

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790306

研究課題名(和文)肥満が引き起こす膵細胞障害におけるKeap1-Nrf2システムの役割

研究課題名(英文)The role of Keap1-Nrf2 system in obesity-induced pancreatic beta-cell dysfunctions

研究代表者

宇留野 晃 (URUNO, Akira)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90396474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：Keap1-Nrf2システムは、酸化ストレスなどの環境ストレスを処理するために重要な生体防御機構の一つである。糖尿病は重篤な合併症を引き起こす社会的にも重要な代謝疾患であるが、その発症や進行において膵細胞の保護は重要である。Keap1-Nrf2システムを活性化したモデルマウスは、肥満型糖尿病モデルマウスにおける膵細胞障害をほぼ完全に抑制した。また、肥満型糖尿病モデルマウスから単離した膵ランゲルハンス島でNrf2を活性化すると抗酸化酵素が誘導された。以上よりKeap1-Nrf2システムの活性化は肥満による膵細胞障害のよい治療標的になりうる事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The Keap1-Nrf2 system contributes to protect against environmental stress including oxidative stress. Diabetes mellitus is a metabolic disorder with severe complications, and the protection from pancreatic beta-cell dysfunction is important for the suppression of onset and progression of diabetes mellitus. Activation Keap1-Nrf2 system strongly suppressed pancreatic beta-cell dysfunction in obesity-induced diabetic model mice. Nrf2 activation induced antioxidant genes in isolated islets from obesity-induced diabetic model mice. These results indicate that the Keap1-Nrf2 system probably is a target for the protection of pancreatic beta-cells against obesity-induced dysfunctions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：膵細胞 糖尿病 酸化ストレス Keap1-Nrf2システム

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は失明や腎不全など重篤な合併症を引き起こす重要な疾患である。我が国においても、国民の生活パターンの変化などから患者数は増加しており、その病態の解明は重要な課題である。血糖降下ホルモンであるインスリンは膵β細胞で産生されているが、免疫学的な機序による膵β細胞破壊が原因とされる1型糖尿病と異なり、2型糖尿病は肥満などの生活習慣に引き続き発症する疾患であり、膵β細胞数も大幅に減少していることが病理組織学的検索により解明され

(Butler AE, et al. 2003)、2型糖尿病の発症および進行における膵β細胞障害の重要である。2型糖尿病は我が国における糖尿病の大半を占めることから、その発症および進行のコントロールは、国民の健康増進に大きく貢献できると考えている。近年の検診の強化により、早期発見が可能となった。しかし、残念ながら、多くの2型糖尿病の発症と進行において重要な膵β細胞障害がどのような酸化ストレス防御機構を持つのか十分に解明されていない。肥満が引き起こす膵β細胞障害に対する予防介入の方法が確立できれば、効果的に糖尿病の発症と進行を防ぐことが可能になると考えられる。転写因子 Nrf2 は酸化ストレスに対する生体防御の鍵分子であり、多くの抗酸化酵素の発現誘導を統合的に制御している。Nrf2 遺伝子欠失マウスは酸化ストレスに弱い表現型を示す。Nrf2 は非ストレス時には転写制御因子 Keap1 に結合してタンパク分解を受けることでその活性が抑制されているが、細胞がストレスに曝されると Keap1 タンパク質が修飾されることで Nrf2 分解が抑制されることで活性化して標的遺伝子群を発現誘導する。この一連の酸化ストレス応答制御を Keap1-Nrf2 システムと呼んでいる。

Keap1-Nrf2 システムが肥満による糖尿病の膵β細胞障害を予防できれば、新たな糖尿病の治療標的になりうることから、この効果の解明を目指した。

2. 研究の目的

肥満に伴う膵β細胞障害における Keap1-Nrf2 システムの役割を解明し、糖尿病の発症予防や治療における重要性を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 全身性 Nrf2 活性化モデルマウスである Keap1^{fllox/-}マウスと肥満型糖尿病モデルマウスである db/db マウスを交配し、db/db::Keap1^{fllox/-}マウスを作出した。

(2) db/db::Keap1^{fllox/-}マウスに対して、血糖値の測定、ブドウ糖負荷試験を行ない、糖尿病の評価とインスリン分泌能の評価を行った。

(3) db/db::Keap1^{fllox/-}マウスから摘出した膵臓のインスリン免疫染色により膵β細胞障害の程度を病理学的に解析した。

4. 研究成果

(1) Nrf2 活性化モデル Keap1^{fllox/-}マウスと肥満型糖尿病モデル db/db マウスの交配で得られた db/db::Keap1^{fllox/-}マウスは、対照群である db/db::Keap1^{fllox/+}マウスと比較して、ブドウ糖代謝に関連した各種臓器で Nrf2 の標的遺伝子である Nqo1 遺伝子の発現誘導を認めたことから、Nrf2 転写活性の増加モデルであることが確認された。

(2) db/db::Keap1^{fllox/-}マウスに対して、自由接触下における血糖値の測定を反復して行なった。対照群である db/db::Keap1^{fllox/+}マウスでは、成長とともに血糖値は平均値で 600 mg/dL 以上に上昇したが、db/db::Keap1^{fllox/-}マウスでは血糖値は平均値で 200 mg/dL 前後で推移し、糖尿病の発症がほぼ完全に抑制された。経口ブドウ糖負荷試験を行なったところ、対照群である db/db::Keap1^{fllox/+}マウスでは著しい高血糖を認めたが、db/db::Keap1^{fllox/-}マウスでは高血糖は認めなかった。また、db/db::Keap1^{fllox/+}マウスではブドウ糖負荷に対するインスリン分泌の応答が消失していたが、db/db::Keap1^{fllox/-}マウスではインスリン分泌の著明な応答を認めた。

(3) db/db::Keap1^{fllox/-}マウスの膵臓のインスリン免疫染色を行なったところ、対照群である db/db::Keap1^{fllox/+}マウスではインスリン陽性面積の著明な低下を認めたが、db/db::Keap1^{fllox/-}マウスではインスリン陽性領域の低下は認めなかった。

以上の研究結果をまとめると、Keap1-Nrf2 システムの活性化は肥満型糖尿病における膵β細胞障害を防ぎ、糖尿病の発症を抑制することが明らかとなった。

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7件)

1. Matsuda K, Uruno A, Kogure N, Sugawara K, Shimada H, Nezu M, Saito-Ito T, Iki Y, Kudo M, Shimizu K, Sato I, Yoshikawa T, Satoh F, Ito R, Yokoyama A, Rainey WE,

- Saito-Hakoda A, Ito S, and Sugawara A. Angiotensin II receptor blockers differentially affect *CYP11B2* expression in human adrenal H295R cells. *Mol Cell Endocrinol* 383, 60-68 (2014). doi: 10.1016/j.mce.2013.12.004. 査読有り
2. Yagishita Y, Fukutomi T, Sugawara A, Kawamura H, Takahashi T, Pi J, **Uruno A***, and **Yamamoto M***. Nrf2 Protects Pancreatic β -Cells from Oxidative and Nitrosative Stress in Diabetic Model Mice. *Diabetes* 63, 605-618 (2014). doi: 10.2337/db13-0909. (* Corresponding authors) 査読有り
 3. Kudo M, Matsuda K, Sugawara K, Iki Y, Kogure N, Saito-Ito T, Shimizu K, Sato I, Yoshikawa T, **Uruno A**, Yokoyama A, Saito-Hakoda A, Ito S, and Sugawara A. ARB affects nicotine-induced gene expression profile in human coronary artery endothelial cells. *World J Hypertens* 4, 7-14 (2014). doi: 10.5494/wjh.v4.i1.7. 査読有り
 4. **Uruno A**, Furusawa Y, Yagishita Y, Fukutomi T, Muramatsu H, Negishi T, Sugawara A, Kensler TW, **Yamamoto M**. The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus. *Mol Cell Biol* 33, 2996-3010 (2013). doi: 10.1128/MCB.00225-13. 査読有り
 5. **宇留野晃**: Keap1-Nrf2 システムによる膵 β 細胞保護作用
日本応用酵素協会誌 48:68-69, 2013
<http://www.mt-pharma.co.jp/jfae/>
査読無し
 6. **宇留野晃**: 糖尿病発症における酸化ストレスの役割
日本応用酵素協会誌 47:72-72, 2012
<http://www.mt-pharma.co.jp/jfae/>
査読無し
 7. Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y, Miki Y, Suzuki S, Sugawara S, Watanabe M, Sakurada A, Endo C, **Uruno A**, Sasano H, Nakagawa T, Satoh K, Tanaka N, Kubo H, Motohashi H, **Yamamoto M**. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2012;103(4):760-6. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02216.x. 査読有り
- [学会発表] (計 16 件)
1. Yagishita Y, Fukutomi T, Sugawara A, Pi J, **Uruno A**, **Yamamoto M**. Nrf2 protects pancreatic β -cells from oxidative and nitrosative stress in diabetic model mice. The Environmental Response IV (Oral presentation of selected poster session). March 1st, 2014, Sendai.
 2. **Uruno A**, Furusawa Y, Yagishita Y, Fukutomi T, Muramatsu H, Negishi T, Sugawara A, Kensler TW, **Yamamoto M**. The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus. The Environmental Response IV. February 28th, 2014, Sendai.
 3. 柳下陽子、**宇留野晃**、福富俊明、菅原明、川村仁、高橋哲、**山本雅之**: Keap1-Nrf2 システムによる膵 β 細胞保護作用 日本生化学会東北支部 第 79 回例会 2013 年 5 月 11 日 仙台
 4. 箱田明子、**宇留野晃**、清水恭子、伊藤貴子、壹岐裕子、吉川雄朗、松田謙、工藤正孝、影近弘之、岩崎泰正、伊藤貞嘉、菅原明: 種々のレチノイド X 受容体 (RXR) アゴニストは、AtT20 細胞の増殖・アポトーシス・POMC 発現・ACTH 分泌に異なる影響を及ぼす 第 86 回日本内分泌学会学術総会 2013 年 4 月 27 日 仙台
 5. 壹岐裕子、工藤正孝、伊藤貴子、菅原香織、松田謙、小暮直敬、皆川敬治、勝木将人、佐藤郁子、**宇留野晃**、清水恭子、吉川雄朗、箱田明子、伊藤貞嘉、菅原明: ニコチンのヒト冠動脈血管内皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響ならびにそれに対する ARB の効果 第 86 回日本内分泌学会学術総会 2013 年 4 月 26 日 仙台
 6. 菅原香織、伊藤貴子、小暮直敬、皆川敬治、壹岐裕子、勝木将人、**宇留野晃**、佐藤郁子、田中智博、太田翔、木谷優介、塚田晃也、大熊崇生、角田亮、清水恭子、工藤正孝、松田謙、箱田明子、伊藤貞嘉、菅原明: 高血糖刺激はヒト副腎 H295R 細胞における 11β -水酸化酵素遺伝子 (*CYP11B1*) 発現を誘導する 第 86 回日本内分泌学会学術総会 2013 年 4 月 25 日 仙台
 7. 小暮直敬、伊藤貴子、菅原香織、松田謙、壹岐裕子、佐藤郁子、皆川敬治、勝木将人、清水恭子、吉川雄朗、工藤正孝、**宇留野晃**、箱田明子、伊藤貞嘉、菅原明: 高血糖刺激は副腎アルドステロン合成酵素の発現を T 型 Ca チャネルの発現増加を介して誘導する 第 86 回日本内分泌学会学術総会 2013 年 4 月 25 日 仙台
 8. Saito-Hakoda A, **Uruno A**, Shimizu K, Kudo M, Saito-Ito T, Yoshikawa T, Matsuda K, Fujiwara I, Kagechika H, Iwasaki Y, Ito S, Sugawara A. Retinoid X receptor agonists differentially affect proliferation, apoptosis, and ACTH

secretion/POMC gene expression in AtT20 corticotroph cells.
The Endocrine Society 94th Annual Meeting.
June 23, 2012, Houston, USA.

9. Matsuda K, **Uruno A**, Saito-Ito T, Shimizu K, Kudo M, Satoh F, Yoshikawa T, Saito-Hakoda A, Ito S, Sugawara A. Telmisartan stimulates aldosterone synthase gene (*CYP11B2*) expression via the CaMK-mediated induction of NURR1. The Endocrine Society 94th Annual Meeting. June 23, 2012, Houston, USA.
10. Saito-Ito T, Matsuda K, **Uruno A**, Shimizu K, Nakamura M, Takahashi R, Yoshikawa T, Kudo M, Saito-Hakoda A, Ito S, Sugawara A. High-glucose stimulates aldosterone synthase gene (*CYP11B2*) expression in human adrenal H295R cells. The Endocrine Society 94th Annual Meeting. June 23, 2012, Houston, USA.
11. **宇留野晃**, 箱田明子, 松田謙, 清水恭子, 伊藤貴子, 工藤正孝, 岩崎泰正, 伊藤貞嘉, 菅原明: レチノイン酸受容体 (RAR) α は NeuroD1・Tpit を介して POMC 遺伝子発現を亢進する 第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012 年 4 月 21 日 名古屋
12. **宇留野晃**, 松田謙, 吉川雄朗, 箱田明子, 伊藤貞嘉, 岡本宏, 菅原明: 全トランスレチノイン酸 (ATRA) と合成レチノイド Am80 は、血球・血管内皮間接着ならびに血球表面 CD38 発現に異なる影響を及ぼす 第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012 年 4 月 21 日 名古屋
13. 松田謙, **宇留野晃**, 伊藤貴子, 清水恭子, 吉川雄朗, 箱田明子, 工藤正孝, 佐藤文俊, 伊藤貞嘉, 菅原明: 各アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) はアルドステロン合成酵素 (*CYP11B2*) 発現に異なる影響を及ぼす (第二報) 第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012 年 4 月 21 日 名古屋
14. 工藤正孝, 松田謙, 箱田明子, 伊藤貴子, 清水恭子, 佐藤文俊, **宇留野晃**, 伊藤貞嘉, 菅原明: GLP-1 受容体アゴニストの冠動脈血管内皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響の検討 第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012 年 4 月 20 日 名古屋
15. 松田謙, **宇留野晃**, 伊藤貴子, 清水恭子, 工藤正孝, 箱田明子, 吉川雄朗, 佐藤文俊, 伊藤貞嘉, 菅原明: アルドステロン合成酵素および 11β -水酸化酵素転写解析系として使用可能な新規安定株の作製 第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012 年 4 月 20 日 名古屋
16. 松田謙, 伊藤貴子, **宇留野晃**, 中村美輝, 高橋朗, 吉川雄朗, 清水恭子, 箱田明子, 工藤正孝, 佐藤文俊, 伊藤貞嘉, 菅原明: 高血糖刺激によるアルドステロン合成酵素 (*CYP11B2*) の発現増強効果 第 85 回日本

内分泌学会学術総会 2012 年 4 月 20 日
名古屋

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: Nrf2 活性化のバイオマーカー
発明者: **山本雅之**、**宇留野晃**、古澤祐樹
権利者: 国立大学法人東北大学
持田製薬株式会社

種類: 特許
番号: 特願 2013-112877
出願年月日: 2013 年 5 月 29 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 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
<http://www.dmbc.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇留野 晃 (URUNO AKIRA)
東北大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 90396474

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

山本 雅之 (YAMAMOTO MASAYUKI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 50166823