

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23949

研究課題名（和文）膵 細胞増殖促進因子Serp1b1の発現制御による新たな糖尿病治療法の探索

研究課題名（英文）Exploring a regulatory mechanism of SerpinB1 expression in the liver

研究代表者

折目 和基（ORIME, Kazuki）

横浜市立大学・先端医科学研究センター・特任助教

研究者番号：60759231

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病発症の要因としてインスリン抵抗性とインスリン分泌低下が重要である。我々は代償性膵 細胞増殖に寄与する肝細胞由来の液性因子としてSerp1b1を報告しており、本研究では肝細胞におけるSerp1b1の発現調節メカニズムについて検討した。肝臓のSerp1b1の発現は、高度のインスリン抵抗性を示すdb/dbおよびob/obマウスで上昇しており、これらの血清で高値を示すインターロイキン-6(IL-6)は、JAK/STAT3経路を介してSerp1b1の発現を上昇させたことから、インスリン抵抗性下の代償性膵 細胞増殖にIL-6/JAK/STAT3経路が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病発症の原因としてインスリン抵抗性やインスリン分泌低下が挙げられる。後者の原因として、インスリンを分泌する膵 細胞の減少が報告されている。一方で糖尿病発症初期には代償性に膵 細胞が増加することも報告されており、その機序を明らかにすることにより糖尿病を治癒出来る可能性がある。本研究では肝臓から分泌され膵 細胞増殖を促進させるSerp1b1の発現上昇機構を明らかにした。この研究をより発展させることにより糖尿病で膵 細胞が減少した患者の膵 細胞量を回復し、新規の糖尿病治療法の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Insulin resistance and decreased insulin secretion are considered to be important factors of developing diabetes. We have reported a proteinase inhibitor, SerpinB1, as a novel humoral factor, which is secreted from the liver and facilitates compensatory pancreatic beta cell proliferation under insulin resistance. In this study, we investigated the mechanism by which SerpinB1 expression is induced in hepatocytes. In the liver of the db/db and ob/ob mice which exhibits severe insulin resistance, the expression levels of SerpinB1 were significantly elevated. Furthermore, an inflammatory cytokine, interleukin-6 (IL-6), the levels of which were elevated in these mice, induced SerpinB1 expression through JAK/STAT3 pathway in the liver. These results suggested that IL-6/JAK/STAT3 pathway plays an important role on the compensatory pancreatic beta cell proliferation in the liver.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 インスリン抵抗性 肝臓

#### 1. 研究開始当初の背景

世界的に2型糖尿病の患者数は過去20年間で2倍以上に増加している。新規糖尿病治療薬の開発により糖尿病治療は目覚ましい進歩を遂げているが、2型糖尿病の患者数は依然として増加の一途をたどっている。

2型糖尿病は、インスリン抵抗性とインスリン分泌障害により引き起こされる慢性高血糖を主徴とする代謝疾患であり、インスリン抵抗性は、高血糖、脂肪毒性、炎症、小胞体ストレス、およびミトコンドリア機能障害の結果として発症すると考えられている。慢性のインスリン抵抗性は膵臓の細胞機能の低下を引き起こし、細胞量の減少、インスリン分泌の低下を招く。これまでに膵細胞量の低下を克服するために、膵細胞の増殖因子に関して盛んに研究が行われており、いくつかの増殖因子が報告されている。その中で我々は肝臓由来のSerp1B1が膵細胞の増殖を促進したことを報告しているが(1)、Serp1B1の発現制御に関しては明らかにされていない。

#### 2. 研究の目的

インスリン抵抗性下で誘導される膵細胞の増殖機構の解明のために、膵細胞増殖因子とされるSerp1B1の肝臓での発現制御機構を解明する。

#### 3. 研究の方法

これまでに高度のインスリン抵抗性を示す肝臓特異的インスリン受容体ノックアウトマウスの肝臓においてSerp1B1の発現上昇を認めているがその他のインスリン抵抗性モデルでのSerp1B1の発現は検討されていないことから、過食により高度のインスリン抵抗性を呈するdb/dbやob/obマウスなどの肝臓についてもSerp1B1の発現を評価する。

次にSerp1B1の発現上昇を認めるモデルの肝細胞や血清を用いて、インスリン抵抗性に関連するサイトカイン、栄養素、ホルモンなどの発現変化を検討する。これらの中から候補となる物質を絞り込む。この候補となる物質をヒト肝細胞株や初代ヒト肝細胞に添加しSerp1B1の発現を検討する。次にルシフェラーゼアッセイによりSerp1B1の発現誘導を確認し、クロマチン免疫沈降によりSerp1B1のプロモーター領域への転写因子の結合についても検討する。

#### 4. 研究成果

高度のインスリン抵抗性を示すモデルとして、これまでに報告されていた肝臓特異的インスリン受容体ノックアウトマウス以外に過食による肥満、インスリン抵抗性、代償性の膵細胞増殖を呈するdb/dbマウス、ob/obマウスを用いて検討を行った。これらのマウスの肝臓ではSerp1B1遺伝子およびタンパク質の発現がWTマウスと比較して有意に上昇していた。db/dbまたはob/obマウスとは対照的に、軽度のインスリン抵抗性と肥満を示す食餌誘発性肥満マウス(DIO)では、肝臓でのSerp1B1の有意な発現上昇は観察されなかった。

肝臓でのSerp1B1の発現誘導は、db/dbおよびob/obマウスでも観察されたことから、これらのマウスに共通する特徴である高度のインスリン抵抗性が肝臓のSerp1B1の誘導に重要な役割を果たすと考えた。Serp1B1の発現誘導物質を特定するために、HepG2細胞で、インスリン抵抗性に関連するサイトカイン、エンドトキシン、ホルモン、代謝物などの多くの物質をスクリーニングした。多くの物質の中から、肝臓におけるSerp1B1発現の制御因子としてインターロイキン-6(IL-6)を同定した。ヒト肝細胞株であるHepG2細胞では、IL-6は時間および用量依存的にSERP1B1遺伝子発現を有意に上昇させ、そのタンパク質発現は遺伝子発現と同様であった。IL-6は、肝臓の炎症とインスリン抵抗性に関係していると報告されている他のSerpinファミリーであるSerp1A1の遺伝子発現には影響を与えなかった。

HepG2細胞は肝細胞癌由来の細胞株であるため、次に正常な肝臓細胞におけるIL-6の効果を評価するために、ヒト初代肝細胞を用いた。ヒト初代肝細胞では、IL-6は時間依存的にSERP1B1のmRNAおよびタンパク質の発現を有意に上昇させた。

SERP1B1遺伝子誘導に対するIL-6の効果を検証するために、HepG2細胞でルシフェラーゼレポーターアッセイを行い、SERP1B1のプロモーター領域を過剰発現させたHepG2細胞でIL-6によるルシフェラーゼ活性の上昇を確認した。

次に、IL-6がSerp1B1の発現を誘導するメカニズムについて検討した。IL-6/IL-6受容体/gp130の下流シグナル伝達として、JAK/STAT3経路が関与することがこれまでに報告されている(2)。したがって、我々はヒトSERP1B1プロモーター領域で転写因子であるSTAT3の結合可能部位を検索した。

ヒトSERP1B1プロモーター配列をEPDデータベースで検索し、ヒトSERP1B1プロモーター領域(-1000から+100bp)で3つの推定STAT3結合部位(-626、-436、-415)が確認

できた。STAT3 が SERPINB1 プロモーター領域に結合するかどうかを評価するために、クロマチン免疫沈降(ChIP アッセイ)を行い、SERPINB1 プロモーター領域への STAT3 の結合を 2 つの独立したプライマーセットで評価した。2 つの独立したプライマーセットともに、定常状態で STAT3 が SERPINB1 プロモーター領域に結合し、IL-6 の存在下で SERPINB1 プロモーター領域への STAT3 の結合が増強された。また、STAT3 の阻害剤による検討も行い、STAT3 阻害剤である C188-9 で HepG2 細胞を前処理することにより、IL-6 を介した SerpinB1 遺伝子およびタンパク質発現の増加が抑制された。

#### 引用文献

(1). El Ouaamari A, Dirice E, Gedeon N, Hu J, Zhou JY, Shirakawa J, Hou L, Goodman J, Karampelias C, Qiang G, Boucher J, Martinez R, Gritsenko MA, De Jesus DF, Kahraman S, Bhatt S, Smith RD, Beer HD, Jungtrakoon P, Gong Y, Goldfine AB, Liew CW, Doria A, Andersson O, Qian WJ, Remold-O'Donnell E, Kulkarni RN: SerpinB1 Promotes Pancreatic beta Cell Proliferation. *Cell metabolism* 2016;23:194-205

(2). Schmidt-Arras D, Rose-John S: IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *Journal of hepatology* 2016;64:1403-1415

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 折目和基、白川純、Rohit N Kulkarni、寺内康夫
2. 発表標題 肝臓由来膜 細胞増殖因子SerpinB1の発現調節機構とインスリン抵抗性に与える影響の解析
3. 学会等名 第34回日本糖尿病肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------