取込みの亢進または糖放出の抑制」と「血糖降下に誘導された体脂肪分解と肝への移行」の代謝リンクは極めて斬新である。SPARC が液性因子であるので、早期の臨床応用が望める点も特徴的である。ゲノムシーズの活用は医学研究において重要であるが、臨床応用への確かな戦略はまだ無い。「分泌蛋白」はヒトにおいて血中測定や投与が比較的容易であるので、臨床応用に展開しやすい利点がある。従って、「分泌蛋白」に特化した膵島トランスクリプトームに関する本研究は、他領域の同様の試みに対してモデル研究になる。

一方、最近 SPARC 欠失マウスが、加齢にしたがって、脂肪組織沈着の増加およびグルコース恒常性の障害を示すことや、加えて SPARC の欠失はマウスの高脂肪食誘発糖尿病を悪化させることが報告された。注目すべきことに、SPARC 欠失マウスの膵島におけるグルコース輸送体 2 (GLUT2) の発現は劇的に減少しており、SPARC 欠失がマウスにおいて糖尿病を引き起こすという最初の証拠を提供した。インスリン分泌不全という臨床像が類似する未知 MODY の原因遺伝子は、「膵島機能ネットワーク」を構成しており、SPARC もまたこのネットワークに属している。本ネットワークに属している遺伝子群から検討することが、インスリン分泌不全に関する SPARC 経路解明への最短アプローチと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. 堀川幸男
MODY 遺伝情報と臨床的知見を糖尿病日常臨床にどう活かすか?
1000 万通りの糖尿病個別化医療に向けた遺伝情報の活用のしかた
科学評論社 48: 181-187, 2019. (査読無)
2. Horikawa Y and Enya M.
Genetic dissection and clinical features of MODY6 (NEUROD1-MODY)
Curr Diab Rep 19:12., 2019 doi: 10.1007/s11892-019-1130-9. (査読有)
3. Iizuka K, Takao Y, Kato T, Horikawa Y, and Takeda J.
ChREBP reciprocally regulates liver and plasma triacylglycerol levels in different manners.
Nutrients 10. pii: E1699., 2018 doi: 10.3390/nu10111699. (査読有)
4. Horikawa Y.
Maturity-onset diabetes of the young (MODY) as a model for elucidating the multifactorial origin of type 2 diabetes mellitus.
J Diabetes Investig 9: 704-712, 2018. doi: 10.1111/jdi.12812, 2018. (査読有)
5. Hatta T, Iemura SI, Ohishi T, Nakayama H, Seimiya H, Yasuda T, Iizuka K, Fukuda M, Takeda J, Natsume T and Horikawa Y.
Calpain-10 regulates actin dynamics by proteolysis of microtubule-associated protein 1B
Sci Rep 8:16756, 2018 DOI: 10.1038/s41598-018-35204-x. (査読有)
6. Horikawa Y, Hosomichi K, Enya M, Ishiura H, Suzuki Y, Tsuji S, Sugano S, Inoue I, and Takeda J.
No novel, high penetrant gene might remain to be found in Japanese patients with unknown MODY.
J Hum Genet 63:821-829, 2018 doi.org/10.1038/s10038-018-0449-4. (査読有)
7. Kato T, Iizuka K, Takao Y, Horikawa Y, T. Kitamura, and Takeda J.
ChREBP knock-out mice show sucrose intolerance and fructose malabsorption.
Nutrients 10. pii: E340., 2018 doi:10.3390/nu10030340. (査読有)
8. Niwa H, Iizuka K, Kato T, Wu W, Tsuchida H, Takao K, Horikawa Y, and Takeda J.
ChREBP rather than SHP regulates hepatic VLDL secretion.
Nutrients 10. pii: E321. , 2018 doi:10.3390/nu10030321. (査読有)
9. Horikawa Y, Enya M, Mabe H, Fukushima K, Takubo N, Ohashi M, Ikeda F, Hashimoto K, Watada H, and Takeda J.
NEUROD1-deficient diabetes (MODY6): Identification of the first cases in Japanese and the clinical features.
Pediatr Diabetes 19: 236-242, 2018. (査読有)
10. 堀川幸男, 塩谷真由美, 武田 純.
遺伝子異常による脂質異常症.
遺伝子医学 MOOK 別冊.
最新多因子遺伝性疾患-研究と遺伝カウンセリング.メディカルドゥ社,
pp 131-137, 2018. (査読無)

[学会発表](計 17 件)

1. 塩谷真由美、酒井麻有、野々村健太、鷹尾 賢、加藤丈博、水野正巳、橋本健一、廣田卓男、飯塚勝美、諏訪哲也、堀川幸男
若年発症糖尿病 (MODY) における片親起源効果についての包括的検討
第 34 回日本糖尿病妊娠学会年次学術集会 2018 年 11 月 24 日 横浜
2. 飯塚 勝美, 加藤 丈博, 鷹尾 賢, 堀川 幸男, 北村 忠弘, 武田 純
腸内細菌叢変化に注目した ChREBP 遺伝子欠失マウスのスクロース不耐症発症機構の検討
第 5 回肝臓と糖尿病・代謝研究会 2018 年 7 月 21 日 米子
3. 加藤丈博、飯塚勝美、鷹尾 賢、土田宏美、堀川幸男、北村忠弘、武田 純
ミグリトール添加スクロース食負荷 ChREBP ノックアウトマウスは新たなフルクトース不耐症のモデルである
第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 2018 年 5 月 25 日 東京
4. 塩谷真由美、堀川幸男、水野正巳、橋本健一、廣田卓男、諏訪哲也、武田 純
単一遺伝子異常による糖尿病 (MODY) 表現型への子宮内環境の影響に関する検討
第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 2018 年 5 月 25 日 東京
5. 鷹尾 賢、飯塚勝美、加藤丈博、土田宏美、堀川幸男、武田 純
高ケトン食の安全性・有効性と ChREBP が及ぼす影響
第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 2018 年 5 月 25 日 東京
6. 堀川幸男
遺伝子異常による糖尿病
第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 教育講演 2018 年 5 月 25 日 東京
7. 加藤丈博、飯塚勝美、鷹尾 賢、土田宏美、堀川幸男、北村忠弘、武田 純
ChREBP ノックアウトマウスはスクロース不耐症のモデルマウスである
第 91 回日本内分泌学会学術総会 2018 年 4 月 26 日 宮崎
8. 鷹尾 賢、飯塚勝美、加藤丈博、土田宏美、堀川幸男、武田 純
ChREBP がケトン体代謝に及ぼす役割
第 91 回日本内分泌学会学術総会 2018 年 4 月 26 日 宮崎
9. 塩谷真由美、堀川幸男、水野正巳、橋本健一、廣田卓男、諏訪哲也、武田 純
日本人 MODY2 / 3 における parent-of origin 効果についての検討
日本人類遺伝学会 第 62 回大会 2017 年 11 月 17 日 神戸
10. 堀川 幸男、塩谷 真由美、間部 裕代、福嶋 恵、田久保 憲行、大橋 正明、池田 富貴、橋本 健一、綿田 裕孝、武田 純
日本人初の低浸透度 NEUROD1-MODY (MODY6) 症例の同定と臨床的特徴について
第 51 回 日本小児内分泌学会学術集会 2017 年 9 月 28 日 大阪
11. 塩谷真由美、堀川幸男、水野正巳、丹羽啓之、橋本健一、廣田卓男、諏訪哲也、武田 純
日本人 MODY2 の臨床像の詳細検討
第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 2017 年 5 月 20 日 名古屋
12. 橋本健一、堀川幸男、野々山由紀子、塩谷真由美、山本真由美、武田 純
HNF4-A, P2 プロモーター遺伝子多型の摂取栄養素の違いによるインスリン分泌能・感受性への影響について
第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 2017 年 5 月 20 日 名古屋
13. 堀川幸男
遺伝子異常による糖尿病
第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 教育講演 2017 年 5 月 20 日 名古屋
14. Horikawa Y
Genetic dissection of early-onset non type 1 diabetes and the clinical
第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 AASD MDIA 2017 年 5 月 20 日 名古屋

15. 丹羽啓之、飯塚勝美、鷹尾 賢、加藤丈博、ウ ウデレフ、土田宏美、堀川幸男、武田 純
肝 VLDL 分泌機構に着目した ChREBP と SHP の相互作用についての考察
第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 2017 年 5 月 18 日 名古屋
16. 加藤丈博、飯塚勝美、鷹尾 賢、土田宏美、丹羽啓之、北村忠弘、堀川幸男、武田 純
小腸と肝臓における ChREBP のフルクトース代謝への関与
第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 2017 年 5 月 19 日 名古屋
17. 鷹尾 賢、飯塚勝美、加藤丈博、土田宏美、丹羽啓之、堀川幸男、武田 純
高脂肪食誘導性肥満病態における脂質と糖質の役割の違い
第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 2017 年 5 月 19 日 名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

岐阜大学大学院医学系研究科 内分泌代謝病態学分野

<http://www.med.gifu-u.ac.jp/diabetes/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：堀川 幸男

ローマ字氏名：Horikawa Yukio

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：大学院医学系研究科 内分泌代謝病態学、医学部附属病院 医療連携センター

職名：臨床教授、准教授

研究者番号 (8 桁)：10323370

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。