

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461338

研究課題名(和文) グルココルチコイドによる耐糖能障害におけるTBP-2の役割の解明

研究課題名(英文) Role of TBP-2 in glucocorticoid-induced glucose intolerance

研究代表者

藤本 新平 (FUJIMOTO, Shimpei)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：00333576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞において細胞培養実験ではグルココルチコイドによってTBP-2は過剰発現するが、グルココルチコイドによるグルコース刺激インスリン分泌障害におけるTBP-2の役割は不明であった。また生体での実験においては、グルココルチコイドによりインスリン感受性の低下とインスリンシグナルの減弱が観察された条件においても骨格筋、肝臓におけるTBP-2の過剰発現は必ずしも認められず、生体におけるグルココルチコイドによるインスリン抵抗性におけるTBP-2の役割は明確ではなかった。

研究成果の概要(英文)：In in vitro experiments using pancreatic beta cell line, glucocorticoid induced TBP-2-overexpression, however, role of TBP-2 in impairment of glucose-induced insulin secretion is not clear. In in vivo experiments, glucocorticoid-treatment brought about insulin resistance and reduced insulin signaling, but did not necessarily induce TBP-2-overexpression in skeletal muscle and liver. Therefore, role of TBP-2 in glucocorticoid-induced insulin resistance is not significant.

研究分野：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：TBP-2 グルココルチコイド 耐糖能障害

1. 研究開始当初の背景

グルココルチコイドは生体内でインスリン拮抗ホルモンの一つとして作用している。その過剰状態は、クッシング症候群、グルココルチコイド剤投与などで生じ、臨床上遭遇する頻度は高く、約30%程度に糖尿病を生じるといわれている。グルココルチコイドによる耐糖能障害はインスリン抵抗性の悪化が原因と考えられてきたが、近年グルコースによるインスリン分泌障害も関与するとされている。グルココルチコイドによるインスリン抵抗性・分泌障害の機序に関しては、これまでインスリンシグナルやインスリン分泌機構において重要な役割を果たす既知の分子への効果から検討されてきたが、グルココルチコイドがどのような機序を介してこれら分子へ作用するのかは未解明である。

-アレスチンファミリーに属する蛋白である Thioredoxin-binding protein 2 [TBP-2、別名 Thioredoxin-interacting protein (Txnip)]が、核内転写因子として作用し、その過剰発現によって、肥満型糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスの膵細胞でのインスリン分泌障害と骨格筋でのインスリン抵抗性が生じることを、TBP-2 欠損マウスを用いて明らかにした。TBP-2 の転写増強因子としてグルココルチコイドが知られていること、ob/ob マウスの耐糖能障害にグルココルチコイド過剰状態が関与していることから、グルココルチコイドによる耐糖能障害に TBP-2 が関与しているのではと着想した。また近年、TBP-2 が自然免疫システムにおいて重要な役割を果たす NLRP3 インフラマゾームを活性化すること、NLRP3 インフラマゾームの活性化はインスリン分泌障害、インスリン抵抗性に関与すること、グルココルチコイドにより NLRP3 インフラマゾームが活性化されることも知られている。

2. 研究の目的

糖尿病の病態における膵細胞、インスリン標的臓器の役割の解明を目的とした長年にわたる研究基盤と TBP-2 の耐糖能障害における役割を世界に先駆けて明らかにした実績に基づき、未解明のままとなっているグルココルチコイドによるインスリン分泌障害・インスリン抵抗性の機序について解明する。グルココルチコイドによる耐糖能障害における TBP-2 の役割について、インスリン分泌障害とインスリン抵抗性の両面から自然免疫系の関与も含めて検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)生体でのグルココルチコイドによる耐糖能障害における TBP-2 の役割の検討
TBP-2 欠損マウス及び野生型マウスにグルココルチコイドとしてデキサメサゾン投与し、耐糖能、インスリン抵抗性を評価し、グルココルチコイドによる耐糖能障害における

TBP-2 の生体内での役割を明らかにする。インスリン抵抗性はインスリン負荷試験で評価したが、1U/kg のインスリン負荷では TBP-2 欠損マウスに低血糖で死亡する場合もあり、0.75U/kg で実施した。また TBP-2 欠損マウスは絶食が長期となると死亡するので、絶食時間は8時間で実施した。

(2)膵細胞におけるグルココルチコイドによるインスリン分泌障害の機序の検討
膵細胞株である INS-1 細胞をデキサメサゾン存在下に培養し、TBP-2 siRNA oligo、negative control oligo を導入し、デキサメサゾンによるグルコース誘発性インスリン分泌の低下が TBP-2 ノックダウンにより回復できるかどうかを検討する。TBP-2 の関与が明らかになった場合には NLRP3 インフラマゾーム活性化についても検討する。

(3)インスリン標的臓器のインスリンシグナルの検討
生体に対してデキサメサゾンを単回腹腔内投与もしくは薬剤溶出ペレットを皮下に投与後、TBP-2 の発現レベルを肝、骨格筋においてウエスタンブロットで検討する。インスリンシグナルは生体へのインスリン投与後の Akt のリン酸化を指標に検討する。

(4)動物実験に関しては、高知大学動物実験委員会に実験計画書を提出し承認を得た後に実施した。動物への苦痛が最小限となるよう配慮した。

4. 研究成果

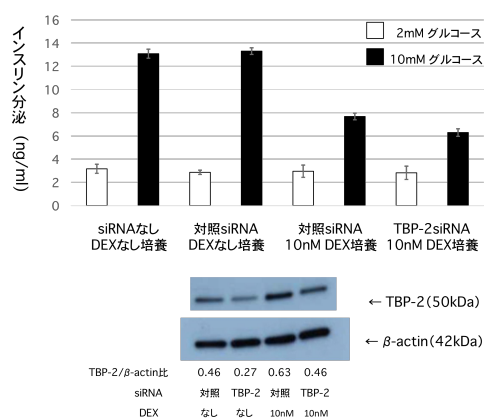
(1)野生型マウスと TBP-2 欠損マウスにデキサメサゾンを単回投与した。野生型では 5mg/kg 以上の腹腔内投与で耐糖能障害とインスリン感受性低下を認めた。この条件下で、骨格筋と肝臓における Akt のリン酸化を指標とするインスリンシグナルの障害を認めた。TBP-2 欠損マウスでは、耐糖能障害とインスリン感受性は改善傾向にあったが、Akt のリン酸化はもともと亢進しておりインスリンシグナルは増強していた。しかしこの条件において野生型では、デキサメサゾンにおける骨格筋と肝臓における TBP-2 の過剰発現は観察されず、単回投与による TBP-2 の役割は証明できなかった。

そこで、皮下に薬剤溶出デキサメサゾンペレットを植え込み(対照には偽薬を植え込み)1週間生体をデキサメサゾンに暴露する実験を実施した。野生型マウスに対する 0.5mg のペレット植え込みでは、インスリン負荷試験におけるインスリン感受性の低下がみられたが、骨格筋、肝臓における TBP-2 タンパクの過剰発現はみられなかった。また野生型マウスに対する 5mg のペレット植え込みでは、インスリン負荷試験におけるインスリン感受性の低下がみられ、骨格筋と肝臓における

Akt のリン酸化を指標とするインスリンシグナルの障害を認めた。この条件において、骨格筋において軽度の TBP-2 過剰発現がみられたが、肝臓における TBP-2 タンパクの過剰発現はみられなかった。

(2) 膵 細胞株である INS-1 をデキサメサゾン 10nM 存在下で 24 時間培養すると高濃度 (10mM) グルコースによるインスリン分泌は障害された。またその際、TBP-2 が過剰発現していることがウエスタンブロットで確認できた。また TBP-2 の siRNA oligo を導入すると TBP-2 の発現は抑制されることがウエスタンブロットで確認できた。しかし、この条件において TBP-2 の発現抑制によりデキサメサゾン曝露によるグルコース刺激インスリン分泌障害は改善されなかった (図)。これらの結果より TBP-2 はデキサメサゾン曝露によるグルコース刺激インスリン分泌障害には関与していない可能性が示唆された。

図



注) DEX=デキサメサゾン

(3) 結論

膵 細胞において細胞培養実験ではグルココルチコイドによって TBP-2 は過剰発現するが、グルココルチコイドによるグルコース刺激インスリン分泌障害における TBP-2 の役割は不明であった。また生体での実験においては、グルココルチコイドによりインスリン感受性の低下とインスリンシグナルの減弱が観察された条件においても骨格筋、肝臓における TBP-2 の過剰発現は必ずしも認められず、生体におけるグルココルチコイドによるインスリン抵抗性における TBP-2 の役割は明確ではなかった。

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 15 件)

Yoshimura K, Hirano S, Takata H, Funakoshi S, Ohmi S, Amano E, Nishi Y, Inoue M, Fukuda Y, Hayashi H, Taguchi T,

Yamada S, Miwa I, Terada Y, Fujimoto S: Plasma mannose level, a putative indicator of glycogenolysis, and glucose tolerance in Japanese subjects. *J Diabetes Investig in press* (査読あり) doi: 10.1111/jdi.12622.

天野絵梨、藤本新平: 膵 細胞インスリン分泌障害におけるミトコンドリア機能の役割, *Diabetes Frontier* 28: 89-95, 2017 (査読なし)

<http://www.kk-kyowa.co.jp/>

天野絵梨、藤本新平: インスリン分泌の分子機構, *Diabetes Journal* 44: 133-141, 2016 (査読なし)

<http://www.kk-kyowa.co.jp/>

天野絵梨、藤本新平: インスリン分泌と糖尿病におけるその破綻、*糖尿病* 59:322-325, 2016 (査読なし)

<http://www.jds.or.jp/>

平野世紀、藤本新平: インスリン分泌システムの形成機構, *Bio Clinica* 31:233-237, 2016 (査読なし)

<http://www.hokuryukan-ns.co.jp/>

藤本新平: 糖尿病におけるインスリン分泌機能不全機構, *日本臨床* 74: 97-102, 2016 (査読なし)

<http://www.nippon-rinsho.co.jp/>

Ogura K, Ogura M, Shoji T, Sato Y, Tahara Y, Yamano G, Sato H, Sugizaki K, Fujita N, Tatsuoka H, Usui R, Mukai E, Fujimoto S, Inagaki N, Nagashima K: Oral administration of apple procyanidins ameliorates insulin resistance via suppression of pro-inflammatory cytokine expression in liver of diabetic ob/ob mice. *J Agric Food Chem* 64:8857-8865, 2016 (査読あり)

doi: 10.1021/acs.jafc.6b03424

Fujitani Y, Fujimoto S, Takahashi K, Satoh H, Hirose T, Hiyoshi T, Ai M, Okada Y, Goshio M, Mita T, Watada H: Effects of linagliptin monotherapy compared with voglibose on postprandial blood glucose responses in Japanese patients with type 2 diabetes: Linagliptin Study of Effects on Postprandial blood glucose (L-STEP). *Diabetes Res Clin Pract* 121: 146-156, 2016 (査読あり)

doi: 10.1016/j.diabres.2016.09.014.

Sato H, Nagashima K, Ogura M, Sato Y, Tahara Y, Ogura K, Yamano G, Sugizaki K, Fujita N, Tatsuoka H, Usui R, Mukai E, Fujimoto S, Inagaki N: Src regulates insulin secretion and glucose metabolism by influencing subcellular localization of glucokinase in pancreatic β -cells. *J Diabetes Investig* 7: 171-178, 2016 (査読あり)

doi: 10.1111/jdi.12407

Ayano-Takahara S, Ikeda K, Fujimoto S,

Hamasaki A, Harashima S, Toyoda K, Fujita Y, Nagashima K, Tanaka D, Inagaki N: Glycemic variability is associated with quality of life and treatment satisfaction in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 38: e1-e2, 2015 (査読あり)

doi: 10.2337/dc14-1801

Matsumoto T, Urushido M, Ide H, Ishihara M, Hamada-Ode K, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Taguchi T, Horino T, Fujimoto S, Terada Y: Small heat shock protein beta-1 (hsb1) is upregulated and regulates autophagy and apoptosis of renal tubular cells in acute kidney injury. *PLoS One* 10: e0126229, 2015 (査読あり)

doi: 10.1371/journal.pone.0126229.

Ayano-Takahara S, Ikeda K, Fujimoto S, Asai K, Oguri Y, Harashima S, Tsuji H, Shide K, Inagaki N: Carbohydrate intake is associated with time spent in the euglycemic range in patients with type 1 diabetes. *J Diabetes Investig* 6: 678-686, 2015 (査読あり)

doi: 10.1111/jdi.12360

藤本新平:酸化ストレスと膵 細胞インスリン分泌、内分泌・糖尿病・代謝内科 39: 160-166, 2014 (査読なし)

<http://www.kahyo.com/>

Ikeda K, Fujimoto S, Morling B, Ayano-Takahara S, Carroll AE, Harashima S, Uchida Y, Inagaki N: Social orientation and diabetes-related distress in Japanese and American patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 9: e109323, 2014 (査読あり)

doi:10.1371/journal.pone.0109323

Hatakeyama Y, Kataoka H, Nakajima N, Watabe T, Fujimoto S, Okuhara Y: Prediction model for glucose metabolism based on lipid metabolism. *Methods Inf Med* 53:357-363, 2014 (査読あり)

doi: 10.3414/ME14-01-0034.

[学会発表](計9件)

Amano E, Ohmi S, Ono M, Takata H, Hirano S, Funakoshi S, Yoshimura K, Terada Y, Saibara T, Fujimoto S: Correlation between insulin sensitivity and pathohistological findings in non-alcoholic fatty liver disease, 11th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress & 8th Scientific meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, 27-30 October 2016, Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan
Funakoshi S, Takata H, Hirano S,

Yoshimura K, Ohmi S, Amano E, Terada Y, Fujimoto S: Analysis of clinical factors influencing bone mineral density in Japanese patients with diabetes, 11th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress & 8th Scientific meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, 27-30 October 2016, Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan

Fujimoto S: Metabolism-secretion coupling in diabetic islets, 11th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress & 8th Scientific meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, 27-30 October 2016, Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan

藤本新平: 細胞における活性酸素種 (ROS) 産生の役割, 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015 年 5 月 22 日, シーモールパレス (山口県下関市)

藤本新平, 稲垣暢也: GK ラット膵島を用いたインスリン分泌障害機構の研究, 第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会, 2015 年 2 月 13-14 日, 京都大学医学部創立百周年記念施設「芝蘭会館」(京都府京都市)

Fujimoto S: Role of overproduction of ROS and lactate in impaired insulin secretion in diabetes, 2014 International Conference on Diabetes and Metabolism, 16-18 October 2014, KINTEX Exhibition Center II, Gyeonggido, Korea

Hirano S, Yoshimura Y, Takata H, Ohmi S, Taguchi T, Yamada S, Miwa I, Terada Y, Fujimoto S: Decrease in plasma mannose level after glucose load is associated with glucose tolerance: plasma mannose level as a putative indicator of glycogenolysis, European Association for the Study of Diabetes, 50th Annual Meeting, 15-19 September 2014, Reed Messe Wien Congress Center, Vienna, Austria

Ohmi S, Ono M, Nishi Y, Hirano S, Tsugita M, Takata H, Yoshimura K, Mori S, Terada Y, Saibara T, Fujimoto S: Correlation between glucose intolerance and histological severity in non-alcoholic fatty liver disease, American Diabetes Association, 74th Scientific Sessions, 13-17 June 2014, Moscone Center, San Francisco, CA, USA

Ayano-Takahara S, Ikeda K, Harashima S, Fujimoto S, Inagaki N: Glycemic variability negatively associated with quality of life and treatment

satisfaction in patients with type 1 diabetes, American Diabetes Association, 74th Scientific Sessions, 13-17 June 2014, Moscone Center, San Francisco, CA, USA

〔図書〕(計2件)

藤本新平：糖尿病学(門脇孝、荒木栄一、稲垣暢也、植木浩二郎、羽田勝計、綿田浩孝編)2型糖尿病-インスリン分泌障害、総頁623(228-238頁)、西村書店、東京、2015

ISBN: 978-4-89013-452-6

藤本新平：糖尿病学2014(門脇孝編)膵細胞における Warburg 効果とインスリン分泌、総頁152(1-7頁)、診断と治療社、東京、2014

ISBN: 978-4-7878-2078-5

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤本 新平 (FUJIMOTO, Shimpei)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：00333576

(2)研究分担者

稲垣 暢也 (INAGAKI, Nobuya)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30241954