

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461364

研究課題名(和文) 亜鉛トランスポーター制御による2型糖尿病治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapies for diabetes by manipulating zinc transporters

研究代表者

藤谷 与士夫 (Fujitani, Yoshio)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30433783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Znt8に依存して膵細胞から分泌される亜鉛イオンは、肝細胞において、インスリン-インスリン受容体複合体のクラスリンに依存したendocytosisを阻害することにより、肝インスリンクリアランスを抑制することが明らかとなった。
また、Zip13KOマウスの皮下組織においてベージュ脂肪細胞が増加することをこれまでに見出していた。本研究では、脂肪細胞褐色化におけるZip13の役割について解析を行った。その結果、ZIP13は細胞・個体レベルで脂肪細胞褐色化を抑制することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We showed that zinc ion secreted in concert with insulin from pancreatic beta cell suppressed hepatic insulin clearance by inhibiting clathrin-dependent insulin endocytosis. In addition, we demonstrated that inactivation of Zip13 preferentially promotes beige adipocyte biogenesis, energy expenditure and ameliorates diet-induced obesity in mice. Our data reveal unexpected association between zinc homeostasis and beige adipocyte biogenesis, which may contribute significantly to novel therapies for diabetes.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病 膵細胞 亜鉛 亜鉛トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

糖尿病や糖代謝における亜鉛の重要性は、1世紀以上前から、繰り返し指摘されているところであるが、その分子メカニズムの詳細は明らかにされてこなかった。そのような中で、最近 GWAS 解析 (genome-wide association study) により、亜鉛トランスポーター 8 (ZnT8) をコードする SLC30A8 遺伝子が、2型糖尿病感受性遺伝子として報告されたことを契機に、亜鉛代謝異常がヒトにおいて糖尿病発症に関係することが明らかとなった (R. Saxena et al. Science 316: 1331: 2007)。多くのグループが ZnT8 を欠損したマウスの作製・解析を行い、その中のいくつかのグループは、ZnT8 欠損マウスでは糖負荷時の末梢インスリン濃度が低値を示すことから、ZnT8 は膵細胞からのインスリン分泌を正に制御することにより細胞機能を調節するものと報告した (Pound et al. Biochem J 421:371: 2009, Nicolson et al. Diabetes 58: 2070: 2009)。我々も独自に膵細胞特異的 ZnT8 欠損マウスを作製した。ZnT8 欠損マウスは、糖負荷後に軽度の耐糖能異常を示し、末梢血インスリン濃度は低値を示した。しかしながら、膵細胞からのインスリン分泌はむしろ増加しており、インスリン分泌と末梢血インスリン濃度の間に著しい乖離を認めた。この乖離を説明すべく、ZnT8 欠損マウスの解析を継続した結果、膵細胞からインスリンと協調分泌される亜鉛イオンが、肝臓におけるインスリンの分解を抑制することで食後の末梢血インスリン濃度を高く維持する機構があることをつきとめた。さらに、db/db マウスや Akita マウスにおいて、随時血糖値が上昇しない糖尿病の初期の段階において、すなわち、膵島に十分なインスリン蛋白質の発現が認められる時期で ZnT8 の蛋白質の発現が低下することを見出し、報告していた (Tamaki, Fujitani et al. Islets 1:124-128, 2009)。

2. 研究の目的

本研究においては、(1) 亜鉛イオンが肝臓でのインスリンクリアランスを抑制する分子メカニズムを解明し、(2) 初期の糖尿病状態において、膵島での ZnT8 の発現低下が糖代謝異常を増悪させる可能性の検討と、その是正による、新たな糖尿病治療戦略の開発を目的とした。さらに、(3) Zip13 は中胚葉由来の結合組織に加えて骨や脂肪細胞のゴルジ装置の膜表面に発現する亜鉛トランスポーターであるが、研究期間の途中で並行して行っていた Zip13 欠損マウスの表現型解析のプロジェクトが本格的に進展を見せ始めたため、研究期間の後半では、研究対象とする亜鉛トランスポーターを ZnT8 から Zip13 に徐々に切り替えることとなった。

3. 研究の方法

(1) 亜鉛イオンが肝臓でのインスリンクリアランスを抑制する分子メカニズムの解明

肝臓におけるインスリン分解の経路はこれまでも、ある程度明らかとなっており、インスリン (Ins) がインスリン受容体 (IR) に結合するステップ、Ins-IR 複合体が細胞表面から endosome へと endocytosis されるステップ、③インスリンが endosome において insulin degrading enzyme (IDE) により分解をうける 3 つのステップに分けられる。これまでに、および③のステップには Zn^{2+} の濃度による影響はほとんど受けず、主このステップが Zn^{2+} により阻害を受けるといふ予備データが得られていたため、本研究においては上記のステップにターゲットをしばり、 Zn^{2+} がおよぼす影響について検討を加えた。

(2) 初期の糖尿病状態において、膵島での ZnT8 の発現低下が生じるメカニズムの解明とその介入法の開発

我々は先に述べたように、糖尿病モデルマウス

スにおいて、糖尿病の初期に ZnT8 が低下することを報告していたため、初期の食後の血糖上昇が ZnT8 の発現低下の原因かを探るために、食後に血糖が変動するマウスモデルを開発し、食後の高血糖を改善させる薬剤介入により、ZnT8 の発現を維持できるかどうかを検討した。さらに ZnT8 の発現低下の分子機構の詳細を検討するために SLC30A8 遺伝子のプロモーター解析を行なった。

(3) Zip13 の脂肪細胞褐色化における機能解析

Zip13 欠損マウス (Zip13KO) は、脂肪組織の量が少ないとの報告がなされていたため、脂肪組織における、Zip13 の機能に着目して解析を行なった。Zip13KO の脂肪組織の histology の変化と、遺伝子発現解析を施行し、KO 個体でのインスリン抵抗性の評価、高脂肪食負荷時の体重の増加推移や、酸素消費量の測定を行なった。その後、Zip13KO とコントロールマウスの脂肪前駆細胞から細胞株を樹立し、Zip13 欠損と脂肪細胞の褐色化の関係を明らかにすることとした。

4. 研究成果

(1) 亜鉛イオンが肝臓でのインスリンクリアランスを抑制する分子メカニズムの解明

これまでに、トランスフェリン受容体 (TfR) の細胞内移行が Zn^{2+} により阻害されるという報告がある。トランスフェリン受容体はクラスリン依存性経路により細胞内に移行する受容体の代表的なものである。従って、 Zn^{2+} はクラスリン依存性の endocytosis を抑制する可能性がある。一方で、インスリン受容体 (IR) はクラスリン依存性の経路と、カベオリン依存性の経路の両方で endocytosis をうけることが報告されていた。IR が肝細胞へと endocytosis されるのを観察できる系において、カベオリン依存性の endocytosis を阻害する chlorpromazine を添加すると、有意に

endocytosis の抑制が認められた。その状況下で Zn^{2+} を添加すると IR の endocytosis はさらなる抑制を受けた。一方、クラスリン依存性の経路を阻害する薬剤 M β CD の添加により endocytosis が抑制されている状況下では、 Zn^{2+} を添加しても、もはやそれ以上の抑制は観察できなかった。以上より、 Zn^{2+} は IR のクラスリンに依存した endocytosis 経路を抑制することが明らかとなった。

(2) 初期の糖尿病状態において、膵島での ZnT8 の発現低下が生じるメカニズムの解明とその介入法の開発

肥満糖尿病モデルである雄の db/db マウスに、午前中 2 時間、午後に 2 時間の合計 4 時間のみ食事を与える、食事制限を加えると、通常の体重増加の約半分程度のスピードに体重増加が抑えられるとともに、食後においてのみ血糖値が上昇する食後高血糖モデルとなった。6 週令から 6 週間、非治療群と miglitol + vildagliptin で治療する群に分けて、治療 6 週間後の膵島組織での ZnT8 の蛋白質発現を比較した。治療群では、毎食後の食後高血糖がほぼ正常化していた。治療開始後 6 週間後の膵島において、非治療群では ZnT8 の膵島における発現が著しく低下していたのに比較し、治療群では ZnT8 の発現が保持されていた。以上のことから、初期の糖尿病であっても、繰り返す食後の高血糖を介して Zn8 の発現低下が誘導されることが明らかとなった。

次に、SLC30A8 遺伝子上流 10kbp 領域の cloning を行なった。細胞株において、各種長さの SLC30A8 遺伝子 5' フラグメントを用いたプロモーター解析を行うことにより、細胞での発現を担う SLC30A8 遺伝子の領域の同定を試みたが、その同定には至らなかった。

(3) Zip13 の脂肪細胞褐色化における機能解

析

Zip13KO マウスの脂肪組織に対し HE (hematoxylin eosin)染色を行なったところ、皮下脂肪組織の褐色化が認められた。このことは、UCP1 蛋白質発現や、UCP1 を含む複数の褐色脂肪細胞特異的遺伝子発現の誘導によっても裏付けられた。Zip13KO では、コントロールマウスに比してインスリン感受性の有意な上昇が認められ、高脂肪食負荷時の体重の増加が有意に抑制された。また、Zip13KO では酸素消費量の有意な上昇が観察された。

以上から、Zip13KO では皮下脂肪において褐色化が誘導されることにより、エネルギー消費量が増加することで高脂肪食誘導性の肥満に対する抵抗性を示すことが明らかとなった。

次に、コントロールマウスと Zip13KO の鼠蹊部から前駆脂肪細胞を採取し、それぞれ不死化細胞株を樹立した。不死化したコントロールの前駆脂肪細胞において Zip13 を不活性化させると、褐色化が亢進し、Zip13KO の前駆脂肪細胞に Zip13 を発現させると褐色化が抑制された。以上のことから、Zip13 は脂肪細胞自律的に褐色化を負に制御していることが明らかとなった。今後、この現象の背景にある分子機序の解明に取り組んでゆく予定である。

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 6 件)

1. Fujimaki K, Ogihara T, Morris DL, Oda H, Iida H, Fujitani Y, Mirmira RG, Evans-Molina C, Watada H. SET7/9 Enzyme Regulates Cytokine-induced Expression of Inducible Nitric-oxide Synthase through Methylation of Lysine 4 at

Histone 3 in the Islet β Cell. *J Biol Chem.* 290:16607-18, 2015. doi: 10.1074/jbc.M115.661777. 査読有

2. Watada H, Fujitani Y. Minireview: Autophagy in pancreatic β -cells and its implication in diabetes. *Mol Endocrinol.* 29:338-48. doi: 10.1210/me.2014-1367, 2015. 査読有
3. Sasaki S, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Takahara M, Yamamoto Y, Yasuda T, Kaneto H, Fujitani Y, German MS, Akiyama H, Watada H, Shimomura I. Activation of GLP-1 and gastrin signalling induces in vivo reprogramming of pancreatic exocrine cells into beta cells in mice. *Diabetologia.* 58 : 2582-91, 2015 doi: 10.1007/s 00125- 015-3728-z. 査読有
4. Shigihara N, Fukunaka A, Hara A, Komiya K, Honda A, Uchida T, Abe H, Toyofuku Y, Tamaki M, Ogihara T, Miyatsuka T, Hiddinga HJ, Sakagashira S, Koike M, Uchiyama Y, Yoshimori T, Eberhardt NL, Fujitani Y, Watada H. Human IAPP-induced pancreatic beta cell toxicity and its regulation by autophagy. *J Clin Invest.* 124: 3634-3644, 2014 doi: 10.1172/JCI69866. 査読有
5. Tamaki M, Fujitani Y, Hara A, Uchida T, Tamura Y, Takeno K, Kawaguchi M, Watanabe T, Ogihara T, Fukunaka A, Shimizu T, Mita T, Kanazawa A, Imaizumi MO, Abe T, Kiyonari H, Hojo S, Fukada T, Kawachi T, Nagamatsu S, Hirano T, Kawamori R, Watada H. The diabetes-susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. *J Clin Invest.* 123:4513-4524. 2013 doi: 10.1172

/JCI68807. 査読有

6. Bin BH, Hojyo S, Hosaka T, Bhin J, Kano H, Miyai T, Ikeda M, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Cho EG, Fukue K, Kambe T, Ohashi W, Kim KH, Seo J, Choi DH, Nam YJ, Hwang D, Fukunaka A, Fujitani Y, Yokoyama S, Superti-Furga A, Ikegawa S, Lee TR, Fukada T. Molecular pathogenesis of spondylocheiroidysplastic Ehlers-Danlos syndrome caused by mutant ZIP13 proteins. *EMBO Mol Med.* 2014 Jul 9;6(8):1028-42. doi: 10.15252/emmm.201303809. 査読有

[学会発表](計 15 件)

1. Ayako Fukunaka The 93rd annual meeting of the physiology society of Japan Mar. 22nd 2016, Hokkaido, Zinc transporter ZIP13 regulates adipocyte browning (invited talk)
2. 福中彩子 第1回生活習慣病とがんの代謝栄養メカニズム研究会 2016年2月27日 東京 亜鉛トランスポーター ZIP13-C/EBP-b 経路による新規脂肪褐色化システムの発見 ポスター発表
3. Ayako Fukunaka *BMB* 2015 Dec. 1st 2015, Kobe, Zinc transporter ZIP13 regulates adipocyte browning (invited talk)
4. 藤谷与士夫 免疫病の発症機構研究会 大阪大学中之島センター 10/18, 2015 エーラス・ダンロス症候群原因遺伝子 Zip13 による脂肪細胞褐色化制御 (招待講演)
5. 福中彩子 第16回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会 2015年9月26日 幕張 エーラス・ダンロス症候群原因遺伝子 *Zip13* による脂肪細胞褐色化制御機構の解明 (招待講演)
6. Hara A, Fujitani Y, Ogihara T, Miyatsuka T, Watada H (2015). 51st EASD Annual Meeting. Stockholm (Sweden) 09/14-18, 2015 Human IAPP impairs the success of islet transplantation. (Poster session)
7. 福中彩子 第15回 islet biology 研究会 2015年7月18日 東京 2型糖尿病における新たな治療標的: IAPPと亜鉛シグナル (招待講演)
8. 福中彩子 第10回トランスポーター研究会 2015年6月20日 東京 亜鉛トランスポーターZIP13による脂肪細胞褐色化制御機構の解明 (招待講演)
9. Fujitani Y 熊本大学発生医学研究所リエゾンラボ研究会 HIGO プログラム最先端研究セミナー, 06/17, 2015, Beta-to-PP cell de-differentiation and deficiency in zinc/insulin co-secretion as novel mechanisms of beta-cell failure in diabetes. (招待講演)
10. 福中彩子 文京 Scientific セミナー 2015年5月13日 東京 亜鉛トランスポーターZIP13による脂肪細胞褐色化制御機構の解明 (招待講演)
11. 福中彩子 第29回肥満動物研究会シンポジウム 2015年2月 京都 エーラス・ダンロス症候群関連遺伝子 Zip13による脂肪細胞褐色化制御機構の解明 (招待講演)
12. 藤谷与士夫 群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同利用共同研究拠点セミナー, 群馬, 10/30, 2014, 転写因子と亜鉛トランスポーターによる細胞分化と糖代謝の制御 (招待講演)
13. 藤谷与士夫 第87回日本生化学会大会, 京都, シンポジウム, 10/15-18, 2014 Zinc transporter-8 regulates hepatic insulin clearance.
14. Fujitani Y ISZB (International Society for Zinc Biology) 2014 meeting, Asilomar, CA, USA 9/15-9/18, 2014 Zn, diabetes and

ZnT8 (シンポジウム口演)

15. 藤谷与士夫 第152回 朝日生命成人病研究所分泌セミナー, 06/07, 2014 亜鉛によるインスリン代謝調節と糖尿病 (招待講演)

〔図書〕(計 10 件)

1. 福中彩子, 藤谷与士夫, 綿田裕孝 (2015). "基礎 ヒト IAPP が誘導する膵細胞傷害とオートファジーによる制御." DIABETES UPDATE 4(1): 12-13
2. 藤谷与士夫 亜鉛によるインスリン分解の制御 Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2015 中外医学社 (2015) 総ページ数 9
3. 藤谷与士夫 (2015). "糖尿病における亜鉛の役割." 近畿亜鉛栄養治療研究会 5(2): 45-56.
4. 藤谷与士夫, 綿田裕孝 (2015). "膵細胞におけるオートファジー 1) IAPP とオートファジー." 内分泌・糖尿病・代謝内科 40(6): 427-433.
5. 福中彩子, 藤谷与士夫, 綿田裕孝 (2015). "ヒト IAPP が誘導する膵細胞傷害とオートファジーによる制御." Diabetes Strategy 5(1): 28-29.
6. 田蒔基行, 綿田裕孝, 藤谷与士夫 (2014). "SLC30A8/ZnT8 の新たな役割." 内分泌・糖尿病・代謝内科 38(5): 436-444.
7. 藤谷与士夫 (2014). "亜鉛輸送によるインスリン代謝調節." 医学のあゆみ 250(12): 1125-1126.
8. 藤谷与士夫, 綿田裕孝 (2014). "【2型糖尿病における膵細胞機能不全のメカニズム】膵細胞機能不全とオートファジー." 内分泌・糖尿病・代謝内科 38(4): 320-326.
9. 藤谷与士夫, 綿田裕孝 (2014). "Zn²⁺はインスリン分泌に関与するか？

Lessons from SLC30A8/ZnT8 KO mice." 内分泌・糖尿病・代謝内科 39(2): 114-121.

10. Fujitani Y, Tamaki M, Fukunaka A, Watada H. Zinc and its role in the pathogenesis of type 2 diabetes. Zinc signals in cellular functions and disorders. Springer, Tokyo (2014) 総ページ数 15

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/taisya_naibunpitsu/k4.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤谷 与士夫 (FUJITANI, Yoshio)
順天堂大学大学院・医学研究科・准教授
研究者番号: 30433783

(2) 研究分担者

福中 彩子 (FUKUNAKA, Ayako)
順天堂大学大学院・医学研究科・研究員
研究者番号: 60586402