

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790871

研究課題名（和文） サート1を介した新規インスリン抵抗性治療薬の探索

研究課題名（英文） Development of newly insulin sensitizers via SIRT1

研究代表者

吉崎 健 (YOSHIZAKI TAKESHI)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：20510324

研究成果の概要（和文）：抗老化分子である SIRT1 は、マクロファージや脂肪細胞において炎症反応を抑制し、脂肪細胞のインスリン感受性を改善させた。また SIRT1 の活性化剤のインスリン抵抗性モデル動物への投与は、脂肪組織の炎症反応を抑制しインスリン感受性を改善させた。また脂肪組織だけでなく、全身のインスリン感受性も改善させた。SIRT1 活性化剤は今後の新しいインスリン抵抗性改善薬として期待される。

研究成果の概要（英文）：In macrophage and adipocyte, SIRT inhibited inflammatory responses accompany with improvement of insulin sensitivity. SIRT1 activator improved glucose intolerance and insulin sensitivity in obese Zucker Fatty rats. Pharmacological activation of SIRT1 may be a useful anti-inflammatoy therapeutic strategy for treating insulin resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000円	570,000円	2,470,000円
2010年度	1,400,000円	420,000円	1,820,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000円	990,000円	4,290,000円

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：インスリン抵抗性、糖尿病、メタボリック症候群、SIRT1

1. 研究開始当初の背景

近年、過食、運動不足などによる、メタボリックシンドロームの罹患者の増加は、社会問題となっている。このメタボリックシンドロームだけでなく生活習慣病疾患群すべての背景に横たわるインスリン抵抗性の是正は極めて重要な社会的課題である。

カロリー制限は、古くから、哺乳類を含む様々な種で寿命延長、老化遅延をもたらすことが報告されており (Sinclair, D.A. Mech Aging Dev. 2005)、さらに、2型糖尿病やメタボリックシンドロームの生活習慣改善の主な方法として使われてきた。最近、カロリー制限により活性化される抗老化分子として NAD 依存性ヒストン脱アセチル化

酵素 Silent information regulator 2 (哺乳類では SIRT1) が同定された。現在 SIRT1 は、寿命、細胞生存、ストレス抵抗性、ミトコンドリア代謝など、様々な病態形成に重要な過程を制御していることが分かってきており Hot topic となっている。

赤ワインやブドウに含まれる天然ポリフェノールである Resveratrol は、SIRT1 を活性化することが報告され (Howitz K. T. et al. Nature 2003)、マウスへの Resveratrol 投与は、高脂肪食負荷による体重増加を抑制すると報告された (Lagouge et al. Cell 2006)。すなわち、SIRT1 活性化は肥満を改善すると考えられた。しかし、この報告に使われている Resveratrol の濃度はワインに換算すると 1 日に 200 本飲まなければならず非実用的である。そこで我々は、1 万分子以上の候補のなかから、SIRT1 に極めて選択的で強力な活性化能力のある小分子を発見した (Milne J. C. et al Nature 2007)。この小分子 SRT1720 は、肥満ラットやマウスにおいて、耐糖能改善、インスリン抵抗性改善効果を認めた。すなわち糖負荷試験における血糖上昇が抑制され、血中インスリン濃度も低下した。

しかしながらこの効果に対する SIRT1 の標的臓器、標的蛋白、分子機構は未だに同定できておらず、In vitro の研究では、SIRT1 のインスリン標的臓器内での直接効果の検討は散見されるが、全身のインスリン抵抗性改善の機構は未だ不明である。

2. 研究の目的

SIRT1 のインスリン抵抗性改善効果の分子機構の解明、標的臓器、標的蛋白の同定を目的とした。

(1) SIRT1 の各臓器における炎症反応へ

の役割。炎症反応に重要とされている NF κ B が SIRT1 の脱アセチル化の標的蛋白のひとつであると報告 (Yang et al. AJP 2007) されていることから、SIRT1 が抗炎症作用を有する可能性が示唆される。最近、慢性炎症状態が、インスリン抵抗性、メタボリックシンドローム、2 型糖尿病などの肥満関連疾患の病因として重要視されていることから、我々は SIRT1 が抗炎症分子として作用しインスリン抵抗性を改善しているという仮説を立てた。そこで、まず、慢性炎症に重要とされ、インスリン抵抗性に深く関わっているとされているマクロファージでの SIRT1 の炎症反応への役割について炎症反応シグナルや、サイトカイン分泌、遺伝子発現を含め、細胞レベルで検討し明らかにする。さらにマクロファージに限らず、脂肪細胞など他のインスリン標的細胞において、SIRT1 が同様に炎症反応に抑制的に働いているか、また SIRT1 の糖代謝への影響も含め細胞レベルで明らかにする。

(2) SIRT1 の臓器間ネットワークへの関与の検索。インスリン抵抗性には、脂肪、マクロファージなどの臓器間ネットワークが重要視されている。マクロファージにおける SIRT1 の発現抑制や活性化が脂肪細胞へ相互作用をしているかを、培養液上清の附置や共培養システムにより検討し明らかにする。

(3) SIRT1 の in vitro での分子機構の動物モデルでの確認。細胞実験の結果をふまえ、インスリン抵抗性モデル動物に SIRT1 活性化化合物を投与して同様の現象が起こっているかを検討する。

(4) SIRT1 活性化を介した新規インスリン抵

抗性治療の探索。SIRT1の活性化は、インスリン抵抗性、2型糖尿病、肥満関連疾患の新たな治療戦略になる可能性を秘めている。我々はSRT1720以外にもハイスループットスクリーニングによりSIRT1活性化化合物を同定しており（未発表）、SRT1720だけでなく、他のSIRT1活性化化合物候補のインスリン抵抗性改善作用、分子機構を培養細胞、マウスを用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) SIRT1の各臓器における炎症反応への役割。新規SIRT1活性化化合物候補によるSIRT1の活性化、siRNAを用いたSIRT1の発現抑制、アデノウイルスを用いたSIRT1の過剰発現の各条件でマクロファージRAW264.7細胞への遊離脂肪酸やLPSによる炎症反応に関して、炎症シグナル経路（JNK, IKKのリン酸化等）をWestern Blot法で、炎症関連遺伝子発現（TNF, IL6, MCP1の発現等）をqPCR法で、サイトカイン分泌（TNF, IL6の分泌等）をELISA法にて検討する。3T3-L1脂肪細胞においても、上記条件の炎症反応、糖代謝への影響を、炎症マーカー、糖取り込み、糖放出、インスリン分泌等で検討する。

(2) SIRT1の臓器間ネットワークへの関与の検索。SIRT1活性化化合物によるSIRT1活性化、siRNAによるSIRT1発現抑制、アデノウイルスによるSIRT1過剰発現したマクロファージを、LPSにて刺激した後、培養液上清を回収し、3T3-L1脂肪細胞に附置し、インスリンによる糖取り込み能をトリチウム標識したグルコースの取り込み測定にて検討することにより、マクロファージのSIRT1の脂肪細胞

への影響を明らかにする。さらに同条件においてインスリン刺激によるインスリンシグナル経路の活性化状態をWestern Blot法にて検討する。

(3) SIRT1のin vitroでの分子機構の動物モデルでの確認。上記に示した細胞実験の結果を動物レベルで確認するため、遺伝的に肥満をきたすインスリン抵抗性モデルラット（Zucker rat）にSIRT1活性化化合物を投与し、血糖値、血中インスリン値などの各種インスリン抵抗性パラメーターを確認する。また、上記細胞実験の結果をふまえた、分子機構の確認に必要な遺伝子発現や蛋白質の解析を、ラットより得た脂肪組織にて解析する。

(4) SIRT1活性化を介した新規インスリン抵抗性治療の探索。SIRT1を活性化させる新規小分子候補（未発表）を脂肪、マクロファージへ前附置し、その効果を上記と同様の方法を用いて検討する。また上述したインスリン抵抗性モデルラットに投与し、そのインスリン抵抗性改善効果、新規薬剤になりうるか（毒性などの副作用も含めて）を各種パラメーターにて解析するとともに、細胞実験の結果をふまえた分子機構の再現性に関しても検討する。

4. 研究成果

(1) SIRT1の各臓器における炎症反応への役割。マウスマクロファージRAW264.7細胞にSIRT1に対するsiRNAを導入することによりSIRT1蛋白発現を約20%に抑制できた。SIRT1の発現抑制は、LPSやパルミチン酸による炎症シグナル経路の活性（JNK経路およびIKK経路）を亢進させ、

TNF、IL6、MCP1などの炎症関連遺伝子発現も増加させた。それにしたがって、TNF、IL6などのサイトカイン分泌も増加させた。逆に、SIRT1活性化剤であるレスベラトロールや SRT1720 をマクロファージに附置しマクロファージの SIRT1 を活性化させると、LPS やパルミチン酸による炎症シグナル経路の活性 (JNK 経路および IKK 経路) を抑制し、TNF、IL6、MCP1などの炎症関連遺伝子発現を減少させた。これらの SIRT1 活性化剤の効果は SIRT1 発現抑制細胞ではみられなかったことから SIRT1 を介しているものと考えられた。アデノウイルスを用い SIRT1 を過剰発現させたが、上記の炎症反応へは影響をおよぼさなかったことより、SIRT1 のマクロファージでの抗炎症作用には SIRT1 の活性が必要であると考えられた。

(2) SIRT1 の臓器間ネットワークへの関与の検索。マクロファージの培養液上清やマクロファージとの共培養により、3T3-L1 脂肪細胞のインスリンによる糖取り込み能は減弱するが、マクロファージの SIRT1 を活性化させておくと、培養液上清の附置や共培養によるインスリンに対する反応性の低下を部分的ではあるが防御することが可能であった。

(3) SIRT1 の *in vitro* での分子機構の動物モデルでの確認。肥満インスリン抵抗性モデルラットへの投与の影響を検討した結果、SIRT1 活性化剤の3週間の投与は、体重には影響をおよぼさなかったが、OGTT での耐糖能の改善を認めた。クランプスタディーより、全身および脂肪組織でのインスリン感受性が改善していたことがわかった。脂肪組織では炎症のマ

ーカーである TNF α や IL6 の発現が減少し、悪玉マクロファージのマーカーである CD11c も減少していたことから、SIRT1 活性化薬の投与は、脂肪組織での炎症反応を抑制することにより、脂肪組織でのインスリン感受性を改善させ、全身のインスリン感受性、耐糖能異常を改善させていることがわかった。現在更なる検討のため、マクロファージ特異的 SIRT1 ノックアウトマウスを作成中である。

(4) SIRT1 活性化を介した新規インスリン抵抗性治療の探索。上記 SIRT1 活性化薬 (SRT1720) 以外に、我々が同定した SIRT1 活性化薬、9種類に関して、培養マクロファージ RAW264.7 細胞、培養 3T3-L1 脂肪細胞での抗炎症反応に関して検討し、おおむね SRT1720 と同様の結果を得ている。

カロリー制限で活性化される SIRT1 の活性化化合物がインスリン抵抗性を改善するという報告 (Lagouge et al. Cell 2006, Milne et al. Nature 2007) は世界的に大変注目を集めている。しかしながら、この効果に対する SIRT1 の分子機構、標的臓器は同定できておらず、非常に重要な研究課題であった。今回我々は、世界に先駆けて、SIRT1 の標的臓器の中心が、脂肪組織であり、脂肪細胞、マクロファージ内の直接作用のみならず、臓器間ネットワークへの SIRT1 の抗炎症作用を解明したことは、独創的で世界に大きなインパクトを与えた。本研究の成果によって SIRT1 の標的臓器が脂肪組織であること、および臓器間ネットワークにより全身のインスリン抵抗性改善に効果があることを解明したのは、創薬に向け

て非常に重要なことである。 今後は、マクロファージ特異的 SIRT1 ノックアウトマウスの検討など、さらにデータを蓄積していく必要がある。

SIRT1 活性化による新規インスリン抵抗性改善薬の開発はすべての生活習慣病疾患群の改善、予防につながるため、今後の医療経済学的に見ても非常に有意義であると考えられる。

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 1 件)

- ① Takeshi Yoshizaki, Simon Schenk, Takeshi Imamura, Jennie L. Babendure, Noriyuki Sonoda, Eun Ju Bae, Da Young Oh, Min Lu, Jill C. Milne, Christoph Westphal, Gautam Bnadyopadhyay, and Jerrold M. Olefsky SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. Am J Physiol Endocrinol Metab Vol 298, E419-E428, 2010 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- ①インスリン抵抗性における SIRT1 の治療応用、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011. 5. 20 札幌
- ②脂肪組織における SIRT1 のインスリン感受性改善機構にはマクロファージの質の変化も関与する、第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、2010. 5. 27 岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉崎 健 (YOSHIKAZI TAKESHI)
滋賀医科大学・医学部・特任助教
研究者番号：20510324