

令和 4 年 4 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17540

研究課題名(和文)プロテアーゼインヒビターによるインスリン分泌制御とインスリン抵抗性形成機構の解明

研究課題名(英文) Exploring roles of a hepatic protease inhibitor on insulin secretion and insulin resistance

研究代表者

折目 和基 (Orime, Kazuki)

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・助教

研究者番号：60759231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病を発症する重要な因子として、インスリン分泌の低下やインスリン抵抗性が挙げられる。我々はこれまでにインスリン抵抗性状態下での代償性膵細胞増殖に寄与する肝細胞由来の液性因子としてSerp1nB1を報告している。本研究では、肝細胞におけるSerp1nB1の発現調節メカニズムと機能について検討した。まず、肝臓でのSerp1nB1の発現は、サイトカインであるインターロイキン-6(IL-6)が、JAK/STAT3経路を介して制御していることを明らかにした。また、肝細胞内でのSerp1nB1はインスリンシグナルの伝達に重要であるインスリン受容体の発現制御に関与していることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病の発症には多くの成因が関与している。特にインスリンの分泌低下やインスリン抵抗性の形成が主要な要因として考えられており、これらの分子機構を明らかにすることは新規糖尿病治療法の開発につながる。これまでに、インスリンを分泌する膵細胞の増殖を促進する分子としてSerp1nB1を報告している。本研究では、Serp1nB1の発現機構や機能について解析を行っており、これらを明らかにすることで、膵細胞量の増加によるインスリン分泌促進という新規の糖尿病治療の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Insulin resistance and decreased insulin secretion are major causes of developing diabetes. We previously reported SerpinB1 as a hepatocytes-derived circulating factor that contributes to adaptive cell expansion under hepatic insulin resistant state. Here, we investigated a regulatory mechanism and novel roles of SerpinB1 in hepatocytes. In this study, we showed hepatic SerpinB1 expression level was regulated by an inflammatory cytokine, Interleukin-6 (IL-6). Then, we showed SerpinB1 regulated the expression level of insulin receptor, which plays an important role in insulin signaling.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 インスリン抵抗性 肝臓

1. 研究開始当初の背景

世界的に2型糖尿病の患者数は過去20年間で2倍以上に増加している。新規糖尿病治療薬の開発により糖尿病治療は目覚ましい進歩を遂げているが、2型糖尿病の患者数は依然として増加の一途をたどっている。

2型糖尿病は、インスリン抵抗性とインスリン分泌障害により引き起こされる慢性高血糖を主徴とする代謝疾患であり、インスリン抵抗性は、高血糖、脂肪毒性、炎症、小胞体ストレス、およびミトコンドリア機能障害の結果として発症すると考えられている。慢性のインスリン抵抗性は膵臓の細胞機能の低下を引き起こし、細胞量の減少、インスリン分泌の低下を招く。これまでに膵細胞量の低下を克服するために、膵細胞の増殖因子に関して盛んに研究が行われており、いくつかの増殖因子が報告されている。その中で我々は肝臓由来の SerpinB1 が膵細胞の増殖を促進したことを報告しているが(1)、肝臓での SerpinB1 の機能や発現制御に関してはこれまでに明らかにされていない。

2. 研究の目的

インスリン抵抗性下で誘導される膵細胞の増殖機構の解明のために、膵細胞増殖因子とされる SerpinB1 の肝臓での発現制御機構や機能について解明する。

3. 研究の方法

これまでに高度のインスリン抵抗性を示す肝臓特異的インスリン受容体ノックアウトマウスの肝臓において SerpinB1 の発現上昇を認めていたが、その他のインスリン抵抗性モデルでの SerpinB1 の発現は検討されていないことから、過食により高度のインスリン抵抗性を呈する db/db や ob/ob マウスなどの肝臓についても SerpinB1 の発現を評価した。

次に SerpinB1 の発現上昇を認めるモデルの肝細胞や血清を用いて、インスリン抵抗性に関連するサイトカイン、栄養素、ホルモンなどの発現変化を検討した。これらの中から候補となる物質を絞り込み、この候補となる物質をヒト肝細胞株や初代ヒト肝細胞に添加し SerpinB1 の発現を検討した。次にルシフェラーゼアッセイにより SerpinB1 の発現誘導を確認し、クロマチン免疫沈降により SerpinB1 のプロモーター領域への転写因子の結合についても検討した。

次に SerpinB1 の肝臓内での機能についても検討した。ヒト肝細胞株である HepG2 や初代ヒト肝細胞で siRNA を用いて SerpinB1 をノックダウンさせたのち、これらの細胞を用いて RNA-seq や Proteomics を行い、SerpinB1 の発現低下に伴い変化する Pathway に関して解析した。この中からインスリンシグナルやインスリン抵抗性に関わる経路を分析し、その経路に関わる分子の発現に関して検討した。

4. 研究成果

高度のインスリン抵抗性を示すモデルとして、これまでに報告されていた肝臓特異的インスリン受容体ノックアウトマウス以外に過食による肥満、インスリン抵抗性、代償性の膵細胞増殖を呈する db/db マウス、ob/ob マウスを用いて検討を行った。これらのマウスの肝臓では SerpinB1 遺伝子およびタンパク質の発現が WT マウスと比較して有意に上昇していた。db/db または ob/ob マウスとは対照的に、軽度のインスリン抵抗性と肥満を示す食餌誘発性肥満マウス(DIO)では、肝臓での SerpinB1 の有意な発現上昇は観察されなかった。

肝臓での SerpinB1 の発現誘導は、db/db および ob/ob マウスでも観察されたことから、これらのマウスに共通する特徴である高度のインスリン抵抗性が肝臓の SerpinB1 の発現誘導に重要な役割を果たすと考えた。SerpinB1 の発現誘導物質を特定するために、HepG2 細胞で、インスリン抵抗性に関連するサイトカイン、エンドトキシン、ホルモン、代謝物などの多くの物質をスクリーニングした。多くの物質の中から、肝細胞における SerpinB1 発現の制御因子としてインターロイキン-6(IL-6)を同定した。ヒト肝細胞株である HepG2 細胞では、IL-6 は時間および用量依存的に SERPINB1 遺伝子発現を有意に上昇させ、そのタンパク質発現は遺伝子発現と同様であった。IL-6 は、肝臓の炎症とインスリン抵抗性に関係していると報告されている他の Serpin ファミリーである SerpinA1 の遺伝子発現には影響を与えなかった。

HepG2 細胞は肝細胞癌由来の細胞株であるため、次に正常な肝細胞における IL-6 の効果を評価するために、ヒト初代肝細胞を用いた。ヒト初代肝細胞では、IL-6 は時間依存的に SERPINB1 の mRNA およびタンパク質の発現を有意に上昇させた。

SERPINB1 遺伝子誘導に対する IL-6 の効果を検証するために、HepG2 細胞でルシフェラーゼレポーターアッセイを行い、SERPINB1 のプロモーター領域を過剰発現させた HepG2 細胞で

IL-6によるルシフェラーゼ活性の上昇を確認した。

次に、IL-6がSerpinB1の発現を誘導するメカニズムについて検討した。IL-6/IL-6受容体/gp130の下流シグナル伝達として、JAK / STAT3経路が関与することがこれまでに報告されている(2)。したがって、我々はヒトSERPINB1プロモーター領域で転写因子であるSTAT3の結合可能部位を検索した。

ヒトSERPINB1プロモーター配列をEPDデータベースで検索し、ヒトSERPINB1プロモーター領域(-1000から+100bp)で3つの推定STAT3結合部位(-626、-436、-415)が確認できた。STAT3がSERPINB1プロモーター領域に結合するかどうかを評価するために、クロマチン免疫沈降(ChIPアッセイ)を行い、SERPINB1プロモーター領域へのSTAT3の結合を2つの独立したプライマーセットで評価した。2つの独立したプライマーセットともに、定常状態でSTAT3がSERPINB1プロモーター領域に結合し、IL-6の存在下でSERPINB1プロモーター領域へのSTAT3の結合が増強された。また、STAT3の阻害剤による検討も行い、STAT3阻害剤であるC188-9でHepG2細胞を前処理することにより、IL-6を介したSerpinB1遺伝子およびタンパク質発現の増加が抑制された。

次に肝細胞内でのSerpinB1の機能を評価するために、遺伝子サイレンシング(siRNA)を用いて、HepG2細胞や初代ヒト肝細胞でSERPINB1をノックダウンし、RNAシーケンシング、SILAC法によるプロテオミクスを行った。得られた結果を用いてパスウェイ解析を行った際に、これらに共通した変化としてインスリンシグナル経路の低下が見いだされた。またインスリンシグナル経路の低下に関与する分子としてインスリン受容体の発現低下が示唆された。RNAシーケンシング、プロテオミクスの結果を確認するために、HepG2細胞や初代ヒト肝細胞でSERPINB1をノックダウンした際に、インスリン受容体の遺伝子、タンパク質発現ともに有意に低下しており、インスリンシグナルの減弱に伴うPGC1A、G6PC、PCK1などの糖新生系の遺伝子発現の亢進や細胞増殖能の低下が認められた。

次にSerpinB1によるインスリン受容体の発現制御機構に関して検討した。これまでに報告されているインスリン受容体の転写因子の中で正の転写制御因子としてSp1、Foxo1、負の転写制御因子としてPresenilin1が挙げられる。SerpinB1のノックダウンでは、Sp1、Foxo1のタンパク質発現を低下させ、Presenilin1のタンパク質発現を増加させた。これらはいずれも、SerpinB1のノックダウンによるインスリン受容体の発現低下に一致した変化であった。

また、インスリン受容体発現に関与する新規の分子としてRps3を見出した。Rps3の発現はSerpinB1により制御されており、HepG2細胞や初代ヒト肝細胞ではRps3のノックダウンによりインスリン受容体のタンパク質発現が低下したことから、SerpinB1によるインスリン受容体の発現変化の少なくとも一部分はRps3の発現変化を介したものである可能性が示唆された。

引用文献

- (1). El Ouaamari A, Dirice E, Gedeon N, Hu J, Zhou JY, Shirakawa J, Hou L, Goodman J, Karampelias C, Qiang G, Boucher J, Martinez R, Gritsenko MA, De Jesus DF, Kahraman S, Bhatt S, Smith RD, Beer HD, Jungtrakoon P, Gong Y, Goldfine AB, Liew CW, Doria A, Andersson O, Qian WJ, Remold-O'Donnell E, Kulkarni RN: SerpinB1 Promotes Pancreatic beta Cell Proliferation. *Cell metabolism* 2016;23:194-205
- (2). Schmidt-Arras D, Rose-John S: IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *Journal of hepatology* 2016;64:1403-1415

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 折目 和基
2. 発表標題 インスリン抵抗性が発現誘導する肝臓由来膵 細胞増殖因子SerpinB1の発現調節機構と機能解析
3. 学会等名 第63回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------