

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：92506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560410

研究課題名(和文)メカノセンサー分子p130Casを介する糖代謝維持機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of p130Cas-mediated regulation of glucose metabolism

研究代表者

澤田 泰宏 (Sawada, Yasuhiro)

社会医療法人社団蛸水会名戸ヶ谷病院(名戸ヶ谷研究所メカノメディスン部門)・名戸ヶ谷研究所メカノメディスン部門・部門長

研究者番号：50313135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：目標としたメカノセンサーの骨格筋、血管内皮、及び、骨細胞特異的遺伝子改変マウスの作製が期間内に達成された。これらのマウスはすべて胎生致死とならず成体となることが確認できたため、それら各々のマウスの表現形を10週齢にて確認した。その結果、骨特異的遺伝子改変マウスでは、骨代謝に異常が生じていることが確認された。血管特異的遺伝子改変マウスも同様に血管形成に異常が生じていることが観察された。しかし、その違いは微細な構造にて顕著であるため、本研究ではまずその血管構造の違いを確定する手法の開発も進め、現在表現形の違いを確定しつつある。骨格筋特異的遺伝子改変マウスについては目立った表現形は確認されなかった。

研究成果の概要(英文)：We generated muscle-, endothelium-, and osteocyte-specific p130Cas knockout (KO) mice by crossing floxed-p130Cas mice with transgenic mice specifically expressing Cre-recombinase in those individual tissues. Since none of these conditional p130Cas KO mice was embryonic lethal, we could analyze their phenotypes at an adult age (10 weeks after birth). Osteocyte-specific p130Cas KO mice exhibited apparently altered bone metabolism. In endothelium-specific p130Cas KO mice, vascular network formation appeared abnormal. We are currently investigating the molecular mechanism behind those phenotypes with specific reference to responses to mechanical perturbations. In contrast, no obvious phenotype was observed in muscle-specific p130Cas KO mice, which showed no difference from their control mice at glucose tolerance test, either with normal diet or after 12-week high fat diet. However, we have noted a possible role of the interstitium in glycolipid metabolism.

研究分野：メカノバイオロジー

キーワード：メカノトランスダクション

1. 研究開始当初の背景

適度な運動が糖尿病・メタボにおける糖代謝改善に有効であることは広く認知されている。しかし、運動の糖代謝に対する作用点、すなわち生体の直接的な運動負荷受容機構が解明されていないので、運動が糖代謝に及ぼす影響の分子メカニズムには不明な点が多い。そのため、分子生物学的基盤に基づいた科学的な「適度な運動」のガイドラインは、いまだ策定できていない。また、適度な運動が人体に好影響を及ぼす分子メカニズムが未解明であることは、運動を行うことが難しい症例にも適用できる運動療法を擬する治療法あるいは薬剤の開発の妨げとなっている。現在、運動が直接関与することが示唆される組織として骨格筋・血管・骨に対するメカニカルストレスと糖代謝に関するこれまでの知見と課題は、

i) 骨格筋と糖代謝: 筋肉は生体中最大のエネルギー消費器官であり、糖代謝に極めて重要な役割を果たす。筋収縮をともなう自発運動のみならず、受動的な伸展(ストレッチング)でも骨格筋における糖取り込みは促進される。したがって、筋組織・筋細胞において、運動負荷を局所のメカニカルストレスとして感知するメカノセンサーが存在し、このメカノセンサーを介する細胞内シグナルが、糖を細胞内に取り込むグルコーストランスポーターの発現や細胞膜局在を制御していると考えられている。しかし、運動による骨格筋の糖取り込み促進に関与するメカノセンサーが同定されていないので、メカニカルストレスの直接的な効果については未解明な点が多い。

ii) 血管と糖代謝: 糖尿病がリスクファクターとなる血管障害は少なくない。また、適度な運動が治療に有効であるという点で血管障害と糖代謝異常には共通するところが大きい。しかし、血管機能と糖代謝制御機構との相互作用におけるメカニカルスト

レスの役割・意義は未解明である。

iii) 骨と糖代謝: 骨代謝がメカニカルストレスの制御を受けることはよく知られており、骨細胞(オステオサイト)がメカノセンサー細胞であると考えられている。また、近年、糖尿病・耐糖能低下と骨粗鬆症とが関連することが明らかとなっている。これらから、身体運動の糖代謝への影響において、骨がメカノセンサー器官として機能している可能性が考えられるが、骨組織による糖代謝の制御に関する知見はこれまでほとんど得られていない。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が得てきた予備的知見としてこれまでに報告のない機械的刺激受容に関与する分子機構を見いだしたことを基盤とし、そのシグナル伝達の最上流に位置する分子(メカノセンサー)の骨格筋、血管内皮、及び、骨細胞特異的遺伝子改変マウスを用いて、メカノセンサーの糖代謝における役割を、特に運動効果とインスリン感受性との関連という観点から検討する。これにより、骨格筋、血管、骨組織が、糖尿病に対する運動療法の作用点であるか否かを明らかにする。

糖尿病やメタボの治療としての運動療法・運動負荷を、生体に対するメカニカルストレスとして捉え、メカノセンサーシグナルの解析により運動療法の分子メカニズムを明らかにしようとするアプローチは世界でも他に類がない。また、どのようにして運動療法がメカニカルストレスを介して、運動器のみならず糖脂質代謝に好影響を及ぼすのか、ということは未解決の課題である。この課題に対して、メカニカルストレスが生体での糖代謝の恒常性維持にどのように寄与しているかという観点からの検討は、これまでにはなされていない。本研究では、運動というメカニカルストレスに対

する生体あるいは細胞の直接的な応答機能であるメカノセンシングを中心に解析するので、刺激（input）である運動と結果（output）である糖代謝への影響（効果）を、運動に付随する他の2次の現象（エネルギー消費など）を除外したうえで結びつけることができる。一般に認知されている筋・骨・血管の機能は、骨・関節を動かす（骨格筋）、血液を供給する（血管）、身体を支える（骨）ことである。本研究により、身体に加わる物理的的刺激（メカニカルストレス）と身体代謝機能とを橋渡しする、メカノセンサーの新たな役割を明らかにすることができる。また、本研究で得られる成果をもとに、それぞれの組織のメカノセンサー機能を制御するという観点から運動（療法）の種類（モード）・強度・頻度を見直せば、糖尿病・メタボの症例に対する「適度な運動」を分子生物学的に定義することが可能となる。

3．研究の方法

本研究では、各種組織特異的発現 Cre リコンビナーゼと floxed-p130Cas マウスとの交配により骨格筋、血管内皮、及び、骨細胞特異的遺伝子改変マウスを作製し、それらの表現形を確定する。その上で、

（1）糖代謝制御器官・組織の表現型を解析、（2）耐糖能、運動負荷及びインスリンに対する感受性の検討、（3）*vitro*での糖取り込み・インスリン感受性の解析、を行い、本研究の作業仮説であるメカノセンサーの新たな作用機序を解明することを目標として研究を進める。

4．研究成果

上記目標とした p130Cas の骨格筋、血管内皮、及び、骨細胞特異的遺伝子改変マウスの作製が期間内に達成された。これらのマウスはすべて胎生致死とならず成体となる

ことが確認できたため、それら各々のマウスの表現形を10週齢にて確認した。その結果、骨特異的遺伝子改変マウスでは、骨代謝に異変が生じていることが確認された。その違いはミトコンドリアを介した代謝経路に関与することが示唆された。血管特異的遺伝子改変マウスでは血管形成に異常が生じていることが観察された。しかし、その違いは微細な構造にて顕著であるため、本研究ではまずその血管構造の違いを確定する手法の開発も進め、現在表現形の違いを確定しつつある。骨格筋特異的遺伝子改変マウスについては目立った表現形は確認されなかった。このことが Cre リコンビナーゼの能力差によるものではないと考え、そのことを検証するために異なる骨格筋特異的 Cre リコンビナーゼマウスを使用することで比較を行った。その結果、2種類のマウスはリコンビナーゼが作用する時期に違いが生じていることが確認されたが、6週齢以降の成体では同等の効果が得られていた。そのため、2つの Cre による骨格筋の質量や形態的な顕著な差異は見られなかった。また12週齢時における糖負荷試験においても耐糖能には差異は認められなかった（図）。このことから、通常飼育では本研究で着目したメカノセンシング機構が作用しないと考え、坐骨神経切除による下肢 unloading、高脂肪食摂取による変化についても検討を行った。しかし、いずれの飼育によっても違いは顕著な変化は現れなかった（図）。

以上の結果より本研究の出発点であった p130Cas の作用機構として、機械的な刺激の作用点に特徴があることが示唆された。すなわち、骨、血管ではそれぞれ間質液の流れ、血流が剪断応力として作用し、血管では拍動に伴う血管の伸張、骨格筋では運動に伴う伸張がそれぞれの組織の細胞に機械的刺激として作用する。骨、血管特異的

遺伝子改変マウスにおいて顕著な表現形が観察され、骨格筋遺伝子改変マウスでは目立った表現形が観察されなかったことから、本研究が着眼した p130Cas の作用機序は伸展刺激に対する応答ではないことが示唆された。現在この知見をもとに、身体に作用するメカニカルストレス効果を最大にする運動療法等について考察するとともに、もっとも敏感な組織、すなわち個体の運動によって作用しうる機械刺激受容組織の同定を進めている。

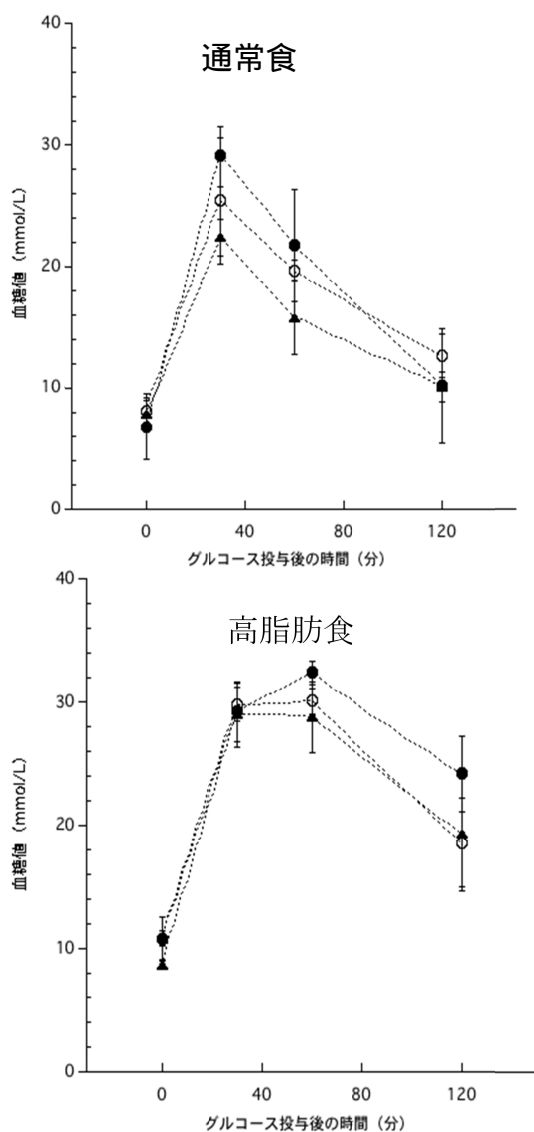


図 糖負荷試験結果
 : floxed コントロールマウス、
 骨格筋特異的 Cre-A、
 骨格筋特異的 Cre-B

5 . 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

Zhao Z, Tan SH, Machiyama H, Kawauchi K, Araki K, Hirata H, Sawada Y. Association between tensin 1 and p130Cas at focal adhesions links actin inward flux to cell migration. **Biol Open**. 5: 499-506, 2016

Machiyama H, Yamaguchi T, Sawada Y, Watanabe T, Fujita H. SH3 domain of c-Src governs its dynamics at focal adhesions and the cell membrane. **FEBS J**. 282(20): 4034-4055, 2015

澤田泰宏, 原田伊知郎, 市原克則, 吉野大輔, 吉村耕一. 「緊張型」と「緩和型」のメカニカルストレスによる生体恒常性維持. **実験医学**. 33(10): 1617-1625, 2015

[学会発表] (計 8 件)

Why is ‘no mechanical stress’ bad for bone? Sawada Y. The 13th Congress of the International Society of Bone Morphometry. Tokyo. April, 2015

Temporal association of tensin1 and p130Cas (Cas) at focal adhesions serves as a molecular clutch that links inwardly moving actin cytoskeletons to cell migration. Sawada Y, Tan SH, Zhao Z, Hirata H, Machiyama H. The 54th Annual Meeting of American Society for Cell Biology. Philadelphia. December, 2014

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

澤田泰宏 (SAWADA YASUHIRO)

社会医療法人社団 蛸水会 名戸ヶ谷病院 附属名戸ヶ谷研究所・メカノメディスン部

門・部長 研究者番号：50313135