

令和 3 年 8 月 23 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08518

研究課題名(和文) 脂肪毒性のメカニズムの解明と膵 細胞の機能改善への治療戦略

研究課題名(英文) Analysis of lipotoxicity and stratagem for diabetes mellitus

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) 3,500,000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してきた。AngiotensinII, TNFはABCA1遺伝子発現を抑制し、インスリン分泌不全を惹起した。逆にGLP-1は細胞内情報伝達系CaMKK/CaMKIV-PREBを介してABCA1遺伝子発現を促進し、脂肪毒性を解除した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵 細胞においては、コレステロール含量が増加することでグルコース依存性インスリン分泌が障害されることが判明した。本実験の特徴は、膵 細胞のコレステロール含量を調節するABCA1の発現調節メカニズムを解明し、加えてコレステロール蓄積によるインスリン分泌不全のメカニズムを網羅的に解析し、最終的にはHDL代謝、ABCA1代謝を賦活することによる膵 細胞の脂肪毒性解除の新たな治療ストラテジーを確立することにある。本研究内容は国内外でも特異であり、今後の発展性および患者数増加からの観点からも本研究の社会的ニーズは高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Type 2 diabetes is characterized by progressive beta-cell dysfunction and loss of beta-cell mass. The reasons for beta-cell dysfunction in type 2 diabetes are incompletely understood. Recently, not only glucose toxicity in pancreatic cells but also lipotoxicity has been attracting attention as a cause of insulin secretion deficiency, and a decrease in glucose sensitivity has been pointed out. We have comprehensively elucidated the intracellular signal transduction mechanism of lipotoxicity in pancreatic cells and elucidated the pathophysiology of insulin secretory deficiency. AngiotensinII and TNF suppressed ABCA1 gene expression and caused insulin secretory deficiency. Conversely, GLP-1 promoted ABCA1 gene expression via the intracellular signal transduction system CaMKK / CaMKIV-PREB and released lipotoxicity.

研究分野：代謝学

キーワード：糖尿病 HDL代謝 膵 細胞 脂肪毒性 ABCA1 細胞内情報伝達系 インスリン分泌 糖毒性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 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のみならず、**脂肪毒性 (lipotoxicity)**が注目されている。その病態の中心である膵細胞におけるインスリン生合成低下の分子メカニズムは不明であるが、最近、膵細胞における ATP-binding cassette transporter A1(ABCA1)の重要性が報告された。ABCA1 はコレステロールを細胞内から High density lipoprotein (HDL)へ転送する分子であり、膵細胞選択的な ABCA1 の knockout は膵細胞への脂肪の沈着 (脂肪毒性)を惹起し、グルコース応答性インスリン分泌不全をおこす。膵細胞における脂肪毒性を解除する分子ターゲットとして ABCA1 が注目されているが、その発現調節機構は不明であった。

(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合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関与した分子の同定を進めてきたが詳細は不明である。

### 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。プロテインキナーゼの網羅的検討にて CaMKK/CaMKIV pathway が脂肪毒性にともない発現が低下し、インスリン合成分泌も減少した。細胞内情報伝達系 CaMKK/CaMKIV pathway は、ABCA1 発現の主調節系である。我々は膵細胞の脂肪毒性に重要な役割をになう ABCA1 は 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 (Li et al J Cell Mol Med 14:1083,2010 2010)。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、CaMKK/CaMKIV pathway 活性化による ABCA1 遺伝子発現メカニズム解明を目指す。すでに DNA マイクロアレイで ABCA1 制御因子として転写因子 PREB を同定している

(2) 膵細胞における ABCA1 発現調節因子 PREB の役割について解明する。膵細胞における PREB による ABCA1 発現調節のメカニズムの解析をおこなう。また膵細胞における PREB 発現の意義について検討するために **PREB 過剰発現トランスジェニックマウス (PREB-Tg; 組み替え DNA 承認番号: 10219)**を作成した。PREB-Tg マウスではコントロールマウスに比較して、予想通り ABCA1 の強発現が認められた。PREB-Tg マウスに高脂肪食を負荷したモデルでは、ブドウ糖負荷に対するインスリン分泌が改善し、脂肪毒性の改善が認められた。一方驚いたことには、膵ランゲルハンス島が増殖していた。そこで今回は、脂肪毒性の解除だけではなく、膵細胞の増殖メカニズムについても検討し、その機序を明らかにする目的である。

### 3. 研究の方法

膵細胞の細胞株を使用し、脂肪毒性について細胞内情報伝達系を中心に網羅的な解析をおこなう。特に ABCA1 発現低下による脂肪毒性が膵細胞に及ぼす影響について、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 および転写因子 PREB による調節されるメカニズムを解析する。細胞内情報伝達系 CaMKK/CaMKIV pathway による PREB の発現調節メカニズムについて明らかにする。また PREB 遺伝子変異マウスを作成し、in vivo の系で膵細胞の脂肪毒性の解除の機序について研究をおこなう。

### 4. 研究成果

(1) 1、膵細胞の脂肪毒性-インスリン分泌不全と ABCA1 発現-HDL 代謝糖尿病における膵細胞からの**インスリン分泌低下**をまねく病態として“**脂肪毒性 (lipotoxicity)**”が最近注目されている。その病態の中心である膵細胞におけるインスリン生合成低下の分子メカニズムは不明であるが、最近、膵細胞における ATP-binding cassette transporter A1(ABCA1)の重要性が報告された。ABCA1 はコレステロールを細胞内から High density lipoprotein (HDL)へ転送する分子であり、膵細胞選択的な ABCA1 の knockout は膵細胞への脂肪の沈着 (脂肪毒性)を惹起し、グルコース応答性インスリン分泌不全をおこす。膵細胞における脂肪毒性を解除する分子ターゲットとして ABCA1 発現調節メカニズムとしては、calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV(CaMKIV)であることを同定した。GLP-1 による膵細胞の改善に関しては、GLP-1 受容体を介した CaMKK-CaMKIV pathway が重要であることを明らかにした。一方、angiotensinII, TNF などは、ABCA1 発現を抑制することが判明した。

(2) 膵細胞における脂肪毒性に関連する ABCA1 発現抑制と細胞内情報伝達系-転写因子

我々は、HDL 代謝、特に ABCA1 遺伝子発現と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に焦点をあて網羅的に検討してきた。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が、プロテインキナーゼは大きく分けると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) を作成した。膵細胞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。上記の変動を認められたバンドに関しては、質量分析法にて解析をおこない約 60kD は calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMKIV) であることを同定した。以前に我々は CaMKIV pathway がグルコース応答性インスリン合成を促進することを報告している。

一方、細胞内情報伝達系の下流に存在する転写因子についても、膵細胞において CaMKK-CaMKIV の強発現モデルに DNA マイクロアレイを用いた網羅的な解析をおこなった (Mol Biol Evol 2013)。CaMKK-CaMKIV pathway を仲介する転写因子の候補として prolactin regulatory element binding (PREB) が抽出できた。転写因子 PREB は、膵細胞において非常に強い発現を認めインスリン遺伝子やグルコキナーゼ遺伝子のプロモーターに特異的な DNA 結合配列を認め、ABCA1 遺伝子プロモーターにも存在することをすでに報告している。膵細胞における脂肪毒性を解除する分子ターゲットとして ABCA1 が注目されているが、臨床的な役割は不明である。最近我々は、インクレチンの一つである GLP-1 が CaMKK/CaMKIV pathway を介して ABCA1 遺伝子転写を促進し、インスリン分泌能を回復することを報告し、脂肪毒性解除に向けた治療法を見いだした。3, ABCA1 を分子標的とした translational research

ABCA1 を分子標的とした translational research を検討する。ストラテジーとしては、インクレチン、GLP-1 の投与、CaMKK/CaMKIV pathway の活性化を検討したが、ABCA1 の選択的な活性化の手法が確立できていない。そこで新規転写因子 PREB に着目している。CaMKK/CaMKIV pathway の支配下にある PREB が ABCA1 遺伝子のプロモーターに結合し、ABCA1 発現を促進することを報告した。細胞内情報伝達系 CaMKK/CaMKIV pathway による ABCA1 発現増強作用と PREB による促進が相関することより、膵細胞に選択的に PREB を遺伝子導入し、ABCA1 の活性化を検討する。前実験として ABCA1 遺伝子導入よりも PREB 遺伝子導入が効率的であることが判明している。PREB 遺伝子導入法に関しては、マイクロバブルと PREB 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な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行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Lyu J, Imachi H, Fukunaga K, Sato S, Kobayashi T, Dong T, Saheki T, Matsumoto M, Iwama H, Zhang H, Murao K	4. 巻 34
2. 論文標題 Role of ATP-binding cassette transporter A1 in suppressing lipid accumulation by glucagon-like peptide-1 agonist in hepatocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Metab	6. 最初と最後の頁 16-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molmet.2019.12.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Dong T, Lyu J, Imachi H, Kobayashi T, Fukunaga K, Sato S, Iyata T, Yoshimoto T, Yonezaki K, Iwama H, Zhang G, Murao K.	4. 巻 838
2. 論文標題 Selective peroxisome proliferator-activated receptor- modulator K-877 regulates the expression of ATP-binding cassette transporter A1 in pancreatic beta cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 78-84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2018.09.015	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 -
1. 著者名 Sato S, Imachi H, Lyu J, Miyai Y, Fukunaga K, Dong T, Iyata T, Kobayashi T, Yoshimoto T, Kikuchi F, Yonezaki K, Yamaji N, Iwama H, Murao K	4. 巻 61
2. 論文標題 Effect of TNF- on the expression of ABCA1 in pancreatic -cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Mol Endocrinol	6. 最初と最後の頁 185-193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/JME-18-0167	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 -
1. 著者名 Lyu J, Imachi H, Fukunaga K, Sato S, Iyata T, Kobayashi T, Dong T, Yoshimoto T, Yonezaki K, Nagata H, Iwama H, Murao K	4. 巻 59
2. 論文標題 Angiotensin II induces cholesterol accumulation and impairs insulin secretion by regulating ABCA1 in beta cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Lipid Res	6. 最初と最後の頁 1906-1915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1194/jlr.M085886	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 -

1. 著者名 Fukunaga Kensaku, Imachi Hitomi, Lyu Jingya, Dong Tao, Sato Seisuke, Ibata Tomohiro, Kobayashi Toshihiro, Yoshimoto Takuo, Yonezaki Kazuko, Matsunaga Toru, Mura0 Koji	4. 巻 315
2. 論文標題 IGF1 suppresses cholesterol accumulation in the liver of growth hormone-deficient mice via the activation of ABCA1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 E1232 ~ E1241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpendo.00134.2018	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 -

1. 著者名 Iwama Hisakazu, Kato Kiyohito, Imachi Hitomi, Mura0 Koji, Masaki Tsutomu	4. 巻 13
2. 論文標題 Human microRNAs preferentially target genes with intermediate levels of expression and its formation by mammalian evolution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 198142 ~ 198142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0198142	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 福長健作、井町仁美、呂 静雅、董 涛、山地 直、佐藤誠祐、小林俊博、井端智裕、米崎加津子、菊池 史、吉本卓生、村尾孝児
2. 発表標題 膵 細胞株 INS-1においてAngiotensin がABCA1遺伝子発現、インスリン分泌に及ぼす影響について
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤誠祐、呂 静雅、山地 直、小林俊博、井端智裕、米崎加津子、福長健作、菊池 史、吉本卓生、井町仁美、村尾孝児
2. 発表標題 膵 細胞株 INS1でのABCA1遺伝子発現に対するTNF の影響について
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jingay Iyu, Tao Dong, 井町仁美、福長健作、佐藤誠祐、井端智裕、小林俊博、米崎加津子、吉本卓生、菊池 史、山地 直、村尾孝児
2. 発表標題 Exendin-4 inhibits glucagon expression via CaMKK/AMPK/FoxO1 pathway in pancreatic alpha cells
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
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
研究分担者	井町 仁美  (Imachi Hitomi)  (80380187)	香川大学・医学部・准教授    (16201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------