

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460383

研究課題名(和文)酸化ストレス増加が引き起こすインスリン抵抗性の病態解明とNrf2の役割

研究課題名(英文)The role of Nrf2 in oxidative stress-mediated insulin resistance

研究代表者

宇留野 晃 (Akira, Uruno)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：90396474

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)：糖尿病は生活パターンの変化から患者数は増加しており、その病態の解明は重要な課題である。糖尿病は酸化ストレスの発生と関連が強い疾患と考えられていることから、その解明を目指した。ラットインスリンプロモーターCreによる条件付きセレノシステイン転移RNA(Trsp)欠失による(TrspRIPKO)マウスでは、脳視床下部領域で酸化ストレスが増加しインスリンおよびレプチン抵抗性を認め、高脂肪食負荷時に糖尿病および肥満が発症した。さらに、これらの表現型はNrf2活性化により抑制された。以上から脳視床下部の酸化ストレスは肥満・糖尿病を発症させ、Nrf2により病態が制御可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The numbers of type 2 diabetes mellitus patients are increasing due to the change of life pattern. As it is important to clarify the pathogenesis of diabetes mellitus, we tried to clarify it.

We generated conditional knockout mice of selenocysteine transfer RNA (Trsp) gene by using rat insulin promoter Cre (TrspRIPKO). The TrspRIP KO mice displayed increments of oxidative stress in hypothalamus. We also found that the mice displayed insulin and leptin resistance to develop obesity and diabetes mellitus. Obesity and diabetes mellitus due to oxidative stress were diminished by activation of Nrf2 signaling in hypothalamus. These results indicate that Nrf2 is a promising target for treatment and prevention of obesity and diabetes mellitus.

研究分野：病態生化学

キーワード：糖尿病 肥満 酸化ストレス Nrf2 セレノシステイン

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は重篤な合併症を引き起こす疾患であるが、我が国においても、国民の生活パターンの変化から患者数は増加しており、その病態の解明は重要な課題である。高濃度のグルコースは強力に活性酸素種 (ROS) を発生させることから、糖尿病は酸化ストレスの発生と関連が強い疾患と考えられている。

一方、Nrf2 (Nuclear factor erythroid-2-related factor) は酸化ストレスに応答し、抗酸化酵素遺伝子群を発現誘導する転写因子である。Nrf2 の転写活性は Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) を介して調節されており、一連の酸化ストレス応答機構を Keap1-Nrf2 系とよび、生体防御の鍵となる遺伝子発現制御系である。

全身性 Nrf2 活性化は糖尿病の発症を抑制するが (Urano A, et al. *Mol Cell Biol.* 2013)、酸化ストレスが増加するモデルについては、これまでの抗酸化酵素の欠失マウスについての報告では抗酸化酵素の種類によって糖尿病を悪化させる場合と改善させる場合の両者が存在し、酸化ストレスの増加が糖尿病の病態を悪化/改善のいずれに作用するのか、一定の見解が得られていなかった。

2. 研究の目的

糖尿病の病態における酸化ストレスの役割を明らかにできれば、糖尿病の新たな病態の解明や新たな糖尿病の治療法の開発に結びつく。このため、糖尿病の病態における酸化ストレスの役割を明らかにして、Keap1-Nrf2 系活性化による糖尿病発症予防効果の解明を目指した。

3. 研究の方法

慢性的に酸化ストレスを増大させるモデルとして、セレノシステインおよび Nrf2 に着目した。グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) やチオレドキシシン還元酵素などの抗酸化酵素は、セレンを含有し、酸化還元反応において重要役割を果たしている。

セレンはセレノシステインというアミノ酸の形で翻訳時に取込まれるが、セレノシステイン転移 RNA (tRNA(Sec)) をコードする *Trsp* 遺伝子の欠失は、セレノシステインを含有する複数の抗酸化酵素の発現を低下させ、慢性的な酸化ストレス増加を引き起こす (Suzuki T, et al. *J Biol Chem.* 2008)。

ラットインスリンプロモーター制御下で膵β細胞と脳視床下部領域で Cre でリコンビナーゼを発現させた RIP-Cre マウスと *Trsp*^{fllox} マウスを交配し、組織特異的 *Trsp* 欠失マウス (*Trsp*^{RIPKO}) を作出した。

さらに、*Trsp*^{RIPKO} マウスでは、膵β細胞および脳視床下部領域で *Trsp* 遺伝子が欠失することから、膵β細胞でのみ Cre リコンビ

ナーゼが発現する大腸菌人工染色体 (BAC) を利用したトランスジェニックマウスである BAC-Ins1-Cre マウスと *Trsp*^{fllox} マウスを交配し、*Trsp*^{Ins1KO} マウスを作出し、*Trsp*^{RIPKO} マウスとの比較検討を行った。

4. 研究成果

Trsp^{RIPKO} 群および対照群マウスに、通常食または高脂肪食を 8 週間給餌した。*Trsp*^{RIPKO} マウスは、通常食では随時血糖値に大きな変動を認めなかったが、高脂肪食負荷時には随時血糖値の上昇を認めた。さらに、*Trsp*^{RIPKO} マウスでは対照群マウスと比較して、高脂肪食負荷時の体重増加が顕著であり、腹部 CT にて腹部脂肪量の増加を認め、肥満の悪化も認めた。高脂肪食負荷時には、血中インスリン濃度および血中レプチン濃度の上昇を認め、さらにインスリン負荷試験およびグルコースクランプ試験でインスリン抵抗性を示す結果であった。

通常食負荷マウスは、前述の通り *Trsp*^{RIPKO} マウスで随時血糖値は上昇せず、体重増加も認めなかったが、血中インスリン濃度および血中レプチン濃度は上昇していた。さらに、レプチン投与試験では、*Trsp*^{RIPKO} マウスでレプチン感受性の低下を認めた。以上から、通常食では糖尿病や肥満の発症は認めなかったが、インスリン抵抗性およびレプチン抵抗性が存在していることが明らかとなった。

引き続き、*Trsp*^{RIPKO} マウスで認めた表現型が、脳視床下部および膵β細胞のいずれによるものかを解明する目的で、*Trsp*^{Ins1KO} マウスの解析を行った。*Trsp*^{Ins1KO} マウスは、予想通り膵β細胞でのみ *Trsp*^{fllox} の組換えを認め、脳視床下部では組換えを認めなかった。*Trsp*^{Ins1KO} マウスは、*Trsp*^{RIPKO} マウスで認めたインスリン抵抗性およびレプチン抵抗性を認めなかった。このことから、インスリン抵抗性およびレプチン抵抗性は、膵β細胞ではなく、脳視床下部での *Trsp* 欠失が原因であると考えられた。

Trsp^{RIPKO} マウスの視床下部を解析したところ、免疫組織学的解析にて第三脳室周囲に酸化ストレスマーカーであるマロンジアルデヒド陽性細胞の増加を認めた。さらに、イメージング質量分析による代謝物解析では、*Trsp*^{RIPKO} マウスの第三脳室周囲で酸化型グルタチオン濃度の上昇を認め、LC-MS で同部位における酸化脂質含有量の増加を確認した。*Trsp*^{RIPKO} マウスにレプチン投与し、に視床下部におけるレプチン受容体下流シグナルを調べたところ、STAT3 リン酸化の低下を認めた。また、*Trsp*^{RIPKO} マウスにインスリンを投与後に、肝臓および骨格筋でのインスリン下流シグナルを解析したところ、*Trsp*^{RIPKO} マウス肝臓で Akt のリン酸化低下を認めた。以上から、*Trsp*^{RIPKO} マウスでは、視床下部でのレプチンシグナル低下および肝臓でのインスリンシグナル低下が引き起

こっていることが明らかとなった。Trsp^{RIP}KOマウスの視床下部をさらに詳細に解析したところ、cleaved caspase-3 陽性細胞が増加しており、レプチンシグナルに重要なプロオピオメラノコルチン (POMC) 陽性ニューロン数の低下を認めた。

以上から、Trsp^{RIP}KO マウスでは、脳視床下部領域で増加した酸化ストレスが、POMCニューロン数を低下させることでレプチンシグナルを抑制し、レプチン抵抗性を引き起こし、さらに肝臓でのインスリンシグナルを低下させることでインスリン抵抗性を誘導し、肥満および糖尿病を発症させることが明らかとなった。

引き続き、視床下部の酸化ストレスによる肥満や糖尿病が Nrf2 を活性化することで解消されるのかを解明する目的で、条件付き Keap1 欠失マウスの解析を行った。Trps^{RIP}KO に、さらに Keap1^{lox} マウスを交配し、Trps-Keap1^{RIP}KO マウスを作出したところ、同マウスでは、視床下部での Nrf2 シグナル活性化を認め、酸化ストレスマーカーは低下していた。その結果、Trps-Keap1^{RIP}KO では、Trsp^{RIP}KO マウスの肥満および糖尿病発症を予防した。

以上から、脳視床下部で発生した酸化ストレスは、POMC 神経をレプチン抵抗性およびインスリン抵抗性を引き起こし、肥満および糖尿病を発症させ、Keap1-Nrf2 系の視床下部における活性化は酸化ストレスを低下させ、肥満および糖尿病発症を抑制した。

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 13 件)

- Higashi C*, Kawaji A, Tsuda N, Hayashi M, Saito R, Yagishita Y, Suzuki T, Urano A*, Nakamura M, Nakao K, Furusako S, Yamamoto M* (*Corresponding authors). The novel Nrf2 inducer TFM-735 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Eur J Pharmacol* 802, 76-84 (2017). DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.02.044. 査読有
- Yagishita Y¹, Urano A*¹, Fukutomi T, Saito R, Saigusa D, Pi J, Fukamizu A, Sugiyama F, Takahashi S, Yamamoto M* (*Corresponding authors, ¹Equal contribution). Nrf2 improves leptin and insulin resistance provoked by hypothalamic oxidative stress. *Cell Reports* 18, 2030-2044 (2017). DOI: 10.1016/j.celrep.2017.01.064. 査読有
- Urano A*, Yagishita Y, Katsuoka F, Kitajima Y, Nunomiya A, Nagatomi R, Pi J, Biswal S and Yamamoto M* (*Corresponding authors). Nrf2-mediated regulation of skeletal muscle glycogen metabolism. *Mol Cell Biol* 36, 1655-1672 (2016). DOI: 10.1128/MCB.01095-15. 査読有
- Saito-Hakoda A, Urano A, Yokoyama A, Shimizu K, Parvin R, Kudo M, Saito-Ito T, Sato I, Kogure N, Suzuki D, Shimada H, Yoshikawa T, Fujiwara I, Kagechika H, Iwasaki Y, Kure S, Ito S, Sugawara A. Effects of RXR Agonists on Cell Proliferation/Apoptosis and ACTH Secretion/Pomc Expression. *PLoS One* 10, e0141960 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0141960. 査読有り
- Urano A*¹, Yagishita Y¹, Yamamoto M*. The Keap1-Nrf2 system and diabetes mellitus. *Arch Biochem Biophys* 566C, 76-84 (2015) (*Corresponding authors, ¹Equal contribution). DOI: 10.1016/j.abb.2014.12.012. 査読有
- Urano A, Saito-Hakoda A, Yokoyama A, Kogure N, Matsuda K, Parvin R, Shimizu K, Sato I, Kudo M, Yoshikawa T, Kagechika H, Iwasaki Y, Ito S, Sugawara A. Retinoic acid receptor- α up-regulates proopiomelanocortin gene expression in AtT20 corticotroph cells. *Endocr J* 61, 1105-1114 (2014). DOI: 10.1507/endocrj.EJ14-0115. 査読有
- Furusawa Y, Urano A*, Yagishita Y, Higashi C, Yamamoto M* (*Corresponding authors). Nrf2 induces fibroblast growth factor 21 in diabetic mice. *Genes Cells* 19, 864-878 (2014). DOI: 10.1111/gtc.12186. 査読有
- Hirotsu Y, Higashi C, Fukutomi T, Katsuoka F, Tsujita T, Yagishita Y, Matsuyama Y, Motohashi H, Urano A*, Yamamoto M*. (*Corresponding authors) Transcription factor NF-E2-related factor 1 impairs glucose metabolism in mice. *Genes Cells* 19, 650-665 (2014). DOI: 10.1111/gtc.12165. 査読有
- Yagishita Y, Fukutomi T, Sugawara A, Kawamura H, Takahashi T, Pi J, Urano A*, and Yamamoto M* (*Corresponding authors). Nrf2 Protects Pancreatic β -Cells from Oxidative and Nitrosative Stress in Diabetic Model Mice. *Diabetes* 63, 605-618 (2014). DOI: 10.2337/db13-0909. 査読有
- Tsujita T, Peirce V, Baird L, Matsuyama Y, Takaku M, Walsh SV, Griffin JL, Urano A, Yamamoto M, Hayes JD. Transcription factor Nrf1 negatively regulates the cystine/glutamate transporter and lipid-metabolizing enzymes. *Mol Cell Biol* 34, 3800-3816 (2014). DOI: 10.1128/MCB.00110-14. 査読有
- Kato-Kaneko M, Liu X, Oki H, Ogasawara S, Nakamura T, Saidoh N, Tsujimoto Y, Matsuyama Y, Urano A, Sugawara M, Tsuchiya T, Yamakawa M, Yamamoto M, Takagi M, Kato Y. Isocitrate dehydrogenase mutation is frequently observed in giant cell tumor of bone. *Cancer Sci* 105, 744-748 (2014). DOI: 10.1111/cas.12413. 査読有

12. Saito-Hakoda A, Kogure N, Kudo M, Yoshikawa T, Shimizu K, Iki Y, Sato I, Kudo M, Uruno A, Matsuda K, Parvin R, Sugawara K, Yokoyama A, Ito S, Sugawara A. Is Heparan Sulfate in the Glomerular Basement Membrane Necessary for the Etiology of Diabetic Nephropathy? *J Biomol Res Ther* 3, e127 (2014). DOI: 10.4172/2167-7956.1000e127. 査読有
13. Kudo M, Matsuda K, Sugawara K, Iki Y, Kogure N, Saito-Ito T, Shimizu K, Sato I, Yoshikawa T, Uruno A, Yokoyama A, Saito-Hakoda A, Ito S, Sugawara A. ARB affects nicotine-induced gene expression profile in human coronary artery endothelial cells. *World J Hypertens* 4, 7-14 (2014). DOI: 10.5494/wjh.v4.i1.7. 査読有

[学会発表] (計 17 件)

1. 齊藤文彦、神野智之、中原基、水野貴志、竹内勝俊、荒井ゆかり、千代田幸治、川本雅毅、前田能崇、東知佳、林真貴子、津田直人、河路淳子、村井武彦、内田一也、神谷昌嗣、那波弘康、中尾一成、古迫正司、宇留野晃、山本雅之：イソチアゾール骨格を有する新規 Nrf2 活性化剤の創製 第 34 回メディスナルケミストリーシンポジウム 2016 年 11 月 30 日 つくば (つくば国際会議場)
2. 宇留野晃、柳下陽子、山本雅之：糖尿病における Keap1-Nrf2 系の役割 第 89 回日本生化学会大会「日本糖尿病学会共催シンポジウム 病気と生化学：個体レベルでの糖代謝調節機構と糖尿病」2016 年 9 月 26 日 仙台 (仙台国際センター)
3. 相川享、宇留野晃、柳下陽子、山本雅之：Nrf2 によるグリコーゲン分枝鎖酵素遺伝子発現制御機構の解明 第 89 回日本生化学会大会 (ポスター発表) 2016 年 9 月 27 日 仙台 (仙台国際センター)
4. Higashi C, Hayashi M, Tsuda N, Kawaji A, Nakao K, Satoh F, Nakamura M, Furusako S, Saito R, Suzuki T, Uruno A, Yamamoto M. A novel Nrf2 inducer TFM-735 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *The 32nd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis*, September 14-17, 2016 London (UK)
5. Saitoh F, Kamino T, Nakahara M, Mizuno T, Takeuchi K, Arai Y, Chiyoda K, Kawamoto M, Maeda Y, Higashi C, Hayashi M, Tsuda N, Kawaji A, Murai T, Uchida K, Kamiya M, Naba H, Nakao K, Furusako S, Uruno A, Yamamoto M. Identification and Evaluation of Isothiazole-Based Novel Nrf2 inducers *The 35th National Medicinal Chemistry Symposium*, June 26-29, 2016 Chicago (USA)
6. 宇留野晃、柳下陽子、山本雅之：骨格筋における Nrf2 のグリコーゲン代謝制御機構 第 38 回分子生物学会/第 88 回日本生化学会大会合同大会(BMB2015) (口頭発表・ポスター発表) 2015 年 12 月 3 日 神戸 (神戸ポートアイランド)
7. 柳下陽子、福富俊明、宇留野晃、山本雅之：Keap1-Nrf2 システムによる *Trsp* 欠失マウス膵β細胞および視床下部の酸化ストレス防御機構 第 38 回分子生物学会/第 88 回日本生化学会大会合同大会(BMB2015) (口頭発表・ポスター発表) 2015 年 12 月 3 日 神戸 (神戸ポートアイランド)
8. Yagishita Y, Uruno A, Katsuoka F, Funayama R, Nakayama K, Kensler TW, Yamamoto M. Nrf2 regulates glucose metabolism-related genes. 27th Annual UPCI Scientific Retreat (Poster presentation). June 18-19, 2015, Pittsburgh (USA)
9. 鈴木大、箱田明子、清水恭子、パービンレハナ、宇留野晃、青木聡、佐藤郁子、島田洋樹、小暮直敬、藤原幾磨、伊藤貞嘉、影近弘之、横山敦、菅原明：レチノイド X 受容体アゴニスト PA024 が副腎 CYP11B2 発現・アルドステロン分泌に及ぼす影響の検討 第 88 回日本内分泌学会学術総会 (口頭発表) 2015 年 4 月 25 日 東京 (ホテルニューオータニ東京)
10. 箱田明子、宇留野晃、清水恭子、パービンレハナ、横山敦、吉川雄朗、工藤正孝、影近弘之、岩崎泰正、伊藤貞嘉、菅原明：種々のレチノイド X 受容体アゴニストは、AtT20 細胞の増殖・アポトーシス・Pomc 発現・ACTH 分泌に異なる影響を及ぼす 第 88 回日本内分泌学会学術総会 (口頭発表) 2015 年 4 月 23 日 東京 (ホテルニューオータニ東京)
11. パービンレハナ、箱田明子、清水恭子、宇留野晃、鈴木大、青木聡、島田洋樹、小暮直敬、工藤正孝、岩崎泰正、伊藤貞嘉、横山敦、菅原明：Pomc 遺伝子のグルココルチコイドによるネガティブ・レギュレーションにおける NeuroD1 の関与 第 88 回日本内分泌学会学術総会 (口頭発表) 2015 年 4 月 23 日 東京 (ホテルニューオータニ東京)
12. Uruno A, Yagishita Y, Yamamoto M. Nrf2 regulates glycogen metabolism in skeletal muscle. The Keap1/Nrf2 Pathway in Health and Disease (Selected Oral Communication). Jan 7th, 2015, Cambridge (UK)
13. Yagishita Y, Uruno A, Katsuoka F, Funayama R, Nakayama K, Yamamoto M. Nrf2 regulates glucose metabolism-related

genes. The Keap1/Nrf2 Pathway in Health and Disease. Jan 7th, 2015, Cambridge (UK)

14. 宇留野晃、古澤祐樹、柳下陽子、山本雅之：Nrf2による糖尿病の発症抑制作用 第87回日本生化学会大会（口頭発表・ポスター発表）2014年10月17日 京都（国立京都国際会館）
15. 柳下陽子、宇留野晃、福富俊明、菅原明、山本雅之：Nrf2による酸化ストレス糖尿病モデルマウスの膵β細胞保護 第87回日本生化学会大会（口頭発表・ポスター発表）2014年10月17日、京都（国立京都国際会館）
16. Furusawa Y, Uruno A, Yagishita Y, Yamamoto M. Nrf2 positively regulates FGF21 in diabetic mice: a potential efficacy biomarker of Nrf2 Induction. American Diabetes Association 74th Scientific Sessions. June, 13th, 2014 San Francisco (USA)
17. 宇留野晃、古澤祐樹、柳下陽子、福富俊明、山本雅之：Keap1-Nrf2システムは糖尿病発症を抑制する 第80回日本生化学会東北支部例会（口頭発表）2014年5月10日 秋田（アキタパークホテル）

〔図書〕（計1件）

1. Yagishita Y, Uruno A, Yamamoto M. The NRF2-mediated gene regulation and glucose homeostasis. Molecular Nutrition and Diabetes, 1st Edition. Ed. by Mauricio D. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, 331-348 (2015). 400 pages.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：糖尿病の予防または治療薬のスクリーニング方法

発明者：山本雅之／宇留野晃／古澤祐樹

権利者：山本雅之／宇留野晃／古澤祐樹

種類：特許

番号：特願 2014-100408、PCT/JP2015/63724

出願年月日：2014年5月14日

国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dmbc.med.tohoku.ac.jp/official/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇留野 晃 (URUNO AKIRA)
東北大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：90396474

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

山本 雅之 (YAMAMOTO MASAYUKI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50166823

(4)研究協力者

柳下 陽子 (YAGISHITA YOKO)
東北大学・大学院医学系研究科・研究員
研究者番号：50733838