

令和 3 年 8 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06952

研究課題名(和文) S-ニトロソ化を介した2型糖尿病の発症制御メカニズムと新規治療法への応用

研究課題名(英文) A novel mechanism of type 2 diabetes through S-nitrosylation and development of new therapies

研究代表者

篠崎 昇平 (Shinozaki, Shohei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：40622626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：組織特異的GSNORノックアウトマウスを用いた解析より、肝臓特異的GSNOR欠損マウスは全身のインスリン感受性が改善するのに対し、筋肉特異的GSNOR欠損マウスでは全身のインスリン抵抗性が高まることを明らかにした。GSNOR欠損マウスにインスリンクランプ法を実施し、インスリン負荷後に肝臓からのグルコース放出量が野生型と比較し有意に減っていた。しかしながら、薬剤によるGSNORの阻害では全身のインスリン感受性が低下した。GSNORには組織による役割の違いが存在し、肝臓では欠損することで全身のインスリン感受性を高めるが、筋肉では欠損していると抵抗性を高めることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで知られていた炎症がインスリン抵抗性を惹起するという知見に対し、そのメカニズムの1つであるS-ニトロソ化について着目して解析を行った。本研究ではGSNORというS-ニトロソ化を還元する酵素の1つに注目し、その機能を明らかとすることで、2型糖尿病に対する新たな治療戦略を提唱することが可能となると考えた。本研究では、GSNORには組織特異的な役割がある点を明らかにし、さらにその結果より肝臓と筋肉では反対に働くことが示唆された。今後、組織特異的に作用する薬の開発が進めば、新たな糖尿病治療薬としての標的となり得る。より体への負担の少ない薬の開発へのヒントとなると思われる。

研究成果の概要(英文)：Analysis of tissue-specific GSNOR knockout mice revealed that liver-specific GSNOR-deficient mice had improved systemic insulin sensitivity, whereas muscle-specific GSNOR-deficient mice had increased systemic insulin resistance. Insulin clamp method was performed on whole-body GSNOR-deficient mice, it revealed that the hepatic glucose output after insulin loading was significantly reduced as compared with the wild type. However, drug-induced inhibition of GSNOR reduced systemic insulin sensitivity. It was revealed that GSNOR has different roles depending on the tissue, and that deficiency in the liver increases systemic insulin sensitivity, but deficiency in muscle increases resistance.

研究分野：基礎医学

キーワード：糖尿病 一酸化窒素 S-ニトロソ化 インスリン抵抗性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症反応によって生じた NO が、S-ニトロソ化(システイン残基のチオール基に一酸化窒素 [NO] が共有結合する反応)を介して様々なタンパク質でその機能を制御していると考えられている (Hess, D.T. et al. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005)。申請者を含め多くの研究者が、脱ニトロソ化の促進による疾患の発症遅延および病態軽減への効果を調べている。これまで申請者らは、一貫して S-ニトロソ化が起こす疾患の発症メカニズムに関して研究を進めてきた (Shinozaki S, et al. Sci Signal. 2014) ほか、2 型糖尿病の発症・進展の原因として、遊離脂肪酸や炎症反応による誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現が蛋白の S-ニトロソ化を介して肝臓のインスリン抵抗性を惹き起こす新しいメカニズムを解明してきた (Shinozaki S, et al. JBC. 2011)。タンパク質の S-ニトロソ化は可逆的な反応であり、その反応には酵素を必要としない。一方、脱ニトロソ化反応を促す酵素として S-ニトロソグルタチオン還元酵素 (GSNOR) が知られている。これまでの研究において、メタボリックシンドローム (内臓脂肪型肥満) の発症メカニズムにおける S-ニトロソ化の関与を明らかとし、脱ニトロソ化の促進による疾患の発症遅延および病態軽減への効果を調べてきた。その研究の過程で作成した 2 種類のモデルマウス (S-ニトロソ化軽減 [ob/ob; iNOS-KO] マウス、促進 [ob/ob; GSNOR-KO] マウス) において、S-ニトロソ化軽減マウスでは、脂肪組織におけるインスリン抵抗性の改善の結果、ob/ob マウスよりも体重が増加することが認められた。一方、S-ニトロソ化促進マウスでは、予想に反して肝臓におけるインスリン抵抗性の改善および体重増加の抑制作用を示すことが認められた。これまで、全身の炎症反応を抑制し疾病を予防する方法を探索してきたが、モデルマウスの解析結果から、臓器によって S-ニトロソ化の持つ意味が異なる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本申請研究の目的は、S-ニトロソ化タンパクの還元に関与する GSNOR のインスリン抵抗性における役割を明らかにすることである。現在、2 型糖尿病の治療には血糖コントロールを改善するという対症療法のみしか存在せず、肝細胞の機能保護や回復に基づいた原因治療が可能な方法や薬剤の開発は遅れている。

これまで、タンパク質の S-ニトロソ化は機能の減弱やシグナル伝達の低下を招くと考えられており、申請者を含めた多くの研究者が、脱ニトロソ化の促進による発症遅延および病態軽減への効果を検討してきた。しかしながら、今回の我々の知見・発見は、これまでの考え方とは異なり、脱ニトロソ化を司る酵素 (GSNOR) を阻害することによってインスリン抵抗性が改善される可能性を提示するものである。

本申請研究期間内に、GSNOR の欠損が 2 型糖尿病発症時に肝細胞機能不全を緩和するメカニズムを解明する。そのために、マウスモデル、マウス単離肝細胞、肝細胞株を用いて、これまでの知見から推測された以下の仮説を検証する。

- 1) 遊離脂肪酸や炎症性サイトカインによる肝細胞機能不全は、GSNOR 阻害により予防できること。
- 2) GSNOR は S-ニトロソ化を介してインスリン感受性に影響を与えること。
- 3) GSNOR は DNA およびヒストンメチル化/脱メチル化酵素の活性制御に関与していること。
- 4) GSNOR の活性を正あるいは負に制御する生理的な化合物があること。

3. 研究の方法

前述の仮説を証明するために本申請研究期間内に下記の方法を用いて研究をすすめた。

A) 遊離脂肪酸や炎症性サイトカインによる肝細胞機能不全における GSNOR 役割の解明

a. レプチン・GSNOR 両欠損マウスの解析

レプチン欠損 (ob/ob) マウスは血中遊離脂肪酸の上昇、脂肪肝の発症を認める肥満糖尿病モデルマウスである。先行研究の過程で作成したレプチン・GSNOR 両欠損マウスを用いて、エネルギー代謝が ob/ob マウスと比較して亢進しているか否か確認するとともに、作出したモデルマウスについて生化学的手法を用いて解析した。

B) 飽食によるインスリン抵抗性における GSNOR 役割の解明

a. 肝臓特異的 GSNOR ノックアウトマウスの解析

高脂肪/高スクロース食などの特殊飼料を与え、肥満および炎症を誘導した状態で、肝臓特異的 GSNOR ノックアウトにおける血糖、血中インスリン、耐糖能、インスリン分泌能を評価する。また、先行研究において同定した転写因子に注目し、転写因子の S-ニトロソ化とインスリン抵抗性発症の関連について解析を行った。

b. 筋肉特異的 GSNOR ノックアウトマウスの解析

筋肉における脱ニトロソ化の抑制が、インスリン抵抗性を改善するかあるいは悪化させるか検討する。通常食で野生型との差が見られない場合は、高脂肪/高スクロース食などの特殊飼料を与えた状態で検討する。

C) GSNOR 阻害薬がインスリン抵抗性改善に与える影響

遺伝的欠損と同様に薬剤で GSNOR を阻害した際に、インスリン感受性が改善するか否かについて既存の GSNOR 阻害薬を用いて検討する。GSNOR 阻害薬は商業的に入手可能なもの (N6022, Axon Medchem) を使用した。ob/ob マウス、あるいは食事誘発性肥満マウスに投与し、その効果を検討した。

D) GSNOR 活性阻害薬・促進薬の網羅的検索

これまでに他の研究者らによって、GSNOR の活性を制御する化合物がいくつか報告されている。昭和大学薬学部の谷岡利裕講師と連携して、GSNOR の活性に影響を与える新規化合物を網羅的に検索し、解析・同定することも予定している。

4. 研究成果

A) 遊離脂肪酸や炎症性サイトカインによる肝細胞機能不全における GSNOR 役割の解明

a. レプチン・GSNOR 両欠損マウスの解析

野生型 (WT) および GSNOR-KO マウスを用いてインスリンクランプ試験を行った。その結果、当初の予想に反して、GSNOR-KO マウスにおいてインスリン感受性が有意に高かった。インスリン刺激前の肝グルコースフラックスは、GSNOR-KO マウスにおいて WT と比較し、インスリン抵抗性を示したものの、インスリン刺激後では肝グルコースフラックスが有意に低下していた (図 1)。

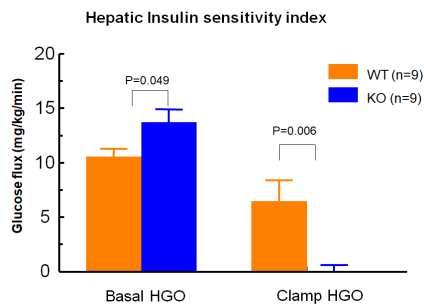


図 1) WT マウスおよび GSNOR-KO マウス肝臓におけるインスリン感受性のデータ。GSNOR-KO マウスでは、インスリン刺激前のグルコースフラックスは有意に高いが、インスリン刺激後では有意な低下が観察された。

肥満・糖尿病における反応性を見るために ob/ob マウスと GSNOR-KO マウスを掛け合わせ、ob/ob;GSNOR-KO マウス作成し、普通餌にて飼育し観察を行った。ob/ob;GSNOR-KO マウスにおいて体重の減少と血糖値の低下が観察された (図 2)。

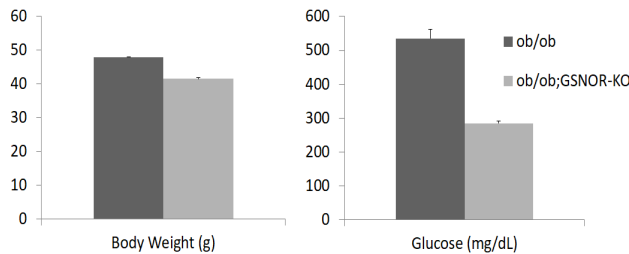


図 2) ob/ob マウスおよび ob/ob;GSNOR-KO マウスの体重と血糖値のデータ。普通餌による飼育において、ob/ob;GSNOR-KO マウスは ob/ob マウスと比較し体重および血糖値の有意な低下を観察した。

ob/ob;GSNOR-KO マウスで見られた血糖値の低下がインスリン抵抗性が改善した結果なのか調べるために、野生型 (WT)、GSNOR 欠損 (GSNOR-KO)、ob/ob マウス、ob/ob;GSNOR-KO マウスの 4 群において肝臓におけるインスリン感受性を調べた (図 3)。

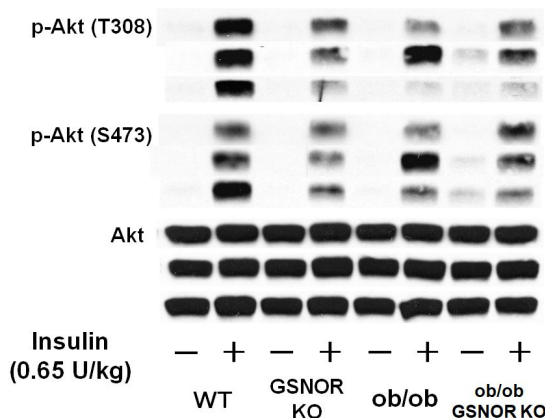


図 3) マウス肝臓におけるインスリン刺激による Akt のリン酸化のウエスタンブロットの結果。インスリン刺激によって Akt のリン酸化が観察された。総 AKT 量には違いが見られない。

インスリンシグナルの重要な分子の一つである Akt のリン酸化は、WT と比較し GSNOR-KO マウスで有意に下がっていたが、ob/ob マウスおよび ob/ob;GSNOR-KO マウスでは有意な差は見られな

かった (図 4)。

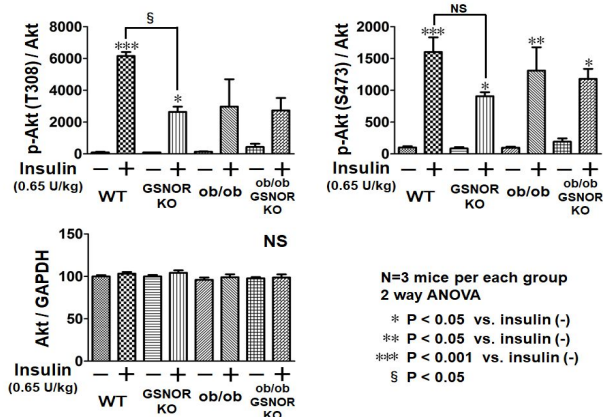


図 4) マウス肝臓におけるインスリン刺激による Akt のリン酸化の定量化の結果。WT と比較して GSNOR-KO マウスのインスリン刺激による Akt のリン酸化が有意に低下していた。ob/ob マウスおよび ob/ob;GSNOR-KO マウスでは有意な差は見られない。総 AKT 量には違いは見られない。

B) 飽食によるインスリン抵抗性における GSNOR 役割の解明

a. 肝臓特異的 GSNOR ノックアウトマウスおよび筋肉特異的 GSNOR ノックアウトマウスの解析
 実験開始当初、組織特異的 GSNOR ノックアウトマウスは普通餌で飼育し、解析していたがフェノタイプに違いが見られなかったため、高脂肪・高シュクロース食 (HFHS 食) に切り替え、肥満および炎症を惹起した状態で解析を行った。グルコース負荷試験より、筋肉特異的に GSNOR を欠損させた場合はインスリン抵抗性がみられ、肝臓特異的に GSNOR を欠損させた場合はインスリン感受性の改善が見られた (図 5)。

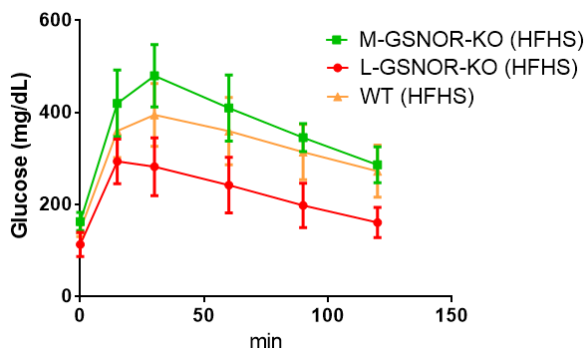


図 5) 野生型 (WT)、筋肉特異的 (M) および肝臓特異的 (L) GSNOR-KO マウスのグルコース負荷試験のデータ。肝臓特異的 GSNOR-KO マウスにおいてインスリン感受性が改善しているのに対し、筋肉特異的 GSNOR-KO マウスではインスリン感受性の低下が観察された。

C) GSNOR 阻害薬がインスリン抵抗性改善に与える影響

肥満・糖尿病を誘導した肝臓特異的 GSNOR-KO でインスリン抵抗性の改善が見られたことから、肝臓において GSNOR の働きを阻害することで、インスリン抵抗性の改善による血糖値の低下が期待できるため、市販の GSNOR 阻害薬 (N6022, Axon Medchem) を使用した。ob/ob マウスに GSNOR 阻害薬を投与し、その効果を検討した。GSNOR 阻害薬は予想とは反し、4 時間絶食時の血糖値を増加させる傾向にあった (図 6)。

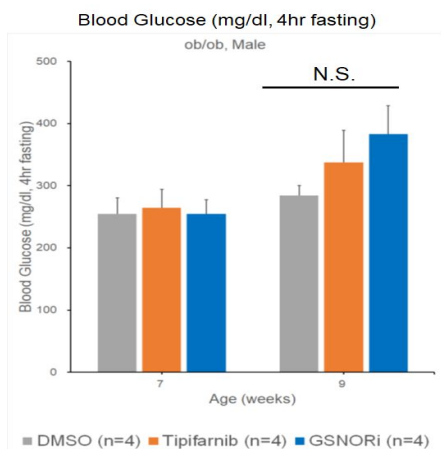


図 6) ob/ob マウスにおける GSNOR 阻害薬の効果。コントロール (DMSO)、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害薬 (Tipifarnib) および GSNOR 阻害薬 (GSNORi) は 1 日 1 回、2 週間投与した。コントロールと比較して GSNOR 阻害薬では血糖値の上昇がみられたが、有意な差はみられなかった。

D) GSNOR 活性阻害薬・促進薬の網羅的検索

本研究期間中、いくつかの阻害薬・促進薬について網羅的に検索したが、シード化合物の中には候補となる薬剤の検出には至らなかった。市販の阻害薬を用いた解析の結果より、今後は組織

特異的に作用する薬剤の検索を重点に取り組むことを検討している。

考察とまとめ

これまでの研究において、肝臓における S-ニトロソ化ストレスの上昇はインスリン抵抗性を惹起することを明らかとしてきた。GSNOR はニトロソ化タンパクを還元する作用を有することから、GSNOR の欠損によってもインスリン抵抗性が惹起されると予想していた。インスリンクランプによるインスリン感受性を調べたところ、インスリン刺激前の基礎的な状態では、インスリン抵抗性を示していたものの、インスリン刺激下では逆に野生型よりも高いインスリン感受性を示した。GSNOR-KO マウスにおいて、ベースラインにおけるインスリン抵抗性は、これまでの研究と一致していたが、インスリン刺激時の反応は予想と反する者であった。組織特異的 GSNOR ノックアウトマウスを用いた解析より、肝臓特異的 GSNOR 欠損マウスは全身のインスリン感受性が改善するのに対し、筋肉特異的 GSNOR 欠損マウスでは全身のインスリン抵抗性が高まることを明らかにした。しかしながら、薬剤による GSNOR の阻害では全身のインスリン感受性が低下した。得られた結果から、GSNOR には組織による役割の違いが存在し、肝臓では欠損することで全身のインスリン感受性を高めるが、筋肉では欠損していると抵抗性を高めることが示唆された。肝臓における GSNOR の働きを特異的に阻害することができる薬剤を開発できれば、インスリン感受性をあげる新たな治療方法の開発につながる事が考えられる。

今後、肝臓特異的 GSNOR 阻害薬の網羅的検索を進めることで、新規治療薬の開発へとつなげていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakazawa Harumasa, Ikeda Kazuhiro, Shinozaki Shohei, Yasuhara Shingo, Yu Yong-Ming, Martyn J.A. Jeevendra, Tompkins Ronald G., Yorozu Tomoko, Inoue Satoshi, Kaneki Masao	4. 巻 9
2. 論文標題 Coenzyme Q10 protects against burn-induced mitochondrial dysfunction and impaired insulin signaling in mouse skeletal muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 348 ~ 363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shohei Shinozaki
2. 発表標題 Oral intake of sulforaphane (broccoli sprouts) on androgen in middle aged male: a randomized, placebo-controlled, pilot trial
3. 学会等名 Japan Society for Biomedical Gerontology（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	谷岡 利裕 (TANIOKA TOSHIHIRO) (80360585)	昭和大学・薬学部・准教授 (32622)	
連携研究者	金木 正夫 (KANEKI MASAO) (10769615)	東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・非常勤講師 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------