

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K13227

研究課題名(和文)更年期インスリン抵抗性に対するエストロゲンの作用とiNOSの関与の解明

研究課題名(英文) Role of estrogen and iNOS during the development of ovariectomy-induced hyperglycemia.

研究代表者

三反崎 聖 (MITAZAKI, Satoru)

高崎健康福祉大学・薬学部・講師

研究者番号：10453424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：高齢女性では、40代から現れる更年期症状に加えて糖尿病のリスクが増加するが、エストロゲンの低下が大きな影響を与えている。本研究により、エストロゲンが一酸化窒素合成酵素(iNOS)の制御を介した血糖上昇抑制作用をもつことを明らかにした。エストロゲンは、AMPK発現や糖取り込みに関与するトランスポーター(GLUT4)膜転移をiNOSの制御を介して行っていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、血糖値上昇におけるエストロゲン低下とiNOSの関与について研究した。iNOSは膵臓においてだけでなく、末梢組織である骨格筋でも機能を有しているのではないか？という仮説を立てた。この仮説を立証するため、iNOSと骨格筋における糖代謝との関連性、中脳辺縁系ドーパミン神経系に制御される自発的な気力・運動量にiNOSが与える影響に着目し、iNOSの機能性と血糖値との関連性を明らかにした。さらに、iNOSシグナル抑制による血糖降下作用についても解析することにより、iNOSの抑制作用が創薬標的になりうるかを検討した。本研究は、酸化ストレス抑制という新たな血糖降下作用の発見に繋がるものである。

研究成果の概要(英文)：Some studies show that inducible nitric oxide synthase (iNOS) plays an important role in the development of insulin resistance in diet-induced obesity. An ovariectomized (ovx) animal is an experimental model for the investigation of postmenopausal pathologic changes due to estrogen deficiency. The aim of this study was to evaluate the role of estrogen and iNOS in the progress of diabetes.

Significant increases in blood glucose levels after glucose injection were observed in ovx mice compared to those in sham mice. And, spontaneous activity in ovx mice impaired those in sham mice. On the other hand, no significant differences in blood glucose levels were observed between the sham and ovx groups of iNOS knockout (KO) mice. In iNOS KO ovx mice, the amount of GLUT4 translocation to the cytoplasmic membrane was greater than the amounts in WT sham and ovx mice and iNOS KO sham mice. Estrogen may control GLUT4 translocation via suppressing iNOS expression.

研究分野：薬理学、毒性学

キーワード：エストロゲン 一酸化窒素合成酵素(iNOS) 卵巣摘出 糖尿病 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化が進む日本では今後、糖尿病に代表される生活習慣病の罹患率の増加が懸念される。2000年にWHO(世界保健機関)が健康寿命を提唱して以来、平均寿命だけではなく、健康寿命の延伸は、世界的にみても取り組むべき重要な課題となっている。高齢女性では、40代から現れる更年期症状(うつ症状、骨粗鬆症)に加えて糖尿病のリスクが増加し、さらに老年期では自発的な気力も低下するが、いずれの症状もエストロゲンの低下が大きな影響を与えている(本研究ではこのようなエストロゲン低下による有害事象をエストロゲン低下症と呼ぶ)。しかし、糖尿病や自発的な気力などのエストロゲン低下症が出現する分子基盤は未だに解明されていない。したがって、エストロゲン低下が生体機能に与える影響およびその分子機構を解明することは、更年期以降に出現する有害事象の発症分子機構の解明に繋がる。将来的に、本研究で得られた知見に基づき健康寿命延伸や、エストロゲン低下症に有効な治療戦略構築に結びつくことが期待される。

私はこれまで高齢者において医薬品の副作用が強く出現することに着目し、更年期モデルマウスを用いて性ホルモンと副作用出現の関与について研究を行ってきた。更年期モデルである卵巢摘出群は、エストロゲン分泌量が低下しており、侵襲が軽微であるにも関わらずヒトにおける更年期と同様の症状を観察できる更年期モデルマウスである。卵巢摘出群では偽手術群と比較して血糖値が上昇しやすいことおよび薬剤による血糖値上昇が生じやすいことを明らかにした。また、卵巢摘出群では、偽手術群に比較してインスリン分泌に変化はなかった。肝臓において糖代謝に関係するAMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)は低下していた。また、卵巢摘出群は偽手術群に比較して手術後、体重が増加する。一方、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)ノックアウト(KO)マウスでは、偽手術群および卵巢摘出群の両群間の血糖値に有意な差は観察されなかった。最近、iNOSや酸化ストレスの過剰状態により血糖値が上昇することが報告され始めているが、エストロゲンのiNOSに対する作用による血糖調節作用についてはほとんど報告されていない。これらのことから、本研究ではエストロゲンによる血糖値上昇抑制作用には、iNOSが関与していると仮説をたて、エストロゲンの血糖降下作用およびインスリンの血糖低下作用に対するiNOSの関与を検討した。

2. 研究の目的

日本では、欧米に比較して肥満者の割合は少ないにも関わらず、糖尿病患者は増加している。エストロゲンの欠乏による血糖値上昇には、iNOSが関与しているのではないかと考え、エストロゲンによる血糖値上昇抑制メカニズムにおけるiNOSの役割を明らかにする。また、運動により生活習慣病が改善することは広く知られているが、具体的なメカニズムや効果、あるいは年齢やホルモンの影響については未だ明らかになっていない。そこで本研究では、卵巢摘出群における影響における筋肉の糖代謝について検討する。

糖尿病研究では、膵臓および糖新生を行なう肝臓に目が向けられがちであるが、筋肉も糖貯蔵のための重要な組織である。卵巢摘出群においてはインスリン抵抗性が高くなっているため、筋肉への糖の取り込み作用も低下していることが考えられる。卵巢摘出群では運動による生活習慣病改善効果が減少することが予想される。運動による生活習慣病改善効果には性ホルモンが重要な役割を担っていると予測されるため、エストロゲンの筋肉に対する作用とメカニズムについて検討を行なう。本研究は医薬品の安全使用のためのデータとなるだけでなく、糖尿病の増悪因子と予防について新たな提案を示し、その他の生活習慣病に対しても波及する大きな結果をもたらすと考えられる。また、糖尿病治療のための新たな

創薬ターゲットを見出す足掛かりにもなりうる。

3. 研究の方法

本研究では、卵巣摘出マウスを使用し、エストロゲンの作用に対する iNOS の関与について筋肉に着目し検討した。Jackson 社より入手し、継代繁殖を続けている C57BL/6J 野生型雌性マウス (7 週齢、約 20g) および iNOS KO マウスを用いた。これらのマウスに両側卵巣摘出手術を行い、更年期モデルである卵巣摘出 (ovx) マウスを作製した。対照として開腹のみの偽手術マウスを作製した。筋肉より mRNA を抽出し、iNOS が関与すると考えられる活性経路の因子について遺伝子およびタンパク質発現をウェスタンブロット法および免疫染色により観察した。また、手術 2 週間後から、各群に対して回転用ケージを用いて運動量を測定した。卵巣摘出の有無により筋肉中のインスリン量および糖の取り込み量に変化を観察し、エストロゲンの有無による運動と筋肉における糖取り込みについて検討した。これらのマウスの筋肉より mRNA を抽出し、iNOS が関与すると考えられる活性経路の因子について遺伝子およびタンパク質発現をウェスタンブロット法および免疫染色により観察した。加えて、同時期に卵巣摘出マウスに徐放性エストロゲンタブレットを埋め込み、卵巣摘出マウスにおいて長期的にエストロゲン量を回復させることにより iNOS 発現の変化およびインスリン抵抗性の軽減の有無、回転用ケージを用いたマウス運動量について、エストロゲンの作用と iNOS の関与を検討した。

4. 研究成果

卵巣摘出群において卵巣摘出群で生じる血糖値上昇がエストロゲンの長期投与およびメトホルミン投与により改善したこと

から、エストロゲンが AMPK 活性化に関与していることが示唆された (図 1 A)。一方、卵巣摘出群では、偽手術群と比較してインスリン分泌に変化は観察されなかった。また、卵巣摘出群で減少傾向であった GLUT4 遺伝子発現はエストロゲン長期投与により増加傾向を示すことを見出した (図 1 B)。卵巣摘出群の結果から、エストロゲンは、AMPK 活性化作用および GLUT4 膜転移を増やすことにより血糖値を調節していることが考えられた。

野生型の卵巣摘出群では偽手術群と比較して高い血糖値の上昇が観察されたが、iNOSKO

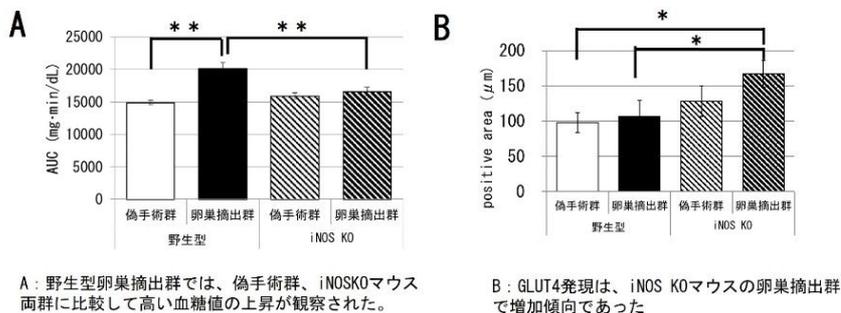


図2 野生型およびiNOS KOマウスにおける血糖値の変化と骨格筋GLUT4発現の変化

マウスでは両群間の血糖値の上昇には有意差は観察されなかった (図 2 A)。GLUT4 の膜移行性は、野生型卵巣摘出群に比較して、iNOSKOマウスの卵巣摘出群で増加した (図 2

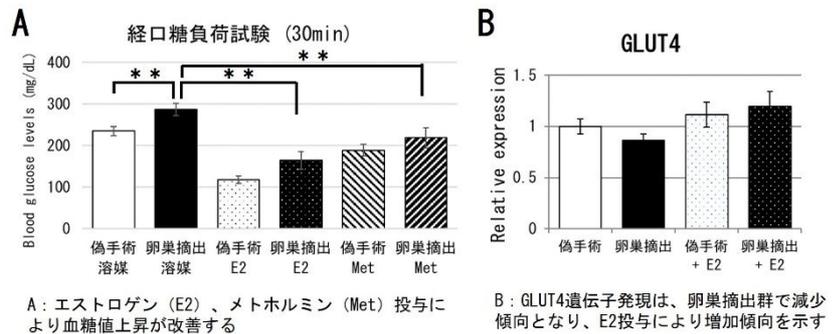
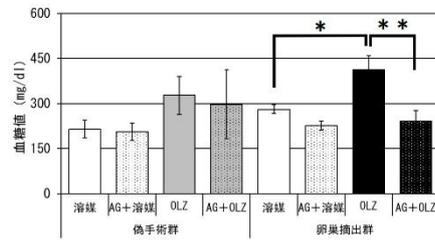


図1 卵巣摘出群における血糖値の変化とエストロゲン、メトホルミンの効果および骨格筋GLUT4発現の変化

B)。WT 野生型の卵巢摘出群ではインスリンによる糖取り込み機能が低下して血糖値が上昇することが考えられた。一方、iNOSKO マウスではGLUT4の膜移行性の増加により卵巢摘出群における血糖値上昇が抑えられたと考えられた。これらの結果から、エストロゲン欠乏時に誘導された iNOS により酸化ストレスが増加することで、血糖値が上昇することが示唆された。

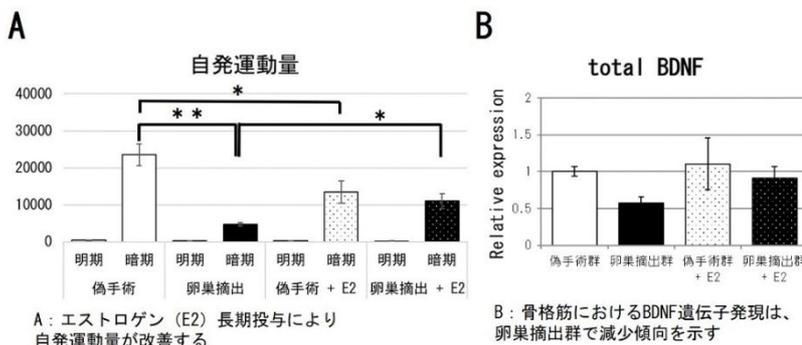


卵巣摘出群はオランザピン(OLZ)誘発性血糖値上昇が増悪し、iNOS阻害薬であるアミノグアニジンは血糖値上昇を改善する

図3 卵巣摘出群における薬物誘発性血糖値上昇とiNOS阻害薬の効果

また、副作用として血糖値上昇を起こすことが知られているオランザピン投与後に、卵巢摘出群でのみ血糖値上昇が観察され、iNOS 阻害薬であるアミノグアニジンを投与することにより、血糖値の上昇が抑制された(図3A)。このことから、iNOS シグナルは卵巢摘出群における血糖値上昇に関与していることが考えられた。

さらに、卵巢摘出群では暗期の自発運動量低下が起こることを新たに見出した。エストロゲン長期投与後に自発運動量低下の軽減が観察された(図4A)。つまり、卵巢摘出後に起こる自発運動量低下もエストロゲンの低下が原因であると考えられる。また、新たに骨格筋においてBDNF 遺伝子発現は卵巢摘出後に低下したため(図4B)、エストロゲンは末梢において



A: エストロゲン (E2) 長期投与により自発運動量が改善する

B: 骨格筋におけるBDNF遺伝子発現は、卵巢摘出群で減少傾向を示す

図4 卵巣摘出群における自発運動量の変化に対するエストロゲンの効果および骨格筋BDNF発現の変化

て BDNF 遺伝子発現の変化にも関与していることが新たに示唆された。本研究室では、ルシフェラーゼによる発光を利用し BDNF 遺伝子発現変化を計測・可視化可能なトラ

ンスジェニックマウス (BDNF-Luc マウス) を用いて、生細胞や生体マウスにおける BDNF 遺伝子発現の変化を継続的に可視化し検討を行なうことができる(図5)。卵巢摘出群では、偽手術群に比較して腹部の BDNF 発現が増加していた。卵巢摘出群では、BDNF 発現が増加し肥満が進行していることが考えられた。肥満の進行により酸化ストレスが増悪し、血糖値上昇を起こすことが示唆された。エストロゲンと骨格筋の関連性については、すでにいくつかの報告がある。例えば、エストロゲンは骨格筋と筋幹細胞の機能維持に重要であることが知られている。また、エストロゲンが骨格筋の乳酸脱水素酵素のアイソザイム形成に影響を与えることも報告されてお

り、乳酸脱水素酵素の変異は横紋筋融解症を引き起こす原因となる。しかしながら、エストロゲンの骨格筋における糖代謝への関与については

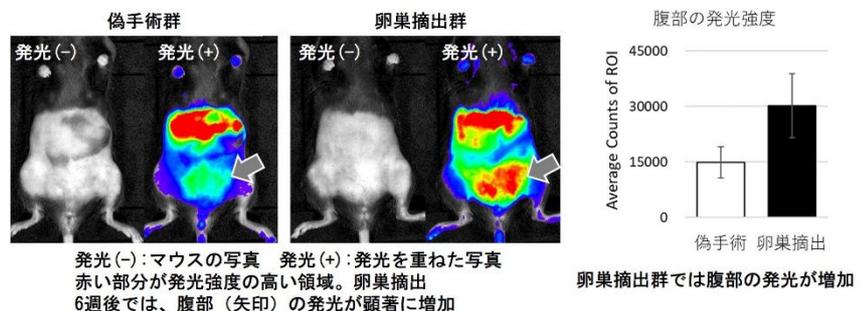


図5 BDNF-Lucマウスの概要および卵巣摘出6週後における腹部の発光の増加

未だ明らかになっていない部分が多い。糖尿病研究では、膵臓および糖新生を行なう肝臓に目が向けられがちであるが、筋肉も糖代謝のための重要な組織である。また、エストロゲンは、生体内で BDNF と関連していることが報告されている。BDNF は、エストロゲンと同様に中枢および末梢において多彩かつ重要な作用をもっており、また、本研究ではすべて明らかになっていないが、iNOS と BDNF の骨格筋における関わりについて検討していくことにより、iNOS および BDNF の新規機能が立証されれば、更年期における病態形成・進行につながる骨格筋内の新規イベントを明示するだけでなく、骨格筋内の iNOS シグナルを標的とした独創的なエストロゲン低下症改善に向けた治療戦略の構築に結びつくことが期待できるため、健康寿命延伸に繋がる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mitazaki Satoru, Kotajima Natsumi, Matsuda Sakiko, Ida Naruki, Iide Mina, Honma Shigeyoshi, Suto Miwako, Kato Naho, Kuroda Naohito, Hiraiwa Kouichi, Yoshida Makoto, Abe Sumiko	4. 巻 104
2. 論文標題 Dimethylthiourea ameliorates carbon tetrachloride-induced acute liver injury in ovariectomized mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 427 ~ 436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三反崎 聖、福地 守、阿部 すみ子
2. 発表標題 エストロゲンの低下は血糖値の上昇と自発運動量の減少を引き起こす
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S Mitazaki, M Iide, S Honma, M Suto, N Kato, K Kuroda, K Hiraiwa, M Yoshida, S Abe
2. 発表標題 Aminoguanidine improves increasing blood glucose levels in ovx mice.
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小柳 成樹、三反崎 聖、吉田 美穂、加藤 菜穂、須藤 美和子、黒田 直人、阿部 すみ子
2. 発表標題 卵巣摘出マウスにおける血糖値の変化とiNOSの血糖値上昇作用
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 茂木 優太、三反崎 聖、松島 涼太、高田 実結、加藤 菜穂、須藤 美和子、黒田 直人、阿部 すみ子
2. 発表標題 iNOS の血糖値変化における影響とエストロゲンの関与について
3. 学会等名 日本薬学会第138回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松島 涼太、三反崎 聖、茂木 優太、高田 実結、加藤 菜穂、須藤 美和子、黒田 直人、阿部 すみ子
2. 発表標題 卵巢摘出マウスにおけるメトホルミン慢性投与による効果
3. 学会等名 日本薬学会第138回年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----