

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591062  
 研究課題名（和文） PI3Kp85 $\alpha$  抑制下でのインスリン作用におけるアディポネクチン、レプチンの関与  
 研究課題名（英文） Involvement of adiponectin and leptin in insulin action in PI3K p85 $\alpha$ -knockout mice  
 研究代表者  
 青木 一孝  
 横浜市立大学医学部・助教  
 研究者番号 60336542

## 研究成果の概要：

p85 $\alpha$  欠損マウスの肝臓でのインスリン作用と糖代謝を比較検討した。グルコースクランプ法では、野生型と比較し、p85 $\alpha$  欠損マウスの末梢組織でのインスリン感受性は亢進していたが、p85 $\alpha$  欠損マウスの肝糖放出は抑制されていなかった。野生型と比較し、p85 $\alpha$  欠損マウスの肝糖新生系酵素の遺伝子発現は上昇していた。また、肝臓での Akt 活性、PTEN 活性は対照の野生型マウスと同程度であった。これらの結果より、p85 $\alpha$  欠損マウスでは、末梢組織とは異なり、肝臓でのインスリン感受性は亢進しておらず、むしろ糖新生が亢進していると考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	2,200,000	660,000	2,860,000
平成20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、糖代謝、レプチン

## 1. 研究開始当初の背景

近年2型糖尿病患者数は、生活習慣の欧米化等により増加の一途であり、この対策をとることは急務である。2型糖尿病の原因は、インスリン分泌の障害とインスリン作用の障害などの遺伝因子と肥満、過食、運動不足が重なって発症する多因子遺伝病であると考えられている。遺伝子ターゲティングにより遺伝因子の明確なインスリン分泌不全やインスリン抵抗性の動物モデルを作成し、その成因や病態を個体レベルで明確にすることは、2型糖尿病の発症・進展の機序の解明

に非常に重要である。

インスリンのシグナル伝達の最初のステップとして重要と考えられたインスリン受容体基質-1 (insulin receptor substrate-1; IRS-1) を欠損したマウスはインスリン抵抗性が認められ、初めて IRS-1 が個体の代謝作用に重要な役割をもっていることが報告された。Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 キナーゼ) はその下流に存在する。p85 $\alpha$  PI3 キナーゼ遺伝子からは選択的スプラシングにより p85 $\alpha$ 、p50 $\alpha$ 、p55 $\alpha$  の3つの蛋白質が作られる。寺内らは、世界では

じめて調節サブユニットの中でもインスリン作用の主体を担う p85 $\alpha$  欠損マウスを作成し検索した。その結果、p50 $\alpha$  の代償によると考えられる末梢(筋肉と脂肪細胞)でのインスリン感受性の亢進が認められ、低血糖を起こすことを見出した(Terauchi Y et al. Nat Genet. 21(2):230-235, 1999)。また、最近に肝臓特異的に p85 $\alpha$  を欠損させたマウスでは肝臓と末梢のインスリン感受性が亢進しており、PI3 キナーゼの活性化だけではなく PTEN も制御することによりインスリン感受性を亢進させていることが示された(Taniguchi CM et. al Proc Natl Acad Sci U S A. 103(32):12093, 2006)。しかし、全身で p85 $\alpha$  を欠損させたマウスでの肝臓の糖代謝を検討した報告は無い。

## 2. 研究の目的

第1に PI3 キナーゼ p85 $\alpha$  欠損マウスの肝臓における糖代謝を検討する。第2に PI3Kp85 $\alpha$  抑制下でのインスリン作用におけるアディポネクチン、レプチンの関与を検討する。

## 3. 研究の方法

### PI3 キナーゼ p85 $\alpha$ 欠損マウスの肝臓における糖代謝の検討

#### (1). 糖代謝基質の肝細胞内濃度 :

Glucose-1-phosphate, Glucose-6-phosphate, Fructose-6-phosphate, F1,6-bisphosphate, Glyceraldehyde-3-phosphate, 2-phosphoglycerate, Phosphoenolpyruvate, Pyruvate, Glycogen を定量する。

#### (2). 糖新生系・解糖系酵素活性と遺伝子発現 : 糖新生系酵素の G6Pase,

fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), PEPCK と、解糖系酵素の glucokinase (GK), phosphofructokinase (PFK), pyruvate kinase (PK) の活性と遺伝子発現を測定する。酵素活性は吸光度計を用い、遺伝子発現はリアルタイム PCR 法にて測定する。

#### (3). グリコーゲン合成・分解酵素活性と遺伝子発現 : 上記予備的検討より、空腹時には低血糖予防のため糖新生が亢進し、グリコーゲン分解系酵素が上昇し血糖値を維持している可能性が予想されるため、グリコーゲン分解・合成酵素及びその遺伝子発現を検討する。

(4). 肝糖放出の評価 : グルコースクランプ法と初代培養細胞を用いた方法 : 顕微鏡下でマウスの頸静脈にカテーテルを挿入し、インスリンとブドウ糖を注入し高インスリン正常血糖グルコースクランプ法を行う。このとき、グルコースのほかに D-glucose 6-6d2 を混注することにより、末梢のインスリン抵抗性ととも肝臓の糖放出を評価する。また、マウスの肝臓を灌流後、初代培養細胞を作成し、1日後に細胞培養液上清へ基質の

fructose を添加し、30 分後の glucose の濃度を測定 (*in vitro* での測定) する。

(5). インスリンシグナル : PI3 キナーゼの下流の糖新生と関係がある Atypical PKC やグリコーゲン合成と関係がある Akt 活性を評価する。

### アディポネクチン、レプチンの影響がない状態での PI3 キナーゼ p85 $\alpha$ の生理的意義の検討

アディポネクチン欠損マウスはインスリン抵抗性を示すが、p85 $\alpha$  欠損マウスはインスリン感受性亢進、高アディポネクチン、高レプチン血症を呈する。そこで、p85 $\alpha$  欠損状態におけるアディポネクチン上昇の影響を検討するため、同マウスとアディポネクチン欠損マウスを交配させ、アディポネクチン p85 $\alpha$  ダブル欠損マウスを生産する。次に、p85 $\alpha$  欠損マウスと ob/+m を交配し、p85 $\alpha$  欠損 ob/ob マウスを作成する。そして、① p85 $\alpha$  欠損マウス、② アディポネクチン・p85 $\alpha$  ダブル欠損マウス、③ アディポネクチン欠損マウスの3群にて、以下の検討(6, 7)と上記の検討(1-5)を行う。また、同様に① p85 $\alpha$  欠損マウス、② p85 $\alpha$  欠損 ob/ob マウス、③ ob/ob マウスの3群にても、以下の検討(6, 7)と上記(1-5)を行う。

(6). 経時的な体重・空腹時血糖値・耐糖能・インスリン分泌能の評価 : このマウスはまだ世界で報告が無いため、いかなる耐糖能を示すか検討する。耐糖能に関しては、16時間絶食後に糖負荷試験を行い、血糖値とインスリン値を経時的に測定し評価する。インスリン分泌能については、臍島を単離の上、グルコース応答性インスリン分泌能を検討する。また、臍 $\beta$ 細胞量については経静脈的にホルモリン固定の上臍組織を取り出し、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、臍性ポリペプチドにて免疫染色し、臍 $\beta$ 細胞量、非臍 $\beta$ 細胞量、臍島最大径等で評価する。

(7). 末梢組織でのインスリン抵抗性の評価 : 高インスリン血症正常グルコースクランプ法にて評価する。さらに、ソマトスタチンにて内因性肝糖放出を抑制した状態で行う Steady state plasma glucose (SSPG) 法を用いて、筋肉・脂肪組織でのインスリン感受性を①~③の3群間で評価、比較する。

## 4. 研究成果

### PI3 キナーゼ p85 $\alpha$ 欠損マウスの肝臓における糖代謝の検討

p85 $\alpha$  PI3 キナーゼ欠損マウスはインスリン感受性亢進と末梢組織での糖取り込み亢進の結果、低血糖を呈した。今回、p85 $\alpha$  PI3 キナーゼ欠損マウスの糖恒常性における肝臓の役割を検討した。

正常血糖・高インスリングルコースクラン

ブ法によると、GIR (Glucose infusion rate) 及び筋肉における糖取り込みの指標である Rd は、野生型マウスに比較して p85 $\alpha$  PI3 キナーゼ欠損マウスで有意に増加していた。一方、肝糖放出(HGP)に関しては、有意差は無かったが、p85 $\alpha$  欠損マウスで増加傾向にあった。この結果に一致し、絶食下の p85 $\alpha$  欠損マウスの肝臓における G6Pase と PEPCK 遺伝子の発現は野生型に比し上昇していた。

p85 $\alpha$  欠損マウスでは、アラニンやピルビン酸などの糖新生基質は変化しておらず、血清グルカゴン濃度はおよそ2倍に増加していた。絶食下で、グルコース 6 リン酸はほぼ完全に枯渇し、フルクトース 6 リン酸も低下傾向にあった。このように、野生型マウスと比較して p85 $\alpha$  欠損マウスでは糖新生は抑制されておらず、糖恒常性維持のために、肝臓は末梢組織での糖取り込み亢進を部分的に代償していた。

p85 $\alpha$  欠損マウスの肝臓では p50 $\alpha$  が IRS-1/2 と結合することで、インスリンによる PI3 キナーゼ活性化において代償的な役割を果たしていた。インスリン刺激下の肝臓 Akt 活性、PTEN 活性は p85 $\alpha$  欠損マウスと野生型マウスの間で変化していなかった。p50 $\alpha$  は p85 $\alpha$  欠損マウス、野生型マウスとともに発現しているが、野生型マウスの骨格筋では p85 $\alpha$  発現レベルと比較すると p50 $\alpha$  の発現レベルはずっと低い。野生型マウスの肝臓での p50 $\alpha$  の発現レベルは骨格筋での発現レベルよりずっと高く、p85 $\alpha$  欠損マウスでは野生型マウスと比較してさらに増加することから、p85 $\alpha$  欠損マウスの肝臓での調節サブユニット：触媒サブユニットの分子比率は、骨格筋での分子比率と異なる。調節サブユニット：触媒サブユニットの分子比率が PI3 キナーゼ活性化に与える影響に関する過去の文献とあわせて考えると、p50 $\alpha$  は PI3 キナーゼ活性化に関して p85 $\alpha$  より強力なわけではなく、PI3 キナーゼを介した最適な情報伝達は PI3 キナーゼの調節サブユニット：触媒サブユニットの分子比率に依存しているように思われた。

以上の成果をまとめて、論文発表した。

#### アディポネクチン、レプチンの影響がない状態でのPI3キナーゼp85 $\alpha$ の生理的意義の検討

同じ遺伝的背景を持つ p85 $\alpha$  欠損マウス、アディポネクチン・p85 $\alpha$  ダブル欠損マウス、アディポネクチン欠損マウス、同じく同一の遺伝的背景を持つ p85 $\alpha$  欠損マウス、p85 $\alpha$  欠損 ob/ob マウス、ob/ob マウスを作製し、解析中である。

#### 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 2件)

Aoki, K., Matsui, J., Kubota, N., Nakajima, H., Iwamoto, K., Takamoto, I., Tsuji, Y., Ohno, A., Mori, S., Tokuyama, K., Murakami, K., Asano, T., Aizawa, S., Tobe, K., Kadowaki, T., and Terauchi, Y. : The role of the liver in glucose homeostasis in PI 3-kinase p85 $\alpha$ -deficient mice. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 296: E842-853, 2009, 査読あり.

Kubota, N., Kubota, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Takamoto, I., Mineyama, T., Ogata, H., Tokuyama, K., Ohsugi, M., Sasago, T., Moroi, M., Sugi, K., Kakuta, S., Iwakura, Y., Noda, T., Nagai, R., Tobe, K., Terauchi, Y., Ueki, K., and 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, 査読あり.

[学会発表] (計 3件)

青木一孝, 窪田哲也, 岩崎知之, 森秀一, 窪田直人, 高本偉碩, 徳山薫平, 寺内康夫 : PI3 キナーゼp85 $\alpha$  欠損マウスにおける肝臓でのインスリン作用と糖代謝の検討. 第 21 回日本肥満・糖尿病動物学会, 盛岡, 2007, 2.

青木一孝, 窪田哲也, 岩崎知之, 森秀一, 窪田直人, 高本偉碩, 徳山薫平, 寺内康夫 : PI3 キナーゼp85 $\alpha$  欠損マウスにおける肝臓でのインスリン作用と糖代謝の検討. 第 80 回日本内分泌学会学術総会, 東京, 2007, 6.

Terauchi Y., Aoki K., Kubota N, Takamoto I, Kadowaki T: The role of liver in glucose homeostasis in PI 3-kinase p85 $\alpha$ -deficient mice. 68<sup>th</sup> American Diabetes Association, San Francisco, 2008, 6.

[図書] (計 1件)

青木一孝, 窪田哲也, 森秀一, 窪田直人, 高本偉碩, 徳山薫平, 門脇孝, 寺内康夫 : PI3 キナーゼp85 $\alpha$  欠損マウスにおける肝臓でのインスリン作用と糖代謝の検討. Diabetes Frontier, 18 (4) : 424-425, 2007.

[その他]

ホームページ

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~nai3naib/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 一孝 (AOKI KAZUTAKA)

横浜市立大学医学部・助教

研究者番号 : 60336542

(2)研究分担者

寺内 康夫 (TERAUCHI YASUO)

横浜市立大学医学部・教授

研究者番号：40359609

(3)連携研究者

なし