

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390232

研究課題名(和文) 血管内皮細胞インスリン受容体基質の運動時骨格筋糖取り込み、動脈硬化における役割

研究課題名(英文) The role of endothelial IRS in the regulation of glucose uptake by muscle during exercise and arteriosclerosis

研究代表者

窪田 直人 (Kubota, Naoto)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50396719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：・血管内皮特異的 IRS-1/IRS-2ダブル欠損マウスを用いた検討：血管内皮特異的 IRS-1/IRS-2ダブル欠損マウスの血管内皮細胞では、インスリンによるAkt、eNOSのリン酸化がほぼ完全に消失していた。またこのマウスでは運動後認められる骨格筋における IRS-2の発現上昇が減弱しており、これに伴って骨格筋における糖取り込みが低下した。

・血管内皮細胞特異的 IRS欠損マウスを用いた検討：血管内皮細胞特異的 IRS-2欠損マウスにおいて内膜増殖に伴う内膜肥厚傾向が認められ、また血管内皮細胞特異的 IRS-2欠損ApoE欠損マウスでは動脈硬化亢進が認められた。

研究成果の概要(英文)：Insulin-stimulated phosphorylation of Akt and eNOS were significantly impaired in the endothelium from endothelial cell specific IRS-1/IRS2 double deficient mice. In these mice, glucose uptake by skeletal muscle during exercise was significantly decreased, suggesting that endothelial IRSs were crucial roles in the regulation of glucose metabolism during exercise. Moreover, neointima formation and arteriosclerosis were significantly exacerbated in endothelial cell specific IRS-2 knockout mice, suggesting that IRS-2 was important for protection of atherosclerosis in the endothelium.

研究分野：糖尿病代謝

キーワード：インスリン受容体基質

1. 研究開始当初の背景

我々は、最近血管内皮細胞において主要なインスリン受容体基質(IRS)である IRS-2 の血管内皮細胞特異的欠損マウスを作製し、血管内皮機能障害(インスリンによる eNOS 活性化障害)が、毛細血管の拡張や骨格筋間質へのインスリン移行を低下させ、骨格筋のインスリン依存性の糖取り込みを低下させることを明らかにした(**Cell Metab.**13:294,2011)。さらに肥満マウスにおいて持続する高インスリン血症の結果、血管内皮細胞の特に IRS-2 の発現が著減し、それに伴って毛細血管拡張能、骨格筋間質へのインスリン移行が低下し、骨格筋のインスリン依存性糖取り込み障害の原因となっていることを明らかにした(**Cell Metab.**13:294,2011)。

骨格筋における糖取り込み機構には、こうしたインスリン依存性の糖取り込み機構に加え、運動によって活性化される糖取り込み機構が存在する。運動時、骨格筋に分布する毛細血管が拡張し、骨格筋間質へのインスリンやグルコース移行が増大すること、血管内皮機能が低下している肥満状態では運動時の毛細血管拡張が低下し、骨格筋における糖取り込みも低下していることが報告されているが、その分子メカニズムや調節機構はなお十分に解明されていない。そこで本研究では第一に(1)運動時の血管内皮細胞 IRS の骨格筋糖取り込み機構における役割について検討する。血管内皮機能障害はまた動脈硬化症においてもしばしば認められる病態であり、実際、全身 IRS-1 欠損マウス、全身 IRS-2 欠損マウスでは内皮依存性の血管弛緩反応の減弱とカフ傷害誘導性の内膜肥厚の増大が認められる(**Circulation**107:3073,2003)。しかしこれらのマウスでは、動脈硬化症のリスクファクターの増大も同時に観察されており、血管内皮機能あるいは血管内皮細胞におけるインスリンシグナルが真に動脈硬化症に与える影響については十分に解明されていない。また IRS はマクロファージに代表される血球系にもその発現が認められることが報告されている。そこで本研究では第二に(2)血管内皮細胞やマクロファージ IRS の動脈硬化症における役割について検討する。

2. 研究の目的

我々は最近、血管内皮細胞の主要なインスリン受容体基質(IRS)である IRS-2 を血管内皮細胞特異的に欠損させたマウスやこの IRS-2 が著減している肥満マウスでは、毛細血管拡張能、骨格筋間質へのインスリン移行が低下し、骨格筋におけるインスリン依存性の糖取り込みが障害されることを明らかにした(**Cell Metab.**13:294,2011)。骨格筋における糖取り込みにはこうしたインスリン依存性の糖取り込み機構に加え、運動によって活性化される糖取り込み機構が存在する。運動時、骨格筋に分布する毛細血管が拡張し、骨格筋間質へのインスリンやグルコース移行が増大すること、血管内皮機能が低下している肥満状態では運動時の毛細血管拡張が低下し、骨格筋における糖取り込みも低下していることが報告されているが、その分子メカニズムや調節機構はなお十分に解明されていない。そこで本研究では第一に(1)運動時の血管内皮細胞 IRS の骨格筋糖取り込み機構にお

る役割について検討する。我々は既に血管内皮細胞特異的 IRS-1/IRS-2 ダブル欠損マウスにおいて運動後の骨格筋糖取り込みが障害されていることを明らかにしている。また、血管内皮細胞特異的 IRS 欠損マウス、マクロファージ特異的 IRS 欠損マウスを利用して、(2)血管内皮細胞やマクロファージ IRS の動脈硬化症における役割について検討する。

3. 研究の方法

(1)運動時の血管内皮細胞 IRS の骨格筋糖取り込み機構における役割について検討する：血管内皮細胞特異的 IRS-1/IRS-2 ダブル欠損マウスの運動後の毛細血管拡張能、骨格筋間質のインスリン・グルコース濃度、血管内皮細胞の eNOS 活性、骨格筋インスリンシグナルを測定するとともに、運動による eNOS 活性化の分子機構を解明する。運動による eNOS 活性化シグナルには、1. IRS-PI3K-Akt シグナル、2. AMP/ATP \uparrow -AMPK シグナル、3. cAMP-PKA シグナルの 3 つの経路が考えられる。阻害剤を用いた実験、血管内皮特異的 AMPK 欠損マウス、血管内皮特異的 PKA 欠損マウスを用いて、その活性化機構の全貌を明らかにする。また高脂肪食負荷実験を野生型マウスや各欠損マウスに対して行い、運動後の eNOS 活性化、毛細血管拡張能、糖取り込みを検討し、肥満に伴う血管内皮細胞 IRS の downregulation も含め、eNOS 活性化・毛細血管拡張能の運動時の骨格筋糖取り込みにおける生理的・病態生理的役割について明らかにする。

(2)血管内皮細胞やマクロファージ IRS の動脈硬化症における役割について検討する：血管内皮細胞あるいはマクロファージで特異的に IRS を欠損しているマウスに対してカフ・ワイヤー傷害モデル、粥状硬化症モデルである ApoE 欠損マウスを使用し、動脈硬化症発症・進展における血管内皮細胞・マクロファージ IRS の生理的・病態生理的役割を明らかにするとともに、その分子メカニズムを解明する。

4. 研究成果

(1)運動時の血管内皮細胞 IRS の骨格筋糖取り込み機構における役割について検討する。血管内皮特異的 IRS-1/IRS-2 ダブル欠損マウスを用いた検討：運動における血管内皮細胞の IRS の役割の全貌を解明すべく樹立した、血管内皮特異的 IRS-1/IRS-2 ダブル欠損マウスの血管内皮細胞では、インスリンによる Akt、eNOS のリン酸化がほぼ完全に消失していることを確認した。また反復慢性効果を検討するのではなく、一回の運動負荷後の骨格筋における糖取り込みを速やかに測定するため、ラベルした 3H-2DG 投与を行うための頸静脈カテと、運動後ストレスなく迅速に採血できるような動脈カテを予めそれぞれ留置したうえで、一定の運動の負荷を行える系を立ち上げた。そして興味深いことに、血管内皮特異的 IRS-1/IRS-2 ダブル欠損マウスでは運動後認められる骨格筋における IRS-2 の発現上昇が減弱し、これに伴って骨格筋における糖取り込みが低下しており、運動時の糖取り込みに血管内皮の IRS が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(2)血管内皮細胞やマクロファージ IRS の動脈硬化症における役割について検討する。血管内皮細胞特異的 IRS 欠損マウスを用いた検討：血管内

皮細胞の IRS-1 や IRS-2 の動脈硬化症における役割を解明するために、血管内皮細胞特異的 IRS-1 欠損マウス、血管内皮細胞特異的 IRS-2 欠損マウスに対してカフ傷害モデルを用いて内膜肥厚の程度、肥厚部分の細胞成分や増殖などを検討した。その結果、特に血管内皮細胞特異的 IRS-2 欠損マウスにおいて内膜増殖に伴う内膜肥厚傾向が認められ、また内膜肥厚部分の細胞成分の大部分が血管平滑筋であることが明らかとなった。また血管内皮細胞特異的 IRS-2 欠損 ApoE 欠損マウスを樹立し高コレステロール食を負荷したところ、動脈硬化亢進が認められ、こうした結果から血管内皮細胞における IRS-2 の動脈硬化進展において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

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 11 件)

1. Shirakawa J, Tanami R, Togashi Y, Tajima K, Orime K, Kubota N, Kadowaki T, Goshima Y, Terauchi Y. Effects of Liraglutide on β -Cell-Specific Glucokinase-Deficient Neonatal Mice. *Endocrinology* 153:3066-3075, 2012.
2. Shibata S, Tada Y, Asano Y, Hau CS, Kato T, Saeki H, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Sato S. Adiponectin Regulates Cutaneous Wound Healing by Promoting Keratinocyte Proliferation and Migration via the ERK Signaling Pathway. *J. Immunol.* 189:3231-3241, 2012.
3. Nakamura A, Tajima K, Zolzaya K, Sato K, Inoue R, Yoneda M, Fujita K, Nozaki Y, Kubota KC, Haga H, Kubota N, Nagashima Y, Nakajima A, Maeda S, Kadowaki T, Terauchi Y. Protection from non-alcoholic steatohepatitis and liver tumorigenesis in high fat-fed insulin receptor substrate-1-knockout mice despite insulin resistance. *Diabetologia* 55:3382-3391, 2012.
4. Shojima N, Hara K, Fujita H, Horikoshi M, Takahashi N, Takamoto I, Ohsugi M, Aburatani H, Noda M, Kubota N, Yamauchi T, Ueki K, Kadowaki T. Depletion of homeodomain-interacting protein kinase 3 impairs insulin secretion and glucose tolerance in mice. *Diabetologia* 55:3318-3330, 2012.
5. Kubota T*, Kubota N*, Kadowaki T. The role of endothelial insulin signaling in the regulation of glucose metabolism. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 14:207-216, 2013 (*co-first authors).
6. Nakaya K, Kubota N*, Takamoto I, Kubota T, Katsuyama H, Sato H, Tokuyama K, Hashimoto S, Goto M, Jomori T, Ueki K, Kadowaki T*. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor anagliptin ameliorates diabetes in mice with haploinsufficiency of glucokinase on a high-fat diet. *Metabolism* 62:939-951, 2013 (*co-corresponding authors).
7. Kumagai H*, Kubota N*, Kubota T*, Takahashi T, Inoue M, Kawai T, Iwayama K, Moroi M, Sugi K, Kadowaki T. Combined treatment with low-dose pioglitazone and beraprost sodium improves glucose intolerance without causing body weight gain. *Diabetology International* 4:226-232, 2013 (*co-first authors).
8. Shirakawa J, Togashi Y, Sakamoto E, Kaji M, Tajima K, Orime K, Inoue H, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi Y. Glucokinase activation ameliorates ER stress-induced apoptosis in pancreatic β cells. *Diabetes* 62:3448-3458, 2013.
9. Iwasaki Y, Shimomura K, Kohno D, Dezaki K, Ayush EA, Nakabayashi H, Kubota N, Kadowaki T, Kakei M, Nakata M, Yada T. Insulin Activates Vagal Afferent Neurons Including those Innervating Pancreas via Insulin Cascade and Ca²⁺ Influx: Its Dysfunction in IRS2-KO Mice with Hyperphagic Obesity. *PLoS One* 8:e67198, 2013.
10. Takamoto I, Kubota N*, Nakaya K, Kumagai K, Hashimoto S, Kubota T, Inoue M, Kajiwara E, Katsuyama H, Obata A, Sakurai Y, Iwamoto M, Kitamura T, Ueki K, Kadowaki T. TCF7L2 in mouse pancreatic beta cells plays a crucial role in glucose homeostasis by regulating beta cell mass. *Diabetologia* 57:542-553, 2014. (*co-corresponding authors).
11. Suzuki Y, Shimizu H, Ishizuka N, Kubota N, Kubota T, Senoo A, Kageyama H, Osaka T, Hirako S, Kim HJ, Matsumoto A, Shioda S, Mori M, Kadowaki T, Inoue S. Vagal hyperactivity due to ventromedial hypothalamic (VMH) lesions increases adiponectin production and release. *Diabetes* 63:1637-1648, 2014.

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1、窪田 直人、遺伝子改変マウスを用いた 2 型糖尿病の分子メカニズムの解明、日本内分泌学会 (2012 年 4 月)
- 2、窪田 直人、窪田 哲也、井上 真理子、植木 浩二郎、門脇 孝、中枢神経系と肥満研究のフロンティア; 中枢におけるインスリン作用の生理的・病態生理的役割、日本肥満学会 (2012 年 10 月)
- 3、窪田 直人、Diabetic Vascular Complications; The role of endothelial insulin signaling in the regulation of glucose metabolism、日本血管生物医学会 (2012 年 12 月)
- 4、窪田 直人、窪田 哲也、井上 真理子、植木 浩二郎、門脇 孝、脳内調節機構からみた肥満のメカニズムとその臨床応用; 中枢におけるインスリン作用の生理的・病態生理的役割、日本糖尿病・肥満動物学会 (2013 年 2 月)
- 5、窪田直人、窪田哲也、門脇孝、インスリン作用研究の進化と展望 インスリン受容体基質(IRS)-1、IRS-2 の生理的・病態生理的役割の解明、日本糖尿病学会 (2013 年 5 月)
- 6、窪田 直人、門脇 孝、インスリン作用機構、日本糖尿病学会 (2014 年 4 月)
- 7、窪田 直人、糖尿病診療の最前線 検査指標 (HbA1c) を絡めて、日本臨床検査自動化学会 (2014 年 9 月)
- 8、窪田 直人、体重とは? 体重の考え方: 現体重 VS 標準体重、日本病態栄養学会 (2015 年 1 月)
- 9、窪田 直人、作用機序を考慮した SGLT2 阻害薬使用時の食事療法の注意点日本病態栄養学会 (2015 年 1 月)
- 10、窪田 直人、発生工学的手法を用いた 2 型糖尿病・肥満の分子機構の解明、日本糖尿病・肥満動物学会 (2015 年 2 月)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :

出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

(窪田直人 Kubota Naoto)

東京大学医学部附属病院 准教授

研究者番号 : 5 0 3 9 6 7 1 9

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :