

平成 20 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591037
 研究課題名（和文） 糖代謝調節・動脈硬化症における血管内皮インスリン受容体基質
 - 2 の役割の解明
 研究課題名（英文） The roles of insulin receptor substrate -2 in the regulation of glucose
 homeostasis and atherosclerosis
 研究代表者
 窪田 直人（KUBOTA NAOTO）
 東京大学・医学部附属病院・特任准教授
 研究者番号：50396719

研究成果の概要：2007年度に、血管内皮細胞において主要な IRS である IRS-2 に着目し、インスリン抵抗性と血管内皮機能について、血管内皮細胞特異的 IRS-2 欠損マウス（ETIRS2KO マウス）を用いて検討を行った。その結果、血管内皮細胞における IRS-2 欠損により血管内皮機能が低下し、インスリンによる骨格筋血流の増加や骨格筋間質へのインスリン移行の増加が障害され、その結果インスリン抵抗性を惹起した可能性が示唆された。そこで2008年度は、血管内皮機能改善薬を ETIRS2KO マウスに投与し、骨格筋のインスリン抵抗性が改善するかどうかについて検討したところ、血管内皮機能改善薬の投与により ETIRS2KO では骨格筋血流や骨格筋間質のインスリン濃度の回復が認められ、骨格筋のインスリン抵抗性が改善した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：インスリン受容体基質-2、血管内皮細胞、糖代謝、動脈硬化症

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化や車の普及などによる運動不足といったいわゆる“ライフスタイルの

変化”に伴い、個々人のインスリン抵抗性は増悪し、糖尿病のみならず、肥満・高血圧・脂質代謝異常などの動脈硬化の危険因子が

重積する、いわゆる代謝症候群を発症することとなる。その結果、我が国では心筋梗塞や脳梗塞といった動脈硬化性疾患の発症率が増加の一途をたどっている。従ってインスリン抵抗性が代謝症候群や動脈硬化症を惹起するメカニズムを解明し、それに立脚した根本的治療法の確立が極めて重要である。我々はこれまでに2種類のインスリン抵抗性モデル動物、インスリン受容体基質(IRS)-1欠損マウス、IRS-2欠損マウスを作製し、いずれもほぼ同程度の代謝症候群を発症し、動脈硬化症(カフ傷害誘導性の内膜肥厚)が野生型マウスに比し促進することを報告した。(Nature 372:182,1994, Diabetes 49:1880,2000, Circulation 107:3073,2003)。興味深いことに我々はこの解析を通じてこれらのマウスではいずれも血管内皮機能が障害(インスリンやアセチルコリンなどによる血管弛緩反応の減弱)されていること、しかも同じ程度の代謝症候群にもかかわらずその程度がIRS-1欠損マウスに比しIRS-2欠損マウスでより重篤であることを見いだした。以前よりインスリン抵抗性や代謝症候群、さらには動脈硬化症の共通の基盤病態として血管内皮機能の障害が注目されており(Diabetes 46:S9,1997)、また血管内皮細胞にも肝臓や骨格筋などのインスリン作用臓器と同様にIRS、特にIRS-2が発現していることから、血管内皮細胞のIRS-2が個体の糖代謝調節や動脈硬化症抑制に作用している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

こうした背景をふまえ、本研究では第一に(1)糖代謝におけるIRS-2の血管内皮細胞での役割を解明する。近年、血管内皮細胞のみならず、動脈硬化形成に重要な役割を果たしているマクロファージを含む骨髄由来細胞

にもIRS-2が発現していることが報告されている。そこで、本研究では第二に(2)動脈硬化症におけるIRS-2の血管内皮細胞や骨髄細胞・マクロファージでの役割について解明する。インスリン抵抗性は、生理的なインスリンシグナル伝達機構のいずれかの段階に障害が生じることによって発生すると考えられている。そのため、発生工学的手法を用いたインスリンシグナル分子の欠損マウスを用いた解析は、インスリン抵抗性が代謝症候群や動脈硬化を惹起するメカニズムを解明する上で極めて良い手段である(Nature 372:182-186,1994, Diabetes 49:1880-1889,2000, Circulation 107:3073-3080,2003)。これまでの研究はインスリン抵抗性の原因臓器として、肝臓や骨格筋、脂肪組織などいわゆる糖代謝に関連する臓器が中心であったが、本研究では血管内皮細胞のインスリン抵抗性に焦点を当てている点が特徴的である。血管内皮細胞を1つの臓器としてとらえ、これが全身の糖代謝においてどのような役割をはたしているのかについての報告はこれまでになく、極めて独創的である。我々はこれまでにIRS-1、IRS-2欠損マウスを作製し(Nature 372:182-186,1994, Diabetes 49:1880-1889,2000)、さらに最近、臓器特異的IRS-2欠損マウスの樹立に成功しており(J Clin Invest 114: 917-927, 2004)、また血管内皮細胞特異的IRS-2欠損マウスも図5で示すように既に作製済みである。上記3系統のマウスを全て有する研究室は我々を除いて米国グループ1つのみであり、またこれまでに血管内皮細胞特異的IRS-2欠損マウスの報告はなく、本研究の新規性は極めて高いものと思われる。これらのマウスを解析することにより、他臓器におけるIRS-2欠損の影響を受けずに血管内皮細胞やマクロファージ・骨髄由来細胞におけるIRS-2の生理機能

と病態生理学的意義および役割を明らかにすることができる。これまでの糖尿病治療薬のターゲットは糖の吸収に関与する腸管や糖代謝に関連する臓器が、動脈硬化症抑制薬のターゲットは主にリスクファクターのコントロールが中心であったが、本研究で血管内皮細胞の個体の糖代謝調節における役割や、血管内皮細胞やマクロファージ・骨髄由来細胞の動脈硬化抑制メカニズムを解明することにより、血管内皮細胞を標的としたこれまでにない新規のインスリン抵抗性改善薬や抗糖尿病薬、さらには抗動脈硬化薬の発見という画期的な意義が予想され、国内外の関連する研究の中で最も重要で最先端の研究であると考えられる。

3. 研究の方法

(1)糖代謝における IRS-2 の血管内皮細胞での役割を解明する。

これまでの IRS-2 欠損マウスは IRS-2 が個体のすべての臓器において欠損していたため、全身の影響を受けてしまい個々の臓器における IRS-2 の機能について十分な解析が不可能であった。この問題を解決するため、我々は最近、Cre-loxP システムを使い、臓器特異的欠損 IRS-2 マウスの作製に成功し報告した(J Clin Invest 114: 917 - 927,2004)。本研究ではこのときに作製した IRS-2flox/flox マウスと血管内皮細胞特異的にCreを発現している Tie-2Cre マウスを交配し、血管内皮細胞特異的 IRS-2 欠損マウスを樹立した。このマウスはメンデルの法則に従い生まれ、コントロールマウスと比較し体重や脂質代謝においてコントロールマウスと差を認めなかった。ところが興味深いことに、インスリン負荷試験、ブドウ糖負荷試験にてインスリン抵抗性と耐糖能異常が認められた。インスリン抵抗性の責任臓器を明らかにするた

めにグルコースクランプを施行したところ、肝臓の糖産生はコントロールマウスと有意な差を認めなかったが、骨格筋における糖取込みが低下しており、全身の糖利用低下は、骨格筋におけるインスリン抵抗性によるものであることが明らかとなった。実際、肝臓や骨格筋におけるインスリンシグナルについて Akt のリン酸化で評価したところ、肝臓ではコントロールと差は認められなかったが、骨格筋において有意に低下していた。この血管内皮細胞特異的 IRS-2 欠損マウスで認められた骨格筋のインスリン抵抗性のメカニズムとして、骨格筋自身による糖取込み低下、あるいはインスリンやブドウ糖の毛細血管から間質への移行の低下が考えられる。さらに、毛細血管から間質への移行の低下を引き起こすメカニズムとして、骨格筋における血流の低下、毛細血管の拡張能の低下、毛細血管の密度の低下などが考えられ、これらを詳細に検討することにより、個体の糖代謝調節における血管内皮細胞の IRS-2 の役割について解明していく。

(2)動脈硬化症における IRS-2 の血管内皮細胞や骨髄細胞・マクロファージでの役割について解明する。

全身の IRS-2 欠損マウスにおいて動脈硬化症(カフ傷害誘導性の内膜肥厚)の促進が認められた原因として3つの可能性が考えられた。1つはマクロファージを含む骨髄由来細胞に発現している IRS-2 が動脈硬化症抑制に作用している可能性、2つめは血管内皮細胞に発現している IRS-2 が動脈硬化症抑制に作用している可能性、3つめは IRS-2 欠損マウスが呈する代謝症候群、すなわち動脈硬化症のリスクファクターによる可能性である。1については骨髄移植モデルを用いて検討する。IRS-2 を欠損した骨髄を取り出し、これを放射線照射を行った野生型マウスに移植

し、その後カフ傷害モデル、ワイヤー傷害モデルによる内膜肥厚の程度を検討することで、マクロファージや骨髄細胞における IRS-2 の動脈硬化症における役割を検討する。2 については上記(1)で樹立した血管内皮細胞特異的 IRS-2 欠損マウスに対してカフ傷害モデル、ワイヤー傷害モデルによる内膜肥厚の程度を検討する。上述のようにこのマウスでは全身の IRS-2 欠損マウスで認められた肥満や脂質代謝異常、糖尿病などは認められないため、血管内皮細胞においてのみ IRS-2 の発現を欠損したときの表現型を解析することができ、動脈硬化症における IRS-2 の血管内皮細胞での役割をより正確に評価できると考えられる。

4 . 研究成果

血管内皮細胞特異的 IRS-2 マウスは、血管内皮細胞における Akt、eNOS のリン酸化が有意に低下していた。またこのマウスの骨格筋では間質へのインスリンの移行が低下し、骨格筋におけるインスリン依存性の糖取り込みが障害されていた。

次に、より一般的なインスリン抵抗性モデル動物で、同様なメカニズムが存在するかを検討するために、高脂肪食誘導性肥満モデル動物を用いた検討を行った。このマウスでは、インスリン刺激による Akt、eNOS の活性化が血管内皮細胞特異的 IRS-2 マウス同様約半分となっていた。このマウスは肝臓とともに骨格筋のインスリン抵抗性を呈し、骨格筋では間質へのインスリンの移行が低下し、骨格筋におけるインスリン依存性の糖取り込みが障害されていた。以上 2 つのインスリン抵抗性モデルの検討より、血管内皮細胞のインスリンシグナルが骨格筋のインスリン感受性調節に重要な役割をしていることが明らかとなった。

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 14 件)

1. Takamoto I, Terauchi Y, Kubota N, Ohsugi M, Ueki K, Kadowaki T. Crucial role of insulin receptor substrate-2 in compensatory beta-cell hyperplasia in response to high fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes Obes. Metab.* S4:147-156, 2008.
2. Fujisawa T, Endo H, Tomimoto A, Sugiyama M, Takahashi H, Saito S, Inamori M, Nakajima N, Watanabe M, Kubota N, Yamauchi T, Kadowaki T, Wada K, Nakagama H, Nakajima A. Adiponectin Suppresses Colorectal Carcinogenesis under the High-fat Diet Condition. *Gut* 57:1531-1538, 2008.
3. Hashimoto H, Eto T, Kamisako T, Hoya N, Hatakeyama T, Arai T, Yokosuka M, Ohnishi Y, Ito M, Hioki K, Suzuki R, Ohsugi M, Saito M, Ueyama Y, Yamauchi T, Kubota N, Tobe K, Kadowaki T, Tamaoki N, Nomura T, Kosaka K. An Efficient reproductive method for *Irs2*^{-/-} mice with C57BL/6JJcl genetic background. *Exp. Anim.* 57:407-411, 2008.
4. Arai T, Hashimoto H, Kawai K, Mori A, Ohnishi Y, Hioki K, Ito M, Saito M, Ueyama Y, Ohsugi M, Suzuki R, Kubota N, Yamauchi T, Tobe K, Kadowaki T, Kosaka K. Fulminant type 1 diabetes mellitus observed in insulin receptor substrate 2 deficient mice. *Clin. Exp. Med.* 8:93-99, 2008.
5. Kubota N, Kubota T, Itoh S, Kumagai H,

- Kozono H, Takamoto I, Mineyama T, Ogata H, Tokuyama K, Ohsugi M, Sasako T, Moroi M, Sugi K, Kakuta S, Iwakura Y, Noda T, Ohnishi S, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Kadowaki T. Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding. *Cell Metab.* 8:49-64, 2008.
6. Takasawa K, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T. Impact of Increased PPARgamma Activity in Adipocytes in vivo on Adiposity, Insulin Sensitivity and the Effects of Rosiglitazone Treatment. *Endocr. J.* 55:767-776, 2008.
7. Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Ohsugi M, Kubota T, Fujiu K, Maemura K, Kubota N, Kadowaki T, Nagai R. SUMOylation of Krüppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR-delta. *Nat. Med.* 14:656-666, 2008.
8. Yano W, Kubota N, Itoh S, Kubota T, Awazawa M, Moroi M, Sugi K, Takamoto I, Ogata H, Tokuyama K, Noda T, Terauchi Y, Ueki K, Kadowaki T. Molecular mechanism of moderate insulin resistance in adiponectin knockout mice. *Endocr. J.* 55:515-522, 2008.
9. Fujisawa T, Nakajima A, Fujisawa N, Takahashi H, Ikeda I, Tomimoto A, Yonemitsu K, Nakajima N, Kudo C, Wada K, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T, Nakagama H, Blumberg RS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) suppresses colonic epithelial cell turnover and colon carcinogenesis through inhibition of the beta-catenin/T cell factor (TCF) pathway. *J. Pharmacol. Sci.* 106:627-638, 2008.
10. Okamoto M, Ohara-Imaizumi M, Kubota N, Hashimoto S, Eto K, Kanno T, Kubota T, Wakui M, Nagai R, Noda M, Nagamatsu S, Kadowaki T. Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration. *Diabetologia* 51:827-835, 2008.
11. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N. The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. *FEBS Lett.* 582:74-80, 2008.
12. Kume S, Uzu T, Araki S, Sugimoto T, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sakaguchi M, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T, Haneda M, Kashiwagi A, Koya D. Role of altered renal lipid metabolism in the development of renal injury induced by a high-fat diet. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18: 2715-2723, 2007.
13. Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T. Adiponectin Stimulates AMP-Activated Protein Kinase in the Hypothalamus and Increases Food Intake. *Cell Metab.* 6: 55-68, 2007.
14. Ebinuma H, Miida T, Yamauchi T, Hada Y, Hara K, Kubota N, Kadowaki T. Improved ELISA for selective

measurement of adiponectin multimers and identification of adiponectin in human cerebrospinal fluid. *Clin. Chem.* 53: 1541-1544, 2007.

[学会発表](計 24件)

1. 窪田直人, 他: 血管内皮細胞のインスリンシグナル障害は骨格筋インスリン抵抗性を引き起こす
第129年会日本薬学会
2009年3月27日, 京都
2. 窪田直人, 他: インスリン感受性調節における血管内皮細胞インスリンシグナルの役割
第23回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
2009年2月14日, 岡山国際交流会館
3. 窪田哲也, 窪田直人, 他: 血管内皮細胞におけるインスリン受容体基質(IRS)2の役割の解明 血管内皮細胞特異的 IRS2 欠損マウスを用いて
第23回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
2009年2月14日, 岡山国際交流会館
4. 山口真一, 窪田直人, 他: 血管内皮機能低下は骨格筋のインスリン抵抗性を惹起する
第12回日本病態栄養学会年次学術集会
2009年1月10日, 京都
5. 窪田直人, 他: インスリン抵抗性とメタボリックシンドローム
第6回徳島大学疾患酵素研究センターシンポジウム
2008年12月5日, 徳島大学
6. Kubota T, Kubota N, et al., Insulin signaling in endothelial cells participates in the regulation of skeletal muscle insulin sensitivity

The 10th Symposium on Molecular Diabetology in Asia

2008年11月29日, 広州(中国)

7. 窪田直人, 他: アディポカイン異常とメタボリックシンドローム
第16回日本ステロイドホルモン学会学術集会
2008年11月22日, 福井
8. Kubota N, et al., Dynamic functional relay between insulin receptor substrate-1 and -2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding.
The 4th Scientific Meeting of Asia Pacific Diabetes and Obesity Study Group
2008年8月23日, 大阪
9. 窪田直人, 他: 肝臓の糖代謝における IRS-1、IRS-2 の役割の検討
第13回アディポサイエンス研究会
2008年8月22日, 大阪
10. Kubota N, et al., Dynamic functional relay between insulin receptor substrate-1 and -2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding.
The 1st Insulin Resistance in Metabolic Disease Forum
2008年7月26日, 東京
11. Kubota N, et al., Insulin signaling defect in endothelial cells causes skeletal muscle insulin resistance
第40回日本動脈硬化学会総会・学術集会
2008年7月10日, 茨城
12. 窪田直人, 他: 血管内皮細胞におけるインスリン受容体基質(IRS)2の役割の解明
第1回日本肥満症治療学会学術集会
2008年6月14日, 東京
13. Kubota T, Kubota N, et al., Insulin signaling in endothelial cells

- participates in the regulation of skeletal muscle insulin sensitivity
68th American Diabetes Association
 2008年6月6日,サンフランシスコ(米国)
14. Kubota N, et al., Dynamic functional relay between insulin receptor substrate-1 and -2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding
68th American Diabetes Association
 2008年6月6日,サンフランシスコ(米国)
15. 窪田哲也, 窪田直人, 他:インスリン抵抗性発症における血管と骨格筋のネットワーク機構の解明
第51回日本糖尿病学会年次学術集会
 2008年5月23日,東京
16. 窪田直人, 他:アディポネクチンの摂食・エネルギー調節における役割
第51回日本糖尿病学会年次学術集会
 2008年5月23日,東京
17. 高橋雄大, 窪田直人, 他:チアゾリジン誘導体の抗動脈硬化作用におけるアディポネクチンの役割の解明
第51回日本糖尿病学会年次学術集会
 2008年5月23日,東京
18. 伊藤晋介, 窪田直人, 他:アディポネクチン欠損マウスのインスリン抵抗性のメカニズムの解明
第51回日本糖尿病学会年次学術集会
 2008年5月23日,東京
19. 渡辺拓, 窪田直人, 他:抗肥満薬 Rimonabant における Adiponectin の役割
第51回日本糖尿病学会年次学術集会
 2008年5月23日,東京
20. 高本偉碩, 窪田直人, 他: IRS-2欠損膵細胞株の樹立
第51回日本糖尿病学会年次学術集会
 2008年5月23日,東京
21. 橋本信嗣, 窪田直人, 他:血管内皮細胞におけるインスリン受容体基質(IRS)-2のインスリン分泌における役割の解析
第51回日本糖尿病学会年次学術集会
 2008年5月23日,東京
22. 窪田直人 他:肝臓特異的 Irs2欠損マウスはインスリン抵抗性、耐糖能異常を呈する
第22回日本糖尿病・肥満動物学会
 2008年2月9日,東京
23. 窪田直人 他:発生工学の観点から血管内皮特異的 IRS2欠損マウスを用いた解析
第22回日本糖尿病合併症学会
 2007年10月26日,茨城
24. 窪田直人 他:アディポネクチンの中枢における役割の検討
第50回日本糖尿病学会年次学術
 2007年5月25日,仙台
- 〔図書〕(計 1件)
 窪田直人 他 秀潤社 **細胞工学** 2008年 p44-p48
- 〔産業財産権〕
 出願状況(計 0件)
 取得状況(計 0件)
- 〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

窪田 直人 (KUBOTA NAOTO)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号 : 50396719

(2)研究分担者

(3)連携研究者

門脇 孝 (KADOWAKI TAKASHI)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号 : 30185889

植木浩二郎 (UEKI KOJIRO)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号 : 40372370

山内敏正 (YAMAUCHI TOSHIMASA)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号 : 40372370