

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 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790869

研究課題名（和文）視床下部 S6 キナーゼの糖尿病における役割

研究課題名（英文）Roles of hypothalamic S6 kinase on diabetes

研究代表者

小野 啓（ONO HIRAKU）

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：10570616

研究成果の概要（和文）：AMPK のリン酸化酵素 LKB1 の発現が、db/db マウスの肝臓で減少していることが分かった。ベクターを用いて肝臓に LKB1 を強制過剰発現すると、空腹時血糖が改善することが示された。また、S6 キナーゼの上流シグナルである PTEN を視床下部にて抑制すると摂食および体重増加が抑制され、高脂肪食の負荷により摂食・体重増加に対する影響は消失するが、これとは独立にインスリン感受性を増強させることが分かった。

研究成果の概要（英文）：(1) The expression of LKB1 in the liver of db/db mouse was decreased compared to the control mouse. LKB1 rescue in db/db mouse liver by expression vector improved glycemic control. (2) Inhibition of PTEN, the upstream regulator of S6 kinase, in the hypothalamic arcuate nucleus by an expression vector suppressed food intake and body weight gain, but this effect was blunted by overfeeding. PTEN inhibition in the arcuate nucleus improved insulin sensitivity independent to body weight.

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	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常、インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

過食と肥満に伴い、なぜインスリン抵抗性が生じ、それが増悪して 2 型糖尿病に至るのか、未だよく分かっていない。当研究代表者は、米国留学中、短期の過食によって視床下部の S6 キナーゼという蛋白質が活性化され、視床下部のインスリン情報伝達を抑制することを介して、肝臓のインスリン抵抗性をもたらすことを発見し、JCI に報告した(Ono H,

Pocai A, Wang Y, Sakoda H, Asano T, Backer JM, Schwartz GJ, Rossetti L. Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *J Clin Invest* 118:2959-, 2008)。

2. 研究の目的

当研究ではこの成果を踏まえ、2 型糖尿病の発症機序に、視床下部の S6 キナーゼや、他

のインスリン情報伝達抑制分子が、いかに関与しているかを検証したい。

3. 研究の方法

インスリン抵抗性および糖尿病モデル動物を用意する。各組織のインスリン情報伝達およびインスリン抵抗性惹起因子の活性を測定し、どのモデルのどの組織で、どの因子がインスリン抵抗性をおこす主因になっている可能性が高いかを調べる。視床下部でインスリン抵抗性を起こしている因子を抑制するために、脳定位固定術を用いてカニューレを脳に挿入し、マウスでは第3脳室に、ラットでは視床下部核に選択的に、ウイルスベクターあるいは阻害剤を注入する。同時に、動静脈カテーテル挿入術を施行し、1週間程度の回復後に無麻酔非拘束下での正常血糖高インスリンクランプ実験を行い、肝臓とその他の末梢組織でのインスリン感受性を分離して測定する。クランプ実験後の各組織サンプルを解析し、インスリン情報伝達、抑制したインスリン抵抗性惹起因子、肝臓の糖産生に關与する因子を活性定量する。

4. 研究成果

インスリン抵抗性/糖尿病モデルマウスおよびそのコントロールとして、C57BL/6マウス、短期・長期高脂肪食負荷マウス、db/dbマウスを用意し、各種組織において、シグナル伝達分子やその上流の因子が、モデルマウスどのように変化しているかを、リアルタイムPCRおよびウエスタンブロットを用いて調べた。その結果、代表的なAMPKのリン酸化酵素であるLKB1の発現が、肝臓において、1日の高脂肪食とdb/dbマウスにおいて有意に低下(mRNAレベルにおいて41±2%)していることが分かった(図1)。

Hepatic LKB1 expression was lower in db/db mouse

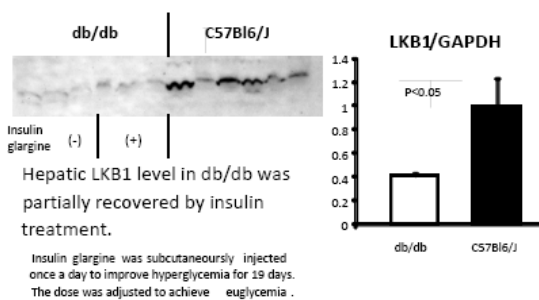


図1

さらに、db/dbマウスにインスリン治療を施して血糖を改善すると、LKB1の発現レベルが回復することも分かった(図1)。そこで、ベクターを用いて肝臓にLKB1を強制過剰発現したときに、糖代謝がどのようになるかを調べたところ、db/dbマウスにおいてLKB1をレ

スキューすることにより、空腹時血糖(コントロール 218±18mg/dL 対 LKB158±17、p<0.05) および糖負荷15分後血糖(442±13mg/dL 対 355±24)が改善することが示された(図2)。

Hyperglycemia in db/db mouse was ameliorated by adenovirus-induced hepatic LKB1 expression

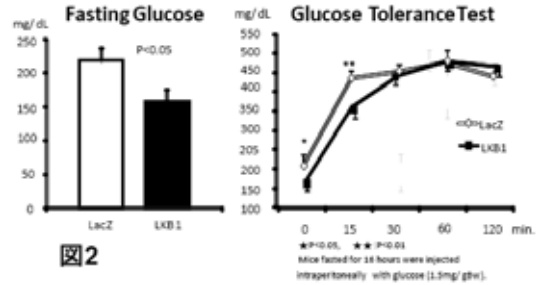
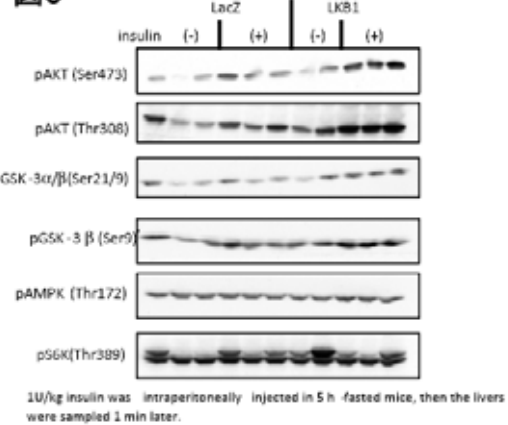


図2

この時、Aktおよびその下流のGSK3のリン酸化はLKB1の強制発現において上昇していた(図3)。以上のことから、肝臓のLKB1の減少がインスリン抵抗性に關与しており、これを補うことで糖尿病が改善しうることが示唆された。

Insulin and AMPK signaling after

insulin bolus injection



また、視床下部S6キナーゼの上流シグナルであるPTENおよびAktをラット視床下部でインターベンションした際に摂食およびインスリン感受性にどのように影響するかを調査した。競合阻害型PTENを視床下部弓状核で強制発現させ同部位でのPTENを抑制すると摂食および体重増加が抑制され、逆に恒常活性型PTENの強制発現では逆の効果がみられた。優位阻害型PTENをMBHに発現させたラットは、通常食を与えた場合には摂食量が減少しており(2.1±0.8g vs. 8.3±3.2, p<0.05, 術後1日; 図4)、体重の増加量も有意に低下していた(図5)。

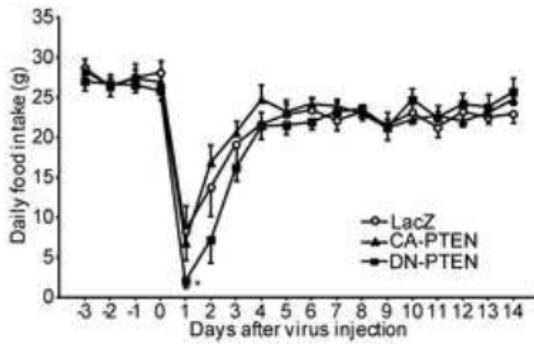


図4 弓状核PTEN変異体の摂食への効果

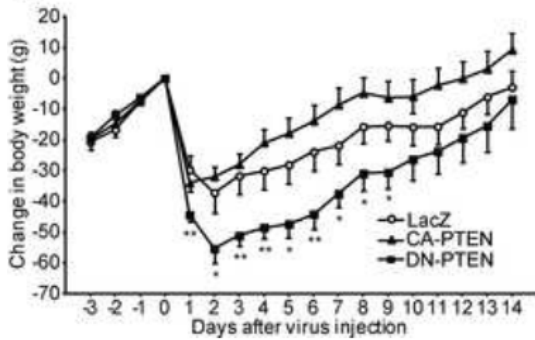


図5 PTEN変異体の体重への効果

興味深いことに、10%ラードを通常食に添加した高脂肪食を与えた場合には摂食量の減少(図6)および体重への影響は認められなかった(図7)。しかし、インスリン負荷試験においては、高脂肪食投与下においても優位阻害型PTEN発現ラットでインスリン感受性が高い傾向が認められた(インスリン投与15分後のPTEN抑制ラットの血糖 69 ± 5 mg/dL、コントロールは 80 ± 6 , $p=0.07$;図8)。逆に、恒常活性型PTEN発現ラットにおいては、空腹時の血中インスリン値が増加しており(図9)、インスリン抵抗性が生じている可能性が示唆された。

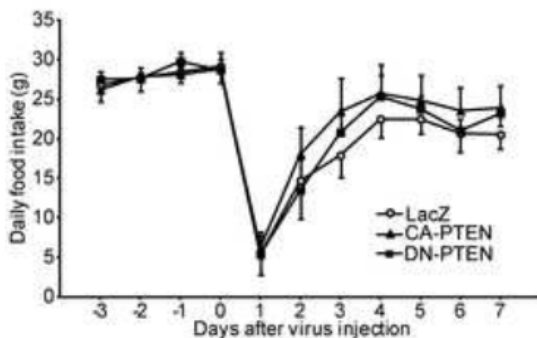


図6 高脂肪食負荷時の摂食への影響

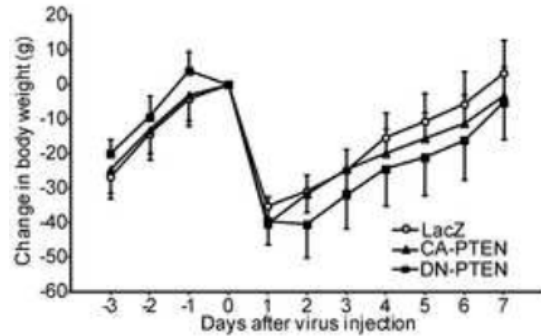


図7 高脂肪食負荷時の体重への影響

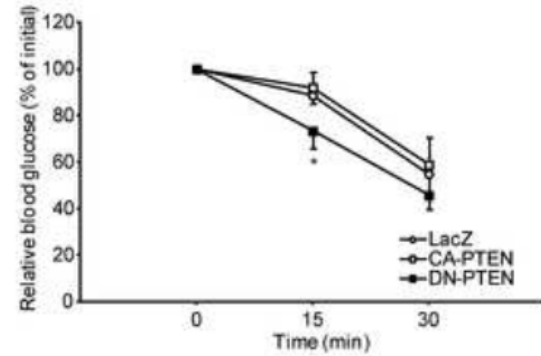


図8 高脂肪食時のインスリン負荷試験

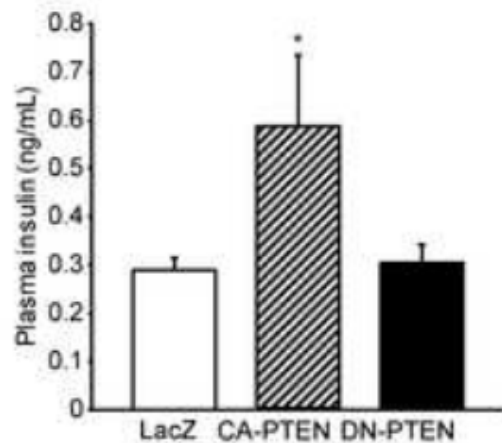


図9 高脂肪食時の空腹時血中インスリン

高脂肪食の負荷はこの摂食・体重増加に対する影響は消失してしまうが、インスリン感受性に対する影響は(体重が同じであるにもかかわらず)残存しており、視床下部インスリン情報伝達が摂食とインスリン感受性とをコントロールする仕組みは互いに独立している可能性が示唆された。

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7件)

Lustig Y, Ruas JL, Estall JL, Lo JC,

Devarakonda S, Laznik D, Choi JH, Ono H, Olsen JV, Spiegelman BM. Separation of the gluconeogenic and mitochondrial functions of PGC-1 α through S6 kinase. *Genes Dev* 25:1232-44, 2011; DOI 10.1101/gad.2054711 査読あり

Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyama A, Zhang J, Ono H,..., Asano T. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 associates with insulin receptor substrate-1 and enhances insulin actions and adipogenesis. *J Biol Chem* 286:20812-22, 2011; DOI 10.1074/jbc.M110.206904 査読あり

Ohno H, Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyama A, Ono H, ..., Asano T. 4F2hc stabilizes GLUT1 protein and increases glucose transport activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 300:C1047-54, 2011; DOI 10.1152/ajpcell.00416.2010 査読あり

小野 啓. 中枢神経のインスリン作用と糖尿病. *International Review of Diabetes* 3:28-31, 2011 査読なし

Watanabe M, Inukai K, Sumita T, Ikebukuro K, Ito D, Kurihara S, Ono H, Awata T, Katayama S. Effects of telmisartan on insulin resistance in Japanese type 2 diabetic patients. *Intern Med* 49:1843-7, 2010 査読あり

Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyama A, Ono H, Fujishiro M, Horike N, Yoneda M, Ohno H, Kamata H, Tahara H, Isobe T, Nishimura F, Katagiri H, Oka Y, Fukushima T, Takahashi SI, Kurihara H, Uchida T, Asano T. Pin1 associates with and induces translocation of CRIC2 to the cytosol, thereby suppressing CRE transcriptional activity. *J Biol Chem* 285:33018-27, 2010 査読あり

Cui X, Kushiyama A, Yoneda M, Nakatsu Y, Guo Y, Zhang J, Ono H, Kanna M, Sakoda H, Ono H, Kikuchi T, Fujishiro M, Shiomi M, Kamata H, Kurihara H, Kikuchi M, Kawazu S, Nishimura F, Asano T. Macrophage foam cell formation is augmented in serum from patients with diabetic angiopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 87:57-63, 2010 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

住田崇, 小野啓, 犬飼浩一, 片山茂裕, 粟田卓也 視床下部 PTEN/Akt の摂食とインスリン感受性に対する影響 第26回 日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会(愛知県) 2012年2月18日

小野啓, 住田崇, 犬飼浩一, 片山茂裕, 粟田卓也 視床下部 PTEN の摂食およびインスリン感受性調節における役割 第25回 日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会(東京都) 2011年11月5日

住田崇, 小野啓, 犬飼浩一, 片山茂裕, 粟田卓也 視床下部 PTEN の摂食およびインスリン感受性調節における役割 第54回 日本糖尿病学会年次学術集会(北海道) 2011年5月19日

Sumita T, Ono H, Inukai K, Awata T, Kayamama S. Acute suppression of hypothalamic PTEN reduces food intake and improves insulin resistance. 40th Keystone Symposia; Type 2 Diabetes, Insulin Resistance and Metabolic Dysfunction(Keystone, Colorado USA) 2011年1月16日

Sumita T, Ono H, Inukai K, Awata T, Katayama S. Role of Hepatic LKB1 in the pathophysiology of diabetes in obese diabetic mouse. FASEB summer research conference, Kyoto Japan, 2010年10月4日

住田崇, 小野啓, 犬飼浩一, 粟田卓也, 片山茂裕 肝 S6 キナーゼの活性化はインスリンの肝糖産生抑制効果を傷害する 第53回 日本糖尿病学会年次学術集会(岡山県) 2010年5月27日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 啓 (ONO HIRAKU)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10570616