

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591352

研究課題名(和文) 膵細胞における脂肪毒性解除にむけた治療戦略

研究課題名(英文) Therapeutic strategy for lipotoxicity of pancreatic beta-cells

研究代表者

村尾 孝児 (Murao, Koji)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：20291982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病は予備軍を含めれば実に2200万人との報告され、国民病として理解されつつある。最近、インスリン分泌不全の原因として膵細胞における糖毒性(glucotoxicity)のみならず、脂肪毒性(lipotoxicity)が注目されており、グルコース感受性の低下が指摘されている。我々は、膵細胞における脂肪毒性の細胞内情報伝達系メカニズムを網羅的に解明し、インスリン分泌不全の病態を解明する。また治療に関しては、脂肪毒性の解除に向けたインクレチン療法の効果および細胞内情報伝達系への影響、さらには新たなトランスレーショナルによる膵細胞の機能改善について検討した。

研究成果の概要(英文)：The reasons for beta-cell dysfunction in type 2 diabetes are incompletely understood. Recently, abnormalities in cholesterol metabolism have emerged as a potential contributor to beta-cell dysfunction. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), a cytoplasmic membrane protein, is a pivotal regulator of lipid efflux from cells to apolipoproteins and plays an important role in reverse cholesterol transport. A recent study reported that mice with specific inactivation of the Abca1 gene in their beta cells had markedly impaired glucose tolerance and defective insulin secretion, but normal insulin sensitivity. Pancreatic islets isolated from these mice demonstrated altered cholesterol homeostasis and impaired insulin secretion in vitro. These results establish a new role for the ABCA1 gene in beta cell cholesterol homeostasis and insulin secretion, indicating that cholesterol accumulation may contribute to beta cell dysfunction in type 2 diabetes, so called "pancreatic lipotoxicity".

研究分野：代謝学

キーワード：糖尿病 代謝学 HDL代謝 膵細胞 脂肪毒性 糖毒性 細胞内情報伝達系 インスリン分泌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病は予備軍を含めれば実に2200万人との報告され、国民病として理解されつつある。病因的にはヘテロな集団ではあるが、日本においてはインスリンの分泌不全が重要な要因である。最近、インスリン分泌不全の原因として膵細胞における糖毒性(glucotoxicity)のみならず、脂肪毒性(lipotoxicity)が注目されており、グルコース感受性の低下が指摘されている。しかし膵細胞における脂肪毒性の細胞内情報伝達系メカニズム、インスリン分泌不全の病態に関する詳細は不明である。

(2) 脂肪毒性の病態の中心である膵細胞におけるインスリン生成低下の分子メカニズムは不明であるが、**細胞内情報伝達系**が関与するとの報告がある。生体内の生命現象は、タンパク質のリン酸化反応により調節されている。このタンパク質リン酸化反応をおこなう酵素が**プロテインキナーゼ**である。**プロテインキナーゼ**は、大きく分けるとセリン・スレオニンキナーゼとチロシンキナーゼの2種類に分類することができる。我々は2種類のキナーゼの保存された触媒ドメインをもとに、セリン・スレオニンキナーゼを網羅する抗体(Multi-PK)、チロシンキナーゼを網羅する抗体(Multi-YK)を作成し、脂肪毒性に関連した細胞内情報伝達系に關与した分子の同定を進めてきた。

## 2. 研究の目的

(1) **膵細胞における ABCA1 発現調節と CaMKK/CaMKIV pathway の役割を明らかにする。**我々は膵細胞の脂肪毒性に重要な役割をになう ABCA1 は glucagon-like peptide 1 (GLP-1) のアナログ Exendin-4 投与により脂肪毒性が解除されることを報告した。この機序は、Exendin-4 が CaMKK/CaMKIV pathway を活性化し、ABCA1 遺伝子発現をプロモーターレベルで刺激することであることを報告した。今回の検討では、GLP-1 受容体と CaMKK/CaMKIV pathway 活性化の分子メカニズム解明を目指す。また新たな知見として、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  が膵細胞に脂肪沈着をおこし、ABCA1 発現の抑制、インスリン分泌抑制を来すことを見いだした。今回の検討では、炎症性サイトカインによる脂肪蓄積の機序と細胞内情報伝達系 CaMKK/CaMKIV pathway の役割についても検討する。

(2) 次に ABCA1 を分子標的とした translational research を検討する。最近、mRNA-33 が ABCA1 遺伝子の 3' UTR に結合し、ABCA1 発現を抑制することが報告された。まず CaMKK/CaMKIV pathway による ABCA1 発現促進作用と microRNA-33 の関連について検討する。さらには膵細胞に選択的に anti-microRNA-33 を遺伝子導入し、ABCA1 の活性化を検討する。anti-microRNA-33 遺伝子導入法に関しては、マイクロバブルと anti-microRNA-33 発現ベクターでミセルを形成し、ウイルスベクターなどの外来性抗原の暴露がなく、侵襲性が少なく、臓器選択性に遺伝子導入が可能で超音波法を利用

した Ultrasonic microbubble destruction 法を検討し、臨床応用に向けた治療法の開発をおこなう。

## 3. 研究の方法

脂肪毒性が膵細胞に及ぼす影響について、特に細胞内情報伝達系(プロテインキナーゼ)に焦点をあて網羅的に解析をおこなう。脂肪毒性の状態におけるインスリン分泌不全と相関する分子を二次元電気泳動、等電点電気泳動、質量分析法にて検討し、変動した約60kDの分子はCaMKIVであると同定した。糖毒性をになう pathway として in vivo の糖尿病ラットにおいて確認する。また脂肪毒性の key molecule、ABCA1 の発現調節メカニズムを解析し、細胞内情報伝達系 CaMKK/CaMKIV pathway による調節されるメカニズムを解析する。また最近のインクレチン療法、GLP-1 analog による ABCA1 発現調節と細胞内情報伝達系についても検討をおこなう。細胞内情報伝達系 CaMKK/CaMKIV pathway による microRNA-33 の発現調節メカニズムについて明らかにする。最終的には、microRNA-33 の発現抑制を目指した新規の遺伝子導入療法について translational research として取り組む。

## 4. 研究成果

(1) 我々は2種類のキナーゼの保存された触媒ドメインをもとに、セリン・スレオニンキナーゼを網羅する抗体(Multi-PK)、チロシンキナーゼを網羅する抗体(Multi-YK)を作成し、網羅的な検討をおこなった。

1, 膵細胞の cell line にコレステロールを負荷し脂肪毒性を誘導し、プロテインキナーゼの発現パターンを上記の multi-kinase 抗体で検討した。Multi-PK では、コントロールと比較して、脂肪毒性状態で約200kD, 150kD, 90kD バンドが強く発現され、約60kD のバンドが消失した。また multi-YK 抗体では、112kD 以上の高分子バンドが消失し、逆に60kD のバンドが増強していた。

2, 脂肪毒性誘導で変動を認めたプロテインキナーゼの同定をおこなう。上記の変動を認めたバンドに関しては、二次元電気泳動、東電点電気泳動、質量分析法にて解析をおこなった。

3, インスリン分泌の変動と同様であった約60kD は calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV(CaMKIV)であることを同定した。

(2) **膵細胞における ABCA1 発現と CaMKK/CaMKIV pathway の役割を明らかにする。**

インクレチンの一つである GLP-1, GLP-1 analog (Exendin-4) が膵細胞において CaMKK/CaMKIV pathway を活性化し、ABCA1 遺伝子転写を刺激することを報告した(J Cell Mol Med 2010, Diabetes Obes Metab 2009)。

この細胞内情報伝達系による ABCA1 発現調節メカニズムを検討した。

1、膵 細胞における GLP-1 受容体と CaMKK, CaMKIV の共存を共役焦点レーザー顕微鏡にて検討した。

2、GLP-1 刺激における CaMKK/CaMKIV のリン酸化について経時的に western blot にて検討する。リン酸化 CaMKK/CaMKIV 抗体は既に作成した。

3、CaMKK/CaMKIV の特異的阻害剤である STO-69 を添加し、GLP-1 刺激時の ABCA1 転写活性、mRNA, コレステロール汲み出しについて検討した。

4、CaMKK/CaMKIV pathway のコンポーネント、CaMKK, CaMKIV の constitutive active, dominant negative form の遺伝子導入により、GLP-1 存在下における脂肪沈着に対する ABCA1 遺伝子発現に与える影響について検討した。

5、CaMKK, CaMKIV それぞれに対する siRNA 法による細胞内 knock down をおこなった。このような膵 細胞における ABCA1 の発現、コレステロール含量、インスリン分泌能について検討し、CaMKK, CaMKIV それぞれの役割について検討した。

6、CaMKK/CaMKIV pathway の過剰発現細胞を作成する。この細胞における ABCA1 発現と microRNA-33 の発現パターンを比較検討する。また ABCA1 の 3' UTR をレポーター遺伝子に組み込み、CaMKK/CaMKIV pathway 過剰発現時における microRNA-33 の ABCA1 遺伝子への影響について検討した。

### ( 3 ) 膵 細胞における ABCA1 発現と CaMKK/CaMKIV pathway の役割を明らかにした。

1、培養細胞系を用いて anti-microRNA-33 遺伝子を効率よく発現できるベクターを開発した。

2、anti-microRNA-33 発現ベクターの遺伝子導入法の検討と発現効率のモニター；

超音波を利用した Ultrasonic microbubble destruction 法、adenovirus, naked DAN, エマルジョン法などの遺伝子導入方法について、発現効率、特異性に関して in vitro で検討し、Ultrasonic microbubble destruction 法が有効に遺伝子導入できる方法であることを検証した。

3、糖尿病モデルラットにおいて in vivo における遺伝子導入法の効率を検討し、約 20% の細胞に遺伝子導入できることが判明した。

### 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 )

1. Decreased expression of platelet human scavenger receptor class B type I in patients with type 2 diabetes mellitus.

Imachi H, Fukata Y, Murao K.

J Diabetes Investig. 2014 May 4;5(3):345-6. doi: 10.1111/jdi.12158. 査読有り

2. Mitochondrial KATP channel involvement in angiotensin II-induced autophagy in vascular smooth muscle cells.

Yu KY, Wang YP, Wang LH, Jian Y, Zhao XD, Chen JW, Murao K, Zhu W, Dong L, Wang GQ, Zhang GX.

Basic Res Cardiol. 2014 Jul;109(4):416. doi: 10.1007/s00395-014-0416-y. 査読有り

3. Oxidative stress and substance P mediate psychological stress-induced autophagy and delay of hair growth in mice.

Wang L, Guo LL, Wang LH, Zhang GX, Shang J, Murao K, Chen DF, Fan XH, Fu WQ.

Arch Dermatol Res. 2015 Mar;307(2):171-81. doi: 10.1007/s00403-014-1521-3. 査読有り

4. Contribution of the renin-angiotensin system in chronic foot-shock induced hypertension in rats.

Wang L, Dong T, Liu B, Zhao X, Chen J, Murao K, Zhu W, Zhang G.

Life Sci. 2014 Dec 11. pii: S0024-3205(14)00967-9. doi:

10.1016/j.lfs.2014.12.004. 査読有り

5. Effect of the anti-diabetic drug metformin in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo.

Miyoshi H, Kato K, Iwama H, Maeda E, Sakamoto T, Fujita K, Toyota Y, Tani J, Nomura T, Mimura S, Kobayashi M, Morishita A, Kobara H, Mori H, Yoneyama H, Deguchi A, Himoto T, Kurokohchi K, Okano K, Suzuki Y, Murao K, Masaki T.

Int J Oncol. 2014 Jul;45(1):322-32. doi: 10.3892/ijo.2014.2419. 査読有り

6. 17β-Estradiol regulates scavenger receptor class BI gene expression via protein kinase C in vascular endothelial cells.

Fukata Y, Yu X, Imachi H, Nishiuchi T, Lyu J, Seo K, Takeuchi A, Iwama H, Masugata H, Hoshikawa H, Hosomi N, Iwasaki Y, Murao K.  
Endocrine. 2014 Aug;46(3):644-50. doi: 10.1007/s12020-013-0134-5. 査読有り

7. Metformin suppresses expression of the selenoprotein P gene via an AMP-activated kinase (AMPK)/FoxO3a pathway in H4IIEC3 hepatocytes.

Takayama H, Misu H, Iwama H, Chikamoto K, Saito Y, Murao K, Teraguchi A, Lan F, Kikuchi A, Saito R, Tajima N, Shirasaki T, Matsugo S, Miyamoto K, Kaneko S, Takamura T.

J Biol Chem. 2014 Jan 3;289(1):335-45. doi: 10.1074/jbc.M113.479386. 査読有り

8. Association between left ventricular hypertrophy and changes in arterial stiffness during hypertensive treatment.

Masugata H, Senda S, Inukai M, Himoto T, Hosomi N, Murao K, Okada H, Goda F.

Clin Exp Hypertens. 2014;36(4):258-62. doi: 10.3109/10641963.2013.810229. 査読有り

9. Apoptosis and autophagy contribute to gender difference in cardiac ischemia-reperfusion induced injury in rats.  
Chen C, Hu LX, Dong T, Wang GQ, Wang LH, Zhou XP, Jiang Y, Murao K, Lu SQ, Chen JW, Zhang GX. *Life Sci.* 2013 Aug 28;93(7):265-70. doi: 10.1016/j.lfs.2013.06.019. 査読有り
10. Chronic restraint stress inhibits hair growth via substance P mediated by reactive oxygen species in mice.  
Liu N, Wang LH, Guo LL, Wang GQ, Zhou XP, Jiang Y, Shang J, Murao K, Chen JW, Fu WQ, Zhang GX. *PLoS One.* 2013 Apr 26;8(4):e61574. doi: 10.1371/journal.pone.0061574. 査読有り
11. Antitumor effect of metformin in esophageal cancer: in vitro study.  
Kobayashi M, Kato K, Iwama H, Fujihara S, Nishiyama N, Mimura S, Toyota Y, Nomura T, Nomura K, Tani J, Miyoshi H, Kobara H, Mori H, Murao K, Masaki T. *Int J Oncol.* 2013 Feb;42(2):517-24. doi: 10.3892/ijo.2012.1722. 査読有り
12. Association of serum anti-periodontal pathogen antibody with ischemic stroke.  
Hosomi N, Aoki S, Matsuo K, Deguchi K, Masugata H, Murao K, Ichihara N, Ohshima H, Dobashi H, Nezu T, Ohtsuki T, Yasuda O, Soejima H, Ogawa H, Izumi Y, Kohno M, Tanaka J, Matsumoto M. *Cerebrovasc Dis.* 2012;34(5-6):385-92. doi: 10.1159/000343659. 査読有り
13. Human microRNAs originated from two periods at accelerated rates in mammalian evolution.  
Iwama H, Kato K, Imachi H, Murao K, Masaki T. *Mol Biol Evol.* 2013 Mar;30(3):613-26. doi: 10.1093/molbev/mss262. 査読有り
14. Liver X receptor  $\alpha$  is involved in the transcriptional regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene.  
Zhao LF, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Okazaki M, Nakayama S, Kambayashi M, Fujimoto S, Hashimoto K, Murao K, Terada Y. *Diabetes.* 2012 May;61(5):1062-71. doi: 10.2337/db11-1255. 査読有り
15. The optimal timing of antihypertensive medication administration for morning hypertension in patients with cerebral infarction.  
Hosomi N, Sueda Y, Masugata H, Dobashi H, Murao K, Ueno M, Miki T, Kohno M, Nishiyama A, Matsumoto M. *Hypertens Res.* 2012 Jul;35(7):720-4. doi: 10.1038/hr.2012.25. 査読有り
16. The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo.  
Kato K, Gong J, Iwama H, Kitanaka A, Tani J, Miyoshi H, Nomura K, Mimura S, Kobayashi M, Aritomo Y, Kobara H, Mori H, Himoto T, Okano K, Suzuki Y, Murao K, Masaki T. *Mol Cancer Ther.* 2012 Mar;11(3):549-60. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0594. 査読有り
17. Association between arterial stiffness and pulmonary function in hypertensive patients.  
Masugata H, Senda S, Okada H, Murao K, Inukai M, Himoto T, Hosomi N, Murakami K, Noma T, Kohno M, Goda F. *Hypertens Res.* 2012 Apr;35(4):388-92. doi: 10.1038/hr.2011.199. 査読有り  
〔学会発表〕(計 8 件)
1. 膵 細胞における ABCA1 発現に及ぼす IGF-I の影響について  
村尾孝児, 呂 静雅、井町仁美、深田陽子、西内崇将、吉本卓生、福長健作、岩間久和、岩崎泰正  
第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 (大阪) 2014 年 5 月 22-24 日口演
2. 膵 細胞における脂肪毒性に対する IGF-1 の効果について  
呂静雅、井町仁美、深田陽子、西内崇将、瀬尾佳代子、岩崎泰正、村尾孝児  
日本糖尿病学会中国四国地方会第 51 回総会 (岡山) 2013 年 11 月 15-16 日
3. 血管内皮細胞における AGEs による HDL 受容体(SR-B1)発現の抑制について 瀬尾佳代子、井町仁美、深田陽子、岩崎泰正、村尾孝児  
日本糖尿病学会中国四国地方会第 51 回総会 (岡山) 2013 年 11 月 15-16 日
4. 転写因子 PREB による脂肪細胞毒性改善効果について  
深田陽子、井町仁美、呂静雅、西内崇将、瀬尾佳代子、岩崎泰正、村尾孝児  
日本糖尿病学会中国四国地方会第 51 回総会 (岡山) 2013 年 11 月 15-16 日
5. IGF-1 による膵 細胞に対する脂肪毒性への影響について  
呂静雅、井町仁美、深田陽子、西内崇将、瀬尾佳代子、岩崎泰正、村尾孝児  
第 13 回日本内分泌学会四国支部学術集会 (高松) 2013 年 9 月 7 日
6. 膵 細胞における膵 ABCA1 発現をおよぼす IGF-I の影響について 呂静雅、井町仁美、深田陽子、多田達史、岩崎泰正、村尾孝児  
第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (熊本) 2013 年 5 月 16-18 日
7. 転写因子 PREB トランスジェニックマウスにおける脂肪肝抑制について 井町仁美、深田陽子、宮井由美、寒川佳代子、竹内彰浩、篁俊成、村尾孝児  
第 86 回日本内分泌学会学術総会 (仙台) 2013 年 4 月 25-27 日
8. TNF による膵 細胞における脂肪毒性への影響について 呂静雅、井町仁美、深田陽子、寒川佳代子、竹内彰浩、岩崎泰正、村尾孝児  
第 86 回日本内分泌学会学術総会 (仙台) 2013 年 4 月 25-27 日
- 〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

村尾 孝児 (Koji Murao)  
香川大学・医学部・教授  
研究者番号：20291982

##### (2) 研究分担者

井町 仁美 (Hitomi Imachi)  
香川大学・医学部・准教授  
研究者番号：80380187

徳光 浩 (Hiroshi Tokumitsu)  
岡山大学・自然科学研究・教授  
研究者番号：20237077

大森 浩二 (Koji Ohmori)  
香川大学・医学部・准教授  
研究者番号：00263913

##### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：