

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25年5月24日現在

機関番号：13701
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22390184
 研究課題名（和文） 体脂肪分解と肝糖取り込みを促進させる糖尿病治療の開発
 研究課題名（英文） Diabetes treatment increasing liver glucose uptake and decreasing fat accumulation
 研究代表者
 武田 純（TAKEDA JUN）
 岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：40270855

研究成果の概要（和文）：

肝臓の糖放出や過体重の改善は2型糖尿病の治療において重要である。臍島トランスクリプトーム解析により、32kDa分泌蛋白が糖脂質代謝に関与することを見出している。モデル動物での過剰発現により、インスリン非依存性の体脂肪減少と血糖低下が認められ、その背景として肝での糖および脂質の取り込み促進が示唆された。ヒトにおける血中レベルは、肥満度と正相関したので、糖脂質代謝の臨床マーカーとなる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In order to treat type 2 diabetes, it is important to improve body weight and liver glucose uptake. In the process of screening for secreted proteins which could decrease blood glucose, a 32kDa protein was identified by comparison of gene expression profile between normal and diabetic pancreatic islets. Overexpression of the protein in mice significantly increased liver glucose-uptake and decreased fat accumulation in an insulin-independent manner. The plasma levels of the protein secreted were not associated with blood glucose levels in diabetic patients, but with body mass index in obese patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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：液性因子、転写標的、肥満、肝脂質代謝、トランスクリプトーム

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

糖尿病に肥満の合併は高頻度であり、治療や予防において肥満の解消は重要である。特に、心血管イベントのリスク軽減において重要である。しかし、食事による減量は長期の努力を要し、十分な改善を見るに至らない場合が多い。運動療法はインスリン抵抗性の改善に欠かせないが、心機能の低下、腎障害、増殖網膜症、関節障害、リハビリなどを有する状態では、運動は困難で適応にない。一方、短期の減量には VLDC 治療などの栄養制限が行なわれるが、入院を要する上に反動が大きい。食欲低下薬は適応が厳しく、しかも長期使用は認められていない。従って、短期に効率的な減量ができて、しかも血糖改善を同時に見込める治療は理想的である。高齢化社会ではこのような治療は心血管イベントの予防にも繋がり、高齢患者の生活自立障害を解消する。

糖尿病、肥満、高脂血症は互いに密接に関連した代謝異常であり、共通素因の存在が示唆されるが、各々の疾患は個別に研究されてきた経緯がある。

申請者らの糖尿病に関する以下の膵島転写因子研究により、コード蛋白の幾つかは「膵島、肝」で共通発現し、生活習慣病の代謝病態に共通に関与することが明らかとなった。組織間では、パートナー因子の相違が表現型の多様性の成因となっている可能性も示唆された。従って、共通の機能接点に関する転写下流のキー分子を見出せば、コモン代謝疾患の発症機序の解明が期待されるのみならず、重要な創薬対象にもなろう。特に、その分子が液性因子であれば、臨床応用に直結するという利点がある。

2. 研究の目的

現在、膵島トランスクリプトーム研究において、特に分泌蛋白に焦点を当てている。その理由は、血中測定と投与が容易であり、早期の臨床応用に直結するからである。

正常と糖尿病の mRNA プロフィールの比較解析から、糖脂質代謝に関連する一連の HNF や ChREBP 転写因子の量的変化に応答する調節カスケード下流の分子に着目している。まず、HNF 標的の幾つかの関心分子について、アデノウイルス系を用いて実験動物で過剰発現させて血中レベルを上昇させたところ、生理機能が不明な 32kDa 分子において糖負荷試験でインスリン分泌を介さない血糖降下作用と、体脂肪量の著明な減少が認められた。一方、肝重量と中性脂肪蓄積は逆に増大したので、体脂肪が肝臓へ移動したように見受けられた。一方、過剰な糖質を脂質に変換する

センサー ChREBP の下流標的の検索でアレイ解析を行い、発現変化分子である分泌蛋白 Orm2 に注目している。

本研究ではモデル動物を用い、上記の分泌蛋白の生理活性を解析し、さらに、ヒトの臨床成績を解析して、診断的応用のみならず、肥満や耐糖能異常の早期検出や治療薬としての可能性を探っている。

3. 研究の方法

HNF 転写因子の下流標的であり、糖尿病によって膵島における発現レベルが変化する分子をマイクロアレイを用いて網羅的に収集した。最初の選別には、膵島 EST プールの発現プロフィールの情報も活用した。次いで、シグナルペプチドのモチーフサーチによって分泌蛋白を選別した。更に、ハウスキーパーを除去し、肝と膵に高発現する分子を選別して候補プールを濃縮した。

同様に、転写因子 ChREBP の下流標的についても同様の探索と候補選別を行った。関心分子については、アデノウイルス発現系を用いて、実験動物において強発現して表現型を解析した。

4. 研究成果

我々は、膵島トランスクリプトーム解析による液性因子スクリーニングの結果、糖尿病の関連臓器である「膵島、肝」で共通発現している HNF 標的の 32kDa 分泌タンパクに着目した。実験動物の肝で過剰発現させたところ、体脂肪蓄積を減少させると共に血糖降下作用が認められた。

この体脂肪蓄積の減少が、1 次的か 2 次的効果かを判別するため、*in vitro* にて検証した。同タンパク遺伝子は 3T3L1 の脂肪細胞への分化に伴って発現が上昇したが、反対にアデノウイルスにて過剰発現下で分化させると、脂肪合成酵素である FAS の発現低下が認められた。

また、軽度肥満モデルとして作成した LRH-1 欠失マウスを用いて、肥満病態への 32kDa タンパクの寄与を検討した。転写因子 LRH-1 は HNF 標的である FXR と SHP と共に胆汁酸代謝を介して、肥満を含めた病態に関与すると考えられている。LRH-1 欠失のホモ接合では胎生致死のため、ヘテロ動物を今回使用した。高脂肪食負荷をかけたところ通常マウスに比べ白色脂肪組織の重量増加による体重増がみられるものの、耐糖能は正常であった。LRH-1 は脂肪細胞の分化と共に減少し、逆に 32kDa タンパクは分化と共に増加した。LRH-1 ヘテロ欠失マウスの白色脂肪組織において 32kDa タンパクの発現は野生型に比べて

約2倍に増加していた。次に、高脂肪食負荷をおこなったところ、LRH-1ヘテロ欠失マウスでは有意に体重が増加し、内臓脂肪量も増加した。一方、32kDaタンパクの発現については、脂肪食負荷により野生型マウスはその発現が約2倍に増加したが、LRH-1ヘテロ欠失マウスでは同程度であった。

膵島発現の32kDa TGマウスの樹立

アデノウイルス発現系を用いた32kDa分子の腹腔内投与では、門脈は介しているものの肝での発現が主体であり、血糖低下に対する肝細胞のオートクリン、パラクリン効果の影響は否定できない。また、元々32kDa分子は膵島ESTプールから同定された分子であるので、膵島由来の分泌効果を検討することが必要である。そこで、ヒトインスリン遺伝子プロモーター下にヒト32kDa分子遺伝子を発現させたTGマウスを作出し、同分子の血中濃度を指標としてスクリーニングを行なった。ゲノムのタイピングでは14ライン、血中測定できたラインは10ライン作出された。しかし、系統維持は困難を極め、持続的な強発現は適切ではないと判断し、Tc制御ベクターを用いた作成に変更した。本課題は次計画への持ち越しとなる。

高脂肪食負荷のSHP^{-/-}マウスの代謝学的解析

LRH-1ヘテロ欠失の表現型を周辺の関与分子の観点からも解析した。ヒトの軽度肥満遺伝子であるSHPはLRH-1の共役分子であり、FXRと共に胆汁酸代謝を介して、肥満を含めた病態に関与する。そこでSHP経路での影響も解析するために、欠失動物を作成して脂肪負荷の表現型を解析した。14%の脂肪成分を含む高脂肪食をSHP^{-/-}マウスに負荷し、体重変化に加えて、耐糖能、脂肪肝の有無、血清脂質について検討を行った。驚くべきことに、高脂肪食負荷の欠失マウスでは、野生型に比して肝臓への脂肪蓄積は見られず、しかも野生型マウスに比べ血清コレステロールも低値であったが、血清中性脂肪は高かった。一方、脂肪食負荷により引き起こされる体重増加や耐糖能異常は不変であった。この背景として、SHP標的であるPPAR γ の発現低下が一部関与すると推定している。

32kDa分泌タンパクの血糖調節作用の検討

初年度に、アデノウイルス発現系を用いて実験動物の肝で過剰発現させたところ、体脂肪蓄積を減少させると共に血糖降下作用を認めた。次いでブドウ糖負荷試験では、同効果がインスリン非依存的に肝臓に糖が取込まれることに起因することを明らかにし、脂肪分解は血糖低下に続発した二次的なエネルギー供給応答である可能性が示唆された。肝糖吸収

は負荷後や食後のみならず、空腹時も同程度に認められたので、同タンパクは肝臓での糖利用のベースレベルを維持している可能性が示唆された。

STZ糖尿病ラットでは体重減少と平行して血中レベルが低下した。

ヒトにおける意義を解析するためにアッセイ系を樹立して血中測定を行った。肥満者では、肥満度と正の相関を示すことが明らかとなり、ブドウ糖負荷試験では耐糖能の低下に従って弱いながらも血中レベルは低下傾向を示すことが判明した。有意な関連かどうかは今後の検討課題である。

肝糖吸収に関連する遺伝子多型の可能性の検討

耐糖能異常における血糖上昇に肝糖吸収能の低下が関与している可能性が想定されたので、同タンパクのコード遺伝子多型をスクリーニングした。その結果、32kDa分子の血中レベルと相関する多型を同定することができた。一方、糖尿病発症の遺伝的背景になる可能性の検討のために、2型糖尿病患者と正常者のDNAを用いて同多型との関連解析を行ったところ、疾患との有意の関連を認めなかったことから、糖尿病発症における主たる感受性多型ではないと考えられた。

肝糖取込みと脂質代謝に関連する液性分子-ChREBP経路

転写因子ChREBPは高グルコースに関係した肝臓の脂肪合成系遺伝子の発現を調節している。HNF経路とも関連し、下流分子は32kDaタンパクと協調する可能性も考えられる。従って、肝臓の糖取込みに感受性のある液性因子はChREBP転写カスケードの下流にある可能性が想定される。そこで、恒常活性型ChREBP発現アデノウイルスを感染させた(Ad-daChREBPマウス)の肝臓を用いてマイクロアレイを行い、mRNA発現レベルが変化する分泌蛋白Orosomucoid2(Orm2)を同定した。Orm2は肝臓で特に発現が高く、白色脂肪細胞や褐色脂肪細胞でも発現が見られる。

インスリン抵抗性モデルであり、高インスリンを呈するob/obマウスの肝臓では発現レベルが上昇し、一方、インスリン欠乏モデルであるSDZ糖尿病マウスでは正常マウスと発現レベルは同等であった。従って、Orm2の発現誘導にはインスリンが必要であり、インスリン依存であるChREBP経路が関与すると推定された。そこで、耐糖能障害の病期に応じてOrm2発現が変化すると考え、8週から高脂肪で高炭水化物の食事を実験動物に与え、Orm2遺伝子発現の変化を経時的に検討した。耐糖能障害(12, 16週)に先行し、臓器内脂肪の蓄積が増加する10週からOrm2およびChREBPのmRNA発現量は増加し、その後、耐

糖能異常の状態になる 16 週では正常レベルに低下した。

32kDa 分子と同様に、耐糖能異常の早期マーカーとなる可能性が考えられ、相互関連の解析や臨床応用は今後の課題である。

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 11 件)

- ① Mune T, Morita H, Takada N, Yamamoto Y, Isomura Y, Suwa T, Takeda J, White PC, Kaku K.
HSD11B2 CA-repeat and sodium handling.
Hypertens Res, 査読有, (In press)
- ② Mune T, Suwa T, Morita H, Isomura Y, Takada N, Yamamoto Y, Hayashi M, Yamakita N, Sasaki A, Takeda N, Takeda J, White PC, Kaku K.
Longer HSD11B2 CA-repeat in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes.
Endocr J, 査読有, 60(5):671-678, 2013
- ③ Iizuka K, Wu W, Horikawa Y and Takeda J.
Role of glucose-6-phosphate and xylulose-5-phosphate in the regulation of glucose stimulated gene expression in the pancreatic β cell line, INS-1E.
Endocr J, 査読有, 60(4):473-482, 2013
- ④ Yoshida S, Yoshida M, Yamamoto M, Takeda J.
Optical screening diabetes mellitus using non-invasive Fourier-transform infrared spectroscopy technique for human lip.
J Pharm Biomed Anal, 査読有, 76: 169-176, 2013.
- ⑤ Okayasu S, Kitaichi K, Hori A, Suwa T, Horikawa Y, Yamamoto M, Takeda J, Itoh Y.
The evaluation of risk factors associated with adverse drug reactions by metformin in type 2 diabetes
Biol Pharm Bull, 査読有, 35: 933-937, 2012.
- ⑥ Iizuka K, Tomita R, Horikawa Y, Takeda J.
A case of glycemic instability and insulin allergy due to anti-insulin antibodies in a patient with type 2 diabetes.
Diabetol Int, 査読有, 3: 233-238, 2012.
- ⑦ Murase H, Suzuki E, Tajima Y, Hayashi K, Nakamura T, Noritake N, Takeda J.
Association of plasma von Willebrand factor ristocetin cofactor activity and 5-hydroxyindole acetic acid concentrations with blood flow arteries in Japanese type 2 diabetic patients with normal ankle-brachial index.
J Diabetes Complications, 査読有, 26: 113-117, 2012.
- ⑧ Hamaguchi M, Takeda N, Kojima T, Ohbora A, Kato T, Sarui H, Fukui M, Nagata C, Takeda J.
Identification of individuals with non-alcoholic fatty liver disease by the diagnostic criteria for the metabolic syndrome.
World J Gastroenterol, 査読有, 18: 1508-1516, 2012.
- ⑨ Iizuka K, Tomita R, Horikawa Y, Takeda J.
Effectiveness of the glucagon test in estimating islet function for liraglutide treatment in a lean diabetic patient with impaired insulin response to glucose: a case report.
Diabetol Int, 査読有, 3: 103-108, 2012.
- ⑩ Iizuka K, Tomita R, Takeda J, Horikawa Y.
Rat glucagon receptor mRNA is directly regulated by glucose through transactivation of the carbohydrate response element binding protein.
BBRC, 査読有, 417: 1107-1112, 2012
- ⑪ Iizuka K, Tomita R, Suwa T, Horikawa Y, Takeda J.
Normalization of fasting hyperglycemia is beneficial for successful introduction of small amount of the GLP-1 analog liraglutide in an obese patient with type 2 diabetes mellitus.
Diabetol Int, 査読有, 3: 61-64, 2012.

〔学会発表〕(計 20 件)

- ① 堀川幸男
岐阜地域における糖尿病統一連携パスの作成と運用
第 13 回日本クリニカルパス学会学術集会、岡山、2012 年 12 月 8 日
- ② Nonoyama Y, Yamomato M, Oba S, Nagata C, Matsui K, Takeda J.
Effect of a diabetes diagnosis on quality of life in the Japanese population.
9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes
Kyoto, Japan. , November 24-27, 2012.
- ③ Suzuki H, Yamamoto M, Nakamura M, Oba S, Nagata C, Takeda J.
Factors affecting glucose metabolism in Japanese subjects: A community-based cross-sectional study in Gifu city.
9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes
Kyoto, Japan. , November 24-27, 2012.
- ④ Enya M, Horikawa Y, Takeda J
Survey of MODY1-6 in Japanese patients with early-onset diabetes
9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes
Kyoto, Japan, November 24-27, 2012.
- ⑤ Iizuka K, Tomita R, Wudelehu Wu, Horikawa Y, Takeda J.
Glucagon receptor and incretin receptors mRNA expression are inversely, Regulated by glucose through ChREBP activation
9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes
Kyoto, Japan, November 24-27, 2012.
- ⑥ Iizuka K, Wudelehu Wu, Tomita R, Tuchida H, Horikawa Y, Takeda J.
Deletion of the small heterodimer partner gene protects against fatty liver and dyslipidaemia, but not obesity and glucose intolerance in C57BL/6J mice fed a high-fat diet.
48th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes
Berlin, Germany, October 4, 2012.
- ⑦ 堀川幸男、塩谷真由美、武田 純
日本人若年発症家族性糖尿病 (MODY) の新規原因遺伝子探索
第 46 回日本小児内分泌学会学術集会、大阪、2012 年 9 月 28 日
- ⑧ Kato T, Suwa T, Tomita R, Hirota T, Iizuka K, Horikawa Y, Takeda J.
Long term remission of pulmonary alveolar proteinosis after successful surgical resection of a Cushing's disease pituitary adenoma
Endocrine Society's 94th Annual Meeting & Expo 2012
Houston, Texas, USA, June 23, 2012.
- ⑨ Iizuka K, Tomita R, Horikawa Y, Takeda J.
Glucagon receptor and glucagon-like peptide-1 receptor mRNA expression are inversely regulated by glucose through ChREBP Activation
72th Scientific Sessions of American Diabetes Association,
Philadelphia, Pennsylvania, USA, June 10, 2012.
- ⑩ 服部泰輔、飯塚勝美、呉鳥徳勒胡、土田宏美、堀川幸男、武田 純
LRH-1 (Liver Receptor homologue-1) ヘテロノックアウトマウスは摂餌量増加により体重増加をきたす
第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、横浜、2012 年 5 月 17-19 日
- ⑪ 塩谷真由美、堀川幸男、土田宏美、飯塚勝美、武田 純
日本人若年発症糖尿病患者における既知 MODY 遺伝子異常の調査
第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、横浜、2012 年 5 月 17-19 日
- ⑫ 加藤丈博、飯塚勝美、諏訪哲也、堀川幸男、武田 純
インスリン製剤からの変更時に DPP-IV 阻害剤と GLP-1 アナログの比較を行った一例

第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、
横浜、2012 年 5 月 17-19 日

- ⑬ 飯塚勝美、富田礼子、水野正巳、
丹羽啓之、加藤丈博、諏訪哲也、
堀川幸男、武田 純
GLP-1 アナログ (Liraglutide) 導入時に
おける空腹時血糖正常化の有用性
膵島機能および adipokine に注目した
検討
第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、
横浜、2012 年 5 月 17-19 日
- ⑭ 橋本健一、飯塚勝美、諏訪哲也、
堀川幸男、武田 純
インスリン+シタグリプチン併用療法
が有効であった 3 症例-膵島機能に注目
した解析
第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、
横浜、2012 年 5 月 17-19 日
- ⑮ 堀川幸男、塩谷真由美、武田 純
若年発症家族性糖尿病 (MODY) の新規原
因遺伝子同定の現状
第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、
横浜、2012 年 5 月 17-19 日
- ⑯ 堀川幸男
2 型糖尿病遺伝素因の解剖
第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、
横浜、2012 年 5 月 17-19 日
- ⑰ 武田 純
糖尿病地域医療連携の構築に向けた
CDEJ 活動のあり方
第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、
横浜、2012 年 5 月 17-19 日
- ⑱ 飯塚勝美、富田礼子、堀川幸男、武田 純
グルコース活性化転写因子 ChREBP の転
写活性調節におけるグルコース 6 リン酸
とキシルロース 5 リン酸の役割
第 85 回日本内分泌学会学術総会、
名古屋、2012 年 4 月 20 日
- ⑲ 水野正巳、飯塚勝美、富田礼子、
諏訪哲也、堀川幸男、武田 純
ステロイド糖尿病にリラグチド投与
が有効であった一例
第 85 回日本内分泌学会学術総会、
名古屋、2012 年 4 月 20 日
- ⑳ 加藤丈博、諏訪哲也、水野正巳、服部泰
輔、富田礼子、丹羽啓之、橋本健一、廣
田卓男、塩谷真由美、川地慎一、飯塚勝
美、堀川幸男、山本眞由美、武田 純
リラグチドで食後血糖改善を認めた

ミトコンドリア糖尿病の 1 例
第 21 回臨床内分泌代謝 Update、
浜松、2012 年 1 月 27 日

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 富田礼子、堀川幸男、武田 純
インスリン分泌—我が国と外国
糖尿病予防と治療のエビデンス
中山書店：94-99, 2012.

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 純 (TAKEDA JUN)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40270855

(2) 研究分担者

堀川 幸男 (HORIKAWA YUKIO)

岐阜大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10323370

(3) 連携研究者 なし