

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591359

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答における甲状腺ホルモン受容体の作用の解明

研究課題名(英文) Impaired oxidative endoplasmic reticulum stress response caused by deficiency of thyroid hormone receptor

研究代表者

古屋 文彦 (FURUYA, Fumihiko)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：90456450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：TR^{0/0}マウスの初代培養膵細胞においても、palmitate負荷によってROSの著明な増加を認めた。高脂肪食で飼育したTR^{0/0}マウスの膵島は縮小しており、膵細胞数の減少、免疫染色ではTUNEL陽性の膵細胞の増加がみられた。また、ATF4の発現を認めず、酸化ストレスマーカーである8-hydroxydeoxyguanosineの発現を認めた。内因性TRはATF4の発現に関わっており、ERストレス下にある膵細胞において抗アポトーシス作用を有し、膵細胞の生存に重要な働きを有していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In control adenovirus-infected pancreatic β -cells, palmitate enhanced the expression of ATF4 and heme oxygenase 1, which facilitates adaptation to oxidative ER stress. However, in AdshTR^{0/0}-infected pancreatic β -cells, palmitate did not induce ATF4-mediated integrated stress response, and oxidative stress-associated apoptotic cell death was significantly enhanced. TR^{0/0}-deficient mice or WT were fed a HFD for 30 weeks, and the effect of oxidative ER stress on pancreatic β -cells was analyzed. HFD-treated TR^{0/0}-deficient mice had high blood glucose levels and low plasma insulin levels. In HFD-treated TR^{0/0}-deficient mice, ATF4 was not induced, and apoptosis was enhanced compared with HFD-treated WT mice. These results indicate that endogenous TR plays an important role for the expression of ATF4 and facilitates reduced apoptosis in pancreatic β -cells under ER stress.

研究分野：内分泌

キーワード：内分泌

1. 研究開始当初の背景

膵細胞は、血中グルコース濃度(血糖値)の増加に応じて、インスリンを産生・分泌するため、高血糖状態では、大量のインスリンの産生が要求され、細胞内で蛋白質を生成する小胞体の処理能力を上回るほどの状態に陥ってしまうことがある。こうしたバランスの崩れた小胞体ストレスの状態になると、細胞は小胞体ストレス応答(unfolded protein response: UPR)という細胞内情報伝達経路を活性化させる。当初、UPRは蛋白質の容量増加を促し、小胞体ストレスの軽減と恒常性の維持に働くが、小胞体ストレスの状態が続くと、UPRシステムは恒常性維持からアポトーシスの促進へと方向性を転換させる。

肥満・運動不足は末梢組織でのインスリン抵抗性を上昇させることが知られている。インスリン抵抗性となった場合には、グルコースを組織に取り込ませるように、膵細胞は更に高いレベルのインスリンを産生する必要が生じる。このようなインスリン抵抗性の患者では、当初あった半数ほどの膵細胞が機能不全や細胞死に陥り、その後インスリン欠乏の状態となることがあると報告されている。2型糖尿病の患者では、症状の進行とともに細胞が慢性的な小胞体ストレスにさらされており、アポトーシスのリスクが上昇し、糖尿病悪化の原因となると考えられている。

甲状腺ホルモン受容体(TR)には α と β のサブユニットが存在する、核内ホルモン受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性の転写因子である。TR遺伝子変異は、甲状腺ホルモン不応症(RTH)の病態を呈することが知られている。我々はRTH患者家系から同定されたTR遺伝子の点変異をCre-LoxP systemを用い遺伝子導入した変異TR α (PV)マウス、変異TR β (PV)マウスを作成し(3)、PVマウスにおいて甲状腺濾胞癌の発癌や、PI3K経路の活性化が誘導されることを報告してきた。さらに、PVマウスではPPAR α 発現

の低下に伴い、褐色脂肪・白色脂肪の著しい形勢不全が見られることがわかった。また、PVマウスでは、甲状腺や肝臓において細胞周期制御因子の一つであるPTTGの蛋白質レベルでの発現増加に伴い、細胞周期や細胞増殖に異常が見られていた。このようにdominant negativeなTR変異マウス(PVおよびPVマウス)において、膵臓、肝臓などの臓器の形成異常が見られ、TRの中胚葉由来臓器の形成、形態維持に作用すると考えられている。

2. 研究の目的

甲状腺ホルモンは、細胞の核内に存在する甲状腺ホルモン受容体を介して作用を示し、恒温動物における熱産生や細胞の基礎代謝促進、分化、発達に關与する重要な役割を有している。我々はこれまで、甲状腺ホルモン受容体(TR) α が甲状腺ホルモン依存性に膵 β 細胞増殖を促進させることを報告してきた。すなわち、TR α は膵 β 細胞の生存に重要な働きを有していると考えられる。

2型糖尿病の膵 β 細胞はインスリンを過剰に産生しており、小胞体(ER)ストレスの状況下にある。この状態が長期間に及ぶと、ERストレス応答の破綻からアポトーシスが誘導され、さらなる膵 β 細胞数の減少とインスリン分泌能の低下を招く。ERストレスを介した膵 β 細胞の減少を抑制することは、糖尿病の治療戦略において重要なものである。

今回我々は主要なERストレスシグナリングであるPERK、eIF2 α 、ATF4の経路に注目し、内因性TR α が膵 β 細胞において示す抗アポトーシス作用の検討を行った。

3. 研究の方法

膵 β 株化細胞であるMIN6細胞に、TR α に対するshRNA発現アデノウイルスベクター(AdshTR α)を感染させTR α をノックダウンし、対照としてAdLacZを感染させたMIN6細胞を用

いた。ER ストレスや酸化ストレスを惹起させる作用のある palmitate を添加し、24 時間後に TUNEL assay を用いて誘導されるアポトーシスを解析した。ER ストレス応答性の転写因子の発現をリアルタイム PCR 法、western blotting 法を用いて検討し、フローサイトメトリーを用いて活性酸素種 (ROS) を測定した。同様に TR α ノックアウト (TR α 0/0) マウスから抽出した初代培養膵 β 細胞に palmitate を添加し、誘導されるアポトーシスを解析した。さらに TR α 0/0 マウスの初代培養膵 β 細胞に対して AdATF4 を感染させ ATF4 の強制発現を行い、palmitate 負荷によって誘導される ROS を測定した。

野生型 (WT) マウス及び TR 0/0 マウスを 30 週間高脂肪食で飼育し、随時血糖値と血中インスリン濃度を経時的に測定した。マウスの膵臓の免疫組織学的解析を行い、アポトーシス関連蛋白の発現を検討した。

4. 研究成果

AdshTR α 感染 MIN6 細胞では、palmitate 負荷によって対象の 3.5 倍の TUNEL 陽性細胞を認め、アポトーシスが誘導されていることが確認された。リアルタイム PCR 法、western blotting 法にて palmitate によって PERK、リン酸化 eIF2 α の増加がみられたが、ATF4 の発現を認めなかった。また、その下流で制御されている抗酸化ストレス蛋白である hemo oxygenase-1 の低下と、cleaved caspase3 の上昇を認めた。TR α 0/0 マウスの初代培養膵 β 細胞においても、palmitate 負荷によって ROS の著明な増加を認めた。AdshTR α を感染させることで palmitate による ROS の増加が抑制された。

高脂肪食で飼育した TR α 0/0 マウスでは、高脂肪食で飼育した WT マウスに対して随時血糖値の上昇と血中インスリン濃度の低下を認め、腹腔内糖負荷試験においては有意な血糖値上昇と内因性インスリン分泌の低下を認めた。高脂肪食で飼育した TR α 0/0 マウスの膵島は

縮小しており、膵 β 細胞数の減少、免疫染色では TUNEL 陽性の膵細胞の増加がみられた。また、ATF4 の発現を認めず、酸化ストレスマーカーである 8-hydroxydeoxyguanosine の発現を認めた。

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 6 件)

1. Furuya F, Shimura H, Takahashi K, Akiyama D, Motosugi A, Ikegishi Y, Haraguchi K, Kobayashi T Skin autofluorescence is a predictor of cardiovascular disease in chronic kidney disease patients. Therapeutic Apheresis and Dialysis. (in press) 2015 査読有
2. Aida K, Saitoh S, Nishida Y, Yokota S, Ohno S, Mao X, Akiyama D, Tanaka S, Awata T, Shimada A, Oikawa Y, Shimura H, Furuya F, Takizawa S, Ichijo M, Ichijo S, Itakura J, Fujii H, Hashiguchi A, Takasawa S, Endo T, Kobayashi T. Distinct cell clusters touching islet cells induce islet cell replication in association with over-expression of Regenerating Gene (REG) protein in fulminant type 1 diabetes. PLoS One. 2014 Apr 23;9(4) 査読有
3. Takahashi K, Furuya F, Shimura H, Kaneshige M, Kobayashi T. Impaired oxidative endoplasmic reticulum stress response caused by deficiency of thyroid hormone receptor α . J Biol Chem. 2014 May 2;289(18):12485-93. 査読有
4. Furuya F, Shimura H, Yokomichi H, Takahashi K, Akiyama D, Asakawa C, Okamura A, Motosugi A, Haraguchi K, Yamagata Z, Kobayashi T. Neutrophil

gelatinase-associated lipocalin levels associated with cardiovascular disease in chronic kidney disease patients. Clin Exp Nephrol. 2013 Dec 12. 査読有

5. Furuya F, Shimura H, Asami K, Ichijo S, Takahashi K, Endo T, Kobayashi T. Ligand-Bound Thyroid Hormone Receptor Contributes to Reprogramming of Pancreatic Acinar Cells Into Insulin-Producing Cells. J Biol Chem. 2013 May 31;288(22):16155-66 査読有

6. Shimura H, Itoh K, Sugiyama A, Ichijo S, Ichijo M, Furuya F, Nakamura Y, Kitahara K, Kobayashi K, Yukawa Y, Kobayashi T. Absorption of radionuclides from the Fukushima nuclear accident by a novel algal strain. PLoS One. 2012;7(9):e44200.

(学会発表) (計 9 件)

1. Furuya F, Takahashi K, Shimura H, Ichizyo S, Kobayashi T, Ligand-bound thyroid hormone receptor B induces cancer cell cycle arrest. The endocrine society's annual meeting and expo, ENDO2014, Chicago, USA.

8. Takahashi K, Furuya F, Shimura H, Impaired oxidative endoplasmic reticulum stress caused by deficiency of thyroid hormone receptor α . The endocrine society's annual meeting and expo, ENDO2014, Chicago, USA.

3. Shimura H, Miyazaki A, Taki K, Furuya F, Ohta K, Ikeda M, Haraguchi K, Endo T, Takusagawa M, Ozaki Y, Suzuki S, Fukunari N, Kitaoka M, Kobayashi T, B-Mode Ultrasonography Is A Predictor of

Progression to Thyroid Dysfunction: A Prospective. The endocrine society's annual meeting and expo, ENDO2014, Chicago, USA.

4. Ichijo M, Shimura H, Furuya F, Ichijo S, Tanaka S, Takizawa S, Aida K, Endo T, Kobayashi T. Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis via IFN- γ production in pancreatic β -cells. The endocrine society's annual meeting and expo, ENDO2013, San Francisco, USA.

5. Furuya F, Shimura H, Ichijo S, Ichijo M, Hayashi Y, Kobayashi T. Ligand-bound thyroid hormone receptor contributes to reprogramming of pancreatic acinar cells. The endocrine society's annual meeting and expo, ENDO2013, San Francisco, USA.

6. Ichijo S, Furuya F, Ichijo M, Shimura H, Hayashi Y, Kobayashi T. Liganded-thyroid hormone receptor β induce anaplastic thyroid cancer cell death via activation of the RhoB signaling pathway. The endocrine society's annual meeting and expo, ENDO2013, San Francisco, USA.

7. Watanabe M, Furuya F, Kobayashi T. DPP-4 inhibitor vildagliptin reduces urinary albumin excretion in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. 15th International Congress of Endocrinology. 2012, Florence, Italy.

8. Furuya F, Shimura H, Endo T, Kobayashi T. Ligand bound-thyroid hormone receptor contributes to reprogramming of pancreatic exocrine cells to insulin-producing cells via induction of Ngn3 and MafA. 15th

International Congress of Endocrinology.
2012, Florence, Italy.

9. Okamura A, Furuya F, Akiyama D, Shimura H, Motosugi A, Haraguchi K, Kobayashi T. Association of cardio-ankle vascular index with diabetes mellitus-related peripheral arterial disease in chronic hemodialysis patients. 15th International Congress of Endocrinology. 2012, Florence, Italy.

6. 研究組織

(1)研究代表者

古屋 文彦 (FURUYA Fumihiko)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号: 90456450

(2)研究分担者

金重 勝博 (KANESHIGE Masahiro)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号: 20377518

(3)研究分担者

小林 哲郎 (KOBAYASHI Tetsuro)

公益財団法人冲中記念成人病研究所・研究

室・研究員 研究者番号: 30113442

(4)研究分担者

志村 浩己 (SHIMURA Hiroki)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40303416