

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590969

研究課題名（和文）インスリン抵抗性と GLUT4 トランスロケーションの障害に関する研究

研究課題名（英文）Study of Insulin resistance involving impaired GLUT4 translocation

研究代表者

神崎 展 (KANZAKI MAKOTO)

東北大学・大学院医工学研究科・准教授

研究者番号：10272262

研究成果の概要（和文）：

インスリン抵抗性病態では、インスリン応答性の GLUT4 トランスロケーションが著しく減弱しているが、その病態機序の全貌については未解明である。生化学的およびナノ計測学的な解析により、Vps10p 受容体ファミリーに属する Sortilin がインスリン応答性 GLUT4 貯蔵小胞の形成に必須であること、さらにインスリン抵抗性病態では Sortilin 減少に伴う GLUT4 のソーティング障害が惹起されていることを明らかにした。既知の「シグナル伝達系の減弱」に加えて、「ソーティング障害」に起因したインスリン抵抗性病態の発症機序が存在することを示す新知見である。

研究成果の概要（英文）：

Defective insulin-responsive GLUT4 translocation is the earliest detectable feature of insulin resistance. Biochemical and nanometrological analyses herein revealed that sortilin, a member of the Vps10p-family sorting receptor, plays a critical role in establishing trans-Golgi network system specialized for generating the insulin-responsive GLUT4-storage vesicles that emerged to be severely deranged under certain insulin resistant conditions. This study thereby unmasks that insulin resistance is caused by not only defects in insulin signaling but also impairment of GLUT4 trafficking itself ("sorting disorder").

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：GLUT4、細胞内小胞輸送系、骨格筋、脂肪細胞、細胞内情報伝達系、Vps10p、イメージング、肥満

1. 研究開始当初の背景

インスリンによる血糖降下作用は、筋および脂肪細胞が発現するインスリン反応性糖輸送担体 GLUT4 のトランスロケーションに

よって達成される。しかし、インスリン抵抗性病態では、この GLUT4 のトランスロケーション量が激減することが知られている。そして、この原因の一つとしてインスリン受容

体シグナル伝達系の減弱が関与することが明らかにされている。

一方、インスリン受容体の初期シグナルに明らかな減弱が伴わないにもかかわらず、GLUT4 トランスロケーションが著しく障害される現象も確認されていたが、その病理機序については不明であった。

2. 研究の目的

インスリン受容体シグナル伝達系の減弱に加え、GLUT4 トランスロケーション機構自体の障害も、2型糖尿病病態の増悪に深く関与する可能性が高い。しかし、インスリン抵抗性時における GLUT4 小胞の形成不全や運搬不全については未だ不明である。

本研究課題では、インスリン反応性 GLUT4 小胞の形成に必須の役割を果たすソーティング蛋白 (Sortilin) に注目し、インスリン抵抗性惹起時におけるその蛋白量変動 (減少) とそれに伴うインスリン GLUT4 トランスロケーションの障害機序について解析する。そして、シグナル伝達系の減弱に加え、「第2のインスリン抵抗性発症機序」として GLUT4 小胞自体の形成/運搬不全が関与する可能性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

GLUT4 がインスリン応答性を獲得するためには、GLUT4 貯蔵小胞とよばれる特殊な小胞コンパートメントに GLUT4 が適切にソーティングされることが必須である。この観点から、(1) 脂肪細胞および筋細胞におけるインスリン抵抗性病態 (エンドセリン [ET1] 誘導性モデルおよび遊離飽和脂肪酸 [FFA] 誘導性モデル) における Sortilin の量的変化を調べるとともに、その病態分子機序を究明した。(2) 独自に開発した「単一分子ライブイメージング解析手法」を用いて、Sortilin が減少した病態時における病態分子機序を解明するとともに、Sortilin による GLUT4 貯蔵小胞形成の分子システム基盤を解明することを試みた。(3) さらに、Sortilin 機能により核周辺部へと繫留される GLUT4 貯蔵小胞のインスリン依存性運搬賦活化機構について解析した。

4. 研究成果

(1) インスリン抵抗性病態における Sortilin の量的変化とその病理機序の解明

① 遊離飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (C16:0) によって惹起される筋細胞のインスリン抵抗性状態では、Sortilin 蛋白量の顕著な減少が惹起されていることをまず見いだした。② この Sortilin 蛋白量の減少には、mRNA 発現低下に加え Sortilin 蛋白寿命 (Half-life) の短縮を伴う2つの分子機序が関与していること、さらに、これらの現象には FFA によって活性化されたストレス応答性キナーゼである Protein Kinase θ (PKC θ)

が関与することを明らかにした。③ PKC θ は TACE (TNF- α converting enzyme) を介して Sortilin の Shedding (切断) を惹起し、その蛋白寿命を短縮させていることを観察した。一方、④ 不飽和脂肪酸であるオレイン酸 (C18:1) には上記の悪影響作用はなく、むしろパルミチン酸誘導性の増悪作用に対して抑制効果 (Sortilin 減少の阻止を伴うインスリン抵抗性の改善効果) が認められた。⑤ インスリン抵抗性の治療薬であるチアゾリジン系薬剤は、病態時にみられる Sortilin 減少をほぼ完全に阻止する能力があることも見いだした (図1)。

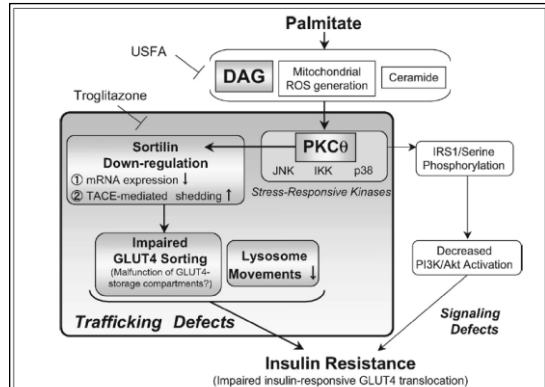


図1: FFAによるSortilin減少とインスリン抵抗性 (Tsuchiya Y. et al. J. Biol. Chem.285(45):34371-34381,2010)

Sortilin はインスリン応答性 GLUT4 貯蔵小胞形成に必須の役割を果たしており、インスリン抵抗性病態においてその蛋白量が有意に減少することを明らかにした。また、Sortilin 蛋白量とその関連制御システムはインスリン抵抗性の新たな治療標的としても重要であると考えられた。

(2) Sortilin による GLUT4 貯蔵小胞形成の分子システム基盤とその破綻影響の解明

① Sortilin は再循環エンドソームからトランスゴルジ網 (TGN) へと GLUT4 分子を選択的に逆行性輸送する能力があり、② この Sortilin 依存性の GLUT4 逆行性輸送には Retromer 複合体と golgin-97 による協同作業が関与していることを見いだした (図2)。

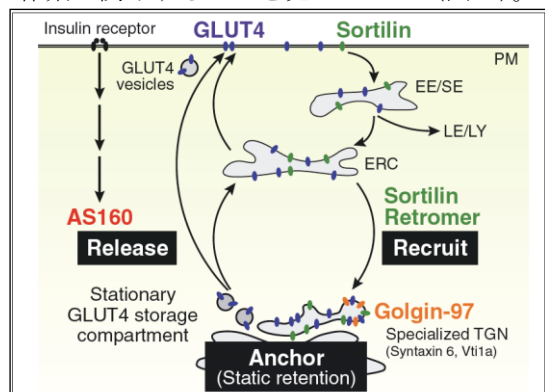


図2: SortilinによるGLUT4ソーティングの重要性 (Hatakeyama & Kanzaki. Traffic 12(12):1805-1820,2011)

さらに、③TGN へとソーティングされた GLUT 4 分子はこの領域近辺に繫留され、その結果 GLUT 4 分子動態は極めて低く保持されていること、一方、病態時ではこの平静な GLUT 4 分子動態は観察されず、過剰な分子動態に陥っていることを明らかにした。④病態時において Sortilin 減少が惹起されると、上述した GLUT 4 分子の適正なソーティングに障害が生じ、結果としてインスリン反応性を所持する GLUT 4 貯蔵小胞の形成不全が起きていると考えられた (図 3)。

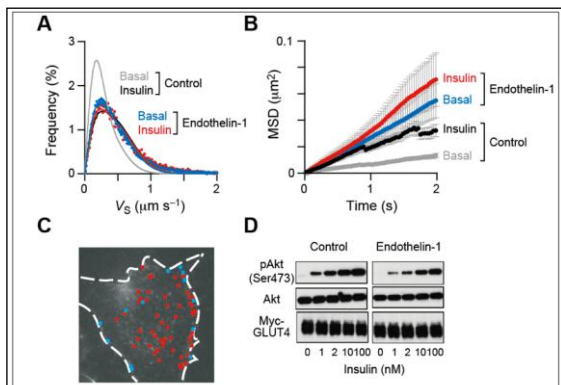


図 3 : インスリン抵抗性病態での GLUT4 動態異常 (A-C) (Fujita H. et al. Mol. Biol. Cell. 21(15):2721-2731, 2010)

これらの研究成果は、既知の「シグナル伝達系の減弱」に加えて、「ソーティング障害」に起因したインスリン抵抗性病態の発症病理機序が存在することを示めており、極めて重要な新知見である。

(3) インスリン応答性の GLUT 4 運搬賦活化機構の解明

①Tbc1d ファミリーの RabGTPase 活性化蛋白 (RabGAP) である Tbc1d1 と Tbc1d4 (AS160 としても知られる) は、Sortilin 依存性に形成された GLUT 4 貯蔵小胞の繫留状態を解放する役割を果たすことを明らかにした。② AS160 はインスリン刺激に反応して GLUT 4 解放を誘導するが、③Tbc1d1 はインスリン応答性を当初は示さず GLUT 4 解放と運搬促進作用を発揮できなかった。しかし、④興味深いことに、AMP キナーゼ (AMPK) 活性化を一端経験した後 (AICAR 処理 → washout → 再平静状態) では、Tbc1d1 は「インスリン応答性を獲得」してインスリン依存性の GLUT 4 運搬賦活化活性を示した。⑤重要なことに、女性超肥満患者にて同定された Tbc1d1 変異体 (R125W) では、この AMPK 刺激後に獲得されるインスリン応答性の亢進作用が全く欠落していること、⑥R125 を含むリン酸化チロシン結合領域 (PTB1) の人為変異 (PTB 機能欠損変異体) でも同様に AMPK 前処理 (疑似運動刺激) 効果が欠落することを明らかにした (図 4)。

これらの研究成果は、Tbc1d1 が示すインスリン応答性獲得機構が筋運動刺激の効果 (運

動によるインスリン反応性の改善効果) の分子基盤としてあり、その障害はヒト肥満を惹起する病理機序の一つであることを示す重要な知見である。

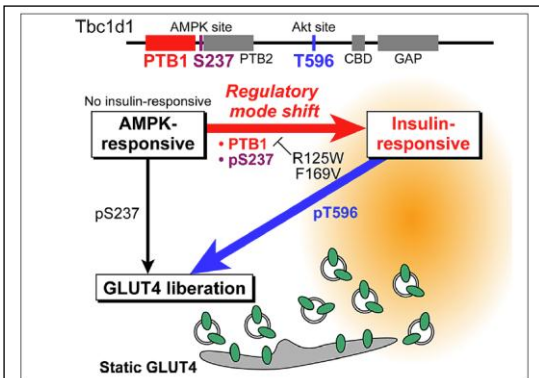


図 4 : Tbc1d1 による GLUT4 解放ステップの調節様式 (Hatakeyama & Kanzaki. Mol. Biol. Cell. 24(6):809-817, 2013)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- Hatakeyama H, and Kanzaki M. Regulatory Mode Shift of Tbc1d1 is Required for insulin-responsive GLUT4 Trafficking Activity (2013) *Mol. Biol. Cell* 24(6): 809-817. (査読あり)
DOI: 10.1091/mbc.E12-10-0725.
- Farmawati A, Kitajima, Nedachi T, Sato M, Kanzaki M, Nagatomi R. Regulation of IL-6 production by electric pulse stimulation in contractile C2C12 myotubes. (2013) *Endocrine Journal* 60(2): 137-147. (査読あり)
<http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.EJ12-0316>
- Hatakeyama H, and Kanzaki M. Molecular basis of insulin-responsive GLUT4 trafficking systems revealed by single molecule imaging (2011) *Traffic* 12(12): 1805-1820. (査読あり)
DOI: 10.1111/j.1600-0854.2011.01279.x.
- Matsui TS, Kaunas R, Kanzaki M, Sato M., Deguchi S. Nonmuscle myosin II induces disassembly of actin stress fibers independently of myosin light chain dephosphorylation. (2011) *Interface Focus* 1(5): 754-766. (査読あり)
DOI: 10.1098/rsfs.2011.0031.
- Castorena, CM., MacKrell, JG., Bogan, JS., Kanzaki M, Cartee, DG. Clustering of GLUT4, TUG and RUVBL2 Protein Levels Correlate with Myosin Heavy Chain Isoform Pattern in Skeletal Muscles, but AS160 and TBC1D1 Levels Do Not (2011) *J. Appl. Physiol.* 111(4): 1106-1117. (査読あり)
DOI: 10.1152/jappphysiol.00631.2011.
- Nagamine K, Kawashima T, Sekine S, Ido Y, Takeda M, Otani S, Kumagai Y, Kanzaki M, Nishizawa, M., Spatiotemporally controlled contraction of micropatterned skeletal muscle cells on a hydrogel sheet (2011) *Lab on a Chip* 11(3):513-517. (査読あり) DOI: 10.1039/c0lc00364f.

- ⑦ Sakamoto N., Segawa K., Kanzaki M., Ohashi T., Sato M., Role of p120-Catenin in Morphological Changes in Endothelial Cells Exposed to Fluid Shear Stress. *Biochem Biophys Res Commun* (2010) 398(3):426-432. (査読あり)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.06.092.
- ⑧ Kaji H., Ishibashi T., Nagamine K., Kanzaki M., Nishizawa M. Electrically induced contraction of C2C12 myotubes cultured on a porous membrane-based substrate with muscle tissue-like stiffness (2010) *Biomaterials* 31:6981-6986. (査読あり)
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.071.
- ⑨ Tsuchiya Y., Hatakeyama H., Emoto N., Wagatsuma F., Matsushita S., Kanzaki M. Palmitate-induced Down-regulation of Sortilin and Impaired GLUT4 Trafficking in C2C12 myotubes. (2010) *J.Biol.Chem.* 285(45): 34371-34381. (査読あり)
DOI: 10.1074/jbc.M110.128520.
- ⑩ Fujita H, Hatakeyama H, Watanabe TM, Sato M, Higuchi H, Kanzaki M. Identification of three distinct functional sites of insulin-mediated GLUT4 Trafficking in Adipocytes using Quantitative Single Molecule Imaging. (2010) *Mol Biol Cell.* 21(15): 2721-2731. (査読あり)
DOI: 10.1091/mbc.E10-01-0029.
- ⑪ Takahashi Y, Murakami Y, Nagamine K, Shiku H, Aoyagi S, Yasukawa T, Kanzaki M., Matsue T. Topographic Imaging of Convuluted Live Cells by Scanning Ion Conductance Microscopy in a Standing Approach Mode. (2010) *Phys Chem Chem Phys* 12(34): 10012-10017. (査読あり)
DOI: 10.1039/c002607g.
- ⑫ Funai, K, Schweitzer GG, Castorena CM, Kanzaki, M., Cartee GD. In Vivo Exercise Followed by In Vitro Contraction Additively Elevates Subsequent Insulin-stimulated Glucose Transport by Rat Skeletal Muscle. (2010) *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(5): E999-1010. (査読あり)
DOI: 10.1152/ajpendo.00758.2009.
- ⑬ Nagamine K, Kawashima T, Ishibashi T., Kaji H, Kanzaki M., Nishizawa M. Micropatterning Contractile C2C12 Myotubes Embedded in a Fibrin Gel. *Biotechnology and Bioengineering* (2010) 105(6):1161-1167. (査読あり) DOI: 10.1002/bit.22636.

[学会発表] (計 14 件)

- ① Rutti, S., Kaddai, V., Negro, V., Kanzaki M., Halban, PA., Bouzakri, K. Impact of Akt1 and 2 on TBC1D1/D4 in response to glucose in beta-cells. 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. EASD meeting. 1-5, Oct. 2012, Berlin, Germany.
- ② Hatakeyama, H and Kanzaki, M. Characterization of Unique Regulatory Mechanism of Tbc1d1 in GLUT4 Trafficking by Single Molecule Analysis of GLUT4 Behavior. 72nd American Diabetes Association Scientific Meeting, June, 8-12, 2012, Pennsylvania Convention Center,

Philadelphia, PA, USA

- ③ Kanzaki, M. Identification of Novel “Exercise Factors” using Contractile Myotube Model. International Symposium on Cellular Mechanobiology. Kyoto University Clock Tower Centennial Hall, Kyoto. March 16, 2012
- ④ Hatakeyama, H and Kanzaki, M. Distinct Roles of Two Rab GAPs, ASI60/Tbc1d4 and Tbc1d1, on Intracellular GLUT4 Trafficking Analyzed with Single Molecule Imaging of GLUT4 Behavior. 51st American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2011/12/3-7 Denver, CO. USA.
- ⑤ Hatakeyama, H and Kanzaki, M. Critical roles of sortilin in GLUT4 trafficking systems and insulin resistant state revealed by single molecule imaging of GLUT4 behavior. FASEB Summer Research Conference “Glucose Transporters, Signaling and Diabetes”, 2011/8/14-19. Snowmass Village, CO. USA
- ⑥ Hatakeyama, H and Kanzaki, M. Impaired Biogenesis of the Insulin-responsive GLUT4 Storage Compartment under Insulin Resistance Revealed by Single Molecule Imaging. 71st American Diabetes Association Scientific Sessions 2011, 2011/6/24-28, San Diego, CA. USA
- ⑦ 神崎 展「GLUT4のソーティング障害と2型糖尿病」第6回トランスポーター研究会. 2011年6月11/12日(仙台)

[産業財産権]

○取得状況 (計 2 件)

- ①名称: Cultured Muscle Cells with High Metabolic Activity and Methods for Production of the Cultured Muscle Cells
発明者: Kanzaki, M., Nedachi, T., Fujita, H.
権利者: 東北大学
種類: 特許
番号: US7, 829, 334 B2
取得年月日: 平成 23 年 11 月 9 日
国内外の別: 国外

- ②名称: インスリン反応性糖輸送担体の膜移行活性が測定可能な培養筋細胞
発明者: 神崎展・根建拓
権利者: 東北大学
種類: 特許
番号: 第 4769935
出願年月日: 平成 23 年 7 月 1 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

https://www.researchgate.net/profile/Makoto_Kanzaki/

<http://www.ecei.tohoku.ac.jp/kanzaki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神崎 展 (KANZAKI MAKOTO)

東北大学・大学院医工学研究科・准教授

研究者番号：10272262