

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08531

研究課題名(和文) 膵細胞の脂肪毒性に対する脂質代謝賦活化による治療戦略

研究課題名(英文) Therapeutic strategy for pancreatic beta-cell lipotoxicity by activating lipid metabolism

研究代表者

村尾 孝児 (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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ABCA1の機能低下は膵細胞に脂質の蓄積をもたらし、結果的にはインスリン分泌に低下につながる。女性ホルモンがABCA1発現を促進することより、その代謝産物の中で、2-Methoxyestradiol (2-ME)がABCA1発現を促進することを見出した。2-MEはABCA1プロモーター活性を増強したが、この効果はPI3K経路を阻害した後に減少した。ABCA1プロモーター領域のFoxO1結合部位を変異させるか、FoxO1特異的siRNAで処理すると、ABCA1発現に対する2-ME2の効果が失われた。またOxLDLは逆にABCA1遺伝子の発現を抑制し膵細胞におけるインスリン分泌を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、膵細胞のコレステロール含量を調節するABCA1の発現調節メカニズムを解明し、コレステロール蓄積によるインスリン分泌不全のメカニズムを網羅的に解析し、最終的にはHDL代謝、ABCA1代謝を賦活することによる膵細胞の脂肪毒性解除を目指した新たな治療ストラテジを確立することにある。

研究成果の概要(英文)：The reduced function of ABCA1 leads to lipid accumulation in pancreatic -cells, which ultimately leads to reduced insulin secretion. Lipotoxicity is thought to be the cause of impaired glucose tolerance due to reduced glucose-responsive insulin secretion. Since female hormones promote ABCA1 expression, we comprehensively investigated the metabolites of female hormones. Among the metabolites, we found that 2-Methoxyestradiol (2-ME) promoted ABCA1 expression. 2-ME enhanced ABCA1 promoter activity, but this effect was reduced after inhibition of the PI3K pathway. Furthermore, 2-ME stimulated rapid phosphorylation of Akt and FoxO1 and reduced nuclear accumulation of FoxO1. Mutation of the FoxO1-binding site in the ABCA1 promoter or treatment with FoxO1-specific siRNA abolished the effect of 2-ME2 on ABCA1 expression, and OxLDL conversely downregulated ABCA1 gene expression and inhibited insulin secretion in pancreatic -cells.

研究分野：代謝

キーワード：ABCA1 HDL インスリン OxLDL 2-Methoxyestradiol promoter LXR FoxO1

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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。

2. 研究の目的

膵細胞における脂肪毒性がグルコース応答性インスリン分泌を低下せる機序が学術的な問いであり、分子ターゲットとして ABCA1 に着目し、その発現機序を解明し新たな治療方法へ繋げる。女性ホルモンが ABCA1 発現を促進することより、女性ホルモンの代謝産物を網羅的に検討した。その代謝産物の中で、2-Methoxyestradiol(2-ME)が ABCA1 発現を促進することを見出し、分子機構について検討をおこなった。

3. 研究の方法

(1) 膵細胞株への脂肪毒性の誘導をおこなう。ABCA1 遺伝子を knock-down した細胞にコレステロールを負荷し、脂肪毒性を誘導する。この細胞でのインスリン分泌能について検討し、インスリン分泌が低下することを確認した。コントロール細胞と脂肪毒性を認めた細胞をメタボローム解析し、代謝産物の相違について解析する (図 3)。

(2) GLP-1 analog, Exendin-4 を作用させることで ABCA1 遺伝子発現が増強することを確認する。脂肪毒性を有した膵細胞株に Exendin-4 を添加し、ABCA1 遺伝子の増加およびコレステロール含量の低下を検証する。また 2 つの細胞をメタボローム解析し、代謝カスケードの変化について検討し、脂肪毒性の解除のための代謝調節機序を検討する。

(3) ABCA1 promoter の deletion mutant を作成し、FoxO1, LXR に応答する領域を同定する。FoxO1 CA の遺伝子導入と reporter assay で確認する。

(4) 応答する ABCA1 promoter 領域の sequence と既知のコンセンサス sequence をもとに開発した DNA 解析ソフトで結合する転写因子を割り出す。

(5) 候補遺伝子について ChIP assay を用いて ABCA1 promoter の結合を確認する。

4. 研究成果

(1) 2-Methoxyestradiol(2-ME)は ABCA1 発現を促進した。

女性ホルモンが ABCA1 発現を促進することより、女性ホルモンの代謝産物を網羅的に検討した。その代謝産物の中で、2-Methoxyestradiol(2-ME)が ABCA1 発現を促進することを見出した。2-ME は ABCA1 プロモーター活性を増強したが、この効果は PI3K 経路を阻害した後に減少した。Akt または p110 の過剰発現は ABCA1 プロモーター活性を誘導し、ドミナントネガティブ Akt は 2-ME2 による ABCA1 プロモーター活性の阻害作用を示した。さらに、2-ME は Akt と FoxO1 の急速なリン酸化を刺激し、FoxO1 の核内蓄積を減少させた。クロマチン免疫沈降法では、FoxO1 が ABCA1 プロモーター領域に結合していることが確認された。ABCA1 プロモーター領域の FoxO1 結合部位を変異させるか、FoxO1 特異的 siRNA で処理すると、ABCA1 発現に対する 2-ME2 の効果が失われた。

(2) OxLDL は ABCA1 発現を抑制し、インスリン分泌を抑制する。

インスリン分泌障害は、2 型糖尿病の主な原因の 1 つである。コレステロール蓄積誘発性脂肪毒性は、膵臓ベータ細胞におけるインスリン分泌障害に寄与している。本研究では、酸化

低密度リポタンパク質(OxLDL)がインスリン含有量を減少させ、PDX-1 発現を低下させ、INS-1 細胞におけるグルコース刺激インスリン分泌(GSIS)を障害し、高密度リポタンパク質(HDL)の添加によって回復したことを証明した。OxLDL 受容体とコレステロール含有量は、OxLDL によって増加した。一貫して、OxLDL は用量依存的かつ時間依存的にコレステロールトランスポーター-ABCA1 の発現と転写を抑制した。MEK をその特異的阻害剤 PD98059 で阻害すると、OxLDL の ABCA1 転写と ERK の活性化に対する効果が変化した。次に、クロマチン免疫沈降アッセイにより、肝臓 X 受容体(LXR)が ABCA1 プロモーターに直接結合し、この結合が OxLDL によって阻害されることが実証された。さらに、OxLDL は核 LXR 発現を減少させたが、これは HDL によって妨げられた。LXR 増強による ABCA1 転写は OxLDL によって抑制され、その効果は LXR 結合部位の変異によって打ち消された。要約すると、私たちの研究は、OxLDL が MEK/ERK/LXR 経路によって ABCA1 発現をダウンレギュレーションし、INS-1 細胞でのコレステロール蓄積につながり、インスリン合成と GSIS の障害につながる可能性があることを示している。

(3)GLP-1 は ABCA1 発現を促進する

GLP-1 は、Ca²⁺/カルモジュリン(CaM)依存性タンパク質キナーゼキナーゼ/CaM 依存性タンパク質キナーゼ IV(CaMKK/CaMKIV)経路を介して肝臓 ABCA1 の発現と転写を刺激したが、GLP-1 受容体拮抗薬エキセンディン 9-39 はこの効果を打ち消した。したがって、GLP-1 は肝臓脂質含有量を減少させた。ChIP は、PREB が ABCA1 プロモーターに直接結合し、それが GLP-1 によって強化されることを示した。さらに、PREB は ABCA1 プロモーター活性を刺激し、ABCA1 プロモーターの PREB 結合部位の変異は、GLP-1 によって強化された ABCA1 プロモーター活性を打ち消した。PREB のサイレンシングは GLP-1 の効果を減弱させ、肝臓コレステロール蓄積を誘発した。STO-609 または siRNA による CaMKK の遮断は、GLP-1 によって誘発された ABCA1 および PREB の上方制御を打ち消した。生体内では、GLP-1 または PREB の過剰発現により肝臓 ABCA1 発現が増加し、HFD によって引き起こされる脂質蓄積と高血漿コレステロールが減少した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Lyu J, Imachi H, Fukunaga K, Sato S, Kobayashi T, Saheki T, Japar S, Iwama H, Matsumura Y, Ozaki M, Yoshimura T, Murao K	4. 巻 44
2. 論文標題 Exendin-4 Increases Scavenger Receptor Class BI Expression via Activation of AMPK/FoxO1 in Human Vascular Endothelial Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Curr Issues Mol Biol	6. 最初と最後の頁 5474-5484
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cimb44110370	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 -
1. 著者名 Japar S, Fukunaga K, Kobayashi T, Imachi H, Sato S, Saheki T, Ibata T, Yoshimura T, Soh KL, Ong SL, Muhamed Z, Murao K	4. 巻 14
2. 論文標題 A pilot study on the effect of D-allulose on postprandial glucose levels in patients with type 2 diabetes mellitus during Ramadan fasting	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetol Metab Syndr	6. 最初と最後の頁 86-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13098-022-00856-3	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 -
1. 著者名 Ibata T, Lyu J, Imachi H, Fukunaga K, Sato S, Kobayashi T, Saheki T, Yoshimura T, Murao K	4. 巻 14
2. 論文標題 Effects of 2-Methoxyestradiol, a Main Metabolite of Estradiol on Hepatic ABCA1 Expression in HepG2 Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 288-296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu14020288	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 -
1. 著者名 Tomohiro Ibata 1, Jingya Lyu 1 2, Hitomi Imachi 1, Kensaku Fukunaga 1, Seisuke Sato 1, Toshihiro Kobayashi 1, Takanobu Saheki 1, Takafumi Yoshimura 1, Koji Murao	4. 巻 14
2. 論文標題 Effects of 2-Methoxyestradiol, a Main Metabolite of Estradiol on Hepatic ABCA1 Expression in HepG2 Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 288-301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu14020288	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 -

1. 著者名 Yin Xue-Min, Song Yi-Yi, Jiang Wen-Yi, Zhang Hao-Tian, Chen Jing-Wei, Murao Koji, Han Meng-Xiao, Sun Wan-Ping, Zhang Guo-Xing	4. 巻 34
2. 論文標題 Mitochondrial KATP channel-mediated autophagy contributes to angiotensin II-induced vascular dysfunction in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 1571 ~ 1580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.numecd.2024.01.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukunaga Kensaku, Yoshimura Takafumi, Imachi Hitomi, Kobayashi Toshihiro, Saheki Takanobu, Sato Seisuke, Saheki Nao, Jiang Wenyi, Murao Koji	4. 巻 15
2. 論文標題 A Pilot Study on the Efficacy of a Diabetic Diet Containing the Rare Sugar D-Allulose in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Prospective, Randomized, Single-Blind, Crossover Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2802 ~ 2802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu15122802	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

1. 著者名 Kohara Yuri, Ikai Shuta, Yoshihara Akihideo, Murao Koji, Sugiyama Yasunori	4. 巻 87
2. 論文標題 Effect of chronic exposure to ketohexoses on pancreatic β -cell function in INS-1 rat insulinoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 163 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac190	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lyu Jingya, Fukunaga Kensaku, Imachi Hitomi, Sato Seisuke, Kobayashi Toshihiro, Saheki Takanobu, Ibata Tomohiro, Yoshimura Takafumi, Iwama Hisakazu, Murao Koji	4. 巻 13
2. 論文標題 Oxidized LDL Downregulates ABCA1 Expression via MEK/ERK/LXR Pathway in INS-1 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3017 ~ 3017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13093017	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

1. 著者名 Kobayashi Toshihiro, Imachi Hitomi, Fukunaga Kensaku, Lyu Jingya, Sato Seisuke, Saheki Takanobu, Ibata Tomohiro, Matsumoto Mari, Japar Salimah B, Murao Koji	4. 巻 68
2. 論文標題 HDL promotes adiponectin gene expression via the CAMKK/CAMKIV pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 89 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JME-20-0211	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakane Tatsuto, Matsumoto Suzuka, Iida Satoshi, Ido Aya, Fukunaga Kensaku, Murao Koji, Sugiyama Yasunori	4. 巻 527
2. 論文標題 Candidate plasticity gene 16 and jun dimerization protein 2 are involved in the suppression of insulin gene expression in rat pancreatic INS-1 -cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 111240 ~ 111240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mce.2021.111240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Toshihiro Kobayashi, Yuka Inoue, Megumi Takaba, Takafumi Yoshimura, Takanobu Saheki, Nao Sahek, Kensaku Fukunaga, Hitomi Imachi and Koji Murao
2. 発表標題 A study on the effect of D-allulose on suppressing postprandial hyperglycemia S26 in patients with type 2 diabetes
3. 学会等名 Rare Sugar Congress 2023 Kagawa (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kensaku Fukunaga, Salimah Japar, Toshihiro Kobayashi, Takanobu Saheki, Takafumi Yoshimura, Nao Sahek, Megumi Takaba, Yuka Inoue, Hitomi Imachi and Koji Murao
2. 発表標題 A pilot study on the effect of D-allulose on postprandial glucose levels in patients with type 2 diabetes mellitus during Ramadan fasting
3. 学会等名 Rare Sugar Congress 2023 Kagawa (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐伯 岳信, 井上 侑香, 高場 萌, 吉村 崇史, 佐伯 直, 小林 俊博, 福長 健作, 井町 仁美, 村尾 孝児
2. 発表標題 NMDAが膵 細胞株 INS-1でABCA1遺伝子発現、インスリン分泌に及ぼす影響について
3. 学会等名 日本糖尿病学会中国四国地方会第60回総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福長 健作, 井上 侑香, 高場 萌, 吉村 崇史, 佐伯 岳信, 佐伯 直, 小林 俊博, 井町 仁美, 村尾 孝児
2. 発表標題 膵 細胞においてペマフィブラートがABCA1発現、インスリン分泌に及ぼす影響について
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐伯 岳信, 井上 侑香, 高場 萌, 吉村 崇史, 佐伯 直, 小林 俊博, 福長 健作, 井町 仁美, 村尾 孝児
2. 発表標題 GLP1がHUVECにおけるSRB1/CLA1発現へ及ぼす影響について
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2023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
研究 分担 者	福長 健作 (Fukunaga Kensaku) (70746932)	香川大学・医学部・助教 (16201)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	井町 仁美 (Imachi Hitomi) (80380187)	香川大学・医学部・准教授 (16201)	

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