

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008 年度
 課題番号：19890018
 研究課題名（和文） 2 型糖尿病の病態形成における膵β細胞ストレス応答異常とインスリン抵抗性の連関
 研究課題名（英文） stress signaling dysfunction of pancreatic beta-cells caused by insulin resistance in Type 2 diabetes
 研究代表者
 山口 賢 (YAMAGUCHI SUGURU)
 東北大学・国際高等研究教育機構・助教
 研究者番号：70451614

研究成果の概要：

2008 年 3 月号の Cell Metabolism 誌において、蛋白の翻訳抑制を担う Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) が、小胞体ストレスによる膵β細胞の細胞死から細胞を保護することを報告した。また、ある蛋白が小胞体ストレスによって誘導されることを発見した。さらなる解析により、この蛋白が分泌蛋白であり、血液中に存在していることをあきらかにした。この蛋白は、小胞体ストレスのマーカーとなる可能性があり、解析を行っている。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,320,000 | 0 | 1,320,000 |
| 2008年度 | 1,350,000 | 405,000 | 1,755,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,670,000 | 405,000 | 3,075,000 |

研究分野：糖尿病

科研費の分科・細目：医歯薬学・内分泌学

キーワード：小胞体ストレス、翻訳抑制機構、糖尿病、分子生物学、膵β細胞

1. 研究開始当初の背景

従来、糖尿病の90%以上を占める2型糖尿病でのインスリン分泌の低下は、分泌機能不全によるものと考えられてきたが、最近になり2型糖尿病患者において膵β細胞の量が減少していることが明らかとなった。膵β細胞量の低下の一因として、小胞体ストレスによる細胞死アポトーシスが注目されている。細胞は蛋白質を産生するが、異常な立体構造をとる不良品は小胞体と名づけられた細胞内の場所に蓄積され、この状態を小胞体スト

レスと呼ぶ。これに対し細胞は小胞体ストレス応答とよばれる適応反応により対処するが、適切に制御できなくなると、細胞死に至ってしまう。膵β細胞は、インスリンを持続的かつ大量に分泌する必要がある、通常状態から小胞体に対する負荷が大きい臓器である。メタボリックシンドロームに代表される肥満によるインスリン抵抗性や過食などによるインスリン需要の増大は、膵β細胞に容易に過度な小胞体ストレスを惹起させることが予想される。

細胞は小胞体ストレスが加わると、小胞体ストレス応答と一連の反応によって恒常性を保とうとするが、この反応によって恒常性が得られない場合、細胞死・アポトーシスを起こす。小胞体ストレスに対する最初の応答は蛋白の翻訳抑制である。蛋白の合成を抑制することで小胞体に流入する蛋白量を減少させることで、小胞体における負荷を軽減させる。

小胞体ストレスは、糖尿病以外にも様々な疾患との関連が指摘されており、分子生物学的解析が進められている。しかしながら、詳細なメカニズムについては不明な点も多く、小胞体ストレスを直接のターゲットとした治療は存在しない。また、現時点で、小胞体ストレスのマーカーとなる血清マーカーは存在しないため、生体内で膵β細胞にどの程度の負荷がかかっているのか、判断することはできない。

2. 研究の目的

本研究は、小胞体ストレスが膵β細胞に及ぼす影響について検討を行い、分子メカニズムを明らかにすることが目的である。小胞体ストレスを主に翻訳制御機構の視点から把握し、過栄養がもたらす膵β細胞への影響についてマウスを用いて解析する。我々がこれまで研究を行ってきた WFS1 蛋白や蛋白の翻訳抑制因子である 4E-BP1 の機能解析を軸とし、小胞体ストレスによる翻訳制御機構を解析する。

膵臓にどのくらいのβ細胞が残存しているか、あるいは、膵β細胞にどの程度の負荷が加わっているかを判別する血清マーカーはない。このような血清マーカーがあれば、個々の患者の病態把握、治療の効果など幅広く応用されるはずである。レーザーイオン化飛行時間質量分析法 (SELDI-TOF-MS 法) という工学的手法やその他分子生物学的な手法を用いて、このようなマーカーの検索を行う。

3. 研究の方法

4E-BP1 欠損 MIN6 細胞を作製し、小胞体ストレスに対する脆弱性を評価した。また、4E-BP1 欠損 MIN6 細胞の蛋白翻訳量を測定し、野生型と比較した。

さらに生体内での 4E-BP1 の作用を明らかにするため、膵β細胞に小胞体ストレスをきたす糖尿病モデルマウスと 4E-BP1 欠損マウスを交配させた。これらのマウスの血糖、膵臓のインスリン含有量、膵島での翻訳量を比較した。

膵β細胞に小胞体ストレスをきたす糖尿病モデルマウスと正常のマウス血清を、レーザーイオン化飛行時間質量分析法

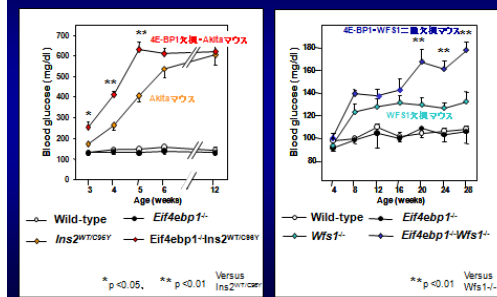
(SELDI-TOF-MS 法) という工学的手法やその他分子生物学的な手法を用いて、解析を行った。

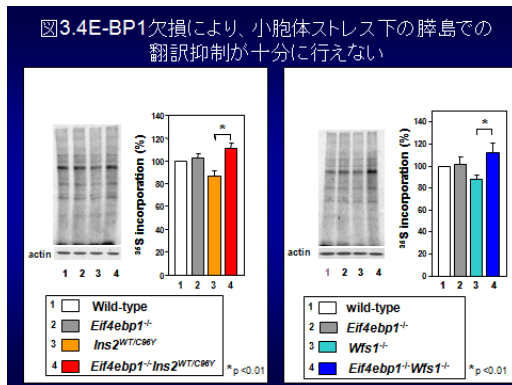
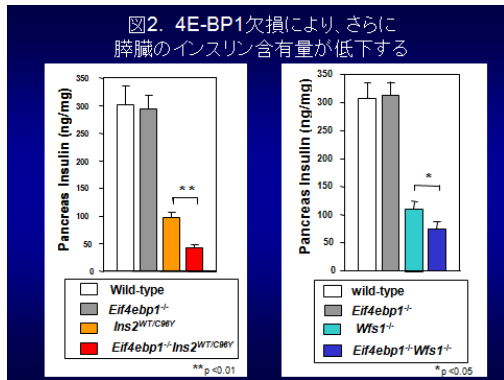
4. 研究成果

2008 年 3 月号の Cell Metabolism 誌において、蛋白の翻訳抑制を担う Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) が、小胞体ストレスによる膵β細胞の細胞死から細胞を保護することを報告した。

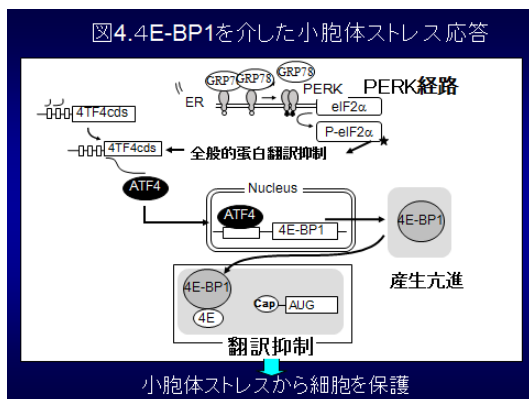
4E-BP1 蛋白は、mRNA から蛋白への翻訳を制御している蛋白翻訳抑制因子である。我々は、まずマウスの膵島やマウスの膵β細胞株である MIN6 細胞において、小胞体ストレス刺激により、4E-BP1 蛋白が増加することを発見した。次に、4E-BP1 が、転写因子である ATF4 によって誘導されることを明らかにし、4E-BP1 遺伝子上の ATF4 の結合部位を同定した。小胞体下での 4E-BP1 の機能解析を調べるため、4E-BP1 欠損 MIN6 細胞を作製し、野生型細胞との比較実験を行った。その結果、4E-BP1 欠損 MIN6 細胞は、翻訳抑制機構の破綻が原因で小胞体ストレスに脆弱であり、アポトーシスが亢進することが分かった。さらに生体内での 4E-BP1 の作用を明らかにするため、膵β細胞に小胞体ストレスをきたす糖尿病モデルマウスと 4E-BP1 欠損マウスを交配させた。4E-BP1 を欠損させることで、さらに血糖の悪化を認めた (図 1)。それらのマウスの膵臓でのインスリン含有量は、減少を示し、膵β細胞の障害がさらに亢進していた (図 2)。作製されたマウスでは、翻訳抑制機構が破綻していた (図 3)。小胞体ストレス下での翻訳抑制を担う 4E-BP1 が欠損したため、小胞体ストレスによる細胞障害が進行したと考えられた。

図1. 4E-BP1欠損により、AkitaマウスやWFS1欠損マウスはさらに高血糖を示す





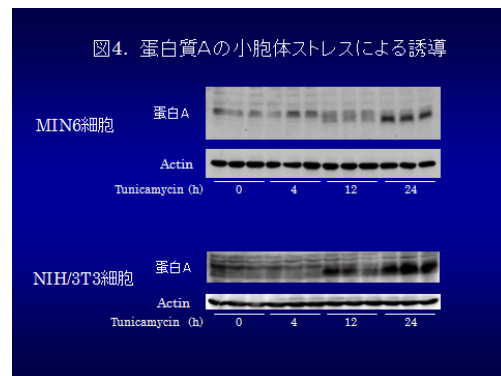
膵β細胞では、4E-BP1が、小胞体ストレス下の蛋白翻訳抑制に重要な役割を担っていることが明らかとなった。4E-BP1欠損 Akita マウスや 4E-BP1・WFS1 二重欠損マウスでさらなる高血糖を認めたことから、この機構により、4E-BP1は、小胞体ストレスによる細胞死から細胞を保護していると考えられる。小胞体ストレスが加わると、まず eIF2α のリン酸化による全般的蛋白翻訳抑制が起こる。つまり、新たに作られる蛋白量を抑制させ、小胞体に流入する蛋白を減少させることで、負荷を軽減させるのである。しかし、この翻訳抑制はフィードバック機構により一過性であり、4E-BP1は eIF2α リン酸化による翻訳抑制が効かなくなった後の翻訳抑制の役割を担っていると考えられた (図4)。



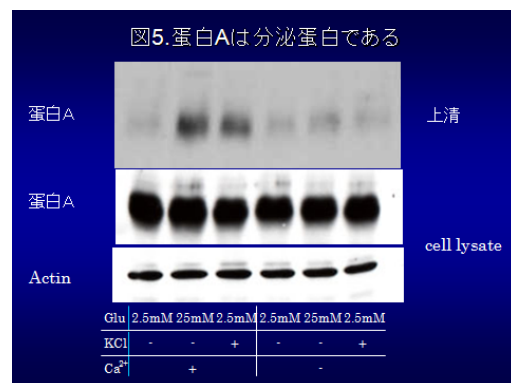
現在、小胞体ストレスをターゲットとした膵β細胞を保護する治療は確立しておらず、我々の研究は新たな治療、創薬へと発展する可能性がある。今後、小胞体ストレス下の 4E-BP1 の機能解析をさらに進める計画である。

今年度、ある蛋白 (本報告書では蛋白 A とする) が小胞体ストレスによって誘導されることを発見した。この蛋白については、これまで報告がほとんどなく、生体でどのような機能を有しているのかは明らかにされておらず、小胞体ストレスの関連も報告されていない。

膵β細胞株である MIN6 細胞や胎児繊維芽細胞である NIH3T3 細胞に tunicamycin という薬剤で小胞体ストレスを負荷させると、蛋白 A の蛋白量は増加した (図4)。



MIN6 細胞に蛋白 A を過剰発現させ、高濃度グルコースや KCL にて、インスリンを分泌させると、上清に蛋白 A を認めた。しかし、カルシウム非存在下でインスリン分泌を止めると、同様の刺激では、上清には蛋白 A の発現を認めなかった (図5)。この実験により、この蛋白が膵β細胞ではインスリンとともに分泌されている可能性が示唆された。さらに我々は、その後の実験により、蛋白 A が血液にも存在していることを明らかにしてい



る。

これらの実験により、蛋白 A が小胞体ストレス応答蛋白であり、さらに分泌蛋白であることが明らかとなった。蛋白 A が、小胞体スト

レスのマーカーとなる可能性が示唆された。過去の報告において、小胞体ストレス応答で、分泌蛋白である報告はない。今後、膵β細胞における小胞体ストレスをきたす糖尿病モデルマウスの血液での蛋白量の評価や機能解析を行い、この蛋白の小胞体ストレスマーカーとしての有用性について解明を行う。

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 1件)

①Suguru Yamaguchi, Hisamitsu Ishihara, Nahum Sonenberg and Yoshitomo Oka, "The Translational Repressor 4E-BP1 is Induced by ATF4 and Plays a Role in Maintaining Pancreatic β Cell Homeostasis under Endoplasmic Reticulum Stress", Cell Metabolism、査読有り、7(3)、2008、269-276

〔学会発表〕(計 3件)

- ①山口 賢、「膵β細胞ストレス応答における翻訳制御の役割」、第20回分子糖尿病学シンポジウム、2008年12月13日、東京カンファレンスセンター品川
- ②山口 賢、「翻訳抑制因子 4E-BP1 は、慢性的な小胞体ストレス下の膵β細胞において、翻訳抑制を介して細胞を保護する」、第51回日本糖尿病学会年次学術集会、2008年5月22日-24日、東京国際フォーラム
- ③山口 賢、「翻訳抑制因子 4E-BP1 の欠損は、小胞体ストレスによる細胞障害を悪化させる」、第50回日本糖尿病学会年次学術集会、平成19年5月25日、仙台サンプラザ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 賢(YAMAGUCHI SUGURU)
東北大学・国際高等研究教育機構・助教
研究者番号:70451614

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者