

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461357

研究課題名(和文) Gsk-3による統合的エネルギー代謝調節機構解明に基づく2型糖尿病治療の研究

研究課題名(英文) The elucidation of roles of GSK3 on the regulation of energy metabolism for developing therapeutic strategy of T2DM

研究代表者

田部 勝也 (TANABE, Katsuya)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00397994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病の病態形成におけるGSK-3活性制御障害の意義について解明を行った。小胞体ストレス下の膵細胞では、過剰なGSK-3活性がATF4蛋白分解の促進を介して小胞体ストレス応答性の翻訳制御を障害し、アポトーシス誘導を増強した。一方、脂肪組織において、高脂肪食負荷によりGSK-3が活性化した。さらに、GSK-3が直接的なリン酸化を介してPPARの転写活性を抑制的に制御することを明らかにした。この結果は、GSK3がエネルギー代謝調節に重要な役割を果たすことを示唆する。以上の研究成果から、GSK-3が2型糖尿病の病態形成に深くかかわっており、有望な治療標的となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the pathophysiological roles of GSK-3 in developing type 2 diabetes. Inactivation of the GSK3 attenuated ER stress-induced β -cell apoptosis with concomitant inhibition ATF4 protein degradation. As a consequence of ATF4 modulation, GSK-3 inhibition resulted in an alteration of translational adaptation to ER stress. On the other hand, GSK3 is activated in adipose tissue of mice fed high fat diet. In addition, GSK-3 negatively regulates transcriptional activity of PPAR α by giving a direct phosphorylation, suggesting that it may play an important role in the regulation of energy metabolism. These results indicate that aberrant activation of GSK3 is implicated to both β -cell loss and a modulation of energy metabolism. Therefore, understanding the mechanisms by which GSK3 modulates glucose metabolism helps developing new strategy to the treatment of type 2 diabetes.

研究分野：代謝学

キーワード：糖尿病 GSK3 膵細胞 小胞体ストレス エネルギー代謝 PPAR

1. 研究開始当初の背景

GSK-3 はインスリン・IGF-1 シグナルにより抑制的に調節される。糖尿病患者および糖尿病モデル動物では、糖代謝に重要な種々の臓器において、おそらくはインスリン作用不足により GSK-3 が活性化しており、耐糖能障害との関連が疑われる。申請者は、糖尿病モデル動物において GSK-3 ヘテロ欠損によりインスリン抵抗性が軽減すること、さらに、膵細胞量の減少を予防することを報告してきた。これらの知見より、GSK-3 が 2 型糖尿病に対する有望な治療標的であることが推察されるが、GSK-3 を介したエネルギー代謝調節機構は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

2 型糖尿病の病態形成における GSK-3 の役割について、(1)小胞体ストレス誘導性膵細胞アポトーシスにおける GSK-3 の役割、(2)脂肪組織における GSK-3 を介したエネルギー代謝調節機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

マウス単離ラ氏島および膵細胞株に薬剤性に小胞体ストレスを誘導した。Akita マウスより膵細胞株を樹立した。これらの小胞体ストレスモデルにおいて GSK-3 特異的阻害薬処理またはレトロウィルスを用いた GSK-3 抑制型変異体強制発現により GSK-3 活性を抑制した。アポトーシス誘導および小胞体ストレス応答経路に対する GSK-3 活性抑制の影響を生化学的手法により解析した。アポトーシスについて切断型カスパーゼ 3 および DNA fragment の検出により評価した。野生型 C56BL6 マウスに 12 週間行い高脂肪食負荷を行い、脂肪組織を採取し、GSK-3 のリン酸化をウェスタンブロット法により解析した。PPAR の転写活性を PPAR 応答配列を組み込んだ luciferase vector を HEK293 細胞にトランスフェクションし解析した。

4. 研究成果

薬剤性に小胞体ストレスを惹起したマウス単離膵ラ氏島およびマウス膵細胞株、変

異インスリンにより小胞体ストレスを来す Akita マウス由来の膵細胞株において GSK-3 が活性化しており、GSK-3 特異的阻害薬処理あるいは GSK-3 恒常抑制型変異体過剰発現によりアポトーシス誘導が減弱した。このとき、小胞体ストレス応答に重要な役割を担う転写因子 ATF4 の発現が増強しており、その主要なメカニズムとして GSK-3 が ATF4 の S214 のリン酸化を介して ATF4 蛋白分解を促進することを明らかにした。S214 は SCF-E3 蛋白分解酵素複合体のアクセプター分子である TrCP の認識配列の近傍に位置しており、TrCP と ATF4 の結合が GSK-3 の活性抑制により著しく減弱した。さらに、S214A 変異体 ATF4 では TrCP との結合が著しく減弱した。さらに、ATF4 転写抑制変異体過剰発現あるいはサイレンシングによる ATF4 機能抑制が GSK-3 抑制の抗アポトーシス効果を顕著に減弱した。一方、GSK-3 活性抑制により小胞体ストレス急性期応答である全般的タンパク翻訳抑制が早期に回復し、このとき eIF2 の脱リン酸化が関連した。一方、慢性期においては、タンパク翻訳は抑制的に制御され、これには ATF4 の転写標的である翻訳制御分子 4E-BP1 の発現増強が関連した。タンパク翻訳に対する GSK-3 抑制の効果は ATF4 依存적であった。加えて、Akita マウス由来の膵細胞株において GSK-3 活性を抑制したところ、蛋白翻訳が有意に抑制されるとともにインスリンの発現が蛋白レベルで減弱した。以上の研究成果から、小胞体ストレス誘導性膵細胞アポトーシスにおいて、GSK-3 による ATF4 発現抑制を介したストレス応答障害の重要性が明らかとなった。

インスリン抵抗性を来すインスリン受容体ヘテロ欠損マウスにおいて、GSK-3 ヘテロ欠損がインスリン抵抗性を劇的に改善する。この時、肝糖放出は GSK-3 ヘテロ欠損により抑制されないものの、筋肉におけるグルコース消費の亢進が関連した。しかしながら、脂肪組織における GSK-3 の作用は不明であった。

マウス脂肪組織において高脂肪食負荷により GSK-3 が活性化した。脂肪細胞機能のマスターレギュレーターである PPAR の Thr269 が GSK-3 のリン酸化基質であることを見出した。さらに、GSK-3 による Thr269 のリン酸化には Ser273 のリン酸化が必須であった。PPAR の転写機能は Ser273 のリン酸化を介して抑制的に制御され、チアゾリジン誘導体の作用点が Ser273 のリン酸化阻害であることがこれまでに明らかにされていることから、GSK-3 が PPAR の機能調節を介してエネルギー代謝調節に重要な役割を担う可能性が示唆された。

以上の研究成果を通じて、GSK-3 がインスリン作用障害の重要なメディエーターとして 2 型糖尿病の病態形成に深くかかわっており、有望な治療標的となり得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 9 件)

Wolfram syndrome: clinical features, molecular genetics of WFS1 gene. Tanabe K, Matsunaga K, Hatanaka M, Akiyama M, Tanizawa Y., Nihon Rinsho. 2015 Feb;73(2):341-349. Review. 査読無

小胞体ストレスと糖尿病 永尾優子、田部勝也、最新医学 70 巻 増刊号 頁 496-503, 最新医学社, 2015 査読無

小胞体ストレスと膵 細胞死 田部勝也、日本体質医学会雑誌 77 巻 第 1 号 頁 14-20, 日本体質医学会, 2015 査読無

Wolfram syndrome in the Japanese population; molecular analysis of WFS1 gene and characterization of clinical features. Matsunaga K, Tanabe K, Inoue H, Okuya S, Ohta Y, Akiyama M, Taguchi A, Kora Y, Okayama N, Yamada Y, Wada Y, Amemiya S, Sugihara S, Nakao Y, Oka Y, Tanizawa Y. PLoS One. 2014 Sep 11;9(9):e106906 査読有 DOI : 10.1371/journal.pone.0106906

A sibling case of Wolfram syndrome with a novel mutation Y652X in WFS1 Iwasaki N, Fukawa K, Matsuo M, Urano M, Watanabe M, Ono Y, Tanabe K, Tanizawa Y, Ogata M, Ide R, Takizawa M, Nagata S, Osawa M, Uchigata Y, Saito K. Diabetology International 2014 June;5(2):148-153. 査読有, DOI : 10.1007/s13340-013-0145-8

Wolfram 症候群における膵 細胞機能不全 松永仁恵、田部勝也、内分泌・糖尿病・代謝内科 38 巻 第 4 号 367-375, 科学評論社, 2014, 査読無

Clock-controlled output gene Dbp is a regulator of Arnt/Hif-1 gene expression in pancreatic islet β -cells. Nakabayashi H, Ohta Y, Yamamoto M, Susuki Y, Taguchi A, Tanabe K, Kondo M, Hatanaka M, Nagao Y, Tanizawa Y. Biochem Biophys Res Commun. 2013 May 3;434(2):370-375, 査読有, DOI : 10.1016/j.bbrc.2013.03.084.

膵 細胞機能・容量調節から病態まで-膵 細胞調節における GSK-3 の役割- 田部勝也、Islet Equality 3 巻 第 1 号 519-526, メディカルレビュー社, 2013, 査読無

Wolfram 症候群における膵 細胞の量的・質的異常 田部勝也、Diabetes Frontier 24 巻 第 5 号 18-21, メディカルレビュー社, 2013, 査読無

[学会発表](計 9 件)

1, Wfs1 欠損マウスにおける膵 細胞脱分化とその意義の解明 椎木幾久子、田部勝也、谷澤幸生、第 27 回分子糖尿病学研究会 2015 年 12 月 5 日 丸ビルホール&カンファレンススクエア(東京都千代田区)

2, Wfs1 deficiency compromises beta cell identity and results in loss of functional beta cell mass. 椎木幾久子、田部勝也、谷澤幸生、Keystone symposia Kyoto (国際学会) 2015 年 10 月 25 日~29 日 ウェスティン都ホテル(京都府京都市)

3, Wfs1 deficiency compromises beta cell identity and results in loss of functional beta cell mass. 椎木幾久子、田部勝也、谷澤幸生、第 75 回米国糖尿病学会 (国際学会) 2015 年 6 月 5 日~9 日 ポストンコンベンションセンター (USA)

4, Wolfram 症候群の診断と発症機構の解明 田部勝也、第 58 回糖尿病学会年次学術集会 (招待講演) 2015 年 5 月 21 日~23 日 シーモル下関 (山口県下関市)

5, Wfs1 欠損膵島における膵 細胞脱分化機構の解析 椎木幾久子、田部勝也、谷澤幸生、第 58 回糖尿病学会年次学術集会 2015 年 5 月 21 日~23 日 シーモル下関 (山口県下関市)

6, Gsk-3 による Integrate Stress Response(ISR)制御と膵 細胞アポトーシス誘導におけるその意義の解明 永尾優子、田部勝也、谷澤幸生、第 58 回糖尿病学会年次学術集会 2015 年 5 月 21 日~23 日 シーモル下関 (山口県下関市)

7, Gsk-3 による Integrate Stress Response(ISR)制御と膵 細胞アポトーシス誘導におけるその意義の解明 永尾優子、田部勝也、谷澤幸生、第 26 回分子糖尿病学研究会 2014 年 12 月 10 日 高知文化プラザかるぼーと (高知県高知市)

8, Role of Gsk-3 in the development of beta cell failure. 田部勝也、第 57 回糖尿病学会年次学術集会 (招待講演) 2014 年 5 月 22 日~24 日 大阪リーガロイヤルホテル (大阪府大阪市)

9, SCF TrCP and Gsk-3 mediated degradation of ATF4 is a pro-apoptotic mechanism in pancreatic cells under ER stress. 田部勝也、第 56 回糖尿病学会年次学術集会 (招待講演) 2013 年 5 月 16 日~18 日 メルパルクホール熊本 (熊本県熊本市) [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 :
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

田部 勝也 (TANABE, Katsuya)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 00397994

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :