

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 6 月 5 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590996

研究課題名（和文）膵β細胞オートファジーにおける亜鉛トランスポーターの役割の解明

研究課題名（英文） Role of zinc transporters in beta-cell-autophagy induction

研究代表者

藤谷与士夫（FUJITANI YOSHIO）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30433783

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病の疾患感受性遺伝子として知られる SLC30A8 の機能解析を行なった。SLC30A8/ZnT8 欠損マウスはコントロールマウスに比し、耐糖能の低下と糖負荷時の末梢血インスリンレベルの低下を認めた。一方、単離膵島からのインスリン分泌は ZnT8 欠損マウスにおいてコントロールマウスよりも高値を示し、両者で逆の結果を得た。その理由として ZnT8 欠損マウスでは肝でのインスリンクリアランスが食後に抑制されないことが原因であることが示された。そのメカニズムの解析を行ったところ、インスリン分泌に同期して亜鉛がβ細胞から門脈を介して肝臓に流入するが、この亜鉛イオンが肝細胞へのインスリンの endocytosis を抑制することが肝でのインスリン分解抑制のメカニズムであることが明らかとなった。ZnT8 欠損マウスおよび SLC30A8 のリスクアレルを有するヒトにはその調節異常が存在することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Recent genome-wide association studies demonstrated that common variants of SLC30A8 increase susceptibility to type 2 diabetes. SLC30A8 encodes zinc transporter-8 (ZnT8), which delivers zinc ion from the cytoplasm into insulin granules. In this study, we generated β-cell-specific Slc30a8-deficient mice, and demonstrated an unexpected functional linkage between Slc30a8 deletion and hepatic insulin clearance. The mutant mice had low peripheral blood insulin levels, despite insulin hypersecretion from pancreatic β cells. In a series of experiments, we showed that a substantial amount of the hypersecreted insulin was degraded during its first passage through the liver. Consistent with these findings, slc30a8-deficient mice exhibited increased insulin clearance, as assessed by the c-peptide/insulin ratio. As one of the explanations for the above findings, we demonstrated that zinc cosecreted with insulin suppressed insulin clearance by inhibiting clathrin-dependent insulin endocytosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：オートファジー、亜鉛、トランスポーター、2型糖尿病

1. 研究開始当初の背景

われわれは最近、膵β細胞におけるオートファジーが、膵β細胞の機能・形態維持に欠くべからざる役割を演じる生体機構であることを明らかにした(Ebato et al. Cell Metab 2008)。さらに我々は、オートファジーとは独立して、膵β細胞における亜鉛シグナルの役割を明らかにすべく、膵β細胞に発現する亜鉛トランスポーターZnT8の機能解析を行ってきたが、亜鉛シグナルがオートファジーの誘導に関与する可能性が示唆されたため、亜鉛シグナルのオートファジー誘導における役割を追求することとした。

2. 当初の研究の目的

本研究では、亜鉛トランスポーターを介した細胞内亜鉛シグナルがオートファジーの活性化を制御する因子として関与する可能性につき検討したい。本研究にあたっては、亜鉛シグナルがオートファジーの制御に関わる可能性を検証し、その制御に関わる亜鉛トランスポーターの実態を明らかにしてゆきたい。

3. 研究の方法

①In vitro 実験系…insulinoma 細胞株を用いて、膵β細胞におけるオートファジー誘導の局面において、亜鉛シグナルが関与するのかを、生化学的方法を用いて明らかにしようとした。

②In vivo 実験系…膵特異的 Slc30a8/ZnT8 欠損マウスを用いて、その表現型を生理学的方法、組織学的方法により解析することで、2型糖尿病感受性遺伝子として知られる ZnT8 の機能をオートファジーとの関係において明らかにしようとした。

4. 研究成果

まず、insulinoma 細胞株をアミノ酸飢餓に暴露させた際にオートファジーが誘導されるが、このオートファジー誘導における亜鉛の役割について亜鉛キレーターTPEN を用いて検討した。合わせて、オートファジー誘導時の亜鉛イオンの細胞内の流れに関して Fluo-Zin3 を用いた解析を行った。しかし、このような実験系においては残念ながら、亜鉛の明確な役割を示すことができなかった。仮説が誤っているか、実験の検出感度の問題のどちらかであると考えられた。

そこで本研究においては、オートファジーの概念とは独立して、2型糖尿病の疾患感受性遺伝子として知られる SLC30A8/ZnT8 の機能解析を行なった。SLC30A8 は、細胞質からインスリン分泌顆粒の内側に亜鉛イオンを

転送する Zinc transporter 8 (ZnT8)をコードする。まず、図1に示すように Slc30a8 遺伝子 locus において flox allele を作製し、Rip(rat insulin promoter)-Cre と交配することにより、膵β細胞特異的 ZnT8 欠損マウスを作製した。

ZnT8 欠損マウスは6週令以降でコントロールマウスに比し、耐糖能の低下を認めた。これに応じて糖負荷時の末梢血インスリンレベルは ZnT8 欠損マウスにおいて低値を示した。しかしながら、単離膵島からのブドウ糖応答性インスリン分泌は ZnT8 欠損マウスにおいてコントロールマウスよりも高値を示し、両者で逆の結果を得た。この変異マウスのインスリン代謝異常について、解析をすすめた。膵灌流や膵-肝灌流実験などを施行することにより、ZnT8 欠損マウスでは肝でのインスリンクリアランスが食後に抑制されないことが示された。そのメカニズムについてさらに解析を行った。コントロールの膵島からは、グルコース刺激に反応して亜鉛が分泌されるが、ZnT8 欠損マウスの膵島からの亜鉛分泌は低下していた。マウスの末梢血中に経血管的にインスリンを投与して2分後に、コントロールマウスの門脈内の亜鉛濃度が末梢血中よりも有意に上昇することが明らかとなり、この現象は ZnT8 欠損マウスでは認められず、ZnT8 機能に依存した現象であることが示された。

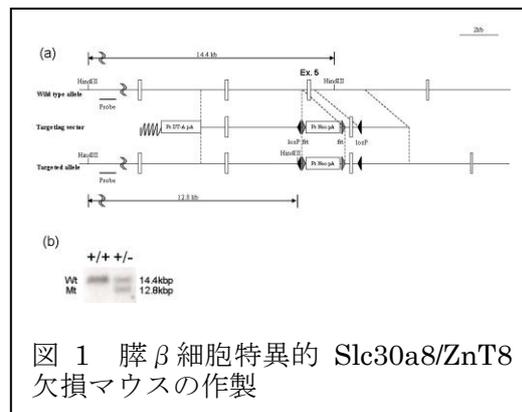


図1 膵β細胞特異的 Slc30a8/ZnT8 欠損マウスの作製

このことは、インスリン分泌に同期して亜鉛が膵β細胞から門脈を介して肝臓に流入することを意味する。次に、門脈からカテーテルを挿入し、一定濃度のインスリン溶液を肝臓に灌流し、下大静脈からのインスリン濃度を検出する肝灌流実験において 30 micro M の亜鉛を添加すると、亜鉛を添加しない場合に比して回収されるインスリン濃度が有意に高くなる現象を認めた。以上より、膵臓から分泌される亜鉛が肝臓においてインスリンのクリアランスを抑制することが示され、ZnT8 欠損マウスにはその調節異常が存在す

ることが明らかとなった。

つぎに、亜鉛がどのようなメカニズムでインスリン分解を抑制するのかについて検討したところ、亜鉛は肝細胞へのインスリンの endocytosis を阻害することが明らかとなった。特に、亜鉛はインスリン受容体の clathrin 依存性の endocytosis を阻害することが示唆された。

膵β細胞特異的 ZnT8 欠損マウスは、β細胞からのインスリン分泌はコントロールマウスよりもむしろ亢進しているにもかかわらず、肝臓でのインスリンクリアランスが亢進しているために末梢血中のインスリン濃度は正常もしくは低下を示す。この現象を反映するように、IPGTT (intraperitoneal glucose tolerance test) においては、糖負荷 30 分後の IRI は ZnT8 欠損マウスでコントロールよりも低値を示すのに対して、肝臓で分解をうけない c-peptide は ZnT8 欠損マウスにおいてむしろ高値を認めた。そして、インスリンクリアランスの指標としてよく用いられる、糖負荷後 30 分の c-peptide/IRI は ZnT8 欠損マウスにおいて有意に高値を示した。

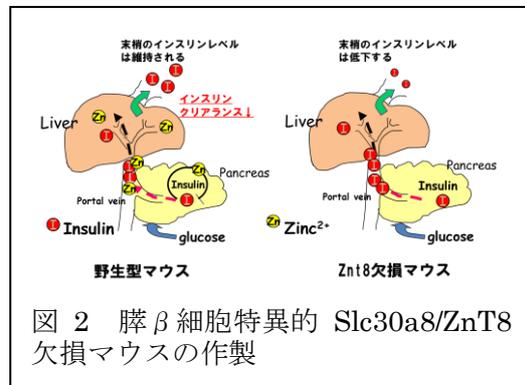
つぎに、この指標を利用して、ヒトにおいても Slc30a8/ZnT8 のリスクアレルが肝臓でのインスリンクリアランスの亢進をもたらすか否かについて解析を加えた。70 名ほどの健常人をリクルートし、75gOGTT を施行した。そしてそのうちの NGT のみを対象とし、Slc30a8 の rs13266634 について genotyping し、リスクアレルをホモに有するものをリスクアレル群、それ以外をノンリスクアレル群とした。BMI, HbA1c など両群間の臨床的指標には有意差は認められなかった。また、対象者全員に hyperinsulinemic euglycemic clamp を施行し、末梢のインスリン感受性の指標と考えられる GIR は両群間に差は認められないことを確認した。その上で OGTT のデータを解析したところ、c-peptide/IRI はリスクアレル群において有意に高値であり、ヒトにおいても Slc30a8 のリスクアレル群でインスリンクリアランスが亢進していることが明らかとなった。

以上まとめると、図 2 に示すような仮説が考えられる。すなわち、野生型マウスでは、膵β細胞からインスリンとともに亜鉛が分泌される。分泌された亜鉛はインスリンとともに門脈を流れ、肝細胞表面に到達する。この際にインスリン分子の近傍の亜鉛濃度がある閾値以上高ければ、インスリン分子の肝臓への取り込みを抑制することにより、肝臓でのインスリン分解を抑制する仕組みがあることが示唆された。インスリンはβ細胞から分泌されたあと、まず肝臓に流れ込み、その約 50%は最初の肝臓の通過時に分解される。

このときに同時に分泌される亜鉛は肝臓でのインスリンクリアランスを抑制することにより、肝をすりぬけて末梢に向かうインスリン濃度を高く保つことが可能となる。ZnT8 欠損マウスでは、インスリン分泌に伴う亜鉛分泌が低下しているために、インスリンが肝に到達した際に、肝臓へのインスリン取り込みが容易に起こり、その結果インスリン分解が亢進することにより、全身に向かうインスリン作用が低下する。

(考察)

上述したように、今回の検討ではオートファジー誘導における亜鉛シグナルの役割がどの程度重要であるのかについては残念ながら明らかにはできなかった。しかしながら、2型糖尿病感受性遺伝子として知られる SLC30a8 の想像を超えた役割、すなわち肝臓でのインスリン代謝を調節する機能について明らかにすることができた。本研究は、インスリン機能を調節する新たなメカニズムを同定するとともに、糖尿病発症機構を考える上でも新たな視点を提供しうる、きわめて重要な成果をもたらしたと考えられる。現在以下の論文を投稿中であり、2013年6月5日現在、revise 中となっている。M Tamaki, Y Fujitani, A Hara, T Uchida, et al: The diabetes susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. *J Clin Invest* in revision



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)

[学会発表] (計 4 件)

1. 藤谷与士夫 亜鉛のながれと 2 型糖尿病体質—SLC30A8/ZnT8 の機能解析より 第 55 回 日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム 1 : 2 型糖尿病 インスリン分泌 (招待講演) 2012 年 05 月 17 日~2012 年 05 月 19 日 横浜
2. Yoshio Fujitani Type 2 diabetes susceptibility gene SLC30A8/ZnT8

regulates hepatic insulin clearance 第 85 回日本生化学会大会 Symposium Zinc Signal: Its Molecular Basis in Cellular Functions and Disorders (招待講演) 2012 年 12 月 14 日～2012 年 12 月 16 日 福岡

3. 藤谷与士夫 ZnT8 の機能解析と 2 型糖尿病発症における役割 第 23 回日本微量元素学会学術集会 リサーチシンポジウム 1「トランスポーター研究の現状と今後の展開—臨床応用を目指して—」(招待講演) 2012 年 7 月 5 日 東京

4. 藤谷与士夫 2 型糖尿病感受性遺伝子 SLC30A8/ZnT8 は肝インスリンクリアランスを制御する 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム 10: 糖代謝と肝臓 (招待講演) 2013 年 5 月 16 日～2013 年 5 月 18 日 熊本

[図書] (計 1 件)

福中彩子、藤谷与士夫 第 8 章 亜鉛と糖尿病 亜鉛の機能と健康—新たにわかった多彩な機能— 建帛社 P. 189-207

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤谷与士夫 (FUJITANI YOSHIO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: **30433783**

(2) 研究分担者

綿田 裕孝 (WATADA HIROTAKA)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 60343480