

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390259

研究課題名 (和文)

分子シャペロンを標的とした細胞内ストレス制御による新規糖尿病治療法の開発

研究課題名 (英文)

Development of novel treatment for type 2 diabetes by regulating cellular stresses targeted to molecular chaperone.

研究代表者

荒木 栄一 (ARAKI EIICHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：10253733

研究成果の概要 (和文)：

分子シャペロンである Hsp72 や BiP の発現誘導は、糖代謝改善に寄与しうる。種々の原因による糖尿病に有効であることから、環境因子・遺伝因子・小胞体ストレスなど多様な要素に起因する糖尿病への治療効果が期待できる。本研究では両者の過剰発現により、糖尿病モデル動物の糖代謝異常を著明に改善できた。これら分子シャペロンの制御が、細胞内ストレスを軽減し、慢性炎症を抑制することでインスリン抵抗性を低減せしめることを証明できた。

研究成果の概要 (英文)：

Induction of molecular chaperones, such as Hsp72 or BiP contributes to improve glucose homeostasis in diabetes. Especially, these inductions can be expected to treat several types of diabetes, because these inductions were effective to diabetes originated from environmental, genetic or ER stress, respectively. We therefore conclude that induction of molecular chaperone, such as Hsp72 or BiP, decreases cellular stresses and chronic inflammation, resulting in improvement of insulin resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2009 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：代謝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病、分子シャペロン、Hsp72、小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者数は増加の一途を辿り、大血管・細小血管合併症の更なる増加が危惧されている。糖尿病の発症にはインスリン抵抗性と膵β細胞のインスリン分泌不全の両者が関与する。申請者らは、2型糖尿病発症・進展

の分子機序として、世界に先駆けて小胞体 (ER:endoplasmic reticulum) ストレスやミトコンドリア由来酸化ストレス (mtROS) の関与を提唱 (P.N.A.S. 2001, J.C.I. 2002, B.B.R.C. 2003, Diabetes. 2006) し、さらに

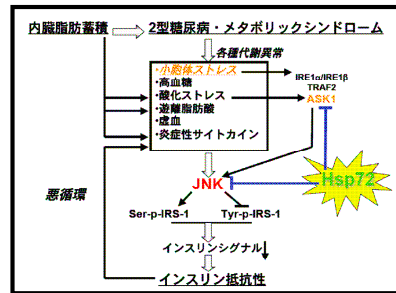
最近、温熱と微弱電流による Hsp72 (Heat shock protein 72) の誘導が内臓脂肪蓄積やインスリン抵抗性、高血糖を改善しうることを見いだした (論文投稿中)。

具体的には、1) 新たな膵β細胞障害機序として、小胞体における異常蛋白の蓄積により誘導される ER ストレスを介したアポトーシスの関与 (P. N. A. S. 2001, J. C. I. 2002, Exp. Biol. Med. 2003)、2) インスリン分泌とインスリン抵抗性への高血糖による mtROS の関与 (B. B. R. C. 2003, Diabetes. 2006)、3) 温熱と微弱電流同時印加による Hsp72 の誘導の個体レベルでのインスリン抵抗性改善効果 (第 64 回アメリカ糖尿病学会口頭発表、論文投稿中)、等を報告してきた。これらの結果は、様々な細胞内ストレスの増加が糖尿病発症に深く関わっていることを示すものであり、細胞内ストレスの制御が糖尿病発症予防や早期治療のための重要なターゲットであることを意味する。

細胞内ストレスが増加したときには、そのストレスを軽減しようとする分子、いわゆる分子シャペロンが誘導され、様々な機序を介して生体防御を担っている。これらの分子シャペロンの中で、申請者らが本研究で重点的に解析するのは Hsp72 と Bip である。

Hsp72 は、温熱刺激などの様々な細胞内ストレスにより誘導される分子シャペロンである。Hsp72 は種々の細胞内ストレスにより活性化される JNK (c-jun N-terminal kinase) や ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) に結合し、活性化を抑制する (EMBO J. 2001, Mol Cell Biol. 2002.)。さらに、Hsp72 はアポトーシス抑制作用、抗酸化ストレス作用、抗虚血作用および抗炎症作用があることも報告されている (Ann NY Acad Sci. 2005)。JNK や ASK1 の活性化はインスリン抵抗性を惹起することから、これらの活性化抑

制は糖代謝改善をもたらすと考えられる。

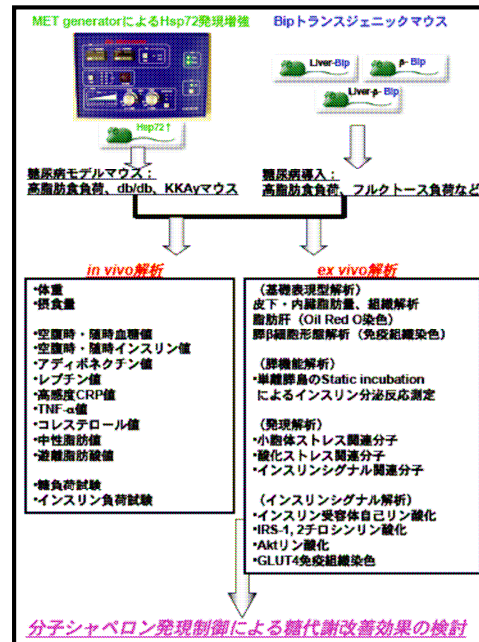


一方、Bip は ER ストレスセンサーの一つで、ER 膜内腔に存在し異常に folding された蛋白を認識して結合し ER ストレス経路の活性化を促す (図 1)。また正常の蛋白成熟・修飾にも関与しているため Bip の過剰発現は ER ストレスの低減をもたらし、細胞障害を軽減すると予想される。

2. 研究の目的

この二つの分子シャペロン、Hsp72 と BiP の発現制御により糖代謝改善が可能であるか、またその分子機序はいかなるものであるかを、細胞レベルから個体レベルにおいて解析することが本研究の目的である

3. 研究の方法



(1) Hsp72発現増強による効果の解析

①申請者らが開発したMETを用いて、膵β細胞由来の細胞、および肝由来の細胞にHsp72を誘導、インスリン分泌能やインスリン作用

に及ぼす効果を解析する。

- ② METを用いて、肥満インスリン抵抗性マウスにHsp72を誘導、膵臓や肝臓における細胞内ストレス反応へ及ぼす影響を解析するとともに、個体における糖代謝能への効果を解析する。

(2) Bip発現増強による効果の解析

- ① Bip発現ベクターを作製し、Bipを組織特異的に発現しうるマウス(BipTgマウス)を作製する。
- ② Bipを膵β細胞・肝由来の細胞に発現させ、小胞体ストレス応答系に及ぼす効果を解析する。
- ③ BipTgマウスと、Cre recombinaseを肝臓特異的、膵臓特異的に過剰発現するマウスを交配し、膵β細胞の機能や肝臓のインスリン作用に及ぼす効果、個体における糖代謝能について解析を行う。

(3) (1)(2) の実験系において、網羅的に遺伝子発現パターンを解析し、細胞内ストレス応答系に反応して膵β細胞機能改善やインスリン抵抗性改善に寄与する標的分子を同定する。これらの解析によって、分子シャペロンの発現制御が糖尿病治療戦略となりうるかを明らかにする。

4. 研究成果

肥満インスリン抵抗性モデル動物に対するMETの施行とその解析

高脂肪食負荷マウス、db/dbマウス、KKAyマウス、にMETを週2回施行(12V、0.1msec peak duration, 55pulses per second, 42°C、10分間)し、10週間行った。これにより特に肝臓でHeat shock protein 72 (Hsp72)発現が増加した。

- (1) 体重・摂食量の経時変化を測定、さらに空腹時血糖値・空腹時インスリン値・随時血糖値も測定し、体重・摂食量

は不変だが、糖代謝は改善した。

- (2) 10週間のMETの後、糖負荷試験・インスリン負荷試験を行ない耐糖能・インスリン抵抗性の改善を確認した。
- (3) adiponectin 値が上昇し、leptin 値をは低下した。また血清中の炎症性サイトカイン値の低下も認めた。
- (4) 下大静脈よりインスリンを投与し、各臓器を摘出・重量測定を行い、肝臓重量の低下を観察した。
- (5) 肝臓においてOil Red O染色を行ない脂肪肝の程度を評価したところ、明らかな脂肪沈着の減少を認めた。
- (6) 肝臓・筋肉・各脂肪組織においてインスリンシグナル分子の活性化を確認した。
- (7) 各臓器においてJNKのリン酸化およびASK1の活性化が低下した。
- (8) 筋肉においてインスリン刺激によるGLUT4の膜移行を免疫組織染色にて検討したところ、GLUT4膜移行の増強を認めた。

上記のどの糖尿病動物に対してもほぼ同等の結果が得られており、環境因子・遺伝因子・小胞体ストレスなど多様な要素に起因する糖尿病への治療効果が期待できると考えられた。

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7件)

1. Glucose uptake in rat skeletal muscle L6 cells is increased by low-intensity electrical current through the activation of the phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI-3K) / Akt pathway. Yano S, Morino-Koga S, Kondo T, Suico MA, Koga T, Shimauchi Y, Matsuyama S, Shuto T,

- Sato T, Araki E, Kai H. *J Pharmacol Sci.* 2011;115(1):94-8. 査読あり
2. Caloric restriction decreases ER stress in liver and adipose tissue in ob/ob mice.
Tsutsumi A, Motoshima H, Kondo T, Kawasaki S, Matsumura T, Hanatani S, Igata M, Ishii N, Kinoshita H, Kawashima J, Taketa K, Furukawa N, Tsuruzoe K, Nishikawa T, Araki E. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jan 7;404(1):339-44. 査読あり
 3. Kondo T, Sasaki K, Adachi H, Nakayama Y, Hatemura M, Matsuyama R, Tsuruzoe K, Furukawa N, Motoshima H, Morino(Koga) S, Yamashita Y, Miyamura N, Kai H, Araki E: Heat shock treatment with mild electrical stimulation safely reduced inflammatory markers in healthy male subjects. *Obesity Research and Clinical Practice* 4: e101-e109, 2010 査読あり
 4. Adachi H, Kondo T, Ogawa R, Sasaki K, Morino-Koga S, Sakakida M, Kawashima J, Motoshima H, Furukawa N, Tsuruzoe K, Miyamura N, Kai H, Araki E: An Acyclic Polyisoprenoid Derivative, Geranylgeranylacetone Protects Against Visceral Adiposity and Insulin Resistance in High Fat Fed Mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 29(5): E764-71. 2010. 査読あり
 5. Kai H, Suico MA, Morino S, Kondo T, Oba M, Noguchi M, Shuto T, Araki E: A novel combination of mild electrical stimulation and hyperthermia: general concepts and applications. *Int J Hyperthermia* 25: 655-660, 2009 査読あり
 6. Morino S, Suico MA, Kondo T, Sekimoto E, Yano S, Matsuda T, Matsuno T, Shuto T, Araki E, Kai H: Mild electrical stimulation increases ubiquitinated proteins and Hsp72 in A549 cells via attenuation of proteasomal degradation. *J Pharmacol Sci* 108: 222-226, 2008 査読あり
 7. Morino S, Kondo T, Sasaki K, Adachi H, Suico MA, Sekimoto E, Matsuda T, Shuto T, Araki E, Kai H: Mild electrical stimulation with heat shock ameliorates insulin resistance via enhanced insulin signaling. *PLoS ONE* 3: 1-11, 2008 査読あり
- [学会発表] (計 10 件)
- 1) Tatsuya Kondo, Eiichi Araki et al.
Activation of Heat Shock Response Reduces Visceral Adiposity and Improves Metabolic Profiles in Male Subjects with Metabolic Syndrome
3rd Insulin Resistance in Metabolic Disease Forum、2010 年 11 月 21 日、ホテル日航福岡
2) 近藤龍也、荒木栄一ほか
熱ショック応答経路(HSR)活性化によるメタボリックシンドローム治療成績
第 48 回 日本糖尿病学会九州地方会、2010 年 10 月 29 日、別府ビーコンプラザ
3) 近藤龍也、荒木栄一ほか
熱ショック応答経路(HSR)活性化による生活習慣病治療
第 60 回日本体質医学会総会、2010 年 10 月 16 日、熊本パレア
4) Tatsuya Kondo, Eiichi Araki et al.
Induction of HSP72, a Potential Novel Therapeutic Approach For Metabolic

Syndrome and Type 2 Diabetes

3rd Baker IDI diabetes summit, 2010 年 10 月 7 日、メルボルン、オーストラリア

5) 近藤龍也、荒木栄一ほか

メタボリックシンドロームに対する熱ショック応答経路 (HSR) 活性化療法の臨床応用
第 31 回 日本肥満学会、2010 年 10 月 1 日、前橋テルサ

6) Tatsuya Kondo, Eiichi Araki et al.

Induction of HSP72, a Potential Novel Therapeutic Approach For Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes

46th EASD Annual Meeting, 2010 年 9 月 20 日、ストックホルム、スウェーデン

7) 近藤龍也、荒木栄一ほか

メタボリックシンドロームに対する熱ショック応答経路 (HSR) 活性化の臨床的有用性
第 18 回西日本肥満研究会、2010 年 7 月 10 日、九州大学医学部百年講堂

8) Tatsuya Kondo, Eiichi Araki et al.

Heat Treatment with Mild Electrical Stimulation Reduces Visceral Adiposity and Improves Insulin Resistance and Inflammatory Markers in Male Subjects with Metabolic Syndrome

70th American Diabetes Association Scientific Sessions, 2010 年 6 月 25 日、オランダ、米国

9) 近藤龍也、荒木栄一ほか

メタボリックシンドロームに対する温熱・電流同時印加療法 (MET) の内臓脂肪減少・代謝改善・慢性炎症マーカー低下効果

第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、2010 年 5 月 23 日、岡山コンベンションセンター

10) 近藤龍也、荒木栄一ほか

糖代謝改善をもたらす分子シャペロン Hsp72 制御療法の臨床応用を目指して、第 107 回日本内科学会総会・講演会 2010 年 4 月 9 日、

東京国際フォーラム

〔図書〕 (計 1 件)

近藤龍也、古賀沙緒里、甲斐広文、荒木栄一
Diabetes Frontier, 細胞レベルにおけるストレス反応と糖尿病 (メディカルレビュー社)、2010 年、447~450 ページ

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/met/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 栄一 (ARAKI EIICHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：10253733

(2) 研究分担者

近藤 龍也 (KONDO TATSUYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：70398204