

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860737

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答がインスリン抵抗性および動脈硬化形成に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Involvement of ER stress in insulin resistance and Arteriosclerosis Acceleration

研究代表者

高 俊弘 (gao, junhong)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：70455781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、インスリン抵抗性の形成や動脈硬化に代表される血管合併症の発症に果たす小胞体ストレス応答の役割を、その調節メカニズムも含めて詳細に検討することである。小胞体ストレスを軽減する役割を持つWFS1を欠損したマウスや培養細胞を詳細に検討し、WFS1が高脂肪食に及ぼす影響について分子メカニズムを解析した。また動脈硬化モデルマウスを用いてWFS1欠損マウスとかけ合わせWFS1が動脈硬化の発生進展について解析を行った。このようにメタボリックシンドロームの基盤となる病態から動脈硬化に至るまでの経路における小胞体ストレス応答の重要性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study mainly focuses on the role of ER stress in insulin resistance and atherosclerosis as well as the molecular mechanism of how ER stress affects the metabolic syndrome development. WFS1 is known to reduce ER stress. Using WFS1 deficiency mice and cells as research objects, their reaction and signal transduction under different stress conditions such as high fat induced obesity or other oxidative stress and inflammatory stress are systematically investigated. Moreover, the molecular mechanism of WFS1 in the pathogenesis of arteriosclerosis is also studied. Our results suggest that ER stress plays an important role in the pathogenesis of metabolic syndrome.

研究分野：医歯薬学

キーワード：メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

インスリン抵抗性は糖尿病、脂質代謝異常、高血圧に代表される様々な疾患の病態基盤となっており、こうした代謝異常の重積はメタボリックシンドロームとして概念化され、動脈硬化に代表される血管合併症を発症するため、その管理・治療が重要視されている。内臓脂肪蓄積に始まり、インスリン抵抗性の形成から代謝異常発症、最終的に動脈硬化に至るメカニズムに関しては様々な角度から多くの研究が報告されている。

全身の様々な病態に関与している生体反応として、**小胞体ストレス応答が重要視**されており、インスリン抵抗性と動脈硬化形成における小胞体ストレスの役割を検討した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、インスリン抵抗性の形成や動脈硬化に代表される血管合併症の発症に果たす小胞体ストレス応答の役割を、その調節メカニズムも含めて詳細に検討することである。小胞体ストレスを軽減する役割を持つ WFS1 を欠損したマウスや培養細胞を詳細に検討し、WFS1 が高脂肪食に及ぼす影響について分子メカニズムを解析した。また動脈硬化モデルマウスを用いて WFS1 欠損マウスとかけ合わせ WFS1 が動脈硬化の発生進展について解析を行った。このようにメタボリックシンドロームの基盤となる病態から動脈硬化に至るまでの経路における小胞体ストレス応答の重要性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1. インスリン抵抗性における WFS1 の役割の検討

野生型と WFS1 欠損マウスにおいて、35%高脂肪食を6週齢から6週間負荷し種々の検討を行う。

1) 体重や血中パラメーターを測定する。また、糖負荷試験やインスリン負荷試験を行い、耐糖能やインスリン感受性を解析する。

2) 肝臓や脂肪組織などの組織の遺伝子発現と病理所見の検討から代謝にかかわる種々の分子の発現変化や小胞体ストレスに関する検討を行い、肥満やインスリン抵抗性などの病態への WFS1 の及ぼす影響について検討する。

3) 酸素消費量や摂餌量を測定し、WFS1 がエネルギーバランスへの影響を介して、インスリン抵抗性に関与している可能性を検討する。

4) WFS1 発現アデノウィルスを用いて肥満・糖尿病マウスに静脈投与することで WFS1 過剰発現の系を作成し、インスリン抵抗性における WFS1 の役割を解析した。

2. 動脈硬化の発症・進展における WFS1 の役割の検討

1) WFS1 欠損マウスにおける炎症による反応性内膜肥厚の検討

大腿動脈にカフ傷害を施し3週間後に同部位の動脈の組織学的検討を行う。またカフを行った血管での RT-PCR 方法で関連遺伝子の発現について検討を行った。

2) WFS1・アポ E 欠損マウスにおける粥状動脈硬化の検討

WFS1・アポ E ダブル欠損マウスを用いて、

高コレステロール血症を背景とする粥状動脈硬化の進展を WFS1 の有無で検討する。既に作成済の WFS1・アポ E ダブル欠損マウスを用いて、高コレステロール血症を背景とする粥状動脈硬化の進展を WFS1 の有無で検討した。また大動脈の免疫染色や遺伝子発現に関する検討を行う。

3) 骨髄移植を用いた動脈硬化における WFS1 の役割の検討

上記のモデルに骨髄移植を行うことで、全身に WFS1 を有する、骨髄のみ WFS1 を有する、骨髄のみ WFS1 を欠損する、全身に WFS1 を欠損するの 4 群のマウスを作成し、反応性内膜肥厚や粥状動脈硬化進展における WFS1 の役割を区別して検討することが出来る。

4) 培養細胞を用いたストレス応答の検討

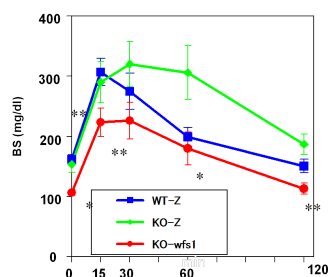
- 以上の知見をもとに、WFS1 欠損マウスを用い小胞体ストレス応答を *in vivo* で系統的に解析すること、および血管内皮細胞 (EC)・平滑筋細胞 (SMC)・マクロファージ (M) の個々の細胞系を用いて *in vitro* で小胞体ストレス応答に関する詳細な機序を解明することにより、動脈硬化の発症・進展の新たな機序を解明するという研究を進めた。動脈硬化形成に重要な役割を果たしている macrophage, 平滑筋細胞、血管内皮細胞にさまざまなストレス状況で、siRNA 方法で血管平滑筋と内皮細胞で WFS1 をノックダウンした後、同様の検討を行い、小胞体ストレス応答から発信される生体内ストレス

応答調節について解析した。また WFS1 欠損マウスから採取した腹腔 M で Tunicamycin で刺激した炎症ストレスでの WFS1 の役割について検討を行った。各培養細胞に小胞体ストレス(tunicamycin, thapsigargin, ホモシステインなど)や酸化ストレス(酸化 LDL, 過酸化水素など) 炎症(LPS, TNF など) 高血糖を誘導し、WFS1 を中心に細胞蛋白や mRNA レベルで生体内ストレス応答について詳細に検討する。siRNA にて上記の各種細胞の WFS1 をノックダウンした状況で、上と同様の検討を行い、小胞体ストレス応答から発信される生体内ストレス応答調節について解析する。

- WFS1 欠損マウスから採取した腹腔 M を、EC と共に培養することで、M の WFS1 が EC に及ぼしている作用に関して、接触共培養とトランスウェルを用いた非接触共培養の条件で検討する。

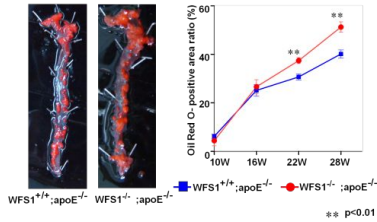
4 . 研究成果

1. インスリン抵抗性における WFS1 の役割の検討



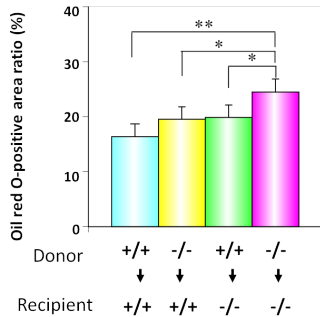
実験の結果、WFS1 欠損群において、高脂肪食によるインスリン抵抗性進展を示唆する結果が得られた。

2. 動脈硬化の発症・進展における Wfs1 の役割の検討



WSF 1 欠損マウスでは高コレステロール食負

荷 16 週後から Wfs1 野生型に比べ、高コレステロール血症による粥状動脈硬化が明らかに進展していた。また、RT-PCR を用いた大動脈での炎症性因子、接着因子の発現が有意に増加していた。



骨髄移植の結果から反応性内膜肥厚モデルでの骨髄移植実験では骨髄由来の

Wfs1 がカフ傷害による内膜肥厚に非常に重要な役割を果たしているのが明らかにした。また一方で粥状動脈硬化進展モデルでの骨髄移植実験では骨髄と血管細胞両方の Wfs1 が粥状動脈硬化進展に重要な役割を果たしているのがはっきりとなった。

また、細胞実験の結果場度をあわせて

- Wfs1 欠損マウスでは、高コレステロール血症による粥状動脈硬化進展が認められた。Wfs1 欠損マウスの大動脈では、炎症性因子、接着因子、酸化ストレス関連因子の発現亢進と ER ストレス反応の抑制を認めた。骨髄移植の結果から粥状動脈硬化の形成においては

においては血管壁と血球細胞の両方の Wfs1 が重要であると考えられた。Wfs1 の欠損あるいは発現抑制によって M、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞における炎症反応が亢進した。

- Wfs1 は炎症反応、増殖抑制因子を抑制しており、動脈硬化の発症、進展に重要な役割を果たしていると考えられた。

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)

なし

[学会発表](計 1 件)

発表者: Junhong Gao

題名: CHOP Mediates Insulin Resistance via Adipose Tissue Macrophage Polarization

第 75 回アメリカ糖尿病学会

2015 年 6 月 5 - 9 日 アメリカ ボストン

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高 俊弘 (Gao, Junhong)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・

助教

研究者番号: 70455781