

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09829

研究課題名（和文）エネルギーセンサーDUSP16を介したインスリン感受性制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of regulatory mechanisms of insulin sensitivity through a energy sensor molecule, DUSP16

研究代表者

松口 徹也（MATSUGUCHI, TETSUYA）

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：10303629

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）：肥満に伴う慢性炎症が糖尿病やがんなどの病因として注目されている。DUSP16は肥満と慢性炎症のリンクの鍵分子として注目されているJNKの特異的活性抑制タンパクである。本研究で、DUSP16が細胞外グルコース濃度によって発現レベルが上昇し、GLUT4の発現誘導に重要な役割を果たす「エネルギーセンサー」としての働きをもつことが示された。またDUSP16は、間葉系幹細胞の脂肪分化で発現が上昇し、脂肪細胞分化の正の制御因子として働くことが明らかになった。本研究によって、糖質・脂質代謝と慢性炎症を繋ぐ因子としてのDUSP16の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は世界的な健康問題となっており、肥満に伴う慢性炎症が、2型糖尿病、心血管障害、脂肪肝、一部のがんなどの発症と密接に関連する。近年の研究で、炎症性キナーゼであるJNKが肥満に伴う組織慢性炎症に必須な分子として同定され、その活性を抑制することで各種合併症を予防できることが期待される。本研究は、JNKの特異的活性抑制タンパクであるDUSP16の糖質代謝と脂肪細胞分化の制御における役割を明らかにした。肥満に伴う各種合併症の発症にDUSP16の活性異常が関わる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Chronic inflammation associated with obesity has attracted attention as a cause of diseases such as diabetes and cancer. DUSP16 is a specific inhibitory protein of JNK, which has been revealed as a key molecule linking obesity and chronic inflammation. This study demonstrated that the expression level of DUSP16 increases with extracellular glucose concentration, and that it functions as an "energy sensor" that plays an important role in inducing GLUT4 expression. It was also found that the expression of DUSP16 increases during adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells, and that it functions as a positive regulator of adipogenesis. Thus, this study suggests the possibility of DUSP16 as a connecting factor connecting carbohydrate and lipid metabolism with chronic inflammation.

研究分野：生化学

キーワード：肥満 メタボリックシンドローム 脂肪細胞 骨芽細胞 間葉系幹細胞 JNK DUSP16 EGR1

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

肥満は世界的な健康問題となっており、II型糖尿病を始めとして、心血管障害、脂肪肝、一部のがんなどの疾患の発症と密接に関連する。近年の研究で、肥満に伴う慢性炎症がこれらの合併症の発症に重要であることが明らかになってきた。肥満と慢性炎症のリンクの鍵分子として注目されているのが、MAPキナーゼファミリーに属するJNKs (cJun N-terminal Kinases) である。多くの研究成果から、肥満患者において広範囲な細胞種 (肝細胞、脂肪細胞、筋細胞、マクロファージ等) でJNK活性が上昇していることが報告されている。また、JNK1のKOマウスやJNK1&2のダブルKOマウスを用いた複数の先駆的研究において、高カロリー食摂取によって誘導される組織慢性炎症とインスリン抵抗性が著明に抑制されることが報告された。これらの所見は、JNKが肥満に伴う組織慢性炎症に必須な分子であり、その活性を抑制することで各種合併症を予防できる可能性を示唆する。

JNKsは、各種細胞ストレス (紫外線、温度変化、浸透圧、ERストレス等)、感染、サイトカイン刺激等によって活性化され、cJun、ATF2等の転写因子をリン酸化・活性化するキナーゼである。JNK1/2/3の3種類のアイソフォームのうち、JNK3は神経、精巣等に発現が集中するが、JNK1/2は共に殆どの組織に発現を認める。近年、各組織におけるJNK1/2の生理機能には明確な差異が認められることが報告されているが、その詳細な分子機構は不明である。JNKのキナーゼ活性は、キナーゼドメイン内のT-P-Yモチーフが上流のキナーゼによる2重リン酸化を受けることで活性化され、逆に、DUSP(Dual-Specificity Phosphatase)による脱リン酸化によって不活性化される。肥満に伴って細胞内のJNK活性が上昇するメカニズムについては、炎症性サイトカイン、小胞体(ER)ストレス、活性酸素(ROS)などの関与が報告されているが、組織間による差も含めて、その詳細な分子機構は不明な点が多い。また、JNK活性の上昇が各組織のインスリン反応性や糖質・脂質代謝に与える影響についても、JNKアイソフォーム間の機能的差異、主要な責任分子の同定など、解明すべき問題点が多数あった。

また、JNK活性は各種細胞の分化調節に重要な役割を果たすことが知られている。申請者らは以前、JNK活性が骨芽細胞の分化において必須の役割を果たすことを報告した(Matsuguchi et al. J. Bone Miner. Res. 2009)。肥満と深い関係がある脂肪細胞は、間葉系幹細胞(MSC)から分化するが、MSCは脂肪細胞以外にも、骨細胞、軟骨細胞、筋細胞、線維芽細胞などに分化する多分化能を有する細胞である。その分化方向の決定機構については多くの研究がなされているが、そのスイッチング機構や分化速度決定機構の詳細については不明な点が多い。これらの機構のより良い解明は、肥満の発症や進行を制御する方法の開発に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

申請者らは以前、JNKを特異的に不活化するフォスファターゼDUSP16 (a.k.a. MKP-M)を発見し(Matsuguchi et al. Mol. Cell. Biol. 2001)、その免疫反応、細胞分化における役割を明らかにしてきた。本研究開始前に行った予備実験において、DUSP16の細胞内発現レベルが細胞外液中のグルコース濃度に比例して上昇することを見出した。この所見は、DUSP16が細胞外グルコース濃度に依存して発現量が調節される「エネルギーセンサー分子」としての働きを持ち、グルコース供給に見合った細胞内JNK活性を維持する調節分子として機能している可能性を示唆した。肥満による細胞ストレスによってDUSP16を介した細胞内JNK活性制御機構が不調となると、慢性炎症やインスリン抵抗性などの発症に繋がるという作業仮説を立て、その検証を本研究の主な目的とした。肥満によって各組織でのJNK活性が亢進することと、インスリン抵抗性を始めとした肥満に伴う合併症の発症にJNK活性が重要であることについて、主にJNK遺伝子KOマウスを用いた多数の報告があるが、それぞれの詳細な分子機構については不明な点が多く、特にDUSPの役割について詳しく検討した先行研究はない。

また、MSCからの脂肪・骨細胞分化決定の分子機構について、特にJNK、DUSP16との関連について解析を行う。本研究はJNKを特異的に不活性化するDUSP16の役割に注目した解析を行うものであり、学術的独自性と創造性が高く、画期的な知見が得られることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) エネルギーセンサーとしてのDUSP16の働き

マウス胎仔(13.5days)由来線維芽細胞(MEF)を単離し、低グルコースDMEM+10%FBS培地(グルコース濃度100mg/dl)で培養した。DUSP16特異的もしくはコントロールsiRNAをMEFにリポフェクション法で導入した後、酸素濃度20%もしくは2%、LG(100mg/dl)もしくはHG(300mg/dl)のそれぞれの組み合わせの環境下でMEFを培養後、day1、2でトータルRNAを単離し、定量リアルタイムPCRによって各種遺伝子の発現レベルを解析した。

(2) 脂肪細胞分化におけるDUSP16の発現レベルの推移とその機能的役割

マウス間葉系幹細胞株ST2に、骨分化誘導(アスコルビン酸+βグリセロリン酸)もしくは脂

肪細胞分化 (IBMX + dexamethasone + rosiglitazone + insulin) を行い、それぞれから経時的にトータル RNA を単離し、定量リアルタイム PCR によって各種遺伝子の発現レベルを解析した。また、DUSP16 特異的もしくはコントロール siRNA を、リポフェクション法で ST2 細胞に導入した後、骨分化誘導もしくは脂肪細胞分化を行い、経時的に定量リアルタイム PCR によって各種遺伝子の発現レベルを解析した。

(3) BMP による骨分化誘導における EGR1 の機能的役割とその分子機構の解析

マウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 に、TetOn システムを使った EGR1 強発現誘導株を樹立した。また、EGR1 特異的もしくはコントロール siRNA を、リポフェクション法で MC3T3-E1 細胞に導入することで EGR1 ノックダウン系を確立した。ドキシサイクリン刺激による EGR1 強発現誘導もしくは siRNA による EGR1 ノックダウンを行った MC3T3-E1 細胞を BMP9 で刺激し、ウェスタンブロット、定量リアルタイム PCR、アリザリンレッド染色等を行った。

(4) MSC の BMP9 による骨分化誘導における転写因子 Hes1 の早期誘導の役割

ST2 細胞に、TetOn システムを使った Hes1 強発現誘導株を樹立した。また、Hes1 特異的もしくはコントロール siRNA を、リポフェクション法で導入することで Hes1 ノックダウン系を確立した。ドキシサイクリン刺激による Hes1 強発現誘導もしくは siRNA によるノックダウンを行った ST2 細胞を BMP9 で刺激し、ウェスタンブロット、定量リアルタイム PCR、アリザリンレッド染色等を行った。

4. 研究成果

(1) エネルギーセンサーとしての DUSP16 の働き (図 1)

マウス胎児線維芽細胞 (MEF) を用いて細胞外液中のグルコース濃度および外気の酸素濃度の変化に対する DUSP16 の発現レベルの変動を確認したところ、高グルコース濃度 (HG: 300mg/dl) の環境は、低グルコース濃度 (LG: 100mg/dl) に比べて DUSP16 の mRNA 発現レベルを有意に上昇させた。一方、低酸素濃度 (2%O₂) は DUSP16 の mRNA 発現レベルに影響を与えなかった。これらの所見は、DUSP16 が細胞外グルコース濃度に依存して発現量が調節される「エネルギーセンサー分子」としての働きを持ち、グルコース供給に見合った細胞内 JNK 活性を維持する調節分子として機能している可能性を示唆した。

次に細胞のグルコース取り込みに関わる GLUT の発現における DUSP16 の役割を解析するために DUSP16 特異的 siRNA を用いた遺伝子ノックダウンを行った。インスリン反応性の GLUT と知られる GLUT4 の発現レベルは HG 処理にて著明に上昇したが、低酸素環境によって目立った変動はなかった。一方、GLUT1 の mRNA 発現レベルは低酸素環境で著明に上昇したが、HG 処理による目立った変動はなかった。興味あることに、DUSP16 siRNA による処理は、Cont siRNA と比較して、HG による GLUT4 発現誘導を顕著に抑制したが、低酸素による GLUT1 の発現誘導を逆に有意に促進した。

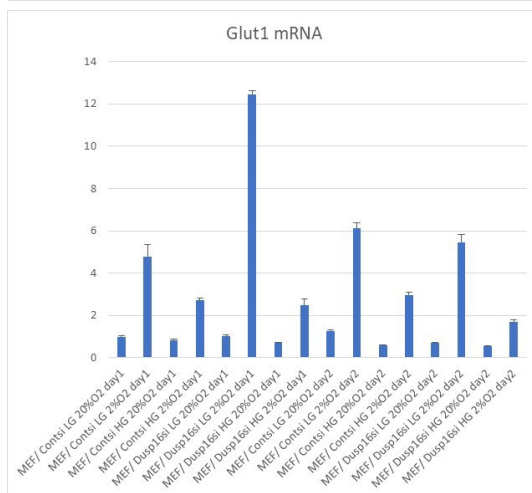
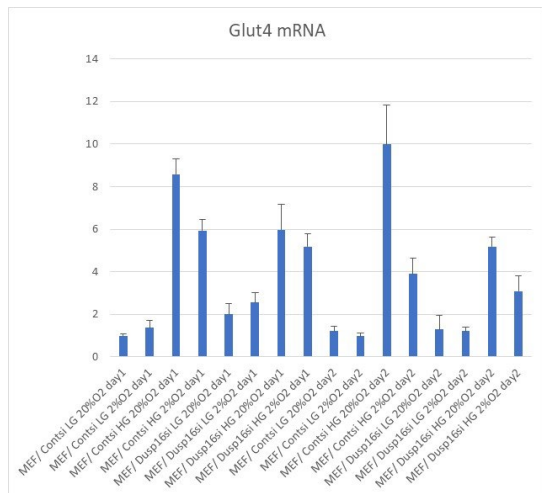
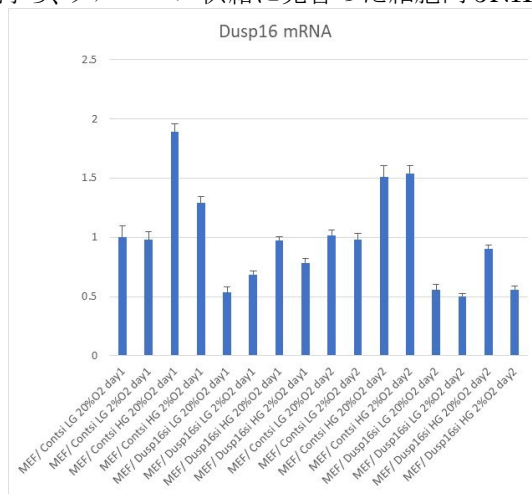


図 1 : MEF の高グルコース濃度および低酸素環境における DUSP16 の発現レベルの変動と、GLUT の発現調節機構における役割

これらの結果から、グルコース感受性で「エネルギーセンサー分子」としての働きを持つ DUSP16 が、細胞における GLUT1 および 4 の発現比率の調節機能を持つことが示された。本解析結果については、他の追加実験を含めて、現在論文投稿準備中である。

(2) 脂肪細胞分化における DUSP16 の発現レベルの推移とその機能的役割

マウスの間葉系幹細胞 (MSC) 株として知られる ST2 細胞に脂肪分化および骨分化誘導の刺激を与え、それぞれの分化過程における DUSP16 の発現レベルの変動を解析した。脂肪および骨分化の確認については、*Bglap* (骨分化マーカー)、*Pparγ*、*Fabp4* (共に脂肪分化マーカー) の mRNA 発現レベルの解析によって行った。

DUSP16 の mRNA レベルは脂肪分化誘導 3 日目より著明に上昇し、少なくとも分化誘導後 15 日まで高値を持続した (図 2)。一方、骨分化誘導においては、6 日目より軽微な上昇を認めただけであった。これは他に解析した DUSP メンバー (DUSP1,2,5,6) とは明らかに異なっており (データ未掲載)、DUSP16 の脂肪分化における機能的役割が示唆された。一方、骨分化特異的に発現が上昇する遺伝子として、転写因子である *EGR1*、*HES1* を見だし、その骨分化における役割についても別途に解析をおこなった (後述)。

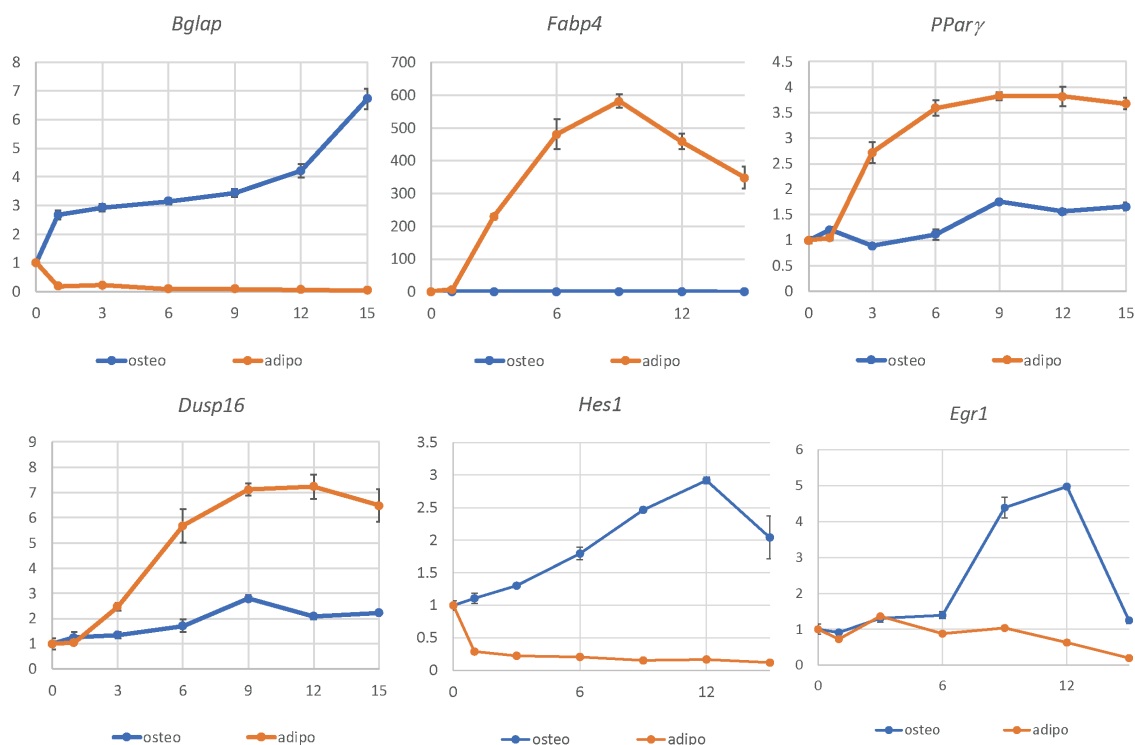


図 2 : MSC 細胞株の脂肪/骨細胞分化における遺伝子発現量の変化

次に脂肪分化における DUSP16 の機能的役割を検討するために、DUSP16 特異的 siRNA を用いた遺伝子ノックダウンを行った。興味あることに、DUSP16 siRNA による処理は、Cont siRNA と比較して、ST2 細胞の脂肪分化誘導に伴って上昇する *Pparγ*、*Fabp4* の mRNA 発現レベルを有意に抑制した (図 3)。これらの結果は、脂肪分化に伴って発現上昇する DUSP16 が、脂肪細胞分化に促進的な役割を果たすことを示唆する。このユニークな DUSP16 の働きについて、現在論文投稿に向けて追加実験による詳細な解析を実施中である。

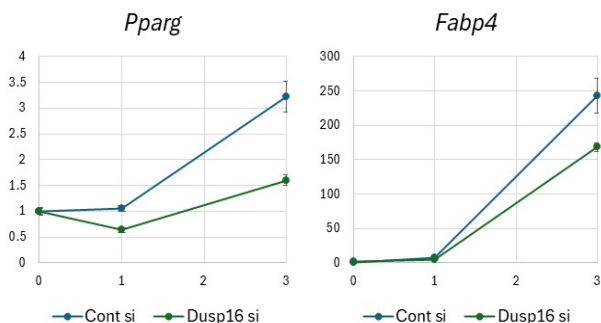


図 3 : DUSP16 ノックダウンは脂肪細胞分化を抑制する。

(3) BMP による骨分化誘導における EGR1 の機能的役割とその分子機構の解析

上述の解析で骨分化に伴って発現上昇する遺伝子として見いだした転写因子 *EGR1* について、骨形成タンパク質 (BMP) 9 による骨分化誘導能と細胞内シグナル伝達機構における役割を解析した。BMP は骨格恒常性の必須調節因子であり、その中でも BMP9 は最も強力な骨形成能を持つ。本研究では、BMP9 と BMP2 が MEK/ERK 依存性転写活性化を介して骨芽細胞で *EGR1* タンパク質発現を急速に誘導することを発見した。一方、siRNA を用いた *EGR1* のノックダウ

ンは、骨芽細胞における BMP9 誘導性マトリックス石灰化および骨形成マーカー遺伝子発現を有意に阻害した。興味あることに、EGR1 のノックダウンは、BMP9 刺激を受けた骨芽細胞における SMAD1/5 リン酸化を有意に減少させた。対照的に、TetOn 発現誘導システムを用いた強制的な EGR1 過剰発現は、BMP9 によって誘導される骨芽細胞分化および SMAD1/5 リン酸化を促進した (図 4)。免疫沈降アッセイを用いて、EGR1 と SMAD1/5 の細胞内での複合体形成が同定された。これらの結果は、EGR1 が SMAD1/5 のリン酸化を促進することにより、BMP9 刺激による骨芽細胞分化に重要な役割を果たすことを示唆していた。この研究成果は、国際科学ジャーナルに掲載された (Chiba, Matsuguchi et al. FEBS Lett. 2022)。

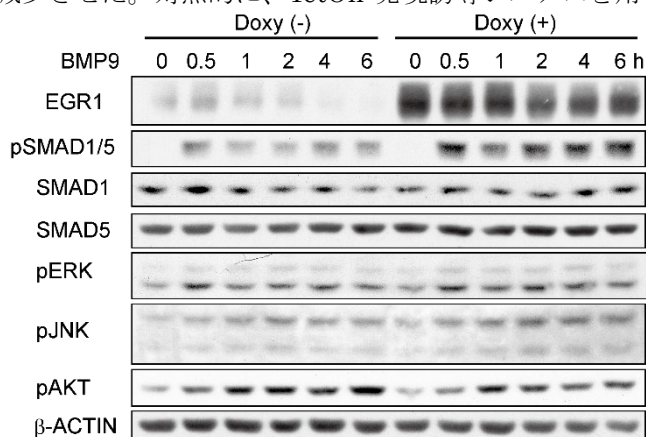


図 4 : EGR1 は BMP9 による SMAD1/5 リン酸化を促進する

(4) MSC の BMP9 による骨分化誘導における転写因子 Hes1 の早期誘導の役割

上述の解析で骨分化に伴って発現上昇する遺伝子として見いだした転写因子 Hes1 について、BMP9 による骨分化誘導能と細胞内シグナル伝達機構における役割を解析した。Hes1 は、塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス (bHLH) ドメインを持つ転写制御因子であり、Notch シグナル伝達のエフェクター分子として知られる。本研究では、ST2 における BMP9 による Hes1 の早期誘導の機能的役割を解析した。BMP9 による骨芽細胞の刺激は、Hes1 mRNA 発現の周期的な増加を誘導した。各種のシグナル阻害剤のうち、Smad 阻害剤による前処理は、BMP9 刺激細胞における Hes1 発現を有意に阻害した。また、BMP9 刺激を受けた ST2 細胞では、Hes1 siRNA によって Sp7 や Bsp などの骨分化マーカーの発現やマトリックス石灰化が有意に増加した。対照的に、Tet-On システムによる Hes1 の強制発現は、BMP9 による骨分化マーカーの発現とマトリックス石灰化を抑制した。さらに、BMP9 による Hes1 の早期誘導は、BMP9 の必須受容体である Alk1 の発現を抑制することを見いだした。これらの解析結果から、BMP9 は Smad 経路を介して Hes1 の発現を早期に誘導し、この Hes1 の早期誘導は、BMP9 によって誘導される間葉系幹細胞の骨分化において負の調節的役割を果たすことが明らかになった。この研究成果は、国際科学ジャーナルに掲載された (Seong, Matsuguchi et al. J. Cell. Biochem. 2023)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Chiba Norika, Noguchi Yukie, Seong Chang Hwan, Ohnishi Tomokazu, Matsuguchi Tetsuya	4. 巻 596
2. 論文標題 EGR plays an important role in BMP9 mediated osteoblast differentiation by promoting SMAD 1/5 phosphorylation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1720 ~ 1732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14407	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 Ohnishi Tomokazu, Hisadome Mitsuhiro, Joji Kusuyama, Chiba Norika, Amir Muhammad Subhan, Kanekura Takuro, Matsuguchi Tetsuya	4. 巻 122
2. 論文標題 Ultraviolet B irradiation decreases CXCL10 expression in keratinocytes through endoplasmic reticulum stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1141 ~ 1156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.29936	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 Chang-Hwan Seong, Norika Chiba, Mardiyantoro Fredy, Joji Kusuyama, Kiyohide Ishihata, Toshiro Kibe, Muhammad Subhan Amir, Ryohei Tada, Tomokazu Ohnishi, Norifumi Nakamura, Tetsuya Matsuguchi	4. 巻 124
2. 論文標題 Early induction of Hes1 by bone morphogenetic protein 9 plays a regulatory role in osteoblastic differentiation of a mesenchymal stem cell line	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Cell Biochem	6. 最初と最後の頁 1366-1378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.30452	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 Chiba Norika, Tada Ryohei, Ohnishi Tomokazu, Matsuguchi Tetsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 TLR4/7 mediated host defense responses of gingival epithelial cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.30576	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 千葉紀香、成昌煥、大西智和、松口徹也
2. 発表標題 EGR1はBMP9によるSMAD1/5活性化を増強して骨芽細胞分化を促進する
3. 学会等名 第64回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉紀香、大西智和、松口徹也
2. 発表標題 EGR1はSMAD1/5リン酸化を増強して骨外細胞分化を促進する
3. 学会等名 第4回 南九州歯学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松口徹也、千葉紀香、大西智和
2. 発表標題 BMP9はPI3K-Akt シグナル経路を介して骨芽細胞のHIF-1 蛋白発現を誘導する
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千葉紀香、成昌煥、大西智和、松口徹也
2. 発表標題 骨芽細胞分化におけるHypoxiaが及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千葉紀香、大西智和、松口徹也
2. 発表標題 マスト細胞の活性化に低酸素環境が及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第65回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 千葉紀香、大西智和、松口徹也
2. 発表標題 LPSによるマスト細胞のサイトカイン産生に低酸素が及ぼす選択的影響
3. 学会等名 第5回 南九州歯学会学術大会
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

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		
インドネシア	アイルランガ大学		