

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591314

研究課題名(和文) 2型糖尿病における運動による炎症性シグナル改善機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms by which exercise improves inflammation induced by type 2 diabetes

研究代表者

藤城 緑 (FUJISHIRO, Midori)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50420211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はまず、3種のMAPキナーゼ蛋白に特殊なMEF tagを取り付けた蛋白をコードするcDNAを作成後、これらの蛋白を発現するアデノウイルスを作成、大量に増幅した後に濃縮精製した。さらに精製したアデノウイルスをマウスのヒラメ筋に直接注射することで、目的の蛋白質を骨格筋に過剰発現させる手法を確立させるため、詳細な条件検討を繰り返した。マウス筋肉に過剰発現させた後は、運動させた群とさせない群の両群から筋肉を採取後に可溶化し、上清を精製処理後に得られたサンプルをLC/MSにより解析する。Bait蛋白に結合する蛋白質の網羅的解析を行い、最も有意な蛋白の同定に繋げていく。

研究成果の概要(英文)：To elucidate mechanisms by which exercise improves inflammation induced by type 2 diabetes, we chose the unique method which we have previously taken (J Biol Chem. 2011;286:20812-22, J Biol Chem. 2010;285:33018-27). The Myc-TEV-FLAG (MEF) tag cassette was generated by DNA synthesis and inserted into cloning sites in the mammalian expression vector pcDNA3. To create the N-terminally MEF-tagged MAP kinase constructs, each cDNA of three MAP kinases was inserted into pcDNA3-MEF. Then the coding portion of MEF-tagged MAPK was isolated from pcDNA3-MEF-MAPK, and the recombinant adenoviruses containing the cDNA coding for MEF-tagged MAPK were constructed. Recombinant adenoviruses expressing MAPK with the N-terminal MEF tag were used for adenoviral gene transfer to mouse muscles as previously described (Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002;282:E1239-44). Subsequent purification of the complex containing MAPKs will clarify the key protein which binds to MAPKs in mouse muscles during exercise.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 2型糖尿病患者数の急増は世界的な問題となっており、心血管疾患や腎不全、失明、下肢切断などの重篤な糖尿病合併症による生活の質の悪化や若年死を予防する為の、健康維持に要する支出は増大の一途である。2型糖尿病は、インスリン分泌とインスリン作用の両者の障害による血糖値上昇を特徴とする多因子疾患である。慢性的な高血糖のみならず、間歇的な血糖上昇も大血管や細小血管合併症を進展させるが、これには、酸化ストレスや軽度の慢性炎症を含む、多くの因子が関与している。現代人の抱える過食、運動不足、ストレスといった生活習慣、またその結果としての肥満が大きく影響していると考えられているが、これらに対する介入は大変困難で、日本においても2型糖尿病新規発症者における肥満の割合は増加している。

(2) 運動不足が常態化している現代の2型糖尿病の病態の分子レベルの理解として、現在、非酵素反応的糖化反応、ミトコンドリアでの電子伝達系経路、膜型 NADPH オキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼなど種々の機序を介して、多様な組織で活性酸素(ROS)が産生されていることが明らかとなっており、インスリン抵抗性と膵細胞機能不全が、ともに過剰な ROS が原因となりうることが知られている。糖尿病モデル動物を用いた研究では、適度な運動習慣が抗酸化作用や抗炎症作用を介して、2型糖尿病に関連する病態生理学的に多様な側面を広く改善させることが証明されている。運動は、広く代謝制御に関して改善効果を発揮するだけでなく、重篤な副作用が無い。

(3) 運動により、3種の MAP キナーゼ経路が抑制されることがこれまでも報告されていたが、最近、高脂肪食負荷肥満動物を用いた研究で、定期的な運動習慣だけでなく、単回運動でも、筋肉・肝臓・脂肪の Toll 様受容体 4(TLR4)の発現やシグナルの減弱を介して、最終的にインスリン感受性が改善することが報告された。MAP キナーゼ経路は TLR4 の下流に存在しており、運動による全身性の抗炎症作用に非常に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

運動と MAPK シグナルを直接つなぐ因子については未解明であり、これを見出すことによって、運動の好ましい効果を模した全く新しい治療を開発できる可能性がある。

Steno-2 などの大規模臨床研究や最近のメタ解析の結果から、2型糖尿病に伴う心血管疾患リスク低減の為には、血糖値だけでなく、血圧や脂質などの他の因子も統合的に改善させることが重要とされている。脂質異常、高血圧、血栓傾向といった2型糖尿病に伴う代謝異常と、それに伴う大血管障害には、間歇的高血糖、酸化ストレスや軽度の慢性炎症が重要な役割を果たし、インスリン抵抗性を

病態の基盤としている。これらの病態に対して現在は個別に薬剤を用いて対応せざるを得ないが、結果的に多剤併用療法が必須となり、費用の問題だけでなく、副作用問題も無視できなくなる。糖尿病に対する薬剤として、不足したインスリン分泌を補う薬は最近の研究の成果として創薬に成功し、新規の薬剤も続々と開発が進められている。一方、インスリン抵抗性に対する薬剤はピグアナイド系以降新規の薬の開発が思わしくない。しかしながら、2型糖尿病の心血管リスク低減のためには、インスリン抵抗性に介入し、酸化ストレスや慢性炎症に伴った血管障害に介入する薬剤の開発が望まれる。そこで、運動を模した効果を得る方法を開発することを目的に、本研究を着想した。

## 3. 研究の方法

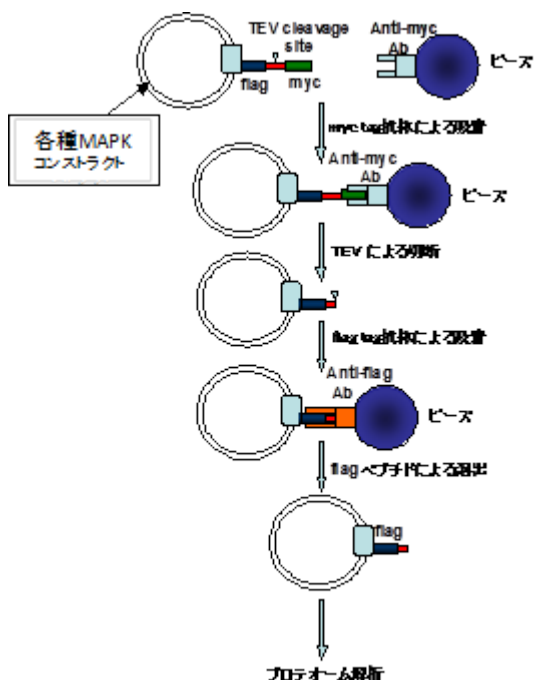
2種類の独立したエピトープタグ (myc : MEQKLISEED と FLAG : MDYKDDDDDKD) を、TEV プロテアーゼ切断配列 (ENLYFQG) とスペーサー配列を用いて直列に連結させた構造を持つ特殊なタグを用いることによって、目的の蛋白に結合している蛋白質を極めて高純度に調整することが可能となる (J Biol Chem. 2011;286(23):20812-22, J Biol Chem. 2010; 285(43):33018-27)。我々はまず、3種の MAP キナーゼ蛋白のそれぞれに、myc tag、TEV プロテアーゼによる切断配列、flag tag を順番に取り付けた蛋白をコードする cDNA を、PCR を用いて作成した。次にこれらの tag 付き蛋白を発現するアデノウイルスを作成し、大量に増幅した後に濃縮精製した。我々は、マウスのヒラメ筋にアデノウイルスを直接注射することで、目的の蛋白質を骨格筋に過剰発現させる手法を報告してきた (Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002; 282(6):E1239-44)。この手法で、高脂肪食を負荷した肥満・インスリン抵抗性糖尿病モデルマウス (db/db マウス) の筋肉に目的の蛋白質を大量に発現させ、運動させた群 (Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008 ;295(3):E586-94) とさせない群の両群から筋肉を採取後に可溶化し、遠心分離する。上清を myc tag に対する抗体をつけたビーズと混合することによって、bait を含む結合蛋白をビーズに結合させる。ビーズを洗浄したのちに TEV プロテアーゼによって tag を切断し、結合蛋白をビーズから一旦切り離す。上清を分離し、これを flag tag に対する抗体を取り付けたビーズと混合させ、最後に flag ペプチドにより溶出する。得られたサンプルを LC/MS により解析し、bait 蛋白に結合する蛋白質の網羅的解析を行い、最も有意な蛋白を同定する。

## 4. 研究成果

我々はこれまでに、3種の MAP キナーゼがインスリン抵抗性に与える影響について詳細に検討し報告してきた (Mol Endocrinol. 2003;17 (3):487-97, J Biol Chem. 2001;276

(23): 19800-6).

平成 24 年度には 3 種の MAP キナーゼ蛋白に上記の特殊な tag を取り付けた蛋白をコードする cDNA を作成後、これらの蛋白を発現するアデノウイルスを作成、大量に増幅した後に濃縮精製した。平成 25 年度から平成 26 年度にかけて、精製したアデノウイルスをマウスのヒラメ筋に直接注射することで、目的の蛋白質を骨格筋に過剰発現させる手法を確立させるため、詳細な条件検討を入念に繰り返した。



筋肉に過剰発現させた後は、運動させた群とさせない群の両群から筋肉を採取し可溶化する。上清を前述の如く処理後に得られたサンプルを LC/MS により解析し、bait 蛋白に結合する蛋白質の網羅的解析を行い、目的の蛋白同定に繋げていく。

## 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 15 件)

Okubo H, Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiya A, Fujishiro M, Fukushima T, Matsunaga Y, Ohno H, Yoneda M, Kamata H, Shinjo T, Iwashita M, Nishimura F, Asano T. Mosapride citrate improves non-alcoholic steatohepatitis with increased fecal lactic acid bacteria and plasma glucagon-like peptide-1 level in a rodent model. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology* 308(2):G151-8, 2015. 査読有  
doi: 10.1152/ajpgi.00198.2014

Tokuhara Y, Shukuya K, Tanaka M, Mouri

M, Ohkawa R, Fujishiro M, Takahashi T, Okubo S, Yokota H, Kurano M, Ikeda H, Yamaguchi S, Inagaki S, Ishige-Wada M, Usui H, Yatomi Y, Shimosawa T. Detection of novel visible-light region absorbance peaks in the urine after alkalization in patients with alkaptinuria. *PLoS One* 23; 9(1): e86606, 2014. 査読有  
doi:10.1371/journal.pone.0086606.  
eCollection 2014

Otani Y, Nakatsu Y, Sakoda H, Fukushima T, Fujishiro M, Kushiya A, Okubo H, Tsuchiya Y, Ohno H, Takahashi S, Nishimura F, Kamata H, Katagiri H, Asano T. Integrator complex plays an essential role in adipose differentiation. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 434(2): 197-202, 2013. 査読有  
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.029

Zhang J, Nakatsu Y, Shinjo T, Guo Y, Sakoda H, Yamamotoya T, Otani Y, Okubo H, Kushiya A, Fujishiro M, Fukushima T, Tsuchiya Y, Kamata H, Iwashita M, Nishimura F, Katagiri H, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T, Asano T. Par14 protein associates with insulin receptor substrate 1 (IRS-1), thereby enhancing insulin-induced IRS-1 phosphorylation and metabolic actions. *Journal of Biological Chemistry* 288(28): 20692-20701, 2013. 査読有  
doi: 10.1074/jbc.M113.485730

Nakatsu Y, Otani Y, Sakoda H, Zhang J, Guo Y, Okubo H, Kushiya A, Fujishiro M, Kikuchi T, Fukushima T, Ohno H, Tsuchiya Y, Kamata H, Nagamachi A, Inaba T, Nishimura F, Katagiri H, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T, Asano T. Role of Pin1 protein in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis in a rodent model. *Journal of Biological Chemistry* 287(53): 44526-44535, 2012. 査読有  
doi: 10.1074/jbc.M112.397133

[学会発表](計 35 件)

H. Okubo, M. Yoneda, H. Sakoda, A. Kushiya, M. Fujishiro, Y. Nakatsu, T. Fukushima, Y. Matsunaga, H. Kamata, M. Iwashita, F. Nishimura, A. Tomoichiro: Mosapride citrate improves non-alcoholic steatohepatitis with increased faecal lactic acid bacteria and plasma glucagon-like peptide-1 level in a rodent model. 50th EASD Annual Meeting, Vienna, Austria, 2014.9

Yamamotoya T, Sakoda H, Fujishiro M,

Kaneko S, Yamazaki H, Kikuchi T, Kushiyaama A, Asano T: The Role of Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex (LUBAC) and its Components in Insulin Signal Transduction. 74th Scientific Sessions of the American Diabetes Association, San Francisco, USA, 2014.6

Shinjo T, Iwashita M, Sakoda H, Fujishiro M, Yamamotoya T, Kushiyaama A, Nishimura F, Asano T: DPP4 Inhibitor Anagliptin Exerts Anti-inflammatory Effects on Macrophages, Adipocytes, and Mouse Liver by Suppressing LPS-induced NF-κB Activation. 74th Scientific Sessions of the American Diabetes Association, San Francisco, USA, 2014.6

藤城緑, 迫田秀之, 山本屋武, 中津祐介, 福嶋俊明, 松永泰花, 浅野知一郎, 櫛山暁史, 西村英紀: キサンチンオキシターゼ阻害剤 Febuxostat による NASH 改善作用の検討. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会, 大阪, 2014.5

藤城緑, 迫田秀之, 中津祐介, 大谷裕一郎, 大久保博史, 浅野知一郎, 岩下未咲, 西村英紀, 櫛山暁史, 菊池貴子: 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に対するクエン酸モサプリド投与の効果. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 熊本, 2013.5

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 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：  
出願年月日：  
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  
藤城 緑 (FUJISHIRO Midori)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：50420211

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：