

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390243

研究課題名(和文) 分子シャペロンによる細胞内ストレス制御の分子基盤解明とその糖尿病治療への応用

研究課題名(英文) Molecular analysis of cell stress regulation by molecular chaperon and application for diabetes treatment

研究代表者

荒木 栄一 (Araki, Eiichi)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：10253733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円、(間接経費) 3,870,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン作用臓器において分子シャペロンであるBiPやHSP72を発現導入することで、in vitroおよびin vivoにおいて糖代謝改善効果および小胞体ストレス耐性を認めた。逆に、BiPやHSP72を発現低下させるとインスリン抵抗性や代謝異常、小胞体ストレスへの耐性低下を招く結果となった。遺伝子発現解析ではHSP72導入にてAMPK、PGC-1a、Sirt1の発現増強を認め、代謝改善効果のeffectorである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Induction of molecular chaperone, such as BiP or HSP72 on insulin sensitive tissues improved glucose homeostasis, insulin signaling and ER stress resistance both in vitro and in vivo. On the other hand, attenuation of BiP or HSP72 resulted in impairment of glucose handling and less ER stress resistance.

On analyses of gene expressions when HSP72 was over expressed, AMPK, PGC-1a and Sirt1 mRNA were un-regulated. These molecules may exert anti-diabetic effects upon HSP72 induction.

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：糖尿病 小胞体ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病の発症には様々な代謝ストレスが関与する。これらのストレスを解除し正常な細胞機能の維持に寄与する分子シャペロンである HSP72 は、主に温熱刺激により誘導される代表的な分子シャペロンであり、インスリン抵抗性を有する糖尿病患者において、その発現レベルが低下することが報告されていた。当教室は世界に先駆けて、HSP72 を細胞・動物・ヒトにおいて誘導できるシステムを開発してきており、糖尿病における HSP72 誘導の有効性について、新しい知見を報告してきた。具体的には、

- 1) 温熱刺激に適切な微弱電流を追加することで、HSP72 のプロテアソームにおける蛋白分解を抑制し HSP72 発現レベルを増強
- 2) 上記の手法 (MET: Mild Electrical stimulation with hyperThermia)により、糖尿病モデルマウスの内臓脂肪量が減少し、インスリン抵抗性および耐糖能を改善
- 3) HSP72 誘導薬である GGA (geranyl geranylacetone)投与により、特に肝臓で HSP72 発現が増強され、MET 施行時と同様に代謝異常を改善
- 4) 適切な微弱電流のみでも、細胞レベルで PI-3 kinase-Akt シグナルを活性化し、糖取り込みを増強すること、MET 施行により、db/db マウスの膵細胞死を抑制しインスリン分泌が改善
- 5) ヒト健常人において MET 施行による副作用はなく、慢性炎症性マーカーの低下を認め、たことヒトメタボリックシンドローム該当者および肥満 2 型糖尿病患者に対し MET を施行し、内臓脂肪減少・インスリン抵抗性改善・耐糖能改善・慢性炎症低下・腎機能改善、などを学術誌や学会で報告してきた。

このように様々な手法で HSP72 発現レベルを増強することは、糖尿病やその前段階と考えられるメタボリックシンドロームの体組成・代謝異常・慢性炎症を改善し、糖尿病発

症予防から治療まで、さらには慢性血管合併症の抑制にも寄与できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

糖尿病の発症は年々加速度的に増加しており、その慢性血管合併症も増加の一途を辿っている。このため、糖尿病発症予防や新規治療法の開発は、喫緊の課題となっている。

本研究は、糖代謝異常の成因にストレス応答性の分子シャペロン HSP (heat shock protein) 72 がどのように関与するかを、細胞から個体レベルにおいて解明し、さらにその時期特異的・臓器特異的発現制御によって責任臓器を同定し、また HSP72 の治療標的としての有用性を分子レベルで解析することを目指している。申請者らは HSP72 を細胞・動物・ヒトにおいて誘導できるシステムを有しており、本研究の進展により糖尿病に対する新しい予防・治療法を提示することが期待されるとともに、糖尿病発症の分子機構や病態のさらなる理解に大きく資するものである。

## 3. 研究の方法

### 研究 1 (in vitro)

インスリンの標的臓器である肝臓、筋肉、脂肪、およびインスリン産生細胞である膵細胞の各々の cell line において BiP および Hsp72 を導入あるいはノックダウンし、高血糖状態あるいは小胞体ストレス環境下で細胞機能がいかに変化するかを解析する。

### 研究 2 (in vivo)

肝臓および膵細胞において時期特異的に Cre を発現できるマウスラインを確立する。これに Cre recombinase 作用下で BiP や Hsp72 発現を誘導できるマウスと交配し、tamoxifen 投与によって時期特異的・臓器特異的に BiP や Hsp72 を過剰発現できるマウスラインを樹立する。これらの変異マウスに対して糖尿病状態を導入し、代謝状態を解析

する。

#### 4. 研究成果

**研究1 (in vitro)** インスリンの標的臓器である肝臓、筋肉、脂肪およびインスリン産生細胞である膵細胞の各々の cell line において BiP もしくは HSP72 を過剰発現導入あるいはノックダウンした。単純に BiP 導入のみでインスリンシグナルの改善は認められなかったが、HSP72 導入した細胞を高糖濃度下で培養すると、低下していたインスリン作用が回復した。

また小胞体ストレス耐性に関しては、BiP, HSP72 導入どちらも抵抗性を示した。逆にノック・ダウン系ではインスリン作用の低下と小胞体ストレスへの抵抗性低下を示した。遺伝子発現解析では、HSP72 導入にて AMPK, PGC-1, Sirt1 の発現増強を認め、代謝改善効果の effector である可能性が示唆された。

**研究2 (in vivo)** 肝臓および膵細胞において時期特異的に Cre を発現できるマウスラインを確立した (Alb-CreER, RIP-CreER)。また Cre recombinase 作用下で HSP72 発現を誘導できるマウス (CAG-CAT-Hsp72) と交配し、tamoxifen 投与によって時期特異的・臓器特異的 HSP72 を過剰発現できるマウスラインも樹立できた。これらの変異マウスに対して糖尿病状態を導入し、HSP72 の時期・臓器特異的作用を検討している。

#### 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 27 件)すべて査読あり

1. Uchimura K, Fukuda K, Kondo T, Araki E, Tomita K, Kitamura K. The serine protease prostaticin regulates hepatic insulin sensitivity by modulating TLR4 signalling. *Nat Commun.*

Mar 11;5:3428. 2014.

2. Miyagawa K, Kondo T, Goto R, Araki E. Effects of combination therapy with vildagliptin and valsartan in a mouse model of type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* Nov 4;12(1):160. 2013.
3. Matsumura T, Kukidome D, Kondo T, Nishikawa T, Araki E. Association between circulating leukocyte subtype counts and carotid IMT in Japanese subjects with T2DM. *Cardiovasc Diabetol.* Dec 27;12(1):177. 2013.
4. Zhang SC, Araki E, Fang J: Relationship between lifestyle and lifestyle-related factors in a rural-urban population of Japan. *Environ Health Prev Med* 18:267-274, 2013
5. Morino-Koga S, Yano S, Kondo T, Shuto T, Araki E, Kai H: IR activation through its accumulation in lipid rafts by mild electrical stress. *J Cell Physiol* 228(2):439-446, 2013
6. Shimoda S, Matsumura T, Araki E: Evaluation of a new device for measurement of hemoglobin A1c for Japanese subjects. *Diabetol Int* 4:112-116, 2013
7. Sakaguchi M, Asashima M, Araki E, Nishinakamura R: The phosphatase Dullard negatively regulates BMP signalling and is essential for nephron maintenance after birth. *Nat Commun* 4:1398, 2013
8. Araki E, Kawamori R, Dugi K, Woerle HJ: Long-term safety of linagliptin monotherapy in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 15:364-371, 2013
9. Kawasaki S, Motoshima H, Kondo T, Araki E: Regulation of TNF

- converting enzyme activity in visceral adipose tissue of obese mice. *Biochem Biophys Res Commun* 430:1189-1194, 2013
10. Kinoshita H, Kondo T, Taketa K, Araki E: Apocynin suppresses the progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice by inactivation of macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 431:124-130, 2013
  11. Shimoda S, Iwashita S, Kondo T, Araki E: Efficacy and safety of sitagliptin as add-on therapy on glycemic control and blood glucose fluctuation in Japanese T2DM subjects ongoing with multiple insulin injections therapy. *Endocr J* 60 (10):1207-14, 2013
  12. Kashiwagi A, Kasuga M, Araki E, Oka Y, Ohashi H; Committee on the Standardization of Diabetes Mellitus-Related Laboratory Testing of JDS: International clinical harmonization of glycated hemoglobin in Japan: From JDS to NGSP values. *Diabetol Int* Published online: 13 March, 2012
  13. Matsumura T, Araki E: TZD-independent activation of PPAR  $\gamma$  is a potential target for diabetic macrovascular complications. *J Diabetes Invest* 3:11-23, 2012
  14. Kawamori R, Inagaki N, Araki E, Watada H, Woerle HJ: Linagliptin monotherapy provides superior glycaemic control versus placebo or voglibose with comparable safety in Japanese patients with T2DM. *Diabetes Obes Metab* 14:348-357, 2012
  15. Kondo T, Sasaki K, Kai H, Araki E: Hyperthermia With MES Protects Pancreatic  $\beta$ -Cells From Cell Stresses and Apoptosis. *Diabetes* 61:837-847, 2012
  16. Suefuji M, Kondo T, Araki E: The impact of CaMKII on insulin gene expression in MIN6 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 421:801-807, 2012
  17. Ishii N, Araki E: Anti-atherosclerotic Potential of Dihydropyridine Calcium Channel Blockers. *J Atheroscler Thromb* 19:693-704, 2012
  18. Namba M, Tobe K, Araki E, Shuto Y, Kadowaki T: The PREDICTIVE TM Study: a multinational, prospective observational study to evaluate the safety and efficacy of insulin detemir treatment in patients with T1 and T2 DM-data from the Japan cohort. *Diabetol Int* 3:11-20, 2012
  19. Su Y, Yamagata K, Araki E, Ando Y: Novel function of transthyretin in pancreatic alpha cells. *FEBS Lett* 586:4215-22, 2012
  20. Tsutsumi A, Kondo T, Kawasaki S, Araki E: Caloric restriction decreases ER stress in liver and adipose tissue in ob/ob mice. *Biochem Biophys Res Commun* 404: 339-344, 2011
  21. Yano S, Kondo T, Suico MA, Araki E, Kai H: Glucose uptake in rat L6 cells is increased by low-intensity electrical current through the activation of the PI-3K/Akt pathway. *J Pharmacol Sci* 115: 94-98, 2011
  22. Oiso H, Furukawa N, Araki E: The role of class I HDAC on gluconeogenesis in liver. *Biochem Biophys Res Commun* 404: 166-172, 2011
  23. Satoh T, Araki E, Mori M, Oyadomari S,

- Eguchi K: CHOP deletion does not impact the development of diabetes but suppresses the early production of insulin autoantibody in the NOD mouse. *Apoptosis* 16:438-448, 2011
24. Araki E, Fukushima H, Kishikawa H: HbA1c: The lower the better? *J Diabetes Invest* 2:45-47, 2011
  25. Yamagata K, Araki E, Miyazaki J, Song WJ: KCNQ1 regulates insulin secretion in MIN6 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 407:620-625, 2011
  26. Adachi H, Kondo T, Araki E: Angptl4 deficiency decreases serum TG levels in LDL-R knockout mice and STZ-induced diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 409:177-180, 2011
  27. Kondo T, Kai H, Araki E: HSR regulates insulin sensitivity and glucose homeostasis: pathophysiological impact and therapeutic potential. *Curr Diabetes Rev* 7:264-269, 2011
- [学会発表](計 15 件)
1. 近藤龍也、荒木栄一 HSR 活性化による糖代謝異常改善作用と末梢血単球の質的变化 第 51 回日本糖尿病学会九州地方会、沖縄コンベンションセンター 那覇、沖縄 2013 年 11 月 8 日～9 日
  2. Kondo T, Araki E. Activation of HSR Improves Metabolic Profiles in Type 2 Diabetes. 2013 ICDM and 5<sup>th</sup> AASD. Seoul, Korea. 2013/11/06-09.
  3. Kondo T, Matsuyama R, Araki E. HSR Activation using Heat Treatment with MES Reduces Adiposity and Improves Insulin Resistance and Inflammation in Male Subjects with T2DM. 6<sup>th</sup> CSSI scientific meeting. Sheffield. United Kingdom. 2013/08/12-22.
  4. Goto R, Kondo T, Ono K, Araki E. The Critical Role of HSP 72 in Diabetic Pathophysiology. ADA 73rd Scientific Sessions 2013/06/21-25. Chicago, USA. 2013/06/21-25.
  5. 近藤龍也、松山利奈、甲斐広文、荒木栄一、公募シンポジウム「細胞内ストレスと糖尿病」 HSR による細胞内ストレス軽減と糖尿病治療、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 メルパルク熊本 熊本 2013 年 5 月 16 日～18 日
  6. Kondo T, Matsuyama R, Kai H, Araki E. Activation of HSR and Insulin Resistance. 26th Spring Congress of the Korean Diabetes Association & 1st Korea-Japan Diabetes Forum, Jeju, Korea. 2013/05/9-11.
  7. Kondo T, Matsuyama R, Araki E. Heat Treatment with MES Reduces Adiposity and Improves Insulin Resistance and Inflammatory Markers in T2DM. 11<sup>th</sup> ICHO/29<sup>th</sup> JCTM2012 scientific meeting. Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan. 2012/8/28-31.
  8. Miyagawa K, Kondo T, Matsuyama R, Araki E. Combination of Vildagliptin and Varsaltan ameliorates both insulin insufficiency and insulin resistance in mouse models of T2DM. ADA 74<sup>th</sup> scientific meeting 2012. Philadelphia, USA. 2012/06/8-12.
  9. Kondo T, Matsuyama R, Kai H, Araki E. Heat Treatment with MES Reduces Adiposity and Improves Insulin Resistance and Inflammatory Markers in T2DM. ADA 74<sup>th</sup> scientific meeting 2012. Philadelphia, USA. 2012/06/8-12.
  10. Kondo T, Matsuyama R, Kai H, Araki E. Activation of HSR Improves Metabolic

Profiles in Diabetic Mice and Humans.  
Keystone Meeting. Santa Fe, USA.  
2012/1/31.

11. 近藤龍也、松山利奈、荒木栄一 HSR 活性化による糖代謝異常関連疾患へのアプローチ 第15回日本病態栄養学会年次学術集会 国立京都国際会館、京都 2012年1月14日
12. Kondo T, Matsuyama R, Kai H, Araki E. Activation of HSR Improves Metabolic Profiles in MS and T2DM. 16th Japan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus. Chiba, Japan. 2011/10/22.
13. Araki E, Kondo T, "Body composition in patients with T2DM." 47<sup>th</sup> EASD Annual meeting. Lisbon. Portugal. 2011/9/15.
14. Kondo T, Matsuyama R, Araki E. Activation of HSR Reduces Adiposity, Improves Insulin Resistance and Inflammation in MS and T2DM. 93<sup>rd</sup> ENDO meeting, Boston, USA. 2011/06/07.
15. 近藤龍也、松山利奈、荒木栄一、シンポジウム「慢性炎症と糖代謝異常」HSR とインスリン抵抗性第54回日本糖尿病学会学術総会 札幌市、ロイトン札幌、2011年5月21日

〔図書〕(計 10 件)

1. 山田祐一郎 (編集), 荒木栄一 (編集) 糖尿病患者の食事と運動ー考え方と進め方 (ヴィジュアル糖尿病臨床のすべて) 中山書店 2014
2. 荒木栄一 南江堂、2型糖尿病. 糖尿病最新の治療 2013-2015(岩本安彦、羽田勝計編) 2013
3. 古川昇、荒木栄一 日本臨床 特集: 肥満 2型糖尿病と耐糖能異常 2013
4. 松村剛、荒木栄一 フジメディカル出版 PPAR の最新動向: PPAR 標的薬の開発

動向. 期待されるチアゾリジン薬 2013

5. 中村二郎 (編集), 荒木栄一 (編集) 糖尿病性神経障害 基礎から臨床のすべて (ヴィジュアル糖尿病臨床のすべて) 中山書店 2013
6. 古家大祐 (編集), 荒木栄一 (編集) 糖尿病腎症のすべて (ヴィジュアル糖尿病臨床のすべて) 中山書店 2012
7. 植木浩二郎 (編集), 荒木栄一 (編集) 糖尿病予防と治療のエビデンス (ヴィジュアル糖尿病臨床のすべて) 中山書店 2012
8. 稲垣暢也 (編集), 荒木栄一 (編集) 糖尿病治療薬の最前線 (ヴィジュアル糖尿病臨床のすべて) 中山書店 2011
9. 谷澤幸生 (編集), 荒木栄一 (編集) 糖尿病の診断と治療の進め方 (ヴィジュアル糖尿病臨床のすべて) 中山書店 2011
10. 荒木栄一 月刊糖尿病 特集: 糖尿病治療最前線 医学出版 2011

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/met/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 栄一 ( ARAKI, Eiichi )

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号: 10253733

(2) 研究分担者

近藤 龍也 ( KONDO, Tatsuya )

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号: 70398204