

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293125

研究課題名(和文) 糖尿病の病態における甲状腺ホルモン代謝酵素の病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathophysiological roles of thyroid hormone metabolism in diabetes mellitus

研究代表者

村上 正巳 (Murakami, Masami)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30241871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、甲状腺ホルモンであるT4をT3に変換して甲状腺ホルモンを活性化する2型ヨードサイロニン脱ヨード酵素(D2)ならびにT4をrT3に、T3をT2に変換して甲状腺ホルモンを不活化する3型ヨードサイロニン脱ヨード酵素(D3)の発現と生理的役割について検討した。その結果、培養膵細胞にD3が発現し、甲状腺ホルモンを不活化することによりインスリン分泌を刺激することを見出した。さらに、培養膵静脈血管内皮細胞にD2が発現し、D2によりT4から変換されたT3のnongenomic actionによって細胞遊走が刺激されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have studied the expression and regulation of thyroid hormone metabolism, including type 2 iodothyronine deiodinase (D2) which activates thyroid hormones and type 3 iodothyronine deiodinase (D3) which inactivates thyroid hormones. We found the expression of D3 in cultured pancreatic beta cells, which is stimulated by GLP-1 via a cAMP-PKA mediated pathway. D3 is suggested to increase insulin secretion from pancreatic beta cells by decreasing intracellular T3. Furthermore, we discovered the expression of D2 in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Conversion of T4 to T3 by D2 is required for rapid nongenomic action of T4, which results in migration of HUVECs. These results may open a novel perspective on understanding of the mechanisms of thyroid hormone action.

研究分野：内分泌代謝疾患における臨床化学を中心とした臨床検査医学

キーワード：糖尿病 甲状腺ホルモン 遺伝子 一塩基多型 自己抗体

### 1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモン代謝酵素には 1 型、2 型、3 型のヨードサイロニン脱ヨード酵素が存在する。このうち、T4 を活性型の T3 に変換する 2 型 (D2) と活性型の T3 を T2 に変換する 3 型 (D3) が甲状腺ホルモンの活性化と不活性化に係る生理的に重要な酵素である。糖尿病の治療においてインクレチン関連薬が注目を集めている。インクレチンは消化管から分泌され、膵細胞膜に存在する受容体にはたらき細胞内 cAMP の増加を介してインスリン分泌を血糖依存性に増幅するものであり、GLP-1 と GIP が知られている。インクレチン関連薬には GLP-1 受容体作動薬と DPP-4 阻害薬があり、低血糖の副作用がなく安全に使用できることから現在広く使用されている。さらに、インクレチンには膵細胞数の増加や膵細胞の機能の維持や保護にもつながる可能性が指摘されているが、その機序の詳細は不明な点が多い。我々は、これまで群馬大学教育学部保健体育学教室と共同で群馬大学の地域貢献事業として地域住民の健診を行い、400 例以上の対象者に 75 g 経口糖負荷試験を実施してきた。この検査結果から HOMA- $\beta$  や insulinogenic index で表わされるインスリン分泌能ならびに HOMA-R で表わされるインスリン抵抗性を解析し、エネルギー代謝に関わる遺伝子の一塩基多型 (SNP) との関連について理化学研究所で開発された新規迅速遺伝子解析法である SmartAmp 法を用いて検討を行ってきた。その過程において、細胞内局所で甲状腺ホルモンの T4 を T3 に変換して活性化する 2 型ヨードサイロニン脱ヨード酵素 (D2) の遺伝子 (D102) の Thr92Ala の SNP がインスリン分泌能の低下に強く関連していることが明らかとなった。我々は D2 が骨格筋、血管平滑筋や褐色脂肪組織に発現していることを見出したが、近年は脂肪酸による TGR5 を解するエネルギー代謝に D2 が重要な役割を果たしていることが報告され (Nature 439:402, 2006) これまでは専らインスリン抵抗性と D2 の関連について研究が進められてきた。我々は、これらの解析結果から、膵ラ氏島の細胞に D2 が発現している全く新たな可能性を推測した。膵細胞における D2 の発現の可能性について培養マウス膵細胞を用いて検討したところ、T4 から T3 に変換する D2 と T3 を T2 に不活化する 3 型ヨードサイロニン脱ヨード酵素 (D3) の発現を認めた。インクレチンである GLP-1 を添加したところ、培養膵細胞からのインスリン分泌の増加とともに、D2 ならびに D3 の酵素活性と D2 ならびに D3 の mRNA が増加することが示され、この刺激には細胞内の cAMP が関与することが明らかとなった。これらの成績は、膵細胞内において D2 ならびに D3 酵素のはたらきによって T4 から T3 への変換、すなわち甲状腺ホルモンの活性化と T3 から T2 への変換、すなわち甲状腺ホルモンの不

活化が GLP-1 受容体 - cAMP 系を介して制御されている可能性を示唆している。本研究において、骨格筋、血管平滑筋、褐色脂肪組織ならびに膵細胞に発現している D2 と膵細胞に発現している D3 の糖尿病や肥満の病態における役割を検討する。

### 2. 研究の目的

本研究において、褐色脂肪組織、骨格筋、血管平滑筋や膵細胞などに発現し甲状腺ホルモンを活性化する D2 と膵細胞に発現し甲状腺ホルモンを不活化する D3 の糖尿病や肥満の病態における病態生理学的意義について臨床検体、培養細胞、遺伝子改変動物を用いて検討する。また、多数の糖尿病症例において D2 の遺伝子 (D102) の一塩基多型 (SNP) を解析し、糖尿病の病態との関連を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) SmartAmp 法による D102 の SNP の解析  
SmartAmp 法は、理化学研究所ゲノム科学総合研究センターで開発され、目標とする遺伝子多型を、核酸抽出の手順を踏むことなく、血液などの臨床サンプルから直接に 30 分という短時間で検出することができる個別化医療実現の一助となる画期的な方法である。血液と試薬を混合するのみの簡便な操作しか必要とせず、感度と特異度が高く、迅速、簡便、低コストで正確に SNP を診断できる検査法である。これまでの D102 の Thr92Ala の SNP の SmartAmp 法による検討では、野生型のホモが 40%、ヘテロが 45%、変異型のホモが 15% という割合であり、正確で安定した結果が得られている。D102 の SNP の SmartAmp 法のキットを用いて、さらに多数例の地域住民の健診受診者と糖尿病症例について検討し、臨床経過、病態、インスリン分泌能について解析し、D102 の SNP との関連について検討する。さらに、健診受診者に運動処方を行い、運動の耐糖能に及ぼす効果と D102 の SNP との関連について検討する。

(2) 培養膵細胞における甲状腺ホルモン代謝酵素の発現とその調節機構ならびに役割の解明

我々の保有する培養マウス膵細胞 (MIN-6) を用いて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により甲状腺ホルモンの代謝を解析する。D2 ならびに D3 などのヨードサイロニン脱ヨード酵素活性と mRNA の発現を検討し、その発現調節機構を細胞レベルで解析する。本研究において、膵細胞に作用することが知られている GLP-1 をはじめとする糖尿病治療薬によるヨードサイロニン脱ヨード酵素活性ならびに mRNA の変化の有無を検討し、膵細胞における発現調節機構を明らかにする。また、D2 ならびに D3 の siRNA を用いて D2 ならびに D3 の酵素活性を阻害し、GLP-1 をはじめとする糖尿病治療薬によるインスリン分泌をはじめとする膵細胞機能の調

節における D2 ならびに D3 の活性阻害による影響を検討し、膵 細胞機能調節における D2 ならびに D3 の役割を解明する。

(3) ノックアウトマウスを用いた糖尿病における D2 の役割の解明

D2 の生理的役割を個体レベルで解析することを目的として、D2 ノックアウトマウスを用いて野生型マウスと比較検討する。各発生段階における野生型マウスと D2 ノックアウトマウスの膵ラ氏島の形態の差異について検討する。野生型マウスと D2 ノックアウトマウスのそれぞれに対して糖負荷ならびに GLP-1 受容体作動薬をはじめとする薬物の投与を行い、血糖ならびにインスリン分泌に及ぼす影響を検討し、D2 のインスリン分泌をはじめとする糖尿病の病態における役割を解明する。

#### 4. 研究成果

(1) 運動による耐糖能改善効果における D2 の SNP の意義

対象者に運動処方を行い、長期間の習慣的な運動の前後で耐糖能を比較し、D102 の SNP の有無と運動による耐糖能改善効果の関連について検討した結果、D102 の SNP を有すると運動による耐糖能改善効果が得られにくくなるという成績が得られ、D102 の SNP が耐糖能の変化に関与する可能性が示唆された。

(2) 膵<sup>β</sup>細胞における甲状腺ホルモン代謝

膵ラ氏島の 細胞の甲状腺ホルモン代謝を解析する目的で、MIN-6 培養マウス膵 細胞を用いて検討したところ、甲状腺ホルモンを不活化する D3 の酵素活性と D3 mRNA の発現を認めた。さらに、インクレチンである GLP-1 を添加したところ、培養膵 細胞からのインスリン分泌の増加とともに、D3 の酵素活性と D3 mRNA が増加することが示され、この刺激には細胞内の cAMP が関与することが明らかとなった。さらに活性型の甲状腺ホルモンである T3 は GLP-1 によるインスリン分泌を抑制することが明らかとなったことから、膵細胞に発現する D3 は GLP-1 によるインスリン分泌を増強する働きがあるものと考えられた。本研究結果は、甲状腺ホルモンならびにその代謝酵素が膵 細胞のインスリン分泌に関与し、糖尿病治療薬として最も多く使用されるインクレチン関連薬の新たな作用メカニズムを示唆するものと考えられる。

(3) 血管壁における甲状腺ホルモン代謝

我々は、培養ヒト血管平滑筋細胞に D2 が発現していることを見出して報告した。今回、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に D2 が発現していることを見出した。HUVEC に発現する D2 により局所で T4 から変換された T3

が、甲状腺ホルモンの典型的な遺伝子発現調節を介さない nongenomic action により血管内皮細胞の遊走を促進することを明らかにした。この研究成果は、甲状腺ホルモンが血管内皮細胞に直接作用して抗動脈硬化作用を発揮する可能性を示しただけでなく、甲状腺ホルモンの nongenomic action に D2 による甲状腺ホルモン活性化が関与する可能性を初めて明らかにしたものである。

(4) D2 ノックアウトマウスを用いた解析

D2 の抗動脈硬化作用を個体レベルで解析する目的で、D2 ノックアウトマウスを用いて血圧と心拍数を測定したところ、収縮期血圧・平均血圧・拡張期血圧・心拍数のいずれも D2 ノックアウトマウスにおいて野生型に比較して低値であった。D2 ノックアウトマウスならびに野生型マウスから筋芽細胞を単離してマイクロアレイによって解析したところ、D2 ノックアウトマウスにおいて G 蛋白共役型受容体のうち発現が増加する 29 遺伝子と発現が低下する 34 遺伝子を同定し、それらの生理的意義について検討している。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 50 件)

Hu X, Sleeman MW, Miyashita K, Linton MF, Allan CM, He C, Larsson M, Tu Y, Sandoval NP, Jung RS, Mapar A, Machida T, Murakami M, Nakajima K, Ploug M, Fong LG, Young SG, Beigneux AP.

Monoclonal antibodies that bind to the Ly6 domain of GPIHBP1 abolish the binding of LPL. *J Lipid Res* 査読有 58:208-215, 2017

DOI: 10.1194/jlr.M072462

Ishiyama N, Sakamaki K, Shimomura Y, Kotani K, Tsuzaki K, Sakane N, Miyashita K, Fukamachi I, Kobayashi J, Stanhope KL, Havel PJ, Kamachi K, Tanaka A, Tokita Y, Machida T, Murakami M, Nakajima K. Lipoprotein lipase does not increase significantly in the postprandial plasma. *Clin Chim Acta* 査読有 464:204-210, 2017

DOI: 10.1016/j.cca.2016.11.035

Nakajima K, Tokita Y, Sakamaki K, Shimomura Y, Kobayashi J, Kamachi K, Tanaka A, Stanhope KL, Havel PJ, Wang T, Machida T, Murakami M. Triglyceride content in remnant lipoproteins is significantly increased after food intake and is associated with plasma lipoprotein lipase. *Clin Chim Acta* 査読有 465:45-52, 2017

DOI: 10.1016/j.cca.2016.12.011

Yagi H, Sumino H, Aoki T, Tsunekawa K, Araki O, Kimura T, Nara M, Ogiwara T,

Murakami M. Impaired blood rheology is associated with endothelial dysfunction in patients with coronary risk factors. *Clin Hemorheol Microcirc* 査読有 62:139-150, 2016  
DOI: 10.3233/CH-151960

Brenta G, Berg G, Miksztoicz V, Lopez G, Lucero D, Faingold C, Murakami M, Machida T, Nakajima K, Schreier L. Atherogenic lipoproteins in subclinical hypothyroidism and their relationship with hepatic lipase activity: response to replacement treatment with levothyroxine. *Thyroid* 査読有 26:365-372, 2016  
DOI: 10.1089/thy.2015.0140

Yoshida K, Kimura T, Aoki T, Tsunekawa K, Araki O, Shoho Y, Nara M, Sumino H, Murakami M. Fasting serum insulin levels and insulin resistance are associated with blood rheology in Japanese young adults without diabetes. *J Int Med Res* 査読有 44:496-507, 2016  
DOI: 10.1177/0300060515627561

Yagi H, Sumino H, Yoshida K, Aoki T, Tsunekawa K, Araki O, Kimura T, Nara M, Nakajima K, Murakami M. Biological antioxidant potential negatively correlates with carotid artery intima-media thickness. *Int Heart J* 査読有 57:220-225, 2016  
DOI: 10.1536/ihj.15-389

Sato K, Okajima F, Miyashita K, Imamura S, Kobayashi J, Stanhope KL, Havel P, Machida T, Sumino H, Murakami M, Schaefer E, Nakajima K. The majority of lipoprotein lipase in plasma is bound to remnant lipoproteins: a new definition of remnant lipoproteins. *Clin Chim Acta* 査読有 461:114-125, 2016  
DOI: 10.1016/j.cca.2016.06.020

Allan CM, Larsson M, Hu X, He C, Jung RS, Mapar A, Voss C, Miyashita K, Machida T, Murakami M, Nakajima K, Bensadoun A, Ploug M, Fong LG, Young SG, Beigneux AP. An LPL-specific monoclonal antibody, 88B8, that abolishes the binding of LPL to GPIHBP1. *J Lipid Res* 査読有 57:1889-1898, 2016  
DOI: 10.1194/jlr.M070813

Mori M, Ishikawara F, Tomoda T, Yamada S, Okamoto M, Itabashi H, Seki Y, Matsumoto R, Shoho Y, Martha L, Sumino H, Murakami M. Use of capillary electrophoresis with dual-opposite end injection for simultaneous analysis of small ions in saliva samples from wrestlers undergoing a weight training program. *J Chromatogr*

*B Analyt Technol Biomed Life Sci* 査読有 1012-1013:178-85, 2016  
DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.01.037

Aoki T, Tsunekawa K, Araki O, Ogiwara T, Nara M, Sumino H, Kimura T, Murakami M. Type 2 iodothyronine deiodinase activity is required for rapid stimulation of PI3K by thyroxine in human umbilical vein endothelial cells. *Endocrinology* 査読有 156:4312-4324, 2015  
DOI: 10.1210/en.2014-1988

Shirakawa T, Nakajima K, Yatsuzuka S, Shimomura Y, Kobayashi J, Machida T, Sumino H, Murakami M. The role of circulating lipoprotein lipase and adiponectin on the particle size of remnant lipoproteins in patients with diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Clin Chim Acta* 査読有 440:123-132, 2015  
DOI: 10.1016/j.cca.2014.10.029

Shirakawa T, Nakajima K, Shimomura Y, Kobayashi J, Stanhope K, Havel P, Machida T, Sumino H, Murakami M. Comparison of the effect of post-heparin and pre-heparin lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase on remnant lipoprotein metabolism. *Clin Chim Acta* 査読有 440:193-200, 2015  
DOI: 10.1016/j.cca.2014.07.020

Aoki T, Yagi H, Sumino H, Tsunekawa K, Araki O, Kimura T, Nara M, Ogiwara T, Nakajima K, Murakami M. Relationship between carotid artery intima-media thickness and small dense low-density lipoprotein cholesterol concentrations measured by homogeneous assay in Japanese subjects. *Clin Chim Acta* 査読有 442:110-114, 2015  
DOI: 10.1016/j.cca.2015.01.010

Machida T, Miyashita K, Sone T, Tanaka S, Nakajima K, Saito M, Stanhope K, Havel P, Sumino H, Murakami M. Determination of serum lipoprotein lipase using a latex particle-enhanced turbidimetric immunoassay with an automated analyzer. *Clin Chim Acta* 査読有 442:130-135, 2015  
DOI: 10.1016/j.cca.2015.01.016

Akiyama S, Ogiwara T, Aoki T, Tsunekawa K, Araki O, Murakami M. Glucagon-like peptide-1 stimulates type 3 iodothyronine deiodinase expression in a mouse insulinoma cell line. *Life Sci* 査読有 115:22-28, 2014  
DOI: 10.1016/j.lfs.2014.09.004

Kikkawa K, Nakajima K, Shimomura Y,

Tokita Y, Machida T, Sumino H, Murakami M. Small dense LDL cholesterol measured by homogeneous assay in Japanese healthy controls, metabolic syndrome and diabetes patients with or without a fatty liver. Clin Chim Acta 査読有 438:70-79, 2014  
DOI: 10.1016/j.cca.2014.07.017  
Enokida Y, Shimizu K, Kakegawa S, Atsumi J, Takase Y, Miyamae Y, Nagashima T, Ohtaki Y, Kaira K, Sunaga N, Yanagitani N, Yoshino R, Tsunekawa K, Igai H, Kamiyoshihara M, Usui K, Lezhava A, Tomizawa Y, Ishikawa T, Murakami M, Hayashizaki Y, Takeyoshi I. Single-nucleotide polymorphism (c.309T>G) in the *MDM2* gene and lung cancer risk. Biomed Rep 査読有 2:719-724, 2014  
DOI: 10.3892/br.2014.305

〔学会発表〕(計 129 件)

Murakami M. Thyroid hormone action -update. 14<sup>th</sup> Asian Society for Clinical Pathology and Laboratory Medicine 2016, Taipei, Taiwan  
Murakami M. Current issues in laboratory medicine. 14<sup>th</sup> Indonesian Society for Clinical Pathology and Laboratory Medicine 2015, Manado, Indonesia  
Aoki T, Kimura T, Shimizu T, Sumino H, Miyazaki O, Fukamachi I, Nakajima K, Okajima F, Murakami M. Clinical implication of apolipoprotein M: apolipoprotein M may be a biomarker of coagulation and fibrinolysis. 82<sup>nd</sup> European Atherosclerosis Society Congress 2014, Madrid, Spain

〔図書〕(計 12 件)

Murakami M. Deiodinase and brain development. Koibuchi N and Yen PM eds. Thyroid hormone disruption and neurodevelopment. 23-31, 2016  
村上正巳. 日本臨床検査医学会における倫理的問題. 臨床病理 63:244-248, 2015  
村上正巳. 甲状腺疾患のバイオマーカーの進歩. Laboratory and Practice 32:57-62, 2014

〔その他〕

プレスリリース：甲状腺ホルモンによる血管修復のメカニズムを解明 動脈硬化の予防・治療法の開発につながる可能性  
<http://www.gunma-u.ac.jp/information/8136>

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 正巳 (MURAKAMI, Masami)  
群馬大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：30241871

(2)研究分担者

木村 孝穂 (KIMURA, Takao)  
群馬大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：90396656

角野 博之 (SUMINO, Hiroyuki)  
群馬大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：10375579

奈良 誠人 (NARA, Makoto)  
群馬大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80420165

荻原 貴之 (OGIWARA, Takayuki)  
群馬大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80361377

荒木 修 (ARAKI, Osamu)  
群馬大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80589482

常川 勝彦 (TSUNEKAWA, Katsuhiko)  
群馬大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：30436307

(3)連携研究者

奥 浩之 (OKU, Hiroyuki)  
群馬大学・理工学研究員・准教授  
研究者番号：20301749