

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790873

研究課題名（和文）

糖尿病における酸化ストレス、小胞体ストレスの病態解明について

研究課題名（英文） The examination of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus.

研究代表者

中谷 嘉寿 (NAKATANI YOSHIHISA)

近畿大学 医学部 講師

研究者番号：40568606

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病の病態では、ASK-JNK 経路が酸化ストレスと小胞体ストレスの両者に深く関与する重要な経路であり、インスリン抵抗性改善の key pathway の可能性であることが考えられた。また、この ASK-JNK 経路を調節することが、2型糖尿病患者に対しての治療標的になりえる可能性があり、そのことが将来的に糖尿病性合併症の予防・進展抑制につながっていく可能性を期待している。

研究成果の概要（英文）：In diabetes, ASK-JNK pathway is considerably involved to oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. So, we could think that this pathway was key pathway to improve insulin resistance. Moreover, to adjust this ASK-JNK pathway it can become a therapeutic target to type 2 diabetic patients, and it expects a possibility that this intervention will lead to prevention and slowly progression of diabetic complication in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、代謝学

キーワード：酸化ストレス、小胞体ストレス、インスリン抵抗性、臓器障害

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は、近年日本において患者数が5-6人に1人の割合を認め、急増している疾患である。その特徴としては膵細胞におけるインスリンの生合成、分泌の低下及び肝臓や末梢組織でのインスリン抵抗性の増加が上げられる。そして臨床上最も大き

な問題として、過食、肥満などによりいったん軽度の高血糖となり、これが持続すると、細胞におけるインスリン生合成及び分泌障害をさらに顕著化させ、また肝臓や末梢組織でのインスリン抵抗性もさらに増加するという悪循環に陥る。これは臨床上

しばしば認められ、“ブドウ糖毒性”として認識されている。この悪循環を断ち切ることが出来れば急増している2型糖尿病患者数の増加を抑制することが可能と考えられ、そのメカニズムの解析及び治療法の検索が待ち望まれている。

2. 研究の目的

2型糖尿病において、ASK-JNK経路が、

細胞障害とインスリン抵抗性亢進の両者に深く関与する重要な経路である事

各臓器（肝臓、筋肉、脂肪組織など）において、小胞体ストレスにいつから、どの程度関与するのか

以上を *in vivo* の実験系を用いて調べ、今後このASK-JNK経路が、2型糖尿病治療の重要なターゲットの経路になりうる可能性があるかどうかを目的とする。

3. 研究の方法

1. インスリン抵抗性におけるASK経路（JNK経路の上流）の役割の検討

-ASKノックアウトマウスに高脂肪食を与えて、代謝、細胞内シグナルを解析-
-2型糖尿病モデルマウスにDN-ASKアデノウイルス投与し、代謝、細胞内シグナルを解析-（マウスのグルコースクランプ法を用いて末梢組織での代謝を解析）

本研究ではASK1が糖尿病の病態に関与する分子生物学的メカニズムの解明と治療への応用を目的とする。ASK1は1997年アポトーシスを誘導するMAPKKKとして報告され、その後様々な細胞種でその機能が報告されてきた。（JNK経路の上流にある）ASK経路が2型糖尿病で認められるインスリン抵抗性に関与しているか否かをASKノックアウトマウスおよび2型糖尿病モデルマウスにアデノウイルス投与によって検討する。（1）ASKノックアウトマウスにhigh fat, high sucrose(HF/HS)食を摂食させ、2ヶ月後に以下のようにその効果を評価する。

（a）ASKノックアウトマウスとそのlittermateにおいてインスリン負荷試験やグルコース負荷試験などを行いインスリン抵抗性および耐糖能評価を行う。インスリン抵抗性に関してはさらに安定同位体2重

トレーサー法を用いて、正常血糖高インスリンクランプを施行し、内因性肝糖産生率（EGF: endogenous glucose production）と末梢組織での糖取り込み率（Rd: glucose disappearance rate）を評価する

（b）クランプ実験終了後、インスリン分泌臓器である膵臓や、インスリン抵抗性の標的臓器である肝臓、筋肉、脂肪を取り出し、western blot法などにより、インスリンレセプターの下流にあるIRS-1やPI-3 kinaseなどの発現や活性がASKの活性化によりどのように影響されるかを評価する。

2. インスリン抵抗性と小胞体ストレスにおけるASK経路の役割の検討

-ASKノックアウトマウス×ERAIマウスに高脂肪食を与え、小胞体ストレスを解析-（2型糖尿病でASK-JNK経路が、各臓器小胞体ストレスにどの程度関与するのかを可視的に解析）

（ERAIマウス：小胞体ストレスが発生すると、その臓器・場所に蛍光発色するマウス）

4. 研究成果

1.（1）（a）ASKノックアウトマウスにhigh fat, high sucrose (HF/HS) 食を摂食させ、2ヶ月後にその効果に対する評価を行った。

・耐糖能障害について

4W-ASKKOマウスのFPG145mg/dl、4W-コントロールマウスFPG135mg/dlと有意差なかった。HF/HS食2か月摂食後では4W-ASKKOマウスFPG160mg/dl、4W-コントロールマウスFPG210mg/dlと有意に血糖値の低下を認めた。

・IPGTT1g/kg（ブドウ糖負荷試験）では、ASKKOマウスの負荷後30分値血糖値は260mg/dl程度にまでしか上昇せず、負荷後60分後には速やかに低下を認めた。2か月HF/HS食摂食後では、30分後に350mg/dlとコントロールマウス+HF/HS食の30分値とほぼ同程度まで上昇するも、60、120分値では速やかに低下し末梢組織での糖利用が改善していることが考えられた。

・インスリン抵抗性については

ITT（インスリン負荷試験）を行ったところ、4W-ASKKOマウス、コントロールマウス

スに有意な差は認めないが、2か月 HF/HS 食を摂取後では、軽度ではあるも ASKK0 マウスでインスリン感受性の亢進が考えられた。(空腹時におけるインスリン抵抗性については、傾向があるも、有意差は現段階では認めていない。

更に安定同位体 2 重トレーサー法を用いて、正常血糖高インスリンクランプを施行し、内因性肝糖産生率: EGF と末梢組織での糖取り込み率: Rd の評価を検討しようと試みた。しかし安定同位体 2 重トレーサー法を行うにあたって、測定機械が古いものを使用しており、機械の状態がよくなく、また部品の交換もままならないために測定がしっかりとできなくなった。別の新しい機械で再度測定できるようなシステムづくりを行っている。

(b) クランプ実験終了後、インスリン分泌臓器である膵臓や、インスリン抵抗性の標的臓器である肝臓、筋肉、脂肪を取り出し、western blot 法などにより、インスリンレセプターの下流にある IRS-1 や PI-3 kinase などの発現や活性が ASK の活性化によりどのように影響されるかを評価した。

ASKK0 マウス+HF・HS 食の脂肪、肝臓で IRS1 tyrosine リン酸化が低下し、IRS2 tyrosine リン酸化が増加していることが確認された。(筋肉での western の結果は正確に blot できず結果不明である。) また、Akt serine473 リン酸化についても増加している事が確認された。

(2) 2 型肥満糖尿病モデルマウスである db/db マウス 8W オスに、頸静脈的に 1×10^8 DN-ASK ウイルスを投与 2W 後に以下のようにその効果を評価した。

db/db マウスに Ad-DN-ASK(ドミナントネガティブ ASK アデノウイルス)を投与すると、コントロールマウスの随時血糖値 400-500mg/dl で推移していたものが、随時血糖値 100mg/dl 程度にまで低下し、その効果は 2 週間以上継続した。以前行った、db/db マウスに Ad-DN-JNK(ドミナントネガティブ JNK アデノウイルス)を投与した時と比較して、より劇的に血糖値が改善した。

インスリン負荷試験でもコントロールマウスと比較して、インスリン抵抗性の劇的な改善が認められている。

更に安定同位体 2 重トレーサー法を用いて、正常血糖高インスリンクランプを施行し、EGF と Rd の評価を検討しようと試みた。しかし、安定同位体 2 重トレーサー法を行うにあたっての測定機械が古く、状態がよくないために測定ができなくなった。そのため別の新しい機械で再度測定できるようなシステムづくりを行っている。

(b) クランプ実験終了後、膵臓、肝臓、筋肉、脂肪を取り出し、western blot 法などにより、インスリンレセプターの下流にある IRS-1 や PI-3 kinase などの発現や活性が ASK の活性化によりどのように影響されるかを評価した。

db/db マウス+Ad-DN-ASK の脂肪、肝臓、筋肉で IRS1 tyrosine リン酸化が低下し、IRS2 tyrosine リン酸化が増加していることが確認された。また、Akt serine473 リン酸化についても増加していた。

2. JNK やその上流にある ASK が、2 型糖尿病で認められる小胞体ストレスで誘導されたインスリン抵抗性に、いつから、どの程度、どの臓器に関与しているか否かをノックアウトマウスに ERAI マウスを掛け合わせてマウス作製を試みた。マウスについては、コントロールマウスと比較して体重など変化なく発育した。しかし、小胞体ストレスがかかるとその部分が光ることが確認されていたが、今回作成したマウスではあまり光ることが観察できなかった。凍結切片を作成してさらに確認を行うも、蛍光しているところは薄くて確認が困難であった。原因については、検討中である。そのために高脂肪食摂取前、摂取後 1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月で、膵臓、肝臓、筋肉、脂肪、腎臓について蛍光顕微鏡による組織の検討を行うも、結果については正しいとは言えないが、時期については早期から出現していると確認できなかった。

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)

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 嘉寿 (NAKATANI YOSHIHISA)
近畿大学 医学部 講師

研究者番号：40568606

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：