

## 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：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790842

研究課題名（和文） 2型糖尿病における小胞体ストレス応答機構の解明

研究課題名（英文） the molecular mechanism of ER stress response in pancreatic beta cells:type 2 diabetis

研究代表者

山口 賢 (YAMAGUCHI SUGURU)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：70451614

研究成果の概要（和文）：

膵β細胞に対する翻訳抑制因子 4E-BP1 の細胞保護効果を明らかにするため、MIN6 細胞において、小胞体ストレス応答と酸化ストレス応答を比較した。4E-BP1 の発現及び活性化制御に違いが認められたが、その過程に JNK の活性化の違いが関与した。

ATF6α の欠損マウスを用いて ATF6α の糖代謝における役割を検討した。膵β細胞においては小胞体ストレスから細胞を保護するが、脂質異常やインスリン抵抗性を惹起する方向に働く。

WFS1 遺伝子欠損マウスに対する、DPP-4 阻害薬・ビルダグリプチンの膵細胞保護効果を検討した。ビルダグリプチンが膵β細胞保護効果を有することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In the current study, we investigated 4E-BP1 expression, which is important for beta-cell survival, in MIN6 cells under ER stress and oxidative stress. We found that JNK activated by oxidative stress is involved in the modulation of 4E-BP1 expression and phosphorylation in MIN6 cells.

In this study, we analyzed Atf6α-null mice. ATF6α protects β-cells from ER stress and suppresses hepatosteatosis, but plays a role in the development of hyperlipidemia and insulin resistance.

The study is designed to investigate whether the activation of the incretin system by DPP-4 inhibition ameliorates β-cell failure in WFS1-deficient mice, a genetically defined model of human diabetes caused by ER stress in β-cells. These findings provide evidence that activation of the incretin system by vildagliptin plays a protective role against β-cells with WFS1-deficiency.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：糖尿病

科研費の分科・細目：医歯薬学・内分泌学

キーワード：膵β細胞、小胞体ストレス、4E-BP1、ATF6α、DPP-4 阻害薬

- |  |   |
|--|---|
| <p>1. 研究開始当初の背景<br/>2 型糖尿病患者において、インスリン分泌</p> | <p>細胞である膵β細胞の量の低下が糖尿病の初期から起こっていることが明らかにされ</p> |
|--|---|

てきている。膵β細胞死の原因として、小胞体ストレスが注目されている。小胞体ストレスとは、小胞体自体の機能異常や生成される蛋白質の構造異常などにより、小胞体内に処理能力を超える蛋白が蓄積した状態である。小胞体ストレスが加わると、細胞は小胞体ストレス応答という一連の反応によって対応するが、処理限界を超えると細胞死・アポトーシスが誘導される。

小胞体ストレスは、糖尿病以外にも様々な疾患との関連が指摘されており、分子生物学的解析が進められている。しかしながら、詳細なメカニズムについては不明な点も多く、小胞体ストレスを直接のターゲットとした治療は存在しない。

## 2. 研究の目的

### (1) 膵β細胞特性からみた小胞体ストレス機構の解明

研究代表者は、翻訳因子である 4E-BP1 の膵β細胞保護効果を初めて報告した。4E-BP1 のプロモーター領域には小胞体ストレス応答部位が存在するが、ストレス下での 4E-BP1 の発現経路の詳細な検討は行っていない。我々は、小胞体ストレス状況下での 4E-BP1 の発現経路が、細胞内のストレスの 1 種である酸化ストレスとは異なることを発見している。本研究では、両者のストレスによる 4E-BP1 の発現経路の特徴を明らかにする。

(2) ATF6α の膵β細胞ストレス応答機構とインスリン抵抗性に役割についての解析  
小胞体ストレスのセンサー蛋白の一つである activating transcription factor 6 (ATF6) 経路では、GRP78 などの分子シャペロンを転写誘導させることにより、異常な蛋白質の folding の処理能力を向上させる。本研究では、ATF6α の膵β細胞と肝臓・脂肪組織でのストレス応答の違いについて比較をする。

### (3) GLP1 の膵β細胞保護機構の解明

GLP1 (Glucagon Like Peptide 1) は、膵β細胞に作用してインスリン分泌を増強するホルモンであるが、糖尿病薬として臨床応用が開始されている。一方、細胞内ストレスに基づく障害から膵β細胞を保護する作用が示唆されている。しかし、GLP1 の膵β細胞保護作用の実態・メカニズムの詳細は、未だ不明である。GLP1 は、血液中で DPPIV (Dipeptidyl Peptidase IV) によって速やかに分解されるため、血中 GLP1 濃度を高めるために DPPIV 阻害薬が臨床の場に昨年より登場した。本研究では、これまで研究代表者が解析してきた WFS1 欠損マウスなどの糖尿病モデルマウスを使用し、DPPIV 阻害剤の膵β細胞障害に対する効果について検討を行う

## 3. 研究の方法

### (1) 膵β細胞特性からみた小胞体ストレス機構の解明

小胞体ストレス応答と酸化ストレス応答の特徴を integrated stress response の経路を中心に検討した。マウスインスリンノーマ細胞である MIN6 細胞に、小胞体ストレスと酸化ストレスを惹起するための薬剤としてそれぞれ、タブシガルギン 0.5 μM を 0、8、24 時間、また砒素 (NaAsO<sub>2</sub>) 15 μM を 0、6、12 時間暴露し、ストレス応答関連の蛋白を中心に観察した。

(2) ATF6α の膵β細胞ストレス応答機構とインスリン抵抗性に役割についての解析  
ATF6α の膵β細胞にいける作用を明らかにするため、膵に強い小胞体ストレスがかかった状態である Akita マウスと掛け合わせ、解析を行う。また、ATF6α のインスリン抵抗性における役割を明らかにするため、インスリン抵抗性によって糖尿病を発症する KKAy マウスと交配させる。これらのマウスに、糖負荷試験やインスリン負荷試験を行い、インスリン分泌能やインスリン抵抗性を測定する。

### (3) GLP-1 の膵β細胞保護機構の解明

WFS1 遺伝子欠損マウスは、膵β細胞における小胞体ストレス応答の障害により、膵β細胞が脱落し、糖尿病を来す。WFS1 欠損マウスに、DPPIV 阻害剤である viladagliptin を連日投与する。これらのマウスの血糖、血清インスリン値、糖負荷試験、膵インスリン含有量を測定する。これらのマウスの膵臓から膵島を単離し、遺伝子や蛋白の発現の違いを解析する。GLP1 存在下での、WFS1 欠損 MIN6 細胞での、小胞体ストレスや酸化ストレスに対する細胞の遺伝子や蛋白の発現の検討を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 膵β細胞特性からみた小胞体ストレス機構の解明

小胞体ストレスと酸化ストレスの両者で eIF2α のリン酸化、ATF4、CHOP の発現量の増加を認めた。酸化ストレスのみで JNK のリン酸化誘導を認め、一方小胞体ストレスのみで XBP1 の発現量上昇を認めた。興味深いことに、この 2 種のストレスで integrated stress response の上流に位置する ATF4 の発現が増加するにも関わらず、下流にある 4E-BP1 については、小胞体ストレスで発現量が著明に増加するのに対し、酸化ストレスでは脱リン酸化が劇的に亢進した。なお、酸化ストレス下で JNK を阻害すると 4E-BP1 蛋白が増加しリン酸化誘導が増強した。さらに酸化ストレス下では ribosomal protein S6 のリン酸化が減少したが、JNK を阻害することでリン酸化誘導が増強した。以上の結果より、β細胞では、小胞体ストレス応答及び酸

化ストレス応答において、4E-BP1 の発現及び活性化制御に違いが認められたが、その過程に JNK の活性化の違いが関与した。以上の結果は、Cell Biochemistry & Function に報告した。

(2) ATF6 $\alpha$  の膵 $\beta$ 細胞ストレス応答機構とインスリン抵抗性に役割についての解析  
小胞体ストレスセンサー蛋白である ATF6 $\alpha$  の膵 $\beta$ 細胞での機能を、ノックアウトマウスを用いて研究を行った。ATF6 $\alpha$  欠損マウスに高脂肪食を負荷すると、野生型マウスに比べ、耐糖能の悪化を認めた。一方、インスリン負荷試験を行い、インスリン抵抗性を評価すると、野生型に比べ、インスリン抵抗性が軽度であった。膵 $\beta$ 細胞に強い小胞体ストレスがかかった状態である Akita マウスにおいて ATF6 $\alpha$  を欠損させると、膵 $\beta$ 細胞障害がさらに進行した。食事誘因性肥満を呈した ATF6 $\alpha$  欠損マウスの肝臓では、糖新生に関わる転写因子の発現が亢進し、脂肪肝はより重度だった。同マウスの骨格筋では、インスリンによる Akt 及び S6 のリン酸化がより亢進していた。

ATF6 $\alpha$  が欠損することにより個体レベルで耐糖能は悪化するが、ATF6 $\alpha$  欠損が耐糖能に果たす役割は臓器間で異なる。膵 $\beta$ 細胞においては ER stress から細胞を保護する方向に働き、肝臓においては糖新生に関わる転写因子の発現を抑制し、骨格筋においてはインスリン抵抗性を惹起する方向に働く。以上の結果は、Metabolism に報告した。

(3) GLP-1 の膵 $\beta$ 細胞保護機構の解明

WFS1 遺伝子欠損マウスに、DPP-4 阻害薬であるビルダグリプチンを4週間連日投与した。その結果、腹腔内ブドウ糖負荷試験ではビルダグリプチン投与群で非投与群と比較し、インスリン初期分泌増加と耐糖能改善を示した。また、ビルダグリプチン投与群では、インスリン含有量の進行性低下が軽減され、膵 $\beta$ 細胞にて、小胞体ストレスの指標である小胞体膨化が減少していた。しかしながら、ビルダグリプチンとともに、GLP-1 のアンタゴニストである exendin(9-32)の継続投与を行うと、膵 $\beta$ 細胞保護効果が消失した。つまり、DPP-4 阻害剤の膵 $\beta$ 細胞保護効果は、GLP-1 シグナルに寄与していることが確認された。次に、膵 $\beta$ 細胞株である MIN6 細胞における GLP-1 の細胞保護効果について検討した。MIN6 細胞に GLP-1 を添加したところ、thapsigargin (小胞体ストレス誘導剤) 暴露下での、アポトーシスが軽減し、cell viability は上昇した。この効果は、WFS1 欠損 MIN6 細胞は、野生型 MIN6 細胞より軽度であった。

小胞体ストレスは、膵 $\beta$ 細胞障害の原因の一つとして認識されている。これに加え、小

胞体ストレスを亢進させる WFS1 遺伝子異常は、Wolfram 症候群という稀な遺伝性疾患の原因であるのみならず、一般的な2型糖尿病の発症リスクとして重要視されている。よって本研究は、Wfs1 遺伝子欠損マウスというヒトの2型糖尿病における病態を反映したモデルマウスを用いて、DPP-4 阻害薬の膵 $\beta$ 細胞保護効果を示した。

現在、海外雑誌に submit を終え、査読中である

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3件)

- ① 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 Biochemistry & Function. 28(5):387-93, 2010  
DOI: 10.1002/cbf.1667
- ② 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. 2011 Aug 16;124(7):830-9  
DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.014050
- ③ Masahiro Usui, Suguru Yamaguchi, Yasuhiro Tanji, Ryu Tominaga, Yasushi Ishigaki, Manabu Fukumoto, Hideki Katagiri, Kazutoshi Mori, Yoshitomo Oka, Hisamitsu Ishihara. 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 Mar 2 (in press).

[学会発表] (計6件)

- ① 第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010年5月27日-29日、岡山  
動脈硬化発症・進展における WFS1 の役割の検討  
高俊弘、片桐 秀樹、石垣 泰、石原 寿光、山田 哲也、今井 淳太、澤田正二郎、宇野 健司、長谷川 豊、山口 賢、金子 慶三、鈴木 俊伸、齋藤 徳郎、突田 壮平、近藤 敬一、高橋 圭、檜尾 好徳、岡 芳知
- ② 第53回日本糖尿病学会年次学術集会、

2010年5月27日・29日、岡山  
膵β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  
富永 竜、石原 寿光、山口 賢、佐竹千尋、薄井 正寛、丹治 泰裕、鈴木千登世、石垣 泰、山田 哲也、檜尾 好徳、片桐 秀樹、岡 芳知

- ③ 第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010年5月27日・29日、岡山  
新規小胞体ストレス蛋白・CRELD2の蛋白特性についての検討

山口 賢、石原 寿光、宗像佑一郎、佐竹千尋、薄井 正寛、富永 竜、丹治泰裕、鈴木 千登世、石垣 泰、山田 哲也、檜尾 好徳、片桐 秀樹、岡 芳知

- ④ 第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月20、札幌

薄井 正寛、石原 寿光、鈴木千登世、山口 賢、石垣 泰、福本 学、森 和俊、岡 芳知、片桐 秀樹 ATF6α欠損マウスを用いた、ATF6α欠損が耐糖能に与える影響についての検討

- ⑤ 第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月20、札幌

丹治 泰裕、山口 賢、薄井 正寛、富永 竜、近藤 敬一、石垣 泰、岡 芳知、片桐 秀樹、石原 寿光 WFS1遺伝子欠損マウスにおけるDPP-4阻害薬 (vildagliptin)の膵β細胞保護効果の検討

- ⑥ the 47th EASD Annual Meeting. 12 - 16 September 2011 Lisbon, Portugal

GLP-1 exerts a protective role in pancreatic β-cells with WFS1-deficiency  
Suguru Yamaguchi, Yasuhiro Tanji, Masahiro Usui, Ryu Tominaga, Keiichi Kondou, Yasushi Ishigaki, Hideki Katagiri, Yoshitomo Oka, Hisamitsu Ishihara

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

- 取得状況 (計◇件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 ( )

研究者番号：

- (2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

- (3) 連携研究者 ( )

研究者番号：