

## 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6月15日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890151

研究課題名（和文） インスリンシグナルにおける活性酸素の関与とカベオリンによる制御機構についての研究

研究課題名（英文） The regulation of insulin signaling by caveolin through modulating reactive oxygen species.

研究代表者

押川 仁 (OSHIKAWA JIN)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：50381471

研究成果の概要（和文）：膜蛋白のカベオリンがインスリンシグナルを促進的に調節することが知られているが、その機序は明らかになっていない。本研究では、その機序として酸化ストレスによるPTP1Bの活性調節にカベオリンが関与していることを仮説としている。カベオリン3をノックダウンすると、インスリン受容体の活性は減少しPTP1Bの活性は上昇することから、カベオリン3がPTP1Bを介してインスリン受容体の活性を制御していることが明らかとなった。また、糖尿病モデルにおけるカベオリンペプチド投与実験を行い、糖代謝の改善を認めた。今後は、PTP1Bの活性制御への酸化ストレスの関与の検討、および糖尿病モデル動物における解析を進める予定である。

研究成果の概要（英文）：Although it has been reported that caveolin proteins promote the activity of insulin signaling, its mechanisms are not fully determined. In this study, caveolin-3 enhanced the activity of insulin receptor through PTP1B which is regulated by reactive oxygen species. We will examine this mechanism in detail using diabetic animal model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：糖尿病、インスリンシグナル、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景  
申請者はこれまでに、膜蛋白であるカベオリ

ンがインスリンシグナルを増強させることや、カベオリンによる糖尿病の遺伝子治療の可能

性を示してきた。ところが、その作用機序はかならずしも明らかではなかった。

近年、活性酸素がシグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして働くことが明らかにされているが、活性酸素の重要な標的分子はチロシン脱リン酸化酵素 (protein tyrosine phosphatase: PTP) である。PTPはインスリンシグナルの調節因子として重要であるだけでなく、カベオリンによる調節を受けることを以前、申請者は報告した。つまり、カベオリンが活性酸素の産生を調節し、その活性酸素がPTPの活性を調節することにより、インスリンシグナルが制御されている可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、カベオリンによる PTP を介したインスリンシグナル調節作用は活性酸素に依存している、という仮説を証明することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨格筋培養細胞におけるカベオリンのインスリンシグナル調節作用

まず、カベオリンの発現量と細胞内酸化ストレス状態およびインスリンシグナル活性との関連性を調べるために、骨格筋の培養細胞での実験を行った。カベオリンをノックダウンするためにカベオリン3に特異的なsiRNAをトランスフェクションし、インスリン受容体のリン酸化を免疫沈降、ウェスタンブロットで検討した。また、カベオリン3をノックダウンした細胞でのPTP1Bの発現、活性を測定した。

### (2) 糖尿病モデルマウスへのカベオリンペプチド投与効果

培養細胞における実験に加え、糖尿病モデルマウスへのカベオリンペプチドの投与を行った。カベオリンペプチドには細胞膜透過性を高めるための配列を結合させ、投与は腹腔内

注射とした。ペプチド投与30分後から糖負荷試験(GTT)を行い、また肝組織を摘出し糖代謝、糖新生に関与する分子の発現調節につき検討した。

## 4. 研究成果

骨格筋の培養細胞としてマウス由来のC2C12を用いた。分化したC2C12はカベオリン3を豊富に発現することが知られている。カベオリン3特異的なsiRNAを作製し、C2C12にトランスフェクションしたところ、2日後にはカベオリン3の発現が80%以上の減少を認めた。この細胞を用いて、インスリン刺激後のインスリン受容体の活性を免疫沈降、ウェスタンブロットにより調べたところ、インスリン刺激5分後のインスリン受容体のリン酸化は、カベオリン3-siRNA処理をした細胞で低下していた。機序は不明であるが、インスリン受容体の発現量そのものは、むしろカベオリン3-siRNA処理をした細胞で増加しており、カベオリン3がインスリン受容体のリン酸化に強く関与していることが示唆された。次に、PTP1Bの発現、活性を調べた。PTP1Bの発現量はカベオリン3-siRNA処理をしても変化はみられなかったが、PTP1Bの活性がカベオリン3-siRNA処理した細胞では増加していた。また、カベオリンのPTP1Bへの直接の作用を調べるために、in vitroにおけるカベオリンscaffolding domain peptideがPTP1B activityに与える効果を測定した。この実験結果から、カベオリン1とカベオリン3のscaffolding domainは濃度依存的にPTP1B activityを抑制することが分かり、カベオリン2に関してはPTP1B activityをむしろ上昇させることが分かった。

次に、糖尿病モデルマウスへのカベオリンペプチドの投与実験を行った。糖尿病モデルマウスは10週齢のKK-Ayオスを用いた。カベオリン3のペプチドは20のアミノ酸からなるscaffolding domainをもとにして

Antennapedia配列を融合し、細胞膜透過性のある36アミノ酸からなるペプチドを作成した。本ペプチドを腹腔内投与すると直ちに肝臓に取り込まれる。KK-Ayマウスにペプチドを投与後、糖負荷試験(GTT)を施行したところ、カベオリン3-scaffolding domainを含むペプチドを投与したマウスで有意に糖代謝が改善していることが分かった。

細胞およびin vitroの系の実験結果から、カベオリン3がインスリン受容体の活性の上昇に必要であることが分かった。その機序として、カベオリンによるPTP1Bの活性調節が重要であることが分かった。PTP1Bはカベオリン scaffolding domainとの直接相互作用があることは明らかであるが、一方、PTP1Bの活性は、酸化ストレスである活性酸素種(Reactive oxygen species:ROS)によって可逆的に制御されていることが報告されている。具体的には、活性型PTP1Bのシステイン残基Cys215(Cys-SH)が活性酸素種により酸化されるとシステインスルフェン酸(Cys-SOH)が生成され、PTP1Bが不活性状態に変換されることが知られている。本研究においてもPTP1Bのレドックス反応がカベオリンによるインスリンシグナルに重要な役割をはたしていることが想定されるため、今後は、カベオリン3による細胞内酸化ストレス状態の解析を進めるとともに、PTP1Bの酸化還元状態を解析する。具体的な手法として、ビオチン化dimedone類似体を用い、システインスルフェン酸に非可逆的に結合させ、検出するという方法を検討している。

糖尿病モデルマウスでのカベオリンペプチドの投与実験については、GTTにおいて糖代謝が改善することを証明したが、その機序については現在検討中である。肝臓における糖新生に関わるPEPCK, glucokinase, G6Paseなどの発現量の変化、PTP1Bの活性の変化を調べる

予定である。

#### 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2件)

- ① Oshikawa J, Kim SJ, Furuta E, Caliceti C, Chen GF, McKinney RD, Kuhr F, Levitan I, Fukai T, Ushio-Fukai M: Novel role of p66Shc in ROS-dependent VEGF signaling and angiogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H724-C732, 2012.
- ② Oshikawa J, Toya Y, Umemura S, Ishikawa Y: The role of caveolae, lipid rafts and caveolin in insulin signaling. *Trends in Cell Mol Biol* 5: 23-33, 2010

[学会発表] (計3件)

- ① Kim SJ, Urao N, Oshikawa J, Caliceti C, Furuta E, Chen GF, McKinney RD, Fukai T, Ushio-Fukai M: p66Shc, a Longevity Adaptor Protein, is Involved in ROS-dependent Activation of VEGF receptor 2 and AMP kinase: Role in VEGF-induced Energy Metabolism and Angiogenesis. Scientific Sessions of American Heart Association 2011. New Orleans, LA USA. 2011.11.16
- ② Varadarajan S, Urao N, Oshikawa J, McKinney RD, Ushio-Fukai M, Fukai T: Role of Extracellular Superoxide Dismutase, Copper Transporter ATP7A and Caveolae/lipid rafts in Endothelial Dysfunction in Type I Diabetic Mice. Scientific Sessions of American Heart Association 2010. Chicago, IL USA. 2010.11.16
- ③ Caliceti C, Oshikawa J, Razvi M, Urao N, McKinney RD, Fukai T, Ushio-Fukai M: p66shc Mediates VEGF Receptor Signaling Linked to Production of ROS from Mitochondria and NO from AMPK-eNOS Involved in Endothelial Cell Migration and Proliferation. Scientific Sessions of American Heart

Association 2010. Chicago, IL USA.

2010. 11. 15

6. 研究組織

(1) 研究代表者

押川 仁 (OSHIKAWA JIN)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：50381471

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：