

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06427

研究課題名(和文) TFGの膵臓・肝臓・脂肪組織における糖・脂質代謝調節機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of TFG in glucose and lipid metabolism in pancreas, liver and adipose tissue

研究代表者

山本屋 武 (Yamamotoya, Takeshi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・助教

研究者番号：50760013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)： Trk-fused gene (TFG) のインスリン分泌における役割を明らかにするため、膵細胞特異的TFG KOマウス ( TFG KO) を作製し、その表現型解析を行った。 TFG KOはインスリン分泌能が低下し、糖負荷試験にて顕著な血糖上昇を呈した。インスリン免疫染色にて、細胞量の低下を認め、単離膵島にてグルコース刺激によるインスリン分泌の低下を認めることから、膵細胞量・機能双方の障害が示唆された。電子顕微鏡観察やマイクロアレイによる遺伝子解析等の結果、インスリン結晶径の低下、軽度の小胞体ストレス、Nrf2下流遺伝子群の発現低下がその機序として示唆された。

研究成果の概要(英文)： To elucidate the role of TFG in insulin secretion, we generated pancreatic  $\beta$ -cell specific TFG knockout mice ( TFG KO) and analyzed the phenotype. TFG KO displayed marked hyperglycemia with impaired insulin secretion on glucose tolerance test. Impairment of both  $\beta$ -cell mass and function was suggested by smaller insulin-positive area in the immunohistochemical analysis of the pancreas and reduced insulin secretion on glucose stimulation in isolated islets. Electron microscopic observation and microarray gene expression analysis revealed smaller insulin crystal diameters, mild ER stress and downregulation of Nrf2 and its downstream genes as possible underlying mechanisms for the impaired  $\beta$ -cell mass and function in TFG KO.

研究分野：糖尿病・代謝

キーワード：糖尿病 インスリン分泌 TFG

## 1. 研究開始当初の背景

Trk-fused gene (TFG) はもともとチロシンキナーゼ活性を有する TrkA (NGF 受容体) と融合した癌遺伝子として 1995 年に報告された (Greco A, et al. Mol Cell Biol. 1995) が、TFG 自体の機能については長らく不明のままであった。

近年、TFG が小胞体 (ER) から Golgi 体への COP 小胞を介した細胞内小胞輸送に重要であることが明らかになってきた (Witte K, et al. Nat Cell Biol. 2011, Johnson A, et al. EMBO J. 2015)。

またさらに、TFG が近位筋優位遺伝性運動感覚ニューロパチー (HMSN-P)、軸索型 Charcot-Marie Tooth 病、遺伝性痙性対麻痺といったいくつかの神経変性疾患の原因遺伝子となることが報告された (Ishiyama H, et al. Am J Hum Genet. 2012, Tsai PC, et al. Neurology. 2014, Beetz C, et al. Proc Natl Acad Sci. 2013)。

我々の研究室では、PTEN 結合蛋白の網羅的解析を行った際に TFG を同定し、さらに肥満・糖尿病モデルマウスの代謝標的臓器において TFG の発現量が変化していることを見出した。さらに、前述の TFG 遺伝子異常が原因となる神経変性疾患のうち、HMSN-P では糖尿病・脂質異常症の合併率が高いことが臨床的に知られており (Takashima H, et al. Ann Neurol. 1997)、TFG が糖・脂質代謝において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

そこで、我々の研究室では各臓器特異的 TFG KO マウスを作製し、その表現型解析を通じて TFG の各代謝標的臓器における機能の解明を試みることにした。

## 2. 研究の目的

膵細胞・脂肪細胞・肝臓など各代謝標的臓器特異的に TFG を欠失するマウスの表現型解析を行うことで、代謝制御において TFG が各臓器で担う役割を明らかにする。

最終的には TFG の発現量や機能を調節することで糖尿病や脂質異常症の新規治療薬開発に結びつけることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 膵細胞における TFG の役割の解明

膵細胞特異的 TFG KO マウス (TFG KO) の表現型解析を通じ、膵細胞における TFG の機能の解明を試みる。

普通食および高脂肪食負荷時の体重変化、耐糖能・インスリン分泌能など個体レベルでの影響を検討する。

膵細胞量および細胞増殖・アポトーシスへの影響を免疫染色等を用い組織学的に検討する。

膵細胞機能につき、単離膵島を用い、各種刺激 (グルコース・KCl など) に対するインスリン分泌能を検討する。

小胞体から Golgi 体にかけての形態異常や

インスリン顆粒の異常がないか電子顕微鏡観察により評価する。

### (2) 脂肪細胞における TFG の役割の解明

脂肪細胞特異的 TFG KO マウスを作製し、その表現型解析を通じ、脂肪細胞における TFG の役割を明らかにする。

肥満・糖尿病モデルマウスの脂肪組織における TFG の発現量を検討する。

脂肪細胞特異的 TFG KO マウスにおける、普通食・高脂肪食負荷時の体重変化、耐糖能、異所性脂肪蓄積 (脂肪肝など) への影響を検討する。

TFG は細胞内小胞輸送に重要であることが知られており、サイトカイン分泌や膜蛋白の輸送などに影響が生じる可能性も考えられる。そこで、

アディポネクチン、レプチン、TNF- $\alpha$  等、各種アディポカイン分泌への影響につき、ELISA を行い検討する。

インスリン刺激による GLUT4 細胞膜輸送が障害されていないか検討を行う。

### (3) 肝臓における TFG の役割の解明

肝細胞特異的 TFG KO マウスの作製を行い、耐糖能、インスリンシグナル・肝糖新生への影響等を検討する。

## 4. 研究成果

本研究期間中は主に膵細胞特異的 TFG KO マウス (TFG KO) の表現型解析を中心に行い、以下のような結果を得た (現在論文投稿中)。

### (1) TFG KO はインスリン分泌能低下に伴い耐糖能障害を呈する

通常食負荷条件下で、コントロールとして用いた TFG f/f マウス (以下 f/f) に比べ TFG f/f; MIP-Cre マウス (以下 KO) では随時血糖には顕著な差を認めなかったが、ブドウ糖負荷試験 (IPGTT) を行うと、KO では特に負荷後早期に著明な血糖上昇を認めた。インスリン負荷試験 (ITT) では有意な差を認めず、ブドウ糖負荷 15 分後の血漿インスリン値が KO で有意に低値であったことから、TFG KO はインスリン分泌能低下により耐糖能障害を呈することが示唆された。

### (2) TFG KO では膵細胞増殖の低下に伴い膵細胞量の低下を認める

次に、膵臓切片のインスリン免疫染色を行い、膵細胞量の評価を行った。f/f に比し KO では膵島当たりの膵細胞面積、膵全体に占める膵細胞面積比率ともに有意な低下を認めた。

Ki67 陽性率が KO の膵細胞では有意に低下しており、TUNEL 陽性率には差を認めなかったことから、膵細胞増殖の低下が TFG KO の膵細胞量低下の原因と考えられた。

高脂肪高スクロース食 (HFHS) を 20 週間負荷し、インスリン抵抗性に伴う代償性膵島肥大への影響も検討した。f/f では HFHS 負荷に伴い膵細胞面積の増加を認めたが、KO ではその代償性変化が障害されていた。

(3) TFG KO の膵島ではグルコース応答性インスリン分泌が障害されている

TFG の膵 細胞機能への影響を評価するため、単離膵島を用い、各種刺激に対するインスリン分泌応答を ELISA にて評価した。KO の膵島では高グルコースおよび SU 薬 (Glibenclamide) 刺激に対するインスリン分泌応答が顕著に障害されていた。グルコース刺激時の ATP 産生量や、細胞内 Ca 濃度上昇の障害は認めず、それよりも下流のステップでの障害が示唆された。

(4) TFG KO の膵 細胞ではインスリン結晶径の低下と軽度の小胞体ストレスを認める

電子顕微鏡にて膵 細胞の微細構造を観察したところ、KO の膵 細胞ではインスリン顆粒内のインスリン結晶径が f/f に比して有意に低下しており (f/f 238 nm vs KO 212 nm)、KO でのインスリン分泌能低下の一因として示唆された。

また、KO の膵 細胞では拡張した小胞体が散見され、膵島における小胞体ストレスマーカー (BiP, sXBP1 mRNA) 発現も軽度ではあるが有意に増加しており、小胞体ストレスの増大が示唆された。chemical chaperone である 4-PBA 添加により KO の単離膵島におけるインスリン分泌障害が部分的ではあるが回復したことから、小胞体ストレスも KO の膵 細胞機能障害に寄与していると考えられた。

(5) TFG KO の膵島では Nrf2 下流遺伝子群の発現が低下している

単離膵島から total RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、KO の膵島では Nrf2 下流遺伝子群の発現が抑制されていることが明らかとなった。Nrf2 は膵 細胞量・機能双方の維持に関与していることが報告されていることから (Urano A, et al. Mol Cell Biol. 2013. Yagishita Y, et al. Diabetes. 2014.)、TFG KO における膵 細胞量・機能障害の一因となっている可能性が示唆された。

その他、脂肪細胞での TFG による代謝制御機構を明らかにするため、Tamoxifen 誘導性脂肪細胞特異的 TFG KO マウスの作製を行った。現在、その表現型解析を進めているところである。

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 10 件)

1. Yamamotoya T, Nakatsu Y, Matsunaga Y, Fukushima T, Yamazaki H, Kaneko S, Fujishiro M, Kikuchi T, Kushiyama A, Tokunaga F, Asano T, Sakoda H. Reduced SHARPIN and LUBAC formation may contribute to CCl<sub>4</sub>- or Acetaminophen-induced liver cirrhosis in mice. *Int J Mol Sci.* 2017;

18(2): E326. doi: 10.3390/ijms18020326. (査読有)

2. 山本屋 武, 中津 祐介, 浅野 知一郎. SGLT2 阻害薬 発見と開発の歴史. *Diabetes Strategy.* 2017; 7(1): 40-46. (査読無)

3. Kushiyama A, Nakatsu Y, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Mori K, Ueda K, Inoue Y, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Asano T. Role of uric acid metabolism-related inflammation in the pathogenesis of metabolic syndrome components such as atherosclerosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016: 8603164. doi: 10.1155/2016/8603164. (査読有)

4. Nakatsu Y, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Ueda K, Inoue Y, Mori K, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Kushiyama A, Asano T. Physiological and pathogenic roles of prolyl isomerase Pin1 in metabolic regulations via multiple signal transduction pathway modulations. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(9): E1495. doi: 10.3390/ijms17091495. (査読有)

5. 山本屋 武, 中津 祐介, 浅野 知一郎. SGLT2 阻害薬 -their potential beyond glucose-lowering. *アンチ・エイジング医学.* 2016; 12(1): 55-63. (査読無)

6. 山本屋 武, 中津 祐介, 浅野 知一郎. SGLT2 阻害薬の作用機序. *内科臨床誌 メディチーナ.* 2016; 53(1): 50-52. (査読無)

7. Qiang S, Nakatsu Y, Seno Y, Fujishiro M, Sakoda H, Kushiyama A, Mori K, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Kamata H, Asano T. Treatment with the SGLT2 inhibitor luseogliflozin improves nonalcoholic steatohepatitis in a rodent model with diabetes mellitus. *Diabetol metab Syndr.* 2015; 7: 104. doi: 10.1186/s13098-015-0102-8. (査読有)

8. Matsunaga Y, Nakatsu Y, Fukushima T, Okubo H, Iwashita M, Sakoda H, Fujishiro M, Yamamotoya T, Kushiyama A, Takahashi S, Tsuchiya Y, Kamata H, Tokunaga F, Iwai K, Asano T. LUBAC formation is impaired in the livers of mice with MCD-dependent nonalcoholic steatohepatitis. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 125380. doi: 10.1155/2015/125380. (査読有)

9. Kanaoka R, Kushiyama A, Seno Y, Nakatsu Y, Matsunaga Y, Fukushima T, Tsuchiya Y, Sakoda H, Fujishiro M, Yamamotoya T, Kamata H, Matsubara A, Asano T. Pin1 inhibitor Juglone exerts anti-oncogenic effects on LNCaP and DU145 cells despite the patterns of gene regulation by Pin1 differing between these cell lines. *PLoS One.* 2015; 10(6): e0127467. doi: 10.1371/journal.pone.0127467. (査読有)

10. Nakatsu Y, Seno Y, Kushiyama A, Sakoda

H, Fujishiro M, Katasako A, Mori K, Matsunaga Y, Fukushima T, Kanaoka R, Yamamotoya T, Kamata H, Asano T. The xanthine oxidase inhibitor febuxostat suppresses development of nonalcoholic steatohepatitis in a rodent model. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2015; 309(1): G42-51. doi: 10.1152/ajpgi.00443. 2014. (査読有)

〔学会発表〕(計 3件)

1. 山本屋 武, 中津 祐介、松永 泰花、櫛山 暁史、石原 寿光、浅野 知一郎. 膵 細胞における Trk-fused gene (TFG)の役割. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 2 日, パシフィコ横浜 (横浜).

2. 山本屋 武, 中津 祐介、迫田 秀之、藤城 緑、山崎 広貴、菊池 貴子、櫛山 暁史、浅野 知一郎. Trk-fused gene (TFG) の膵 細胞における役割の解明. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016 年 5 月 20 日, みやこめっせ (京都).

3. 山本屋 武, 迫田 秀之、藤城 緑、山崎 広貴、金子 直、菊池 貴子、櫛山 暁史、浅野 知一郎. 肝臓における LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) 活性低下は Akt-mTOR 経路の亢進および肝での炎症を惹起する. 第 2 回肝臓と糖尿病・代謝研究会, 2015 年 5 月 23 日, シーモールパレス(下関).

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山本屋 武 (YAMAMOTOYA, Takeshi)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号 : 50760013