

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650269

研究課題名（和文）

新規概念エレクトロニックシャペロンを活用した新しい疾患予防法の開発

研究課題名（英文）

A new preventive way on diseases using electronic chaperones as a novel concept.

研究代表者

甲斐 広文（KAI HIROFUMI）

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：30194658

研究成果の概要（和文）：温熱療法関連の研究から、電流刺激が生体に与える作用についての研究に着手し、パルス幅（持続時間：0.1ms）を有する短形波の微弱電流には、PI3K-AKT 経路の活性増強効果が認められること、さらに微弱電流がユビキチン/プロテアソーム経路の阻害効果を有していることを見出した（*PLoS ONE* 2008, 2012; *J. Pharmacol. Sci.* 2008, 2010; *Int. J. Hyperthermia* 2009; *J. Surg. Res.* 2009 等で発表）。一般に、細胞膜は電氣的抵抗が高いため、細胞内のシグナル分子に影響することはあり得ないことから、細胞の表層を流れる電流がどのようにして細胞内に刺激を伝えるのか、これまでの細胞生物学的アプローチの経験から（*EMBO J.* 2007; *J. Biol. Chem.* 2009; *Mol. Cell. Biol.* 2008; *Mol. Cell* 2012 など）、様々な角度から微弱電流が生体に与える効果を科学的に検証してきた。その結果、持続パルス時間が0.1 ミリ秒の電流に対して何らかの受容体が存在すること、ラフトの関与があること等を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Our previous report showed that mild electrical stress (MES) enhanced the insulin-induced signaling pathway. However, the molecular mechanism of the effect of MES remains unclear. We assessed the effect of MES, which is characterized by low-intensity direct current, on insulin signaling *in vitro* and *in vivo*. Here we showed that MES activated the insulin signaling in an insulin-independent manner, and improved insulin resistance in peripheral tissues of high fat-fed mice. Moreover, we found that MES increased the localization of IR in lipid rafts and enhanced the level of phosphorylated Akt in insulin-resistant hepatic cells. Ablation of lipid rafts disrupted the effect of MES on Akt activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：人間医工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：微弱電流、TRP family, ラフト構造、インスリン受容体

1. 研究開始当初の背景

生体に対する電流の作用は次の3つに分類されている。能動的な電気特性の、活動電位発生を伴う現象、受動的な電気特性の、抵抗損失による組織の発熱・変形・破壊、極めて微弱な電流の長期作用として、骨の発育や

損傷治癒の促進作用等の、元来の生理機能に対する補助的効果である。このうち、18世紀の頃から現在まで、その有用性は経験的に認知されていたにも関わらず、作用メカニズムについては全く不明であった。そして、申請者らが温熱療法関連の研究から本研究に

着手し、極めて微弱な電流には PI3K-Akt 経路の活性増強効果が認められること、さらに微弱電流がユビキチン/プロテアソーム経路の阻害効果を有していることを見出し、投稿準備をしていた頃（後に PLoS ONE, 2008, J Pharmacol Sci, 2008, Int J Hyperthermia, 2009, J Surg Res, 2009 に発表）、微弱電流が創傷治癒を促進する際に PI3K を活性化しているという報告がドイツのグループからなされた (Nature, 2006)。この論文では創傷部に流れる微弱な電流（創傷電流）の生理的役割が示されていた。さらに、近年、微弱電流に ES 細胞を心筋細胞へと分化促進させる作用があるという報告もなされた (Exp Cell Res, 2009)。しかしながら、最も重要な作用点は未だ解明されていないままである。そこで、申請者らは電流の作用機序の解明を目指している。申請者らが同定した特定の周波数、最適なパルス幅を有する矩形波の微弱電流（以下、MES）は、直流且つ低周波数（55Hz）であることから、生体物性学的には、生体を体積導体として内部まで広がった電流分布になることは想定できる。しかしながら、細胞の表層を流れる電流がどのようにして細胞内に刺激を伝えるかは不明である。これまでの細胞生物学的研究の経験 (EMBO J, 2007, Mol Cell Biol, 2008, J Biol Chem, 2009 など多数) に基づき、様々な角度から MES が生体に与える効果を科学的に評価してきた。そして、今までの予備検討の結果から、MES は膜タンパク質に分子シャペロンの効果を及ぼし、種々の生体機能を補助的に制御するのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、“エレクトロニックシャペロン（造語）”という今までにない新しい概念として提唱し、実証することである。

3. 研究の方法

MES の効果に対する脂質ラフト阻害剤の影響を検討し、実際に MES がインスリン受容体を脂質ラフトに移行させているか明らかにする。また、MES がどの膜分子に影響しているのか検討するために、人工脂質膜の再構築を行い、MES の作用発現に必要な膜ドメインの構成成分を同定する。さらに、一分子可視化技術を用いて、MES 処置後のインスリン受容体の挙動も検討する。MES が腎糸球体上皮細胞であるポドサイトに対して保護効果を示すか検討する。具体的には、腎症モデル細胞に対する MES の保護効果を、インスリンシグナルの活性化を指標に評価する。

4. 研究成果

(1) ラット骨格筋細胞株 L6 細胞を用いて検討した結果、MES 処理により PI-3K 活性

化及び PI-3K 活性化依存的な Akt リン酸化亢進を認めた。さらに、MES 処理において、GLUT 4 膜上発現亢進を介した細胞内への糖取り込みが促進することがみられた。また、MES 処理により細胞死を誘導しない程度の一過性のミトコンドリア膜電位低下がみられ、膜電位低下依存的な AMPK リン酸化亢進が起こることを明らかにした。さらに、野生型 N_2 線虫を用いた検討では、MES 前処理により、AMPK リン酸化亢進がみられるとともに、温熱及び酸化ストレスに対する耐性が付与されることを明らかにした。

(2) 糖尿病腎症の発症には腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）障害が関与しており、これは高血糖誘導性のアポトーシスと細胞骨格の破綻により引き起こされると考えられている。そこで、マウスポドサイト細胞株 (MPC5) を用いて、高血糖誘導性のポドサイト障害に対する MES + HS の効果について検討を行った。MPC5 を高グルコース (25 mM) 条件下で培養したところ、caspase-3 活性化および p38 MAPK のリン酸化を伴うアポトーシス (TUNEL positive) の増加と線維芽細胞様形態に特徴付けられる細胞骨格の変化が確認された。一方で、MES + HS 群では高グルコース誘導性のアポトーシスの抑制、および細胞骨格強化が観察され、ポドサイト保護効果を及ぼす Akt のリン酸化が増強されることも認められた。これらの結果から、MES + HS は、アポトーシスや細胞骨格の破綻を引き金としたポドサイト障害に対する保護効果を有し、その効果は一部 Akt を介している可能性が示された。

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 5 件）

- ① Koga T, Kai Y, Fukuda R, Morino-Koga S, Suico MA, Koyama K, Sato T, Shuto T, Kai H. Mild electrical stimulation and heat shock ameliorates progressive proteinuria and renal inflammation in mouse model of alport syndrome. *PLoS One*. 7(8): e43852 (2012), 査読有, 10.1371/journal.pone.0043852.
- ② Morino-Koga S, Yano S, Kondo T, Shimauchi Y, Matsuyama S, Okamoto Y, Suico MA, Koga T, Sata T, Shuto T, Arima H, Wada I, Araki E, Kai H. Insulin receptor activation through its accumulation in lipid rafts by mild electrical stress. *J. Cell. Physiol*. 228: 439-446 (2012), 査読有,

10. 1002/jcp. 24149
- ③ Kondo T, Sasaki K, Matsuyama R, Morino-Koga S, Adachi H, Suico MA, Kawashima J, Motoshima H, Furukawa N, Kai H, Araki E. Hyperthermia With Mild Electrical Stimulation Protects Pancreatic β -Cells From Cell Stresses and Apoptosis. *Diabetes* 61: 838-47 (2012). 査読有, 10. 2337/db11-1098.
- ④ Kondo T, Koga S, Matsuyama R, Miyagawa K, Goto R, Kai H, Araki E. Heat shock response regulates insulin sensitivity and glucose homeostasis: pathophysiological impact and therapeutic potential. *Curr. Diabetes Rev.* 7(4):264-9 (2011), 査読有
- ⑤ Yano S, Morino-Koga S, Kondo T, Suico MA, Koga T, Shimauchi Y, Matsuyama S, Shuto T, Sato T, Araki E, Kai H. Glucose Uptake in Rat Skeletal Muscle L6 Cells Is Increased by Low-Intensity Electrical Current Through the Activation of the Phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI-3K) / Akt Pathway. *J Pharmacol Sci.* 115(1):94-8 (2011), 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 松山 真吾, 岡本 有加, 四反田 伊穂李, 大町 紘平, 森内 将貴, Mary Ann SUICO, 首藤 剛, 甲斐 広文, (新規 physical medicine 微弱パルス電流の LKB1-AMPK 経路活性化を介した脂肪蓄積抑制効果およびストレス耐性付与効果), 日本薬学会第 133 年会, 2013. 3. 27-30, パシフィコ横浜, (横浜)
- ② 甲斐 友佳理, 古賀 友紹, 福田 亮介, 古賀 沙緒里, Mary Ann SUICO, 小山 皓介, 松山 真吾, 佐藤 卓史, 首藤 剛, 甲斐 広文, (遺伝性糸球体腎疾患アルポート症候群に対する新たな physical medicine の腎病態改善効果), 日本薬学会第 133 年会, 2013. 3. 27-30, パシフィコ横浜, (横浜)
- ③ 甲斐 広文, (Physical Medicine を科学する～新たな医療機器の研究開発～), 熊本和光ライフサイエンスフォーラム, 2013. 2. 22, 熊本大学(熊本)
- ④ 松山 真吾, 岡本 有加, 四反田 伊穂李, 大町 紘平, 森内 将貴, スイコ メリーアン, 首藤 剛, 甲斐 広文, (微弱パルス電流の LKB1-AMPK 経路活性化を介したストレス耐性付与および脂肪蓄積抑制効果), 第 35 回日本分子生物学会

- 年会, 2012. 12. 11-14, 福岡国際会議場(福岡)
- ⑤ 甲斐 広文, (薬理的アプローチによる新たな Physical Medicine の研究開発), 第 65 回 日本薬理学会西南部会, 2012. 11. 23, 熊本大学(熊本)
- ⑥ Hirofumi Kai, Tomoaki Koga, Yukari Kai, Saori M. Koga, Mary Ann Suico, Tsuyoshi Shuto, (Mild electrical stimulation and heat shock ameliorates progressive proteinuria and renal inflammation in mouse model of chronic kidney diseases), I C H O & J C T M 2012, 2012. 8. 28-31, ハイアットリージェンシー京都(京都)
- ⑦ Ryosuke Fukuda, Kosuke Koyama, Kohei Omachi, Yukari Kai, Shingo Matsuyama, Yuka Okamoto, Mary A Suico, Tsuyoshi Shuto, Hirofumi Kai, (Specified pulse-width mild electrical stimulation induces p53 phosphorylation and transcriptional activation"), I C H O & J C T M 2012, 2012. 8. 28-31, ハイアットリージェンシー京都(京都)
- ⑧ 甲斐 広文, (遺伝性腎疾患および糖尿病性腎症に対する新たな physical medicine の腎病態改善効果), 日本薬学会第 132 年会, 2012. 3. 28-31, 北海道大学(北海道)
- ⑨ Hirofumi Kai, Tatsuya Kondo, Saori Koga-Morino, Eiichi Araki, (Physical medicine -Basic and translational research on conditioned physical stress-), 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011. 12. 13-16, パシフィコ横浜(横浜)
- ⑩ 甲斐 友佳理, 古賀 友紹, 福田 亮介, 古賀 (森野) 沙緒里, メリーアン スイコ, 小山 皓介, 佐藤 卓史, 首藤 剛, 甲斐 広文, (遺伝性腎疾患 alport 症候群に対する新たな physical medicine の腎病態改善効果), 第 28 回日本薬学会九州支部大会, 2011. 12. 10-11, 福岡大学(福岡)
- ⑪ 松山 真吾, 矢野 脩一郎, 古賀 (森野) 佐緒里, 島内 裕一郎, 岡本 友加, 四反田 伊穂李, メリーアン スイコ, 首藤 剛, 甲斐 広文, (ストレス耐性付与および脂肪蓄積抑制作用を有する新たな physical medicine), 第 28 回日本薬学会九州支部大会, 2011. 12. 10-11, 福岡大学(福岡)
- ⑫ 岡本 有加, 古賀 (森野) 沙緒里, 古賀 友紹, 大町 紘平, メリーアン スイコ, 首藤 剛, 甲斐 広文, (糖尿病性腎症に対する新たな physical medicine の病態改善効果), 第 28 回日本薬学会九州支部大会, 2011. 12. 10-11, 福岡大学(福岡)

[その他]
ホームページ等
<http://molmed730.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐 広文 (KAI HIROFUMI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：30194658

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：