

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 5 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659125

研究課題名(和文)分子シャペロンを用いた糖尿病再生医療戦略

研究課題名(英文)Diabetes mellitus regenerative medicine strategy with cheperone.

研究代表者

伴野 祥一 (Shouichi, Tomono)

群馬大学・保健学研究科・教授

研究者番号：90164045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：今回、膵臓特異的にheart shock factor1を発現されることはできなかったが、脂肪細胞においてメタボリックシンドロームにおいて重要な以下の結果を得た。成熟した脂肪細胞で高血圧作動物質の添加でLipoprotein lipaseの発現の抑制を認めた。しかし、未熟の脂肪細胞では、逆にLipoprotein lipaseの発現の亢進を認めた。つまり、メタボリックシンドロームのように成熟脂肪細胞が多く存在すると、Lipoprotein lipaseの発現が低下して高中性脂肪の原因となる。平成27年9月17日 PLOS ONEにacceptされた。

研究成果の概要(英文)：We can not significantly express constitute active heat shock factor1. However, we have the information about metabolic syndrome bellow. The hypertensive agents reduced lipoprotein lipase expression in the mature adipocyte, but in immature adipocyte, the hypertensive agents induced lipoprotein lipase expression. we accepted the journal PLOS one at 17. September. The title is iAngiotensin II reduces lipoprotein lipase expression in visceral adipose tissue via phospholipase C 4 depending on feeding but increases lipoprotein lipase expression in subcutaneous adipose tissue via c-Src,

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 メタボリックシンドローム 脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化に伴い、高血圧、肥満、糖尿病、高脂血症の増加は社会問題の一つとなっている。糖尿病の罹患者も年々増加している。以前、我々は脂質代謝改善薬であるスタチンの血管内皮保護作用の報告で、分子シャペロン heat shock proteins (HSPs) の関与を報告した (Atherosclerosis: 2006:188(2) 265-273)。

この論文で、スタチンにより、複数の HSPs の発現させる転写因子である heat shock factor 1 (HSF1) が活性化されていることを示した。そして、HSF1 の decoy によって、血管内皮細胞機能改善が抑制されたことから、スタチンによる血管内皮細胞の機能改善には、HSF1 の活性化が関与することが示された。

次に我々は、HSF1 が血管内皮細胞の改善作用を有するか検討するために、HSF1 を過剰発現させるアデノウイルスを作成した。この HSF1 の過剰発現により、スタチンと同様な血管内皮細胞の機能改善を認めた。 (Atherosclerosis: 2007 190(2) 321-9)

この結果から、我々は、HSF1 がどの細胞にも発現していることから、HSF1 が血管内皮細胞だけでなく、膵β細胞にも機能改善の作用、つまりインスリン分泌改善の方向に作用すると仮説した。

2. 研究の目的

何故、膵β細胞はラ氏島を形成しα細胞、δ細胞ともにあるのであろうか？単にβ細胞のみを再生すれば、糖尿病治療は終わるのであろうか？胚性幹細胞からβ細胞へ分化させる再生医療に注目を受けているが、我々は、胚細胞を用いず、機能不全を起こした自らの細胞を再生させることにより、機能改善を図ることをコンセプトに、糖尿病治療に関して戦略を考察した。以前に我々は、分子シャペロンを誘導する転写因子 heat shock factor 1 (HSF1) を血管内皮細胞に過剰発現させることによって、血管内皮機能改善を認めた (Atherosclerosis 2007)。HSF1 はあらゆる細胞に発現していることから、HSF1 は膵β細胞においてもインスリンの発現やインスリン分泌を亢進させるのではないかと仮説した。また、我々は HSF1 の常時活性型を作成した。この活性型を使用することにより、効率よく効果を発揮すると思われる。

3. 研究の方法

分子生物学的手法

しかしながら、vector の作成、human insulin promoter を有した heart shock factor 1 の制作が困難であったため、方向を変えた。

糖尿病は、インスリンの分泌の低下以外に、インスリンの作用の低下がある。その対象は主に脂肪細胞であり、糖尿病と関連の深いメタボリックシンドロームにおける脂肪細胞を対象にし、皮下脂肪と内臓脂肪での高血圧作動物質であるアンジオテンシン II による中性脂肪分解酵素であるリポプロテイン リパーゼの発現の相違として分子生物学的に実験を行った。

実験方法：

チャールズ リバーから購入した 8-10 週の雄の 300-350 g の Wister ラットから、鼠けい部の皮下から、皮下脂肪を採取し、コラゲナーゼ処理にて脂肪細胞を単離し、アルブミンを添加した DMEM にて培養した。また、内臓脂肪に関しては、一般的には、精巣上体脂肪組織を使用するが、ヒトには精巣上体が存在しないので、腎臓周囲の脂肪組織を内臓脂肪として使用した。同様にコラゲナーゼ処理し、単離してアルブミンを添加した DMEM にて培養した。脂肪細胞単離後 2 日後に刺激し、刺激後 24 時間で回収した。

今回は、単離した脂肪細胞以外に脂肪組織を使用した。脂肪組織は約 100 mg を採取して DMEM で培養した。(脂肪細胞は、エネルギーを貯蔵庫であるので、周囲の繊維細胞の骨格の中で肥大化する。そのため、骨格であるコラーゲンを抜いてしまうと、肥大化した脂肪細胞が破裂する。つまり自然な状態と異なってしまふ。このため、今回の多くの実験は単離脂肪細胞でなく、脂肪組織を使用した。)

測定方法：

リポプロテイン リパーゼ mRNA とタンパクにて発現を回収した。mRNA は Quantitative polymerase chain reaction にて、β-actin と発現との相対的な発現を定量化した。タンパクに関しては、ウエスタン ブロットにて発現を調べた。

また、リポプロテイン リパーゼは、脂肪細胞から分泌されて、血管内皮細胞に輸送されて、作用する。そのため、分泌されたリポプロテイン リパーゼを測定するために、ヘパリン添加した PBS で培養して、脂肪細胞が分泌したリポプロテイン リパーゼの活性を測定した。

4. 研究成果：

そして、以下の結果を得た。

①：内臓脂肪において、高血圧作動物質であるアンギオテンシン II は、リポプロテイン リパーゼの発現を低下した。しかし、皮下脂肪では、逆に、アンギオテンシン II は、リポプロテイン リパーゼの発現を亢進させた。

②：皮下脂肪、内臓脂肪細胞で作用が異なるが、同じ、アンギオテンシン II 受容体タイプ 1 (GPCR) を介していた。

③：同じ GPCR であったが、皮下脂肪では、関与している $G\alpha$ subunit **i** が関与し、そして、内臓脂肪では、 $G\alpha$ subunit **q** が関与していた。

④：G タンパクにて活性化される phospholipase C β 4 の発現が、内臓脂肪において皮下脂肪に比較して優位に高かった。そして、内臓脂肪で si-RNA にて phospholipase C β 4 の発現を抑制するとアンギオテンシン II によるリポプロテイン リパーゼの発現の低下が解除されたことから、phospholipase C β 4 が key signal であることが分かった。

⑤：内臓脂肪における phospholipase C β 4 の発現は、日内変動し、夕方に発現が上昇した。そして、絶食によって phospholipase C β 4 の発現は抑制された。今まで、phospholipase C β 4 は、日内変動、気温によって発現が制御されることが、今回はじめて、食事によっても発現することが示された。

上記結果をまとめて、平成 27 年 6 月 4 日に PLoS ONE に投稿し、平成 27 年 7 月 1 日に Revise となり、再実験、英文校正を行い。平成 27 年 9 月 10 日に再提出し平成 27 年 9 月 17 日 accept 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 1 件)
Tsuyoshi Uchiyama^{1*}, Shoichi Tomono², Koichi Sato¹, Tetsuya Nakamura³, Masahiko Kurabayashi⁴, and Fumikazu Okajima¹. Angiotensin II reduces lipoprotein lipase expression in visceral adipose tissue via phospholipase C β 4 depending on feeding but increases lipoprotein lipase expression in subcutaneous adipose tissue via c-Src. PLoS ONE 17. September 2015 accepted. (in press 8. October 2015 2pm Eastern Time (US) publication date) 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

①：内山 強
Heat shock factor-1 と活性型 Heat shock factor-1 は血管内皮機能を改善する
日本高血圧学会
平成 24 年 10 月 20 日 栃木県 栃木市

②：内山 強
MIN6 細胞において、hHSF1, CA-hHSF1, HSPs は Insulin 分泌及び、pro insulin の発現を亢進させる。
日本糖尿病学会
平成 24 年 5 月 20 日 神奈川県 横浜市

[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

伴野 祥一 (Tomono Shouichi)

群馬大学 大学院保健学研究科 教授

研究者番号： 90164045

(2) 研究分担者

内山 強 (Uchiyama Tsuyoshi)

群馬大学 生体調節研究所 研究員

研究者番号： 40420103

(3) 連携研究者

()

研究者番号：