

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591336

研究課題名(和文)熱ショック応答経路活性化による抗炎症効果の分子メカニズム解析

研究課題名(英文)The mechanisms of anti-inflammatory effects by the activation of heat shock response

研究代表者

近藤 龍也 (Kondo, Tatsuya)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：70398204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：種々の細胞に対して高血糖やTGやTMで刺激すると、ERストレス分子・炎症関連蛋白が上昇するがMET処置により低下した。HSP72 siRNAを投与してMETを施行すると、部分的に効果が解除された。網羅的に微弱電流の刺激を伝達する受容体を同定中。肥満糖尿病マウスに対し、12週間METを施行。体重は不変だが内臓脂肪減少を認め、血糖値・インスリン値の改善、および血中サイトカインの低下を認めた。また諸臓器におけるERストレス、酸化ストレス、炎症関連蛋白の発現は低下した。AMPKをノックダウンすると、この効果は半減し、METの作用はHSP72発現のみではなく、AMPK活性化が重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Stimulation of several cell types with high glucose etc. increased ER stress and inflammatory signals, and these were attenuated by MET treatment. HSP72 siRNA with MET partially decreased this attenuation. Obese diabetic model mice were treated with or without MET for 12 weeks. BW was not altered, but visceral adiposity was particularly decreased and glucose homeostasis, insulin resistance and chronic inflammation were improved. ER stress, oxidative stress and inflammatory signals were attenuated in liver and adipose tissues. When AMPK was knockdown, this amelioration was declined. These data support that MET activates not only HSP72 expression but also AMPK phosphorylation.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 熱ショック応答経路 HSP72 AMPK

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の発症には様々な代謝ストレスが関与する。これらのストレスを解除し正常な細胞機能の維持に寄与する分子シャペロンである HSP72 は、主に温熱刺激により誘導される代表的な分子シャペロンであり、インスリン抵抗性を有する糖尿病患者において、その発現レベルが低下することが報告されていた。当教室は世界に先駆けて、効率的に HSP72 発現増強を促す MET (Mild Electrical stimulation with hyperThermia)を開発し、下記のような基礎的・臨床的有用性を報告した。

- 1) 温熱刺激に適切な微弱電流を追加することで、HSP72 のプロテアソームにおける蛋白分解を抑制し HSP72 発現レベルを増強できること (Morino S, [Kondo T](#), [Araki E](#) et al., *J. Pharmacol. Sci.* 2008)、
- 2) MET により、糖尿病マウスの内臓脂肪が減少し、インスリン抵抗性・耐糖能を改善し、慢性炎症抑制効果・アディポネクチン増加効果を示したこと (Morino S, [Kondo T](#), [Araki E](#) et al., *PLoS ONE*. 2008)、
- 3) HSP72 誘導薬 GGA 投与により、肝臓で HSP72 発現が増強され、MET 施行と同様の体組成・代謝異常改善作用を示すこと (Adachi H, [Kondo T](#), [Araki E](#) et al., *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010)、
- 4) 適切な微弱電流のみでも、細胞レベルで PI-3K-Akt を活性化し、糖取り込みを増強すること (Yano S, Morino S, [Kondo T](#), [Araki E](#) et al., *J. Pharmacol. Sci.* 2010)、
- 5) MET により、db/db 豚のβ細胞死を抑制しインスリン分泌を改善させたこと ([Kondo T](#), [Araki E](#) et al., *Diabetes.* 2012)
- 6) 健常人において MET による副作用はなく、慢性炎症の低下を認めたこと (Sasaki K, [Kondo T](#), [Araki E](#) et al., *Obest. Res. Clin. Pract.* 2010)
- 7) MS・肥満 T2D 患者に MET を施行し、内臓脂肪減少・インスリン抵抗性・耐糖能

改善・慢性炎症低下・腎機能改善などの有効性を認めたこと ([Kondo T](#), [Araki E](#) et al., *EBioMedicine.* 2014)、

などを、英文学術誌や学会で報告してきた。

このように様々な手法で HSP72 発現レベルを増強することは、糖尿病やメタボリックシンドロームの体組成・代謝異常・慢性炎症を改善し、糖尿病発症予防から治療まで、さらには慢性血管合併症の抑制にも寄与できる可能性が期待できる。また、MET により糖尿病動物の CRP, TNF- α , IL-6 などの炎症性サイトカインレベルが 20~40%低下した。慢性炎症は、糖尿病病態の進展悪化や慢性血管合併症の増悪に関連していることから、MET による慢性炎症抑制の分子メカニズムが解明されることで代謝異常のみならず、炎症をターゲットにした創薬へ寄与できる可能性が広がる。

2. 研究の目的

本研究は、糖尿病病態の進展悪化に加えて慢性血管合併症の悪化にも直結する慢性炎症を、MET がどのような分子機序で改善するのか、細胞レベルおよび動物レベルで解明し、さらに下流の新規慢性炎症抑制分子を同定することで治療ターゲットとしての有用性も検証することを目的とする。

3. 研究の方法

研究 1 (in vitro)

「平成 24 年度」

- 1) HepG2, L6, 3T3-L1 および MIN6 および磁気ビーズ法にて単離した CD14 陽性末梢血単球に対して MET (0.6V/cm, 0.1ms, 55 pps, 42 \square , 10min)を施行する。
- 2) これらの細胞を高血糖で、あるいは ER ストレスを誘導する thapsigargin (TG)や tunicamycin (TM)で刺激し、その際に認められる炎症性シグナルの活性化状態を検討する。
- 3) 上記の細胞群においてストレス環境下に

おける MET 施行による上記検討項目の変化を検討する。

4) さらに、上記細胞群に HSP72 siRNA を投与して HSP72 作用を消失させた上で、MET を作用させ、反応性の違いを検討して微弱電流そのものの効果を明らかにする。

5) AMPK siRNA, p53 si RNA を用いて MET 作用がこれらの経路を介して抗炎症作用を發揮しているかどうかを検証する。

「平成 25 年度以降」

6) 細胞毎に網羅的遺伝子発現変化の解析を行い、MET 作用の下流に存在する新規炎症惹起性因子および抗炎症性因子の同定を行い、新たな糖尿病治療・抗炎症治療ターゲットを探索する。

研究 2 (*in vivo*)

「平成 24 年度」

1) 肥満糖尿病モデルマウス(HFD、db/db マウス)に対し、12 週間に渡って MET (12V, 0.1ms, 55pps, 42□, 10min, 2 回/week)を施行する群と施行しない群を設定する。

2) 経過中に体重・血糖値・インスリン値(毎週)および血中サイトカイン(TNF- α , CRP, IL-6, IL-8, MCP-1)の濃度を測定。

3) 12 週間終了後に、解剖し各臓器(肝臓・筋肉・脂肪・膵島・末梢血単球)を単離し、JNK, ASK-1, p-PERK, XBP-1 splicing, AMPK, NF-kB, p53, TNF- α , CRP, IL-6, IL-8, MCP-1 の発現(一部活性化や核移行)を検討する。

4) 脂肪重量測定し、内臓脂肪減少の効果を再検証する。また膵島単離によるインスリン分泌促進作用を再検証する。

「平成 25 年度以降」

5) MET 作用により AMPK 活性化・p53 活性化を介した慢性炎症抑制作用が認められるかを検討する。

a) AMPK siRNA 発現プラスミドを構築し、*in vivo*JET PEI により全身的に AMPK を

ノックダウンする。この状態で糖尿病モデルマウスに MET を施行し、抗炎症作用の変化を検討する。

b) p53 siRNA 発現プラスミドを用いて、同上の実験を行う。

in vitro 研究で候補に挙げた新規炎症惹起性因子および抗炎症性因子の発現変化が、*in vivo* でも確認できるかを再検証する。

4 . 研究成果

(*in vitro*)

HepG2, L6, 3T3-L1 および MIN6 および CD14 陽性末梢血単球に対して MET を施行し、高血糖で、あるいは ER ストレスを誘導する TG や TM で刺激すると、ER ストレスマーカー、炎症関連蛋白の上昇が認められたが、MET 処置により低下した。HSP72 siRNA を投与して HSP72 作用を消失させた上で、MET を施行させたところ、それでも部分的に ER ストレスおよび炎症抑制効果が確認された。現在、網羅的に微弱電流の刺激を伝達する受容体の同定を行っている。

(*in vivo*)

肥満糖尿病モデルマウス(HFD、db/db マウス)に対し、12 週間 MET を施行。未処置群に比して、体重は不変であったが内臓脂肪の特異的な減少を認め、血糖値・インスリン値の改善、および血中サイトカインの低下を認めた。また諸臓器における ER ストレス、酸化ストレス、炎症関連蛋白の発現は低下した。AMPK をノックダウンすると、この効果は半減し、MET の作用は HSP72 発現のみではなく、AMPK 活性化が重要であることを示した。

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 17 件) 全て査読あり

1. Kondo T, Matsumura T, Kai H, Araki E: Mild electrical stimulation with heat shock reduces visceral adiposity and improves

- metabolic abnormalities in subjects with metabolic syndrome or type 2 diabetes: Randomized crossover trials. *EBioMedicine* 1:80-89, 2014. doi:10.1016/j.ebiom.2014.11.001
2. Kondo T, Kai H, Araki E: The role of heat shock response in insulin resistance and diabetes. *Diabetes Metab J* 38:100-6, 2014. doi:10.4093/dmj.2014.38.2.100
 3. Matsuyama S, Kondo T, Araki E, Kai H: MES increases stress resistance and suppresses fat accumulation via activation of LKB1-AMPK signaling pathway in *C. elegans*. *PLoS One* 9:e114690, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0114690.
 4. Uchimura K, Kondo T, Araki E, Kitamura K: The serine protease prostaticin regulates hepatic insulin sensitivity by modulating TLR4 signalling. *Nat Commun* 5:3428, 2014. doi: 10.1038/ncomms4428.
 5. Fukuda K, Kondo T, Araki E: Statins mediate anti-atherosclerotic action in SMC by PPAR- γ activation. *BBRC* 457:23-30, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.063.
 6. Nishikawa T, Araki E: Mitochondrial ROS in the pathogenesis of early diabetic nephropathy. *J Diabetes Invest* 6:137-139, 2015 doi: 10.1111/jdi.12258.
 7. Morino-Koga S, Yano S, Kondo T, Araki E, Kai H: Insulin receptor activation through its accumulation in lipid rafts by MES. *J Cell Physiol* 228(2):439-446, 2013 doi: 10.1002/jcp.24149.
 8. Kawasaki S, Kondo T, Araki E. Regulation of TNF α converting enzyme activity in visceral adipose tissue of obese mice. *BBRC* 430:1189-1194, 2013 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.086.
 9. Kinoshita H, Matsumura T, Kondo T, Araki E. Apocynin suppresses the progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice by inactivation of macrophages. *BBRC* 431:124-130, 2013 doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.014.
 10. Sakaguchi M, Araki E, Nishinakamura R: The phosphatase Dullard negatively regulates BMP signalling and is essential for nephron maintenance after birth. *Nat Commun* 4:1398, 2013 doi: 10.1038/ncomms2408.
 11. Miyagawa K, Kondo T, Araki E. Effects of combination therapy with vildagliptin and valsartan in a mouse model of type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 12:160, 2013 doi: 10.1186/1475-2840-12-160.
 12. Matsumura T, Kondo T, Araki E. Association between circulating leukocyte subtype counts and carotid IMT in T2D. *Cardiovasc Diabetol* 12:177, 2013 doi: 10.1186/1475-2840-12-177.
 13. Nishikawa T, Araki E: Mechanism-based antioxidant therapies promise to prevent diabetic complications? *J Diabetes Invest* 4:105-107, 2013 doi: 10.1111/jdi.12041.
 14. Matsumura T, Araki E: TZD-independent activation of PPAR γ is a potential target for diabetic macrovascular complications. *J Diabetes Invest* 3:11-23, 2012 doi: 10.1111/j.2040-1124.2011.00182.x.
 15. Kondo T, Sasaki K, Kai H, Araki E: Hyperthermia With MES Protects Pancreatic β -Cells From Cell Stresses and Apoptosis. *Diabetes* 61:837-847, 2012 doi: 10.2337/db11-1098.
 16. Suefuji M, Kondo T, Araki E: The impact of CAMK II on insulin gene expression in MIN6 cells. *BBRC* 421:801-807, 2012 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.091.
 17. Ishii N, Araki E: Anti-atherosclerotic Potential of Dihydropyridine CCB. *J*

Atheroscler Thromb 19:693-704, 2012 doi:
10.5551/jat.12450.

[学会発表](計 26 件)

1. 近藤龍也, 荒木栄一 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 HSR の活性化は、MS 該当者の末梢血単球の慢性炎症惹起性形質を改善する、2014/5/22, 大阪
2. Kondo T, Araki E. ADA scientific meeting Heat Treatment with MES Attenuates Systemic Inflammation and Reduces Cytokine Expression in Monocytes from subjects with MS. 2014. June 13. San Francisco, USA
3. Goto R, Kondo T, Araki E: The Role of Aldosterone in the Pathogenesis of Diabetes in Human and Rats. The 7th Int. Aldosterone Forum, 2014/5/31, Yokohama, Japan.
4. 近藤龍也, 荒木栄一第 52 回日本糖尿病学会九州地方会 熊本大会シンポジウム「糖尿病における HSR の役割と臨床応用への展望」、2014/10/31, 熊本
5. 荒木栄一: 細胞内ストレスと生活習慣病 - 分子シャペロン Hsp72 の耐糖能改善効果とその機序 - . 第 64 回日本体質医学会, 2014/9/6, 大阪
6. 近藤龍也, 荒木栄一: 糖尿病における HSR の役割と臨床応用への展望. 第 52 回日本糖尿病学会九州地方会, 2014/10/31, 熊本, シンポジウム
7. 後藤理英子, 近藤龍也, 荒木栄一. アルドステロン(ALD)過剰状態は膵島の慢性炎症による β 細胞障害を引き起こす. 第 87 回日本内分泌学会学術総会, 2014/4/24, 福岡
8. 後藤理英子, 近藤龍也, 荒木栄一: ALD 過剰状態による β 細胞障害は膵島の慢性炎症によって引き起こされる. 第 57 回日本糖尿病学会集会, 2014/5/22, 大阪
9. 近藤龍也, 荒木栄一: HSR の活性化は、MS の末梢血単球の慢性炎症惹起性形質を改善する. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2014/5/22, 大阪
10. 後藤理英子, 近藤龍也, 荒木栄一: ALD 過剰状態は膵島細胞における内因性サイトカインに変化を起こす. 第 52 回日本糖尿病学会九州地方会, 2014/10/31, 熊本
11. Goto R, Kondo T, Araki E: The Role of ALD in the Pathogenesis of Diabetes in Human and Rats. The 73th Annual Meeting of ADA, 2013/6/21, Chicago, USA
12. Matsuyama R, Kondo T, Araki E: The Critical Role of HSP72 in Diabetic Pathophysiology. The 73th Annual Meeting of ADA, 2013/6/21, Chicago, USA
13. 近藤龍也: Activation of HSR ameliorates Metabolic Abnormalities in Diabetes with Attenuation of Cell Stress. 第 56 回日本糖尿病学会, 2013/5/16, 熊本, シンポジウム
14. 近藤龍也, 荒木栄一: HSR 活性化による糖代謝改善効果と分子機構の解明. 第 63 回日本体質医学会, 2013/10/5, 久留米, 研究奨励賞受賞講演
15. 後藤理英子, 近藤龍也, 荒木栄一: 原発性 ALD 症における耐糖能障害発症機序. 第 110 回内科学会総会, 2013/4/12, 東京
16. 宮川克俊, 近藤龍也, 荒木栄一: DPP-4 阻害薬と ARB の併用による糖尿病モデルマウスに対する膵及び膵外作用の解析. 第 56 回日本糖尿病学会学術集会, 2013/5/16, 熊本
17. 後藤理英子, 近藤龍也, 荒木栄一: ヒトおよび動物における ALD 過剰状態と耐糖能障害発症の関連. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013/5/16, 熊本
18. 松山利奈, 近藤龍也, 荒木栄一: HSP72 欠損マウスにおける耐糖能異常発症機序の解明. 第 56 回日本糖尿病学会, 2013/5/16, 熊本
19. 近藤龍也, 荒木栄一: HSR 活性化による糖代謝異常改善作用と末梢血単球の質的变化. 第 51 回日本糖尿病学会九州地方会, 2013/11/8, 沖縄,
20. Miyagawa K, Kondo T, Araki E: Combination

- of Vil and Var ameliorates both insulin insufficiency and insulin resistance in mouse models of T2D. The 72th Annual Meeting of ADA, 2012/6/8-2012/6/12, Philadelphia, USA
21. Kondo T, Araki E: Heat Treatment with MES Reduces Visceral Adiposity and Improves Insulin Resistance and Inflammatory Markers in T2D. ICHO/JCTM2012 scientific meeting, 2012/08/31, Kyoto, Japan. Symposium
 22. 近藤龍也, 荒木栄一: HSR活性化による糖代謝異常関連疾患へのアプローチ. 第15回日本病態栄養学会年次学術集会, 2012/01/14, 京都
 23. 宮川克俊, 近藤龍也, 荒木栄一: DPP-4阻害薬: vildagliptinとARB: valsartanの併用による抗糖尿病効果の検討. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会, 2012/5/17, 横浜
 24. 後藤理英子, 近藤龍也, 荒木栄一: ALD過剰状態モデルラットにおける膵β細胞障害作用の解明. 第50回日本糖尿病学会九州地方会, 2012/10/19, 久留米
 25. 宮川克俊, 近藤龍也, 荒木栄一: DPP-4阻害薬とARB併用の糖尿病モデルマウスに対する膵及び膵外作用の解析. 第50回日本糖尿病学会九州地方会, 2012/10/19, 久留米,
 26. 宮川克俊, 近藤龍也, 荒木栄一: DPP-4阻害薬とARBの併用による抗糖尿病効果の解析. 第62回日本体質医学会総会, 2012/11/3, 東京

〔図書〕(計8件)

1. 荒木栄一: 新しい治療目標-熊本宣言 2013-. 医学と薬学 71(1): 23-26, 2014 自然科学社
2. 荒木栄一: 特集 糖尿病 -診断・治療 Update- 序論. 最新医学 69(1): 4-5, 2014 最新医学社
3. 荒木栄一, 他: 座談会 糖尿病の診断、病態解明と治療の Update. 最新医学 69(1): 7-18, 2014 最新医学社

4. 荒木栄一, 野出孝一: 対談 Meet the Expert. Cardio-Renal Diabetes 3(1):28-33, 2014 メディカルレビュー社
5. 荒木栄一: 糖尿病患者の治療目標の個別化:熊本宣言 2013. Current Therapy 32(4): 30-34, 2014 ライフメディコム
6. 荒木栄一: 大きく展開する糖尿病の薬物治療 -SGLT2 阻害薬は糖尿病治療をどう変えるか. 医学と薬学 71(4): 609-620, 2014 自然科学社
7. 荒木栄一, 木戸良明, 金藤秀明, 近藤龍也: インクレチン関連薬による膵β細胞の保護作用とその機構 -最近,注目されている膵β細胞障害メカニズムとしての細胞内ストレスと膵β細胞アポトーシス機序の解析を中心に -. **Islet Equality** 2(1): 4-15, 2013 メディカルレビュー社
8. 荒木栄一: 糖尿病治療の新たな潮流 -糖尿病治療薬の作用機序と使い方 -. **日本内科学会雑誌** 102(3): 624-631, 2013

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/met/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 龍也 (KONDO TATSUYA)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 70398204

(2)研究分担者

荒木栄一 (EIICHI ARAKI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 10253733