

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月29日現在

機関番号：32665  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21591147  
 研究課題名（和文） 小胞体ストレス応答の破綻による膵β細胞障害とインスリン抵抗性の分子機構  
 研究課題名（英文） Molecular mechanisms of pancreatic β-cell failure and insulin resistance due to impaired ER stress response  
 研究代表者  
 石原 寿光（ISHIHARA HISAMITSU）  
 日本大学・医学部・教授  
 研究者番号：60361086

研究成果の概要（和文）：細胞内の小胞体の機能異常が、様々な疾患の根底に隠れていることが想定されている。私たちは、小胞体の恒常性の維持に重要である転写因子 ATF6 $\alpha$  の欠損マウスを高脂肪食で飼育するなどの方法で解析した。その結果、ATF6 $\alpha$  ひいては小胞体の機能異常が、糖尿病の基本病態であるインスリン分泌障害とインスリン抵抗性亢進に複雑に絡んでいることが明らかとなった。さらに、本研究において、膵β細胞の小胞体機能維持に重要と思われる新たな遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：Dysfunction of endoplasmic reticulum (ER) is suggested to be a cause of a variety of diseases. ATF6 $\alpha$  is an important molecule to maintain ER homeostasis. We have analyzed ATF6 $\alpha$ -null mice fed with a high fat diet. ER dysfunction has been revealed to be involved in impaired insulin secretion and insulin resistance. Furthermore, we have identified novel genes responsive to ER stress in the pancreatic beta cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：糖尿病・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、膵島、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は、膵β細胞からのインスリン分泌障害と骨格筋・脂肪細胞および肝臓でのインスリン抵抗性が複雑に絡み合って、発症・進展する疾患である。最近の研究では、小胞体ストレス応答が2型糖尿病患者のβ細胞 (Laybutt et al. Diabetologia 50, 2007) および肥満患者の脂肪組織 (Sharma et al. J

Clin Endocrinol Metab. 2008) において亢進していることが報告され、2型糖尿病の発症に小胞体ストレスが深く関与していると考えられてきている。小胞体ストレス応答は、小胞体ストレス状態を是正しようとする細胞の適応反応であり、中心は転写因子 ATF4, XBP1, ATF6 $\alpha$  の3つの転写因子の活性化による転写レベルでの遺伝子発現調節と eIF2 $\alpha$

および eIF4E の活性抑制による mRNA の翻訳抑制であることが明らかにされていた。このうち、eIF2 $\alpha$  の活性抑制による翻訳制御が糖代謝に重要な役割を担うことは 2000 年代初頭に示されていた。また、eIF4E の活性抑制による mRNA の翻訳制御の重要性は 2008 年に我々が報告した。また、ATF4 および XBP1 の糖代謝における重要性は、2000 年代中ごろに示されているが、さらにそのメカニズムのより深い解明が必要とされている。一方、ATF6 $\alpha$  の糖代謝における役割については、2007 年にそのノックアウトマウスが作成され、解析が端緒についたところであった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、2 型糖尿病の発症・進展における小胞体ストレスの関与を検討するため、小胞体ストレス応答において中心的役割を演ずる ATF4, XBP1, ATF6 $\alpha$  の糖代謝における役割とそのメカニズムを検討することである。

## 3. 研究の方法

### 1) ATF6 $\alpha$ ノックアウトマウスの解析。

京都大学理学部の森和俊教授との共同研究で、同教授が作製された ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスの糖代謝の解析を行った。通常食で飼育するとともに、脂肪を 60% 含む高脂肪食で 6 週齢から 18 週間飼育し検討した。

### 2) eIF2 $\alpha$ -ATF4 経路の解析。

小胞体ストレスとともに、酸化ストレスによる eIF2 $\alpha$ -ATF4 経路の解析を、酸化ストレスを誘導するヒ素を用いて検討した。さらに、新規に同定した小胞体ストレス応答分子 Zcchc12/sizn1 について、点変異の導入や発現調節領域のクローニングを行い、解析した。

## 4. 研究成果

### 1) ATF6 $\alpha$ ノックアウトマウスの解析。

ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスを通常食で飼育した場合には、耐糖能に変化を来さなかった。しかし、高脂肪食で飼育したところ、ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスは野生型より耐糖能の悪化を認めた。この耐糖能障害には、膵インスリン含有量低下と糖負荷試験時のインスリン分泌低下を伴っていた。さらに、膵 $\beta$ 細胞の変化を詳細に検討するため、電子顕微鏡を用い細胞内オルガネラの異常を検討した。その結果、ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスの $\beta$ 細胞において小胞体の膨満化を高頻度に認めた(図 1)。高脂肪食摂取によるインスリン抵抗性がもた

らすインスリン産生重要な増加が $\beta$ 細胞に小胞体ストレスを惹起するが、ATF6 $\alpha$  欠損状態では、増加した小胞体ストレスに十分対抗できずに、膵 $\beta$ 細胞数の低下を招いたと推察された。

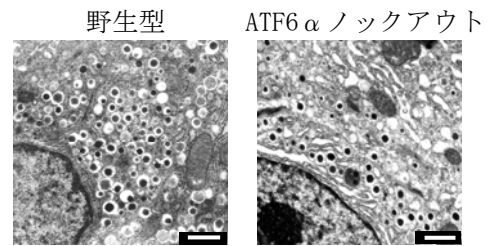


図 1 : 高脂肪食での膵 $\beta$ 細胞の変化

このことを *in vivo* で検証するために、ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスを異常インスリンの産生により膵 $\beta$ 細胞において小胞体ストレスが亢進している Akita マウスと交配した。作製された ATF6 $\alpha$  ノックアウト Akita マウスは、 $\beta$ 細胞の障害が著しく増悪し、重篤な糖尿病状態を示した。

ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスでは、耐糖能の障害を認めたものの、インスリン抵抗性に関しては、野生型マウスが高脂肪食によって獲得したインスリン抵抗性より軽度であることが、インスリン負荷試験により明らかになった。また、空腹時の血糖とインスリン値から計算される HOMA-R は、通常食野生型マウス 2.20、通常食ノックアウト 1.66、高脂肪食野生型 9.81、高脂肪食ノックアウト 4.58 であり、インスリン抵抗性は亢進するものの、野生型の半分ぐらいにとどまることが明らかになった。インスリン抵抗性の亢進が抑制されることをさらに検証するため、食欲中枢での遺伝子異常により過食となりインスリン抵抗性を示す Agouti yellow マウスとの交配を行った。高脂肪食負荷時と同様、ATF6 $\alpha$  欠損 Agouti マウスでは、膵インスリン含量の低下を認めるとともに、インスリン負荷試験での血糖降下が大きく、インスリン抵抗性が抑制されていることが認められた。

その原因を検討するために、肝臓および骨格筋・脂肪組織での遺伝子発現の検討等を行った。ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスの肝臓では、Xbp-1 の発現亢進などが認められ、小胞体ストレス亢進状態にあると考えられた。また、糖新生系の酵素の発現の亢進が認められ、肝糖放出の増加を来して耐糖能低下に関与していると考えられた。さらに、肝臓での脂質含量

を検討するとATF6 $\alpha$ ノックアウトマウスの方が、野生型マウスより高くなっていることが明らかとなった。ところが、興味深いことに血清の中性脂肪およびコレステロールが低い傾向を認めた。肝臓で小胞体ストレスが亢進しているために、高次構造の高度なアポリポタンパクの安定性が悪くなる可能性が示唆された。

また、ATF6 $\alpha$ ノックアウトマウス骨格筋においては、野生型の骨格筋と比べ、インスリン負荷時のAKTのリン酸化の亢進が認められ、インスリン抵抗性が軽減されている可能性が考えられた。さらに、骨格筋において遺伝子発現の変化を検討すると、ATF6 $\alpha$ がPGC-1 $\alpha$ の発現調節に重要な役割を担っている可能性を示唆する知見を得た。現在その詳細なメカニズムの検討をさらに行っている。

このように、ATF6 $\alpha$ は糖代謝に関与する様々な臓器において、固有の役割を担いながら、個体の耐糖能の調節に関与していることが示唆された。これらの成果を、英文論文として発表した（発表論文1）。

## 2) eIF2 $\alpha$ -ATF4 経路の解析。

小胞体ストレス応答の主要な要素である PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4経路は、様々なストレス応答に共通のintegrated stress responseの上流にある。翻訳抑制因子4E-BP1は、ATF4によって転写誘導される分子であるが、酸化ストレスではeIF2 $\alpha$ -ATF4経路が小胞体ストレスと同定度に活性化されるにも関わらず、4E-BP1の転写誘導は軽度であった。興味深いことに、酸化ストレス下では、4E-BP1のリン酸化状態が変化して、細胞の翻訳制御に関与することが明らかとなった。これらのストレス応答分子の役割を詳細に解析することによって、環境ストレスと2型糖尿病発症のメカニズムの解明の道が開けていくと考えられる。これらの成果を、英文論文として発表した（発表論文5）。

次に、膵 $\beta$ 細胞株 MIN6 と繊維芽細胞株 NIH3T3 細胞を小胞体ストレス惹起分子であるツニカマイシンを添加した培養液で培養し、MIN6細胞で特異的に小胞体ストレスに応答する遺伝子を複数個見出した。その中でも特に、Zcchc12/Sizn1 (Zinc finger CCHC domain containing protein 12/Smad interacting zinc finger protein)に注目した。Zcchc12は、骨形成タンパク質 (bone morphogenic protein) シグナル系を修飾す

るタンパク質として見出された新規の分子である。本タンパクは核内へ移行して作用を発揮すると考えられるが、その分子内に塩基性アミノ酸に富む核移行シグナルを2か所同定した。また、Zcchc12のストレスによる誘導機構を明らかにするため、転写調節領域をクローニングし、その中にATF4結合領域となりうる配列を見出した。Smad1やSmad4タンパクの発現は、小胞体ストレスにて変化しないことも見出したが、Zcchc12が小胞体ストレスに応答することで、Smadのシグナル系がストレス応答の修飾に関与する可能性が示唆された。

## 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. Usui M, Yamaguchi S, Tanji Y, Tominaga R, Ishigaki Y, Fukumoto M, Katagiri H, Mori K, Oka Y, Ishihara H. Atf6 $\alpha$ -null mice are glucose intolerant due to pancreatic beta-cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance. *Metabolism* 2012, in press. 査読有. doi:10.1016/j.metabol.2012.01.004.
2. Kirkpatrick CL, Wiederkehr A, Baquié M, Akhmedov D, Wang H, Gauthier BR, Akerman I, Ishihara H, Ferrer J, Wolheim CB. Hepatic nuclear factor 1 $\alpha$  (HNF1 $\alpha$ ) dysfunction down-regulates X-box-binding protein 1 (XBP1) and sensitizes beta-cells to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 286, 32300-32312, 2011. 査読有. doi: 10.1074/jbc.M111.247866.
3. Gao J, Ishigaki Y, Yamada T, Kondo K, Yamaguchi S, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Sawada S, Ishihara H, Oyadomari S, Mori M, Oka Y, Katagiri H. Involvement of endoplasmic stress protein C/EBP homologous protein in arteriosclerosis acceleration with augmented biological stress responses. *Circulation* 124, 830-839, 2011. 査読有. doi:10.1161/circulationaha.110.014050.
4. Suzuki T, Imai J, Yamada T, Ishigaki Y, Kaneko K, Uno K, Hasegawa Y, Ishihara H, Oka Y, Katagiri H Interleukin-6 enhances glucose-stimulated insu

- lin secretion from pancreatic beta-cells: potential involvement of the PLC-IP3 dependent pathway. *Diabetes* 60, 537-547, 2011. 査読有. doi:10.2337/db10-0796.
5. Tominaga R, Yamaguchi S, Satake C, Usui M, Tanji Y, Kondo K, Katagiri H, Oka Y, Ishihara H. The JNK pathway modulates expression and phosphorylation of the translational suppressor 4E-BP1 in MIN6 pancreatic beta-cells under oxidative stress conditions. *Cell Biochem Funct* 28, 387-393, 2010. 査読有. DOI: 10.1002/cbf.1667.
  6. Fonseca SG, Ishigaki S, Osowski CM, Lu S, Lipson KL, Ghosh R, Hayashi E, Ishihara H, Oka Y, Permutt MA, Urano F. Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest* 120, 744-755, 2010. 査読有. doi: 10.1172/JCI39678.
  7. Tokita A, Ishigaki Y, Okimoto H, Hasegawa H, Koiwa Y, Kato M, Ishihara H, Hinokio Y, Katagiri H, Kanai H, Oka Y. Carotid arterial elasticity is a sensitive atherosclerosis value reflecting visceral fat accumulation in obese subjects. *Atherosclerosis* 206, 168-172, 2009. 査読有. doi:10.1016/j.athero.2011.03.031.
- [学会発表] (計 19 件)
1. Ishihara H. Therapeutic strategy for type 2 diabetes mellitus based on physiology of islet hormone secretion. The 16<sup>th</sup> Japan-Korea symposium on diabetes mellitus. 2011年10月21日. 浦安市.
  2. Ishihara H. Zcchc12/Sizn1 is a novel ER stress-responsive gene expressed in the pancreatic beta cell. The 47<sup>th</sup> European association for study of diabetes annual meeting. 2011年9月14日. Lisbon, Spain.
  3. Usui M. ATF6 $\alpha$  deletion accelerates beta cell loss but improves insulin sensitivity in mice. The 71<sup>st</sup> Scientific sessions of American diabetes association. 2011年6月25日. SanDiego, U.S.A.
  4. 石原寿光. 糖尿病とがん. 第50回日本消化器がん検診学会総会. 2011年5月22日. 東京.
  5. 薄井正寛. ATF6 $\alpha$ 欠損マウスを用いたATF6 $\alpha$ 欠損が耐糖能に与える影響についての検討. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会. 2011年5月21日. 札幌市.
  6. 丹治泰裕. WFS1 遺伝子欠損マウスにおけるDPP-4 阻害薬(vildagliptin)の膵 $\beta$ 細胞保護効果の検討. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会. 2011年5月20日. 札幌市.
  7. 石原寿光. インスリン治療の up to date. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会. 2011年5月20日. 札幌市.
  8. 石原寿光. インスリン・グルカゴン分泌機構からみた2型糖尿病治療. 第45回糖尿病学の進歩. 2011年2月18日. 福岡市.
  9. Ishihara H. Translational and transcriptional regulation of stress responses in glucose homeostasis. 第33回日本分子生物学会総会. 2010年12月9日. 神戸市.
  10. Ishihara H. Cell type-specific transcriptional regulation of 4E-BP1 under ER stress in MIN6 beta-cells. The 46<sup>th</sup> European association for study of diabetes annual meeting. 2010年9月22日. Stockholm, Sweden.
  11. 富永竜. 膵 $\beta$ 細胞における小胞体ストレス応答と酸化ストレス応答のクロストーク. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会. 2010年5月28日. 岡山市.
  12. 山口賢. 新規小胞体ストレス蛋白CRELD2の蛋白特性についての検討. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会. 2010年5月28日. 岡山市.
  13. Ishihara H. Transcriptional and translational control in adaptive stress responses in pancreatic beta cells. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会. 2010年5月27日. 岡山市.
  14. Ishihara H. Transcriptional and translational regulation in adaptive responses to environmental stress in pancreatic beta cells. The official satellite symposium of the 14th international congress of endocrinology "New insight into pathogenesis and treatment of diabetes" 2010年3月25日. 東京.
  15. 石原寿光. 2型糖尿病の病態形成におけるインスリン分泌機構の障害. 第44回糖尿病学の進歩. 2010年3月6日. 大阪市.

16. 薄井正寛. 膵β細胞におけるATF6αの役割:ATF6α欠損マウスを用いた検討. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会. 2009年5月22日. 大阪市.
17. 高俊弘. 動脈硬化発症・進展におけるCHOPの役割の検討. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会. 2009年5月22日. 大阪市.
18. 石原寿光. 加齢・老化と膵β細胞ストレス応答. 第52回日本糖尿病学会年次学術集会. 2009年5月22日. 大阪市.
19. 石原寿光. Lilly賞受賞講演:2型糖尿病発症における膵β細胞障害の分子機構. 第52回日本糖尿病学会年次学術集会. 2009年5月22日. 大阪市.

[その他]

<http://www.med.nihon-u.ac.jp/department/dmet>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石原 寿光 (ISHIHARA HISAMITSU)  
日本大学・医学部・教授  
研究者番号: 60361086

### (2) 研究分担者

岡本 真由美 (OKAMOTO MAYUMI)  
日本大学・医学部・講師  
研究者番号: 80349993

### (3) 連携研究者

山口 賢 (YAMAGUCHI SUGURU)  
日本大学・医学部・助教  
研究者番号: 70451614

佐川 知雅子 (SAGAWA CHIGAKO)  
日本大学・医学部・助子  
研究者番号: 30459896 (2009-2010)