

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：30111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860064

研究課題名(和文)細胞膜メタロプロテアーゼADAMによるインスリン情報伝達系制御機構の解明

研究課題名(英文)Study on the role of metalloprotease ADAM in insulin signaling

研究代表者

高栗 郷 (Takaguri, Akira)

北海道薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90623710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋におけるインスリン抵抗性は、2型糖尿病発症の主な原因である。我々は、L6骨格筋細胞のインスリン情報伝達に対する細胞膜メタロプロテアーゼADAMの役割について検討した。インターロイキン-1は、ERK/NF BおよびJNK/AP-1経路を介して、ADAM17の発現を増加させることを明らかにした。さらに、ADAM17を一過性に過剰発現させた後、エンドセリン(ET)-1を処理すると、インスリンによるIRS-1のチロシンリン酸化およびAktのリン酸化が顕著に抑制されることを明らかにした。以上の結果は、ADAM17がET-1によるインスリン伝達抑制に重要な役割を果たすことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Insulin resistance on skeletal muscle cells contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes. In this study, we examined the role of a disintegrin and metalloprotease ADAM17 on insulin signal transduction in L6 myotubes. Interleukin-1 increases ADAM17 expression through the ERK/NF B and JNK/AP-1 signaling pathways. We also observed that endothelin-1 significantly inhibited insulin-induced IRS-1 tyrosine phosphorylation and Akt phosphorylation when ADAM17 were over-expressed. These results suggest that ADAM17 expression plays a pivotal role in ET-1-impaired insulin signal transduction in L6 myotubes.

研究分野：薬理学

キーワード：ADAM17 Insulin signaling Interleukin-1 Endothelin-1 Insulin resistance Skeletal muscle cells

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化やライフスタイルの変化により、国内の糖尿病患者数は、予備軍も含めると推定 2,000 万人以上にもなる。骨格筋および脂肪細胞でのインスリン伝達障害、すなわちインスリン抵抗性は、2 型糖尿病発症の主な原因である。

インスリンが受容体に結合すると、受容体のチロシンリン酸化が惹起されることで、インスリン受容体基質 (IRS-1) のチロシン残基がリン酸化され、続く PI3 キナーゼおよび Akt が次々と活性化され、最終的に glucose transporter 4 (GLUT4) が細胞質から細胞膜へと移行する。その結果、GLUT4 の細胞膜融合が起こり、血中からグルコースが取込まれる。これらのシグナルのいずれかに障害が起こると、インスリン抵抗性が惹起される。とりわけ、最大の臓器である骨格筋におけるグルコースの取込みは、糖代謝調節において非常に重要であり、骨格筋におけるインスリン抵抗性は、2 型糖尿病発症に深く関与している。

これまでの報告から、tumor necrosis factor (TNF)- α や interleukin (IL)-1 などのサイトカインが、自身の受容体を介して、ERK や JNK を活性化することで、IRS-1 のセリンリン酸化を引き起こすことが知られており、これがチロシンリン酸化に対してネガティブフィードバックとして働き、下流シグナルが抑制される。我々は、TNF- α による IRS-1 の 636/639 のセリンリン酸化が、インスリン作用を減弱させることを見出した (Shibata T et al., *J Pharmacol Sci.*, 122(2): 93-102, (2013))。その結果、GLUT4 の細胞膜への移行が抑制され、インスリン抵抗性の発現に繋がると考えられている。

A disintegrin and metalloprotease (ADAM) は、切断活性をもつ細胞膜メタロプロテアーゼであり、さまざまな前駆体リガンドの細胞外ドメインを切断し、成熟体を生成し、多様な細胞応答を引き起こす。我々は、これまでに動脈硬化に関わる血管平滑筋における ADAM17 の役割を *in vitro*、*in vivo* で明らかにしてきた (Takaguri A et al., *Hypertension.*, 57(4):841-845 (2011); Takaguri A et al., *J Mol Cell Cardiol.*, 50(3):545-551, (2011))。その他、これまでにがん、アルツハイマー病などさまざまな疾患の発症に ADAM が関与することが報告されている。しかしながら、骨格筋のインスリン情報伝達における ADAM17 の役割について、これまで報告はない。元々、ADAM17 は、TNF- α

前駆体を切断するタンパク質として同定されたことから、我々は、ADAM17 の発現増加および活性化によりインスリン情報伝達が抑制されると考えた。

よって、本研究では、骨格筋におけるインスリンシグナル伝達に対する ADAM17 の役割とその発現調節機構を検討し、インスリン抵抗性の新たな発症機序の解明を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、L6 骨格筋細胞を用いて、インスリンシグナル伝達に対する ADAM17 の役割について明らかにするため、以下の 3 つの項目について検討を行った。

- (1) IL-1 による ADAM17 の発現調節メカニズムについて
- (2) ADAM17 の発現増加がインスリンシグナル伝達に及ぼす影響について
- (3) G タンパク質共役型受容体アゴニスト、エンドセリン (ET-1) によるインスリンシグナル伝達抑制への ADAM17 の関与について

3. 研究の方法

上記の 3 つの目的を達成するため、以下の方法を用い検討を行った。

- (1) 2 型糖尿病患者において、血中 IL-1 濃度が上昇することが報告されている。そこで我々は、骨格筋において、IL-1 α および IL-1 β が ADAM9、ADAM15、ADAM17 および ADAM19 の発現に与える影響をリアルタイム PCR およびウエスタンブロッティングにより検討した。また、各種阻害剤を用いて、IL-1 による ADAM の発現メカニズムを検討した。
- (2) ワイルドタイプの ADAM17 を組込んだアデノウイルスを作製し、一過性に ADAM17 を過剰発現させた L6 骨格筋細胞におけるインスリンシグナル伝達について、インスリンによる Akt のリン酸化を指標に検討した。
- (3) ET-1 によるインスリンシグナル伝達への作用が ADAM17 の発現増加によって引き起こされる影響を、一過性に ADAM17 を過剰発現させた後、ET-1 を処理し、インスリンによる IRS-1 のチロシンリン酸化および Akt のリン酸化を指標に検討した。また、IL-1 による ADAM17 発現増加を shADAM17 によるノックダウンにより抑制し、ET-1 によるインスリンシグナル伝達抑制に ADAM17 が関与しているのかを検討した。

4. 研究成果

(1) L6 骨格筋細胞において、IL-1 は、ERK/NF κ B と JNK/AP-1 経路を介して ADAM17 の発現を増加させる。

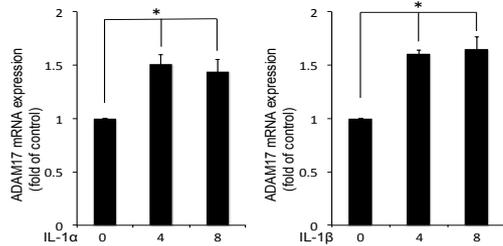


図 ADAM17 mRNA 発現に対する IL-1 α および IL-1 β の影響

L6 骨格筋細胞において、IL-1 α および IL-1 β を 24 時間処理すると ADAM17 の発現増加が mRNA およびタンパク質レベルで観察された。しかしながら、他のユビキタスに発現している ADAM9、ADAM15 および ADAM19 については、IL-1 による影響は認められなかった。IL-1 による ADAM17 発現に関わる分子を同定するため、各種 MAPK 阻害剤を前処理したところ、ERK および JNK の活性化が、IL-1 による ADAM17 の発現に重要であることが示唆された。また、転写因子 NF κ B および AP-1 の各阻害剤の前処置は、IL-1 による ADAM17 発現を抑制した。

以上の結果から、IL-1 は、ERK/NF κ B および JNK/AP-1 経路を介して、ADAM17 の発現を増加させることが示唆された。また、これらの結果から、少なくとも ADAM9、ADAM15 および ADAM19 の発現に、IL-1 受容体を介したシグナルは関与しないことが示唆された。また、IL-6 の処理では、ADAM17 の発現には影響しなかったことから、IL-6 受容体を介した STAT シグナルは、ADAM17 の発現には影響しないことが示唆された。

(2) IL-1 α 、あるいは ADAM17 の過剰発現は、インスリンによる Akt のリン酸化に影響しない。

IL-1 α が ADAM17 の発現を増加させた時間

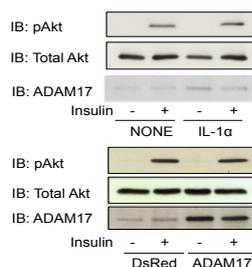


図 インスリンシグナル伝達に対する IL-1 α 処理および ADAM17 の過剰発現の影響

(24 時間) において、インスリンシグナルへ

の影響を検討したところ、IL-1 α の 24 時間処理は、インスリンによる Akt のリン酸化には影響しなかった。また、アデノウイルスを用いて ADAM17 を一過性に過剰発現させた細胞においても、インスリンによる Akt のリン酸化には影響しなかった。

以上の結果から、骨格筋において、ADAM17 の発現増加自体は、インスリンシグナル伝達に影響を及ぼさないことが示唆された。

(3) ADAM17 は、エンドセリン-1 によるインスリンシグナル伝達抑制の仲介分子として機能する。

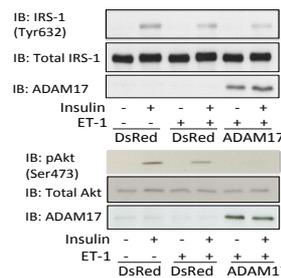


図 エンドセリン-1 によるインスリンシグナル伝達抑制における ADAM17 の役割

GPCR アゴニストであるエンドセリン (ET)-1 は、インスリンシグナル伝達を抑制することが知られている。我々は、同じく GPCR アゴニストであるアンギオテンシン II が、血管平滑筋細胞において ADAM17 を活性化することを見出してきた。これらのことから、ET-1 のインスリンシグナル伝達抑制に、ADAM17 が関与しているのかを検討した。ET-1 を処理すると、インスリンによる IRS-1 のチロシンリン酸化および Akt のリン酸化は部分的に抑制された。興味深いことに、ADAM17 を一過性に過剰発現させた後、ET-1 を処理すると顕著にインスリンシグナル伝達が抑制された。

また、IL-1 による ADAM17 発現が、ET-1 によるインスリンシグナル伝達抑制に関与しているのかを検討した。IL-1 を前処理後、ET-1 を処理するとインスリンによる Akt のリン酸化は抑制された。IL-1 による ADAM17 発現を ADAM17 に対する shRNA アデノウイルスを用いて抑制した結果、ET-1 によって引き起こされる Akt のリン酸化抑制は解除された。

以上の結果より、ET-1 は、ADAM17 を介して、インスリンシグナル伝達を負に制御することが示唆された。

本研究におけるこれらの結果は、ADAM17 を仲介する GPCR アゴニストによる新たなインスリンシグナル伝達抑制機構を提唱するも

のであり、今後、ADAM17を介在するシグナルがどのようにインスリン情報伝達を抑制するのかを明らかにすることで、インスリン抵抗性の新たな発症機序解明に繋がると考えられる

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0件)

[学会発表] (計4件)

- ① 高栗郷、佐藤久美「L6骨格筋細胞のインスリンシグナル伝達におけるADAM17の役割」第88回日本薬理学会年会(2015年3月18日、名古屋)
- ② Akira Takaguri, Kumi Satoh. A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEASE 17, A POTENTIAL MEDIATOR OF INTERLEUKIN-1A DEPENDENT INSULIN RESISTANCE IN L6 RAT SKELETAL MUSCLE CELLS. 10th IDF-WPR and 6th AASD Scientific Meeting 2014(2014年11月22日、シンガポール)
- ③ 高栗郷、佐藤久美「インスリンシグナル伝達に対するADAM17の機能的役割解明」第65回日本薬理学会北部会(2014年9月27日、福島)
- ④ 倉田舞、高栗郷、佐藤久美「サイトカインによるADAMの発現メカニズムの解明」第61回北海道薬学大会(2014年5月25日、札幌)

[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0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

高栗郷 (Takaguri Akira)
北海道薬科大学薬理学分野・准教授
研究者番号：90623710

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：