

学内グラント 報告書

平成21-22年度 学内グラント終了時報告書

視床下部インスリン／レプチン抵抗性の分子機構と摂食・糖代謝調節

研究代表者 小野 啓(大学病院 内分泌・糖尿病内科)

研究分担者 住田 崇*, 鈴木 徳子*

緒言

インスリンが血糖値を低下させるしくみは、いまだに完全には解明されていない。現在のところ、インスリンは肝臓・骨格筋・脂肪組織の3組織に作用して血糖値を下げると考えられている。骨格筋と脂肪組織では、インスリン受容体の活性化から始まり、IRS(インスリン受容体基質)、PI3キナーゼ、Aktの活性化を介して、最終的に糖輸送担体であるGLUT4の細胞膜表面への出現を起し、グルコースの細胞内への取り込みをさせる。一方、肝臓では、インスリンが作用すると、糖新生とグリコーゲン分解が抑制され、解糖とグリコーゲン合成が促進されることにより、その総和としての肝臓からの糖産生が抑制される。すなわち、肝臓と筋肉・脂肪とは、インスリンの作用機序は全く異なっている。近年、2型糖尿病においては肝臓においてインスリンの作用が低下している、つまり肝臓のインスリン抵抗性がその病態生理の中核を成しているという考えがあり、肝臓におけるインスリン作用のしくみ、および肝臓のインスリン抵抗性の起きるしくみの解明が非常に重要視されている。

インスリンが肝臓の糖産生を抑制するしくみには、2種類が知られており、直接作用と間接作用とよばれている。直接作用とは、インスリンが肝臓のインスリン受容体に結合してこれを活性化し、IRS1、PI3キナーゼ、Aktの活性化を起す。このAktが転写因子Foxo1を非活性化する。Foxo1は糖新生の律速酵素であるPEPCKおよびG6Paseの転写促進因子であるため、Foxo1が非活性化されるとこれらの酵素の転写が起こらなくなり、糖新生が起こらなくなる。また、Aktはグリコーゲン合成酵素の阻害因子であるGSK3を非活性化することにより、グリコーゲン合成を促進する。これらがインスリンの肝臓における直接作用とよばれている。一方、イン

スリンは視床下部の摂食中枢である弓状核に作用し、迷走神経を介して肝臓の糖新生を抑制するといふ、神経を介した経路があることが、最近Rossettiのグループ(Nature 2005;434:1026-31)、Bruningのグループ(Science 2000;289:2122-5)を中心として報告されている。これをインスリンの間接作用と呼ぶ。インスリンが視床下部弓状核に作用すると、インスリン受容体、IRS、PI3キナーゼの活性化を介してATP依存性カリウムチャンネルを活性化し、肝臓への迷走神経遠心路を興奮させる。この入力肝臓に達すると、肝臓のIL6/STAT3経路が活性化し、糖新生の律速酵素であるPEPCK、G6Paseの転写を抑制することにより、糖新生を抑制するという経路である。つまり、インスリンは肝臓に直接作用するしくみ、および視床下部を介して間接的に肝臓に作用するしくみの2通りで、肝臓の糖産生を抑制しているのである。

それでは、2型糖尿病の病態生理の中核を成していると言われている、肝臓のインスリン抵抗性というのは、直接作用と間接作用、どちらが障害されているのであろうか。当研究代表者は、この点を明らかにすべく、2005年4月より4年間、米国アルバートアインシュタイン医科大学のRossettiの研究室に留学し、研究を行った。その結果、インスリン抵抗性モデルである短期高脂肪食ラットにおいて、視床下部のインスリン情報伝達の中でIRS1の部分に障害が生じており、この原因として視床下部のS6キナーゼという酵素が活性化されているからであることを示した。つまり、視床下部S6キナーゼの活性化によりインスリンの視床下部における作用が障害をうけ、このことにより肝臓のインスリン抵抗性が生じていることが証明できた。この結果を、原著論文(J Clin Invest 2008;118:2959-68)に報告し、また総説(Cell Cycle 2009;8(18):2885)および(小野啓. 視床下部S6キナーゼと糖代謝・摂食調節. 分子糖尿病学の進歩 2009. 2009. p59-65)を執筆している。

短期間の高脂肪食負荷ラットにおける肝臓のイン

*大学病院 内分泌・糖尿病内科

スリン抵抗性が、視床下部のS6キナーゼの活性化によって起きていることが分かったところで、次なる疑問として、より長期間の過食の場合、あるいは糖尿病にすでになっている場合、肝臓のインスリン抵抗性が起きるしくみが果たして同じであろうか、という疑問が生じてくる。マウスの長期高脂肪食モデルの視床下部において、IRS1の脱リン酸化酵素でありIRS1を非活性化するPTP-1Bが増加しているという報告(J Biol Chem 2008;283:14230-41)、および、S6キナーゼと同様のしくみでIRS1を非活性化するIKK β の活性が上昇しているという報告(Cell 2008;135:61-73)が他のグループから成されている。これらの報告は、その結果として摂食調節が障害され、過食が起こる、という表現型を示したものであり、PTP-1BまたはIKK β のために肝臓のインスリン抵抗性が起こる、ということ示されていない。しかしながら、これらの分子が視床下部のインスリン抵抗性を引き起こし、インスリンの間接作用を障害することによって肝臓のインスリン抵抗性を引き起こしていることは十分考えられることである。すなわち、過食の長短や、インスリン抵抗性を起こす原因によって、肝臓のインスリン抵抗性のしくみが異なっている可能性がある。例えば、レプチン情報伝達異常のために肥満と重症の糖尿病を来すdb/dbマウスにおいては、肝臓自体のインスリン情報伝達がIRSのレベルから障害を受けているという複数の報告があり、肝臓へのインスリンの直接作用が障害されていることが肝臓のインスリン抵抗性の病態機序であることが予想される。

材料と方法

【実験A】

インスリン抵抗性/糖尿病モデルマウスおよびその

コントロールとして(a) C57BL6マウス(b) aに1日の高脂肪食を負荷したマウス(c) aに3日の高脂肪食を負荷したマウス(d) aに1週間の高脂肪食を負荷したマウス(e) aに11週間の高脂肪食を負荷したマウス(f) db/dbマウス(高度の糖尿病モデル)の6種類のマウスを用意し、各種組織において、シグナル伝達分子やその上流の因子が、モデルマウスでどのように変化しているかを、リアルタイムPCRおよびウエスタンブロットを用いて調べた。

【実験B】

Sprague-Dawleyラットの視床下部内側基底部(MBH)に、優位阻害型PTEN(My-C124S-PTEN)もしくはコントロールのLacZを発現するアデノウイルスベクターを注入し、注入後2週間における体重増加と摂食量を、通常食または高脂肪食を与えて測定した。また、同様の修飾を施したラットにインスリン負荷試験を行い、糖代謝への影響を調べた。

結果

【実験A】

興味深いことに、代表的なAMPKのリン酸化酵素であるLKB1の発現が、肝臓において、1日の高脂肪食とdb/dbマウスにおいて有意に低下(mRNAレベルにおいて $41 \pm 2\%$)していることが分かった(図1)。さらに、db/dbマウスにインスリン治療を施して血糖を改善すると、LKB1の発現レベルが回復することも分かった(図1)。そこで、ベクターを用いて肝臓にLKB1を強制過剰発現したときに、糖代謝がどのようになるかを調べたところ、db/dbマウスにおいてLKB1をレスキューすることにより、空腹時血糖(コントロール 218 ± 18 mg/dL 対 LKB1 158 ± 17 , $p < 0.05$)および糖

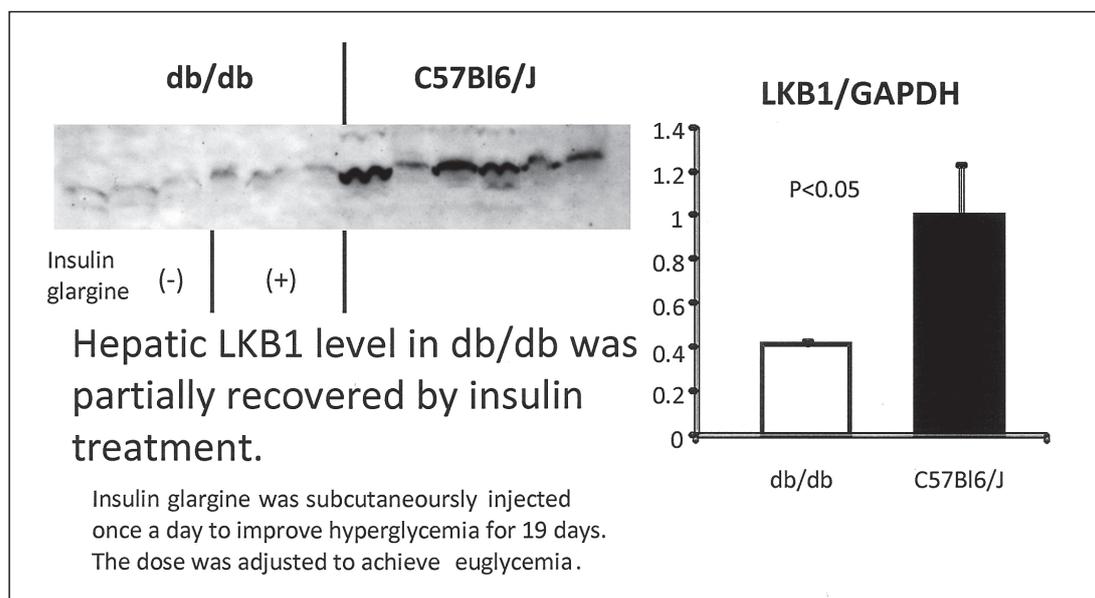


図 1. Hepatic LKB1 expression was lower in db/db mouse.

負荷15分後血糖(442 ± 13 mg/dL 対 355 ± 24)が改善することが示された(図2)。この時、Aktおよびその下流のGSK3のリン酸化はLKB1の強制発現において上昇していた(図3)。以上のことから、肝臓のLKB1の減少がインスリン抵抗性に関与しており、これを補うことで糖尿病が改善しうることが示唆された。

【実験B】

優位阻害型PTENをMBHに発現させたラットは、通常食を与えた場合には摂食量が減少していた(2.1 ± 0.8 g vs. 8.3 ± 3.2, p < 0.05, 術後1日; 図4)。興味深いことに、10%ラードを通常食に添加した高脂肪食を与えた場合には摂食量の減少は認められなかった(図5)。しかし、インスリン負荷試験においては、高

脂肪食投与下においても優位阻害型PTEN発現ラットでインスリン感受性が高い傾向が認められた(インスリン投与15分後のPTEN抑制ラットの血糖69 ± 5 mg/dL, コントロールは80 ± 6, p = 0.07; 図6)。

考 察

肝臓においてはLKB1のダウンレギュレーションがインスリン抵抗性に関与している可能性が示唆された。また、視床下部においては、PTENとこれによって代謝されるPIP3が摂食の調節と、糖代謝の調節とを独立したしくみで制御している可能性が示唆された。

今後、視床下部のシグナルと肝臓のシグナルとの関連において、これらの分子がどのように関与しているのかを解明するべく、さらに実験を続けている。

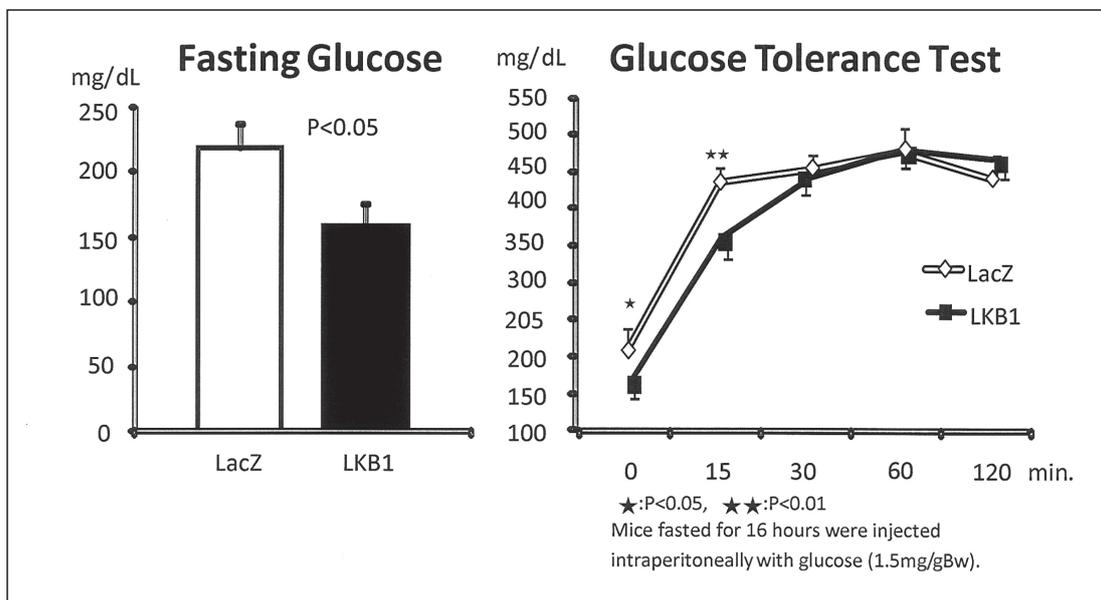


図 2. Hyperglycemia in db/db mouse was ameliorated by adenovirus-induced hepatic LKB1 expression.

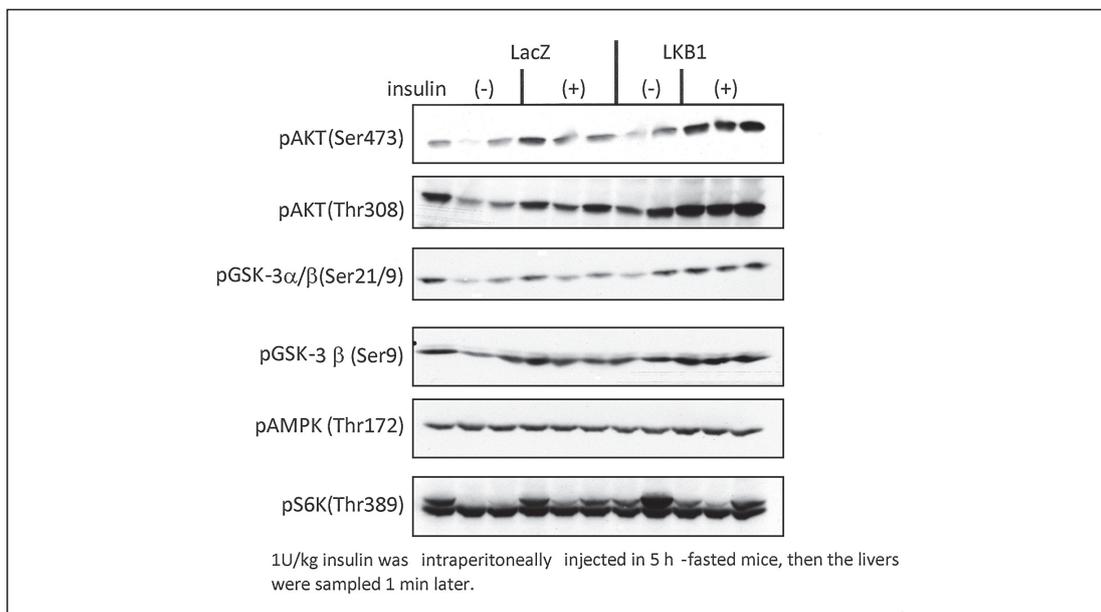


図 3. Insulin and AMPK signaling after insulin bolus injection.

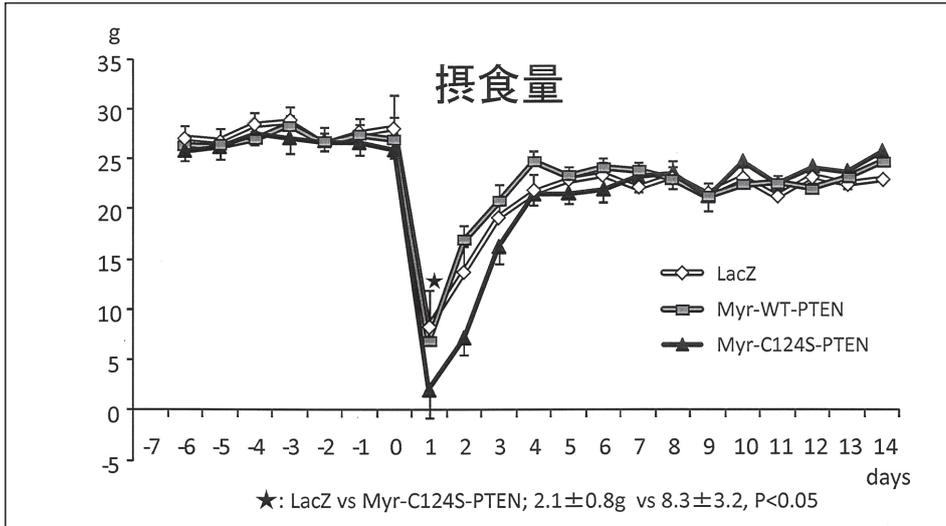


図 4. MBHのPTENを急性に抑制すると摂食量が減少した。

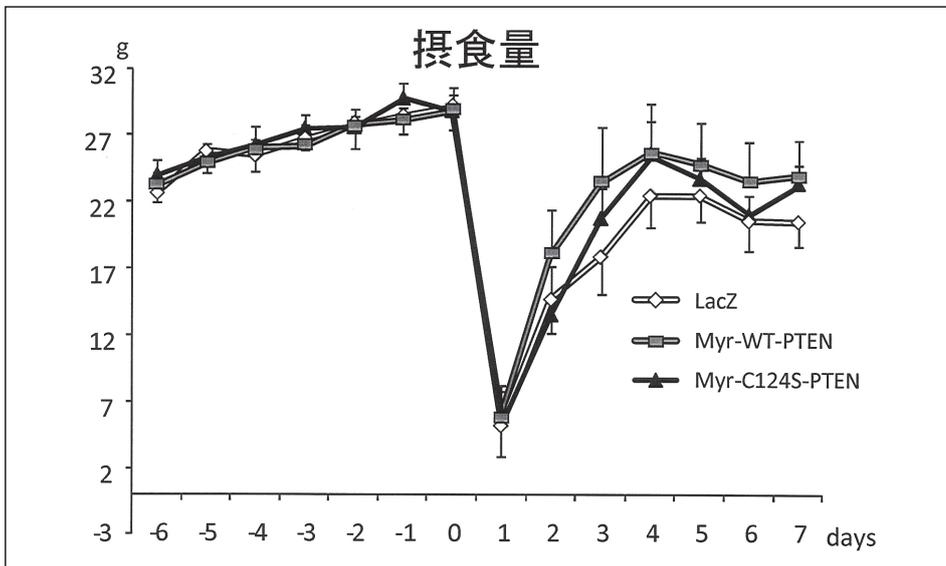


図 5. 高脂肪食負荷下ではPTENによる摂食への影響は消失した。

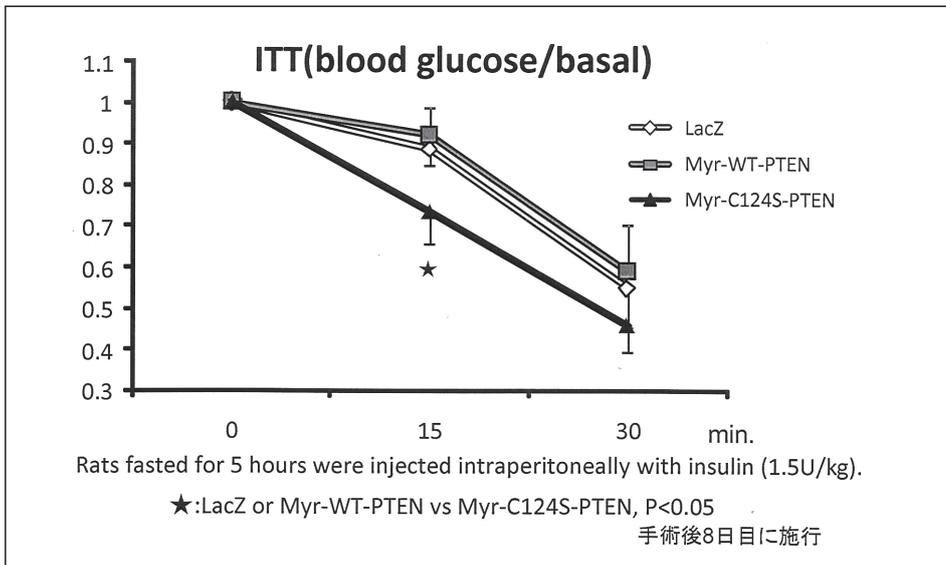


図 6. 高脂肪食負荷でもMBHのPTENを急性に抑制するとインスリン感受性が増大した。

研究成果リスト

学会発表

- 1) 住田崇, 小野啓, 他. 肝S6キナーゼの活性化はインスリンの肝糖産生抑制効果を傷害する. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010年5月, 岡山
- 2) Takashi Sumita, Hiraku Ono, et al. Role of hepatic LKB1 in the pathophysiology of diabetes in obese diabetic mouse. FASEB summer research conference, AMPK: Central Regulatory System in Metabolism & Growth, 2010年10月, 滋賀
- 3) Takashi Sumita, Hiraku Ono, et al. Acute suppression of hypothalamic PTEN reduces food intake and improves insulin resistance. 40th Keystone Symposia; Type 2 Diabetes, Insulin Resistance and Metabolism Dysfunction. Keystone, Colorado USA
- 4) 住田 崇, 小野 啓, 他. 視床下部PTENの摂食およびインスリン感受性調節における役割. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011年5月, 札幌