

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860740

研究課題名(和文)スフィンゴシン-1-リン酸による新規インスリン抵抗性改善機序の解明

研究課題名(英文)The novel mechanism of improving insulin resistance by sphingosine 1-phosphate

研究代表者

蔵野 信 (Kurano, Makoto)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60621745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多機能性生理活性脂質であるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)、およびそのHDL上の輸送体、かつ代謝調節因子であるアポ蛋白M(ApoM)の糖尿病との関連について検討し、マウスにおいては、ApoM、S1Pには肝臓におけるインスリン抵抗性改善作用、および膵細胞からのインスリン分泌促進作用があること、また、脂肪肝、高血糖ではApoM、S1Pが増加することを発見した。本研究より、ApoM、S1Pは糖尿病の新しい検査・治療に応用できる可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the involvement of sphingosine 1-phosphate (S1P), a potent bioactive lipid mediator, and apolipoprotein M (apoM), a carrier and modulator of S1P, in the pathogenesis of diabetes. We found with animal experiments that apoM and S1P exert anti-diabetic properties by improving insulin resistance in liver and promoting insulin secretion from beta-cell. We also observed that both plasma and hepatic contents of apoM and S1P are increased in streptozotocin-induced diabetic mice and mice fed with high fat diet. These results suggest the possibility of applying apoM and S1P into clinical laboratory medicine and therapeutic medicine in the fields of diabetes.

研究分野：代謝学

キーワード：アポ蛋白M スフィンゴシン1-リン酸 インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は、近年、腫瘍学、血管生物学、免疫学、発生学など様々な分野にて注目を集めている細胞膜のスフィンゴ脂質由来の、細胞増殖作用や血管内皮保護作用などを持つ多機能性生理活性脂質であり、疾患との関連においても、循環器疾患、腫瘍性疾患、肝疾患、先天性疾患など多岐にわたる疾患との関連が幅広く報告されている。

そのような疾患の中で、S1Pは糖尿病との関連も深いと考えられる。すなわち、インスリン抵抗性に関する報告はほとんどない。一方、S1Pは、インスリンシグナルの下流にあるAktのリン酸化作用、細胞の増殖促進作用があり、インスリンシグナルと共通する、あるいはインスリンシグナルを増強する性質を持っている可能性がある。

しかし、研究開発当初は、S1Pのインスリン抵抗性に対する直接作用についての報告は皆無であった。その理由の一つとして、インスリン抵抗性の病態形成には、脂肪、肝臓、骨格筋、神経、そして血球といった多臓器間のネットワークが関与するため、in vivoでの検討が必要であるが、S1Pは、生体内で絶えず生成と分解を繰り返しており、外部から生体内に投与しても、速やかに分解されてしまうため、in vivoでの検討が難しい、という点が挙げられる。

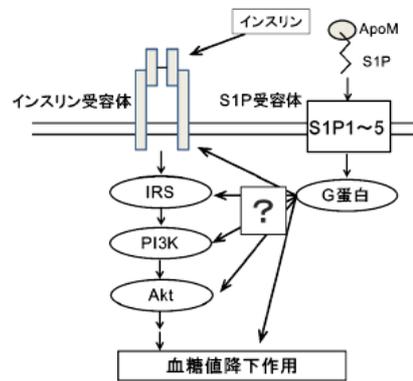
さて、S1Pは、循環血液中では、主にHDL(70%)に結合しているが、HDL上のアポ蛋白M(ApoM)が、S1Pの輸送体として働いている。さらに、研究代表者は、ApoMがS1Pの分解を抑制することにより、体内のS1P送達を増加させることを発見していた。また、一方で、糖尿病に関して、ApoMは、若年発症糖尿病の一つであるMODY3の原因遺伝子であるHNF1の制御を受け、また、疫学研究からもApoMのSNPと糖尿病の関係が複数報告されており、ApoMも糖尿病の病態生理に深くかかわっていることが考えられていたが、その機序は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、以下の2点について検討することにより、ApoM、S1Pの糖代謝における意義を解明することを目的とする。

(1) インスリン抵抗性の病態を形成する各臓器・組織(肝臓、骨格筋、脂肪組織)におけるApoM-S1Pのインスリン抵抗性改善機序、および、その作用機序における各S1P受容体の関わり、を明らかにし、ApoM、S1P、S1P受容体のインスリン抵抗性における役割を解明する(図1)。

(2) 逆に、糖尿病を形成する病態(肝臓への脂肪蓄積、高血糖、低インスリン状態)が、肝臓でのApoMの発現、各臓器におけるS1P代謝へどのような影響があるか、を検討し、ApoM、S1Pの糖代謝異常の病態形成における意義を解明する。



インスリンシグナルとS1Pシグナル

図1 研究目的(仮説)

3. 研究の方法

ApoMの過剰発現が、インスリン抵抗性を改善する機序について、肝臓、骨格筋、脂肪組織といったインスリンの主要な標的臓器を対象にin vivo(糖代謝異常モデルマウスにApoMを過剰発現させる)、in vitro(標的臓器・組織の細胞の細胞株とApoMを過剰発現させたHepG2細胞を共培養させる)の実験系を用いて検討する。

ApoMをshRNAにて抑制した場合、過剰発現した場合と逆の変化がみられるか、検討する。

代謝性ストレス(脂肪酸負荷、高血糖)やインスリンのApoM、S1Pに対する影響をin vivo、in vitroの実験系にて検討し、糖代謝異常の病態形成におけるApoM、S1Pの意義について検討する。

4. 研究成果

ApoM、S1Pのインスリン抵抗性に対する影響については、食事誘導肥満マウス(DIO)マウス、db/dbマウスにApoMをアデノウイルスにて過剰発現させたところ、ともに空腹時血糖、自由摂食下血糖は低下(図2A、B)し、インスリン負荷テストでは、インスリン抵抗性が改善していた(図3A)。

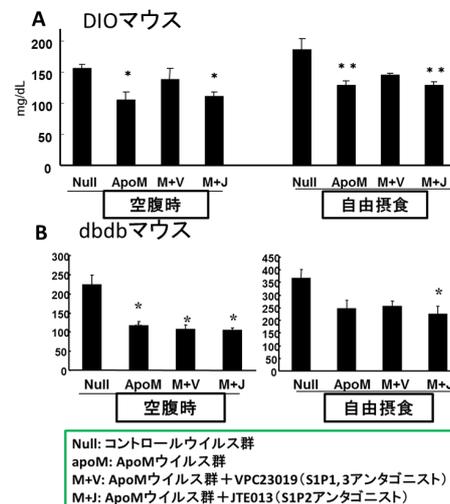


図2 ApoM、S1P アンタゴニストの血糖値に対する影響

一方、VPC23019(S1P1, 3のアンタゴニスト), JTE013(S1P2のアンタゴニスト)などのS1P受容体のアンタゴニストの効果検討では、DIOマウスにて、VPC23019にてApoMの血糖降下作用が部分的に阻害されたが、その他の検討では顕著な効果は見られなかった(図2)。

肝臓、骨格筋、脂肪組織のApoMの影響についても検討した。肝臓ではApoM過剰発現群ではAkt, AmpKのリン酸化が亢進していたが、アゴニストの影響ははっきりとはわからなかった。骨格筋ではAkt, AmpKの変化は見られず、脂肪組織でもインスリンシグナルに関係するタンパクの発現量の変化は認められなかった(図3B, C)(学会発表#1)。

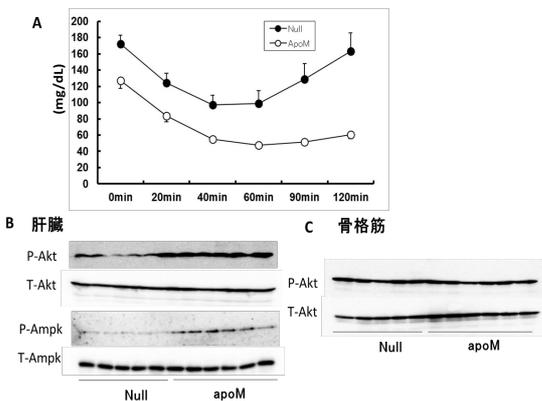


図3 ApoM 過剰発現のインスリン抵抗性に対する影響

また、通常食で飼育した野生型マウスにアデノウイルスを用いてApoMを過剰発現させたところ、インスリン分泌が増強すること、この増強効果は、VPC23019により阻害されることを発見した(図4)。このことは膵細胞株であるmin6細胞を用いたin vitroの実験においても確認しており、*Biochim. Biophys. Acta.* 1841: 1217-1226, 2014.に報告している(雑誌論文#1)。

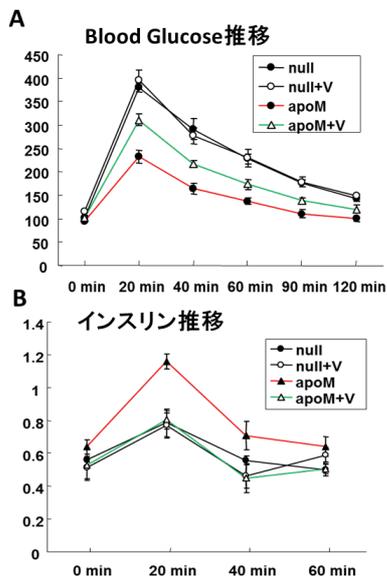


図4 ApoM, S1Pのインスリン分泌に対する影響

一方、HepG2細胞と標的組織の細胞株の共培養系は、HepG2細胞にアデノウイルスを用いてApoMを過剰発現させると、共培養先の細胞にもウイルスが感染することがわかったため、当初の計画通り進まなかった。

ApoMの発現抑制による糖代謝の変化については、shApoMがうまく働かなかったため、in vivo siRNAの手法を用いて検討した。その結果、siApoM群では、空腹時の血糖は変わらなかったが、自由摂食下の血糖の上昇(図5A)、インスリン負荷テストによる血糖低下の減弱が認められた(図5B)。また、肝臓のAkt, AmpKのリン酸化の減弱がみられた(図5C)が、骨格筋、脂肪組織には変化がみられなかった。

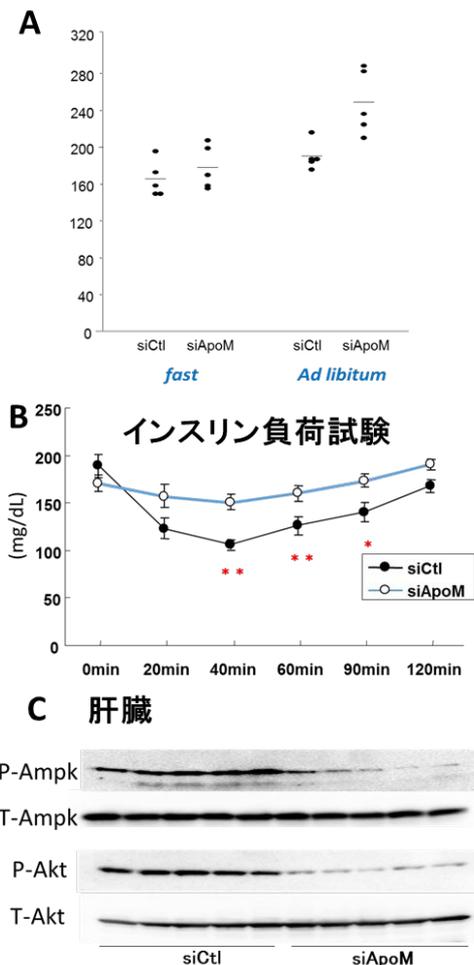


図5 ApoM 発現抑制のインスリン抵抗性に対する影響

代謝性ストレス(脂肪酸負荷、高血糖)やインスリンのApoM, S1Pに対する影響をin vivo, in vitroの実験系を用いて検討した。高血糖モデルマウスであるストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスでは、血漿、肝臓、腎臓S1P, ApoMが増加しており、インスリンの投与により、低下した(図6)。このことはHepG2細胞を用いたin vitroの実験においても確認しており、*J Diabetes Investig.* 2014 Nov;5(6):639-48に報告した(雑誌論文#2)。

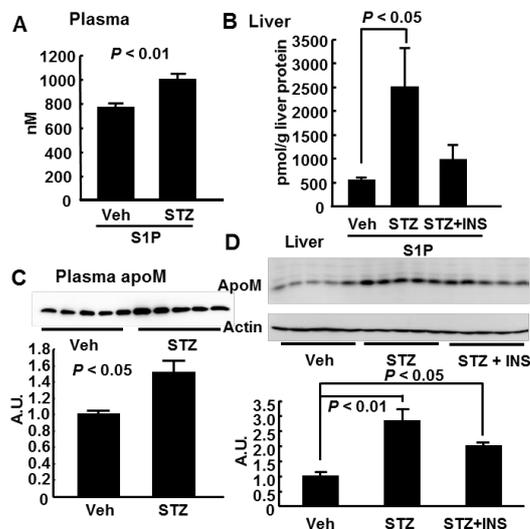


図6 ストレプトゾトシン(STZ)およびインスリン(INS)のApoM, S1P に対する影響

また、マウスに高脂肪食(HF)、高脂肪高コレステロール食(HFHC)、コリンメチオニン欠損食(MCD)を8週間負荷したところ、血漿S1P, ApoMは、HF, HFHC群で増加していた(図7)。この機序として、肝臓のApoMの増加ではなく、LDL受容体の発現低下によるApoM含有リポ蛋白のクリアランスの低下が疑われた(図8)(学会発表#2)。この結果を手掛かりとして、LDL受容体がApoEをリガンドとしてApoM-S1Pをクリアランスするという血漿S1P濃度の制御に関する新しい機序を発見し、*J Biol Chem.* 2015 Jan 23;290(4):2477-88。(雑誌論文#3)に報告した。

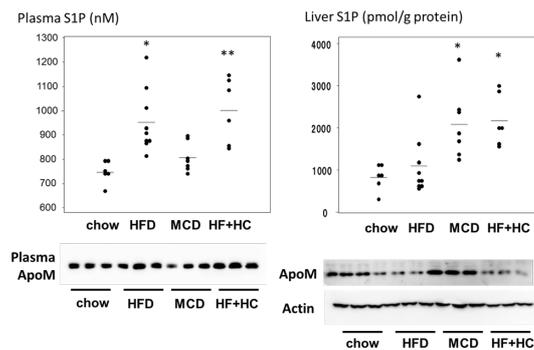


図7 肝障害によるApoM, S1Pの変動

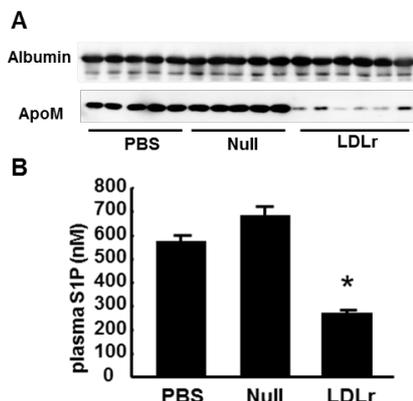


図8 LDL受容体過剰発現は血漿ApoM, S1P

を低下させる

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3件)

#1. Kurano M, Hara M, Tsuneyama K, Sakoda H, Shimizu T, Tsukamoto K, Ikeda H, Yatomi Y. Induction of insulin secretion by apolipoprotein M, a carrier for sphingosine 1-phosphate. *Biochim Biophys Acta.* 2014, 1841(9):1217-26.

#2. Nojiri T, Kurano M, Tokuhara Y, Ohkubo S, Hara M, Ikeda H, Tsukamoto K, Yatomi Y. Modulation of sphingosine 1-phosphate and apolipoprotein M levels in the plasma, liver and kidneys in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Diabetes Investig.* 2014 Nov;5(6):639-48.

#3. Kurano M, Tsukamoto K, Hara M, Ohkawa R, Ikeda H, Yatomi Y. LDL Receptor and ApoE are Involved in the Clearance of ApoM-associated Sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem.* 2015 Jan 23;290(4):2477-88.

[学会発表](計6件)

#1. 蔵野 信, 原 眞純, 常山 幸一, 迫田 秀之, 野尻 卓宏, 塚本 和久, 矢富 裕. アポ蛋白 M-スフィンゴシン 1-リン酸経路を介した, 糖代謝の恒常性維持における肝臓の役割. 第57回日本糖尿病学会学術集会. 2014. 5. 24. 大阪

#2. 蔵野 信. 「リゾリン脂質と肝臓」 第54回日本臨床化学学会学術集会 シンポジウム 東京 2014.9.6

#3. 蔵野 信, 大川 龍之介, 池田 均, 矢富 裕. アポ蛋白 M-スフィンゴシン 1-リン酸含有リポ蛋白代謝におけるLDL受容体、アポ蛋白 E の役割. 第53回臨床化学学会学術集会 2013. 8.30 徳島

#4. 蔵野 信, 大川 龍之介, 小野 佳一, 池田 均, 矢富 裕. 血漿スフィンゴシン 1-リン酸がアポ蛋白 B 含有リポ蛋白と正の相関を示す機序についての解明. 第60回日本臨床検査医学会学術集会 2013. 11.2. 神戸

#5. 野尻 卓宏, 蔵野 信, 大久保 滋夫, 池田 均, 矢富 裕. streptozotocin誘発型糖尿病マウスにおける sphingosine 1-phosphate および apolipoprotein M の変動. 第54回日本臨床化学学会学術集会 東京 2014.9.6

#6. 野尻 卓宏, 蔵野 信, 大川 龍之介, 大久

保 滋夫, 横田 浩充, 矢富 裕 糖代謝関連
因子のアポ蛋白 M、スフィンゴシン 1-リン酸
代謝に対する影響 第 60 回日本臨床検査医学
会学術集会 2013. 11.3. 神戸

〔図書〕(計 1 件)

#1. 蔵野 信、大川 龍之介、池田 均、矢
富 裕 スフィンゴシン 1-リン酸-基礎から
臨床へ 臨床化学 Vol.42 No.3 p242-249

〔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

東京大学・医学部附属病院・特任助教

蔵野 信 (KURANO, MAKOTO)

研究者番号：60621745

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：